



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**



**ESCOLA D'ENGINYERIA  
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA**

**Estratègies d'operació per a la producció  
de lipases de *Rhizopus oryzae* amb el fenotip  
Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* mitjançant substrats  
mixtes**

**Memòria de Tesi Doctoral**

**Programa de doctorat: Biotecnologia**

CAROL ARNAU JIMENEZ

Bellaterra, Abril 2011



FRANCISCO VALERO BARRANCO, catedràtic del Departament d'Enginyeria Química i CARLES CASAS ALVERO, professor titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que l'enginyera química Carol Arnau Jimenez ha dut a terme, sota la nostra direcció, als laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball amb el títol “Estratègies d'operació per a la producció de lipases de *Rhizopus oryzae* amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* mitjançant substrats mixtes” que es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant aquesta certificació.

Bellaterra, Abril 2011

Dr. Francisco Valero Barranco

*In Memoriam* del  
Dr. Carles Casas Alvero



## AGRAÏMENTS

Feia temps que esperava el moment de poder agrair a totes les persones que han format per d'aquest treball, tant directa com indirectament...

En primer lloc vull agrair la tasca dels meus directors, Paco Valero i Carles Cases, per la vostra dedicació, aportació científica, rigor i confiança en mi al llarg de tot aquest treball. A més a més, Paco et vull agrair que sempre hagi estat al peu del canó, disponible, accessible i proper, inclús en moments complicats!! També et vull agrair la teva humanitat i finalment dir-te que has estat un gran director. Moltes gràcies!!

Carles, m'hagués agradat molt poder-te dedicar aquestes paraules en persona, però malauradament la vida no ho ha permès. Et vull agrair tot el que vas fer perquè aquest treball es tirés endavant i per haver aportat una visió biològica que en situacions, per mi ha estat realment complicat! Carles, Moltes gràcies allà on estiguis, has estat un gran director.

Vull agrair també a la Universitat Autònoma de Barcelona per haver-me ofert una beca PIF per a poder dur a terme aquest treball.

A continuació vull agrair a tots els companys del grup de lipases, tant als més experts: Dolors, Jose Luis, Pau i Joan, com als antics; Ramon Ramon (RRR merci per tota l'ajuda, suport i amistat!!), Resina (merci per respondre sempre amablement a totes les meves preguntes biològiques ;) ), Oriol (per iniciar-me en el món de les fermentacions), Manuel, Anna U (merci pels consells bios i gels), Anna S ( merci per l'ajuda amb la PPF), Kristin (gracias por haberme acompañado todos estos años lipasera y haberlo hecho mas divertido!), com als nous; Marina (siempre nos quedará el “*esto se hace en tres días!!*“ Gracias por la ayuda con los geles, westerns i zimogramas), Joel (ara indubtablement seràs el papi!!), Marc, Jose, Núria (això ho acabem aquí, ni una hora més! Jijiji Merci per tota l'ajuda amb el HAC), Elena (encara no sé quina nota tinc *personal shoper!!* Jijiji), Xavi, i també vull agrair la feina feta pels tècnics del nostre grup: Noelia, JuanMa i Margot!

També vull agrair als estudiants Cindie, l'Asly i al Tomás per tota l'ajuda amb les fermentacions i els moments divertits! Merci beaucoup! Thank you! Moltes gràcies!

També vull agrair l'excel·lent feina feta per les secretàries del departament d'Enginyeria Química; la Montse (como van esas PAC's!! ;) ), la Nati, la Miriam i la Rosa, per tota l'ajuda amb el tema *papeleos, contractes, comandes, etc!!*

Gràcies als tècnics del departament: Manuel, Rosi i Pili.

During my research stay in the Dr. Weuster-Botz working group at the Department of Biotechnology at the Technical University of Munich, I want to thank many people who gave me support and help: specially to Gabi, Andrea, Steffi and Michael, and the rest of the group.

De la col·laboració realitzada amb el grup del Dr. Cerdà de la Universitat de Palma de Mallorca vull agrair en especial al Burkhard en alemany i Pau en català ;) per l'eficiència amb el treball realitzat.

A la Mireia Baeza per ajudar-me a veure amb més claredat l'interessant món dels SIA. Moltes gràcies per les correccions i disponibilitat.

A tots els companys de despatx: JuamMi (merci per tot guapo!!), Jordi (merci per la col·laboració amb el curs ICE i les bones estones al despatx), Sergio, Engracia, Cristina, Núria, Carles, i especialment al Toranet (recordaré sempre “*Goteborg el dia que vaig marcar tres gols fiu fiu fiu fiu*” merci per les estones al despatx més divertides i la *Sing Star* ‘s session and ABBA! Estem on-fire!!!) i al Vilaplain (merci pel teu toc de “*serietat*” quan he hagut de treballar dur, m’encanta!! ;) Merci per haver-me obert els ulls a la bona musica!! ;) i per ser un dels millors clients de METERSAKER! (la veritat és que si, Marcel vaig manipular el sorteig!! És broma!).

També vull agrair a tots els companys del departament amb els que hem compartit caps de setmana a la Molina, Sa cova, calçotades, Karts, festetes, SAF, sopars Hα (es veritat ens hem copiat!!), etc: Jero, Laura, Carlota, Marc, Edu, Roger, Bartro, Carlos, Mar, Edu I, Javi, Juliana, Sergio i Belen’s.

Als companys del departament d’enginyeria química, docència i dinars de tupper a la ETSE.

Jero, quina peneta, que el nostre camí estudiantil comú sembla que se’ns acaba (... o no?)!! Moltes gràcies per haver compartit amb mi tota aquesta experiència, tant la carrera com el doctorat! Merci per l’amistat i les bones estones que em passat tots aquests anys! ;)

Nuria guapiss!! com et vaig trobar a faltar quan vas marxar!! Merci per la teva amistat i aquest any si que arribem a temps a l’operació B!!

A la Laura, al Farré, a la Cris, al Martini, a l’Isma, al Xavi i al Salva merci a tots per la vostra amistat i paciència amb les meves fermentacions i per totes les ocasions que he dit no per les *Pichia* ‘s!! Això s’ha acabat!!! ;)

Als meus pares, germans, nebots, cunyats, i a la meva família “*política*” per ajudar-me en aquesta aventura de per un doctorat i recolzar-me en les meves decisions!! Moltes gràcies a tots!!

En especial vull agrair-te Uri que sempre hagi estat al meu costat, que sempre m’hagi recolzat i que sempre m’hagi animat al llarg de tots aquests anys!! Moltes gràcies guapuuu!! I acabada aquesta etapa espero començar-ne una de diferent amb noves experiències que tinc moltes ganes de compartir amb tu! T’estimo!

I finalment a tota la gent que ha col·laborat d’alguna forma en aquest treball, a tots vosaltres: MOLTES GRÀCIES!!

Carol.

# INDEX





# ÍNDIX

<b>0</b>	<b>RESUM</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants.</b>	<b>9</b>
1.1.1	Sistemes procariotes.	9
1.1.2	Sistemes eucariotes.	10
1.1.2.1	Els llevats.	10
1.1.2.2	Els fongs filamentosos.	11
1.1.2.3	El sistema cèl·lules d'insecte-baculovirus.	12
1.1.2.4	Sistemes d'expressió basats en cèl·lules de mamífer.	13
1.1.2.5	Animals transgènics.	13
1.1.2.6	Sistemes d'expressió basats en plantes transgèniques.	14
<b>1.2</b>	<b><i>Pichia pastoris</i> com a sistema d'expressió.</b>	<b>15</b>
1.2.1	Avantatges al treballar amb <i>Pichia pastoris</i> .	16
1.2.2	El metabolisme del metanol en <i>P. pastoris</i> .	18
1.2.3	Promotors.	19
<b>1.3</b>	<b>Producció de proteïnes heteròlogues en <i>P. pastoris</i>.</b>	<b>22</b>
1.3.1	El medi i les condicions de cultiu.	22
1.3.2	L'estratègia de cultiu en semicontinu.	24
1.3.2.1	Fase discontinua amb glicerol.	24
1.3.2.2	Fase de transició.	25
1.3.2.3	Fase d'inducció.	26
<b>1.4</b>	<b>El monitoratge del cultiu.</b>	<b>27</b>
<b>1.5</b>	<b>Lipases.</b>	<b>31</b>
1.5.1	Definició.	31
1.5.2	Obtenció.	32
1.5.3	La lipasa nativa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL).	33
<b>1.6</b>	<b>Revisió de l'obtenció heteròloga de ROL.</b>	<b>34</b>
<b>1.7</b>	<b>Bibliografia.</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>OBJECTIU</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Solucions.</b>	<b>53</b>
3.1.1	Solució 500 X Biotina (0.02%).	53
3.1.2	Solució antiescumejant.	53

3.1.3	Solució tampó Tris-HCl 400 mM CaCl <sub>2</sub> a pH 7.25 (Anàlisi activitat lipolítica) .....	53
3.1.4	Solució de sals traça.....	54
<b>3.2</b>	<b>Medis de cultiu.....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Medi per a cultius en flascons agitats .....	54
3.2.2	Medi per a cultius en <i>discontinu</i> .....	55
3.2.3	Medi per a cultius en <i>semicontinu</i> .....	55
3.2.4	Composició substrats a la fase d'inducció.....	56
<b>3.3</b>	<b>Soques de treball .....</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Tècniques microbiològiques .....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Preparació plaques de Petri (YPD) .....	57
3.4.2	Determinació de la concentració de biomassa total.....	58
3.4.2.1	Anàlisi del pes sec.....	58
<b>3.5</b>	<b>Mètodes analítics .....</b>	<b>58</b>
3.5.1	Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular.....	58
3.5.2	Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular .....	60
3.5.3	Quantificació de proteïnes.....	61
3.5.4	Activitat proteàsica .....	61
3.5.5	SDS- PAGE .....	61
3.5.6	Western Blot.....	61
3.5.7	Zimograma.....	62
3.5.8	Determinació de la concentració de glicerol i sorbitol.....	62
3.5.9	Determinació de la concentració de metanol .....	63
3.5.10	Determinació de la concentració d'amoni.....	63
3.5.11	Determinació de la concentració de metilamina.....	64
<b>3.6</b>	<b>Equipament emprat.....</b>	<b>65</b>
3.6.1	Fermentador .....	66
3.6.2	Sistema d'addició de substrats.....	66
3.6.3	Control i anàlisi de la concentració de metanol en línia .....	67
3.6.4	Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol).....	69
3.6.5	Equipament informàtic .....	70
<b>3.7</b>	<b>Cultius amb <i>Pichia pastoris</i> .....</b>	<b>71</b>
3.7.1	Cultius en flascons agitats.....	71
3.7.2	Cultius en fermentador d'un litre .....	71
3.7.3	Cultiu en fermentador de 5 litres.....	72
<b>3.8</b>	<b>Càlculs.....</b>	<b>74</b>
3.8.1	Càlcul de la $\mu$ , $q_s$ i $q_p$ .....	74

3.8.1.1	Cultiu en discontinu .....	75
3.8.1.2	Cultiu en semicontinu .....	75
3.8.2	Càlculs dels valors mitjans.....	76
3.8.3	Càlcul dels rendiments .....	77
3.8.3.1	Rendiment biomassa / substrat ( $Y_{X/S}$ ).....	77
3.8.3.2	Rendiment producte / biomassa ( $Y_{P/X}$ ).....	78
3.8.4	Càlcul de les productivitats .....	78
<b>3.9</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>79</b>
<b>4</b>	<b><i>Optimització del sistema de producció de ROL en Pichia pastoris utilitzant un sistema de 48 milibioreactors agitats treballant en paral·lel</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>87</b>
<b>4.3</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Bioreactors a escala mil·lilitre .....	99
4.3.2	Control en paral·lel del procés.....	102
4.3.3	Monitoratge de l'oxigen dissolt i el pH.....	103
4.3.4	Medis de cultiu utilitzats en els cultius .....	103
<b>4.4</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>105</b>
4.4.1	Calibrat dels sensors químics per les mesures de pH.....	105
4.4.2	Experiments emprant estratègies en discontinu i semicontinu mitjançant l'ús del promotor induïble AOX .....	106
4.4.3	Cultius realitzats en discontinu amb el promotor induïble FLD .....	115
4.4.4	Cultius realitzats amb el promotor GAP .....	117
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>121</b>
<b>4.6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>122</b>
<b>5</b>	<b><i>Producció de ROL recombinant amb P. pastoris mitjançant la utilització de sorbitol i metanol com a cosubstrats en semicontinu</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>5.1</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>127</b>
<b>5.2</b>	<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>129</b>
<b>5.3</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>133</b>
5.3.1	Cultiu en discontinu usant com a únic substrat el metanol.....	133
5.3.2	Estratègia per realitzar els cultius en semicontinu utilitzant el fenotip Mut <sup>s</sup> .....	137
5.3.3	Estratègia d'addició del metanol.....	139
5.3.4	Evolució dels diferents cultius realitzats.....	141

5.3.5	Comparació dels resultats obtinguts en les diferents condicions .....	146
5.3.6	Comparació amb resultats obtinguts utilitzant el metanol com a única font de carboni.....	152
5.3.7	Monitoratge del sorbitol en cultius amb <i>P. pastoris</i> aplicant la tècnica d'anàlisi d'injecció seqüencial (SIA).....	156
<b>5.4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>165</b>
<b>5.5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b><i>Efecte del glicerol com a substrat mixte sobre la producció de ROL en P. pastoris en cultius en semicontinu</i>.....</b>	<b>173</b>
<b>6.1</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>173</b>
<b>6.2</b>	<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>175</b>
<b>6.3</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>179</b>
6.3.1	Comparació dels cultius realitzats sota les mateixes condicions utilitzant el glicerol o sorbitol com a cosubstrat .....	179
6.3.2	Cultius en semicontinu utilitzant el glicerol com a cosubstrat sota diferents velocitats específiques de creixement.....	185
<b>6.4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>197</b>
<b>6.5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>199</b>
<b>7</b>	<b><i>Canvi d'escala per a la producció de lipasa de ROL en el sistema d'expressió de Pichia pastoris mitjançant l'ús de substrats mixtes</i>.....</b>	<b>205</b>
<b>7.1</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>205</b>
<b>7.2</b>	<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>207</b>
<b>7.3</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>215</b>
7.3.1	Preparació del inòcul .....	215
7.3.2	Condicions i estratègia del procés de cultiu.....	215
<b>7.4</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>219</b>
7.4.1	Comparació geomètrica dels reactors Biostat B i Biostat UD50 .....	219
7.4.2	Avaluació del $k_{La}$ del reactor Biostat UD50.....	221
7.4.3	Resultats del cultiu a escala pilot (50l) .....	223
7.4.4	Comparació dels principals paràmetres entre el cultiu realitzat a la planta pilot i el realitzat a escala laboratori .....	227
7.4.5	Distribució vertical del metanol en el reactor UD50.....	231
7.4.6	Resultats del cultiu a escala pilot addicionant el metanol mitjançant una cànula a la meitat del reactor .....	235

7.4.7	Comparació dels resultats obtinguts entre els cultius realitzats a la PPF i a escala laboratori (BB5L) .....	238
<b>7.5</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>243</b>
<b>7.6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>245</b>
<b>8</b>	<b><i>Efecte de la coexpressió del gen HAC1 de Pichia pastoris sobre la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup></i>.....</b>	<b>251</b>
<b>8.1</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>251</b>
<b>8.2</b>	<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>253</b>
<b>8.3</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>261</b>
8.3.1	Efecte de la coexpressió del gen <i>HAC1</i> induïble per a la producció de ROL utilitzant una estratègia de substrats mixtes: comparació de soques amb coexpressió i sense. ....	261
8.3.2	Efecte de la coexpressió del gen <i>HAC 1</i> induïble utilitzant el metanol com a única font de carboni per a la producció de ROL: comparació de soques amb coexpressió i sense. ....	268
8.3.3	Efecte de la coexpressió constitutiva del gen <i>HAC1</i> sota el promotor GAP utilitzant una estratègia de substrats mixtes .....	272
<b>8.4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>279</b>
<b>8.5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>281</b>
<b>9</b>	<b><i>Conclusions generals i propostes de futur</i>.....</b>	<b>285</b>
<b>10</b>	<b><i>Abreviatures</i>.....</b>	<b>289</b>
<b>11</b>	<b><i>Annexes</i>.....</b>	<b>293</b>
<b>11.1</b>	<b>Annex 1: Calibrat sonda metanol.....</b>	<b>293</b>
<b>11.2</b>	<b>Annex 2: Calibrat de l'activitat lipolítica .....</b>	<b>294</b>



# RESUM





## 0 RESUM

En aquest treball s'ha optimitzat el procés de producció de lipases de *Rhizopus oryzae* amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* mitjançant la utilització de substrats mixtes establint les condicions de procés més favorables.

Inicialment es planteja comprovar la funcionalitat d'un sistema de 48 milibioreactors en paral·lel de 12 ml de volum de treball a la Universitat Tècnica de Munich sota la direcció del Dr. Weuster-Botz, amb l'objectiu d'optimitzar el procés de selecció de l'estratègia de cultiu més efectiva, així com la selecció dels clons i sistemes d'expressió òptims, un dels punts febles del sistema *P. pastoris* a l'utilitzar el metanol com a substrat inductor. Quan els cultius es realitzen utilitzant els fenotips Mut<sup>s</sup> i Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* sota els promotors induïbles AOX i FLD s'obté com a resultat un creixement deficient. La principal problemàtica recau en el sistema de condensació que presenten els milibioreactors a la part superior, no sent efectiva i permeten una pèrdua de metanol corresponent a  $0.5 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Es descarta la utilització del sistema de 48 milibioreactors per soques induïbles. D'altra banda, s'utilitza el promotor GAP (constituti) utilitzant glicerol i glucosa com a substrats, els que permeten obtenir resultats satisfactoris de creixement del microorganisme, oferint valors similars als que prèviament s'obtenien a escales superiors de treball (5 l), demostrant la viabilitat del sistema de 48 milibioreactors pel seguiment de bioprocessos que utilitzin aquest tipus de substrats.

Posteriorment davant les avantatges que presenta la utilització de substrats mixtes en soques de fenotip Mut<sup>s</sup> sota el promotor AOX, s'utilitzen sorbitol o glicerol juntament amb el metanol per observar l'efecte del cosubstrat sobre la producció de ROL. A l'utilitzar el sorbitol es realitzen diversos experiments per optimitzar el procés de producció. Es realitzen cultius en semicontinu mantenint la concentració de metanol fixada en 0.5, 2 i 4 g l<sup>-1</sup> mitjançant un algoritme de control predictiu combinat amb un controlador PI, i es manté la  $\mu$  fixada en 0.01 i 0.02 h<sup>-1</sup> mitjançant una addició exponencial preprogramada d'una solució concentrada de sorbitol. S'observa que la concentració de metanol residual en el medi de cultiu és el paràmetre clau per l'optimització de la producció de ROL, trobant-se els valors màxims quan aquesta es troba fixada a 2 g l<sup>-1</sup>. A l'augmentar o bé disminuir aquesta concentració, la

productivitat disminueix considerablement (2 vegades). D'altra banda, s'observa que l'efecte de la  $\mu$  és molt inferior, obtenint valors de productivitat similars, independentment de la  $\mu$  utilitzada. També s'analitzen les velocitats específiques de creixement, consum de substrats i producció. Finalment en col·laboració amb el grup liderat del Dr. Cerdà de la Universitat de Palma de Mallorca, es valida un sistema SIA per a l'anàlisi de sorbitol en línia.

El sorbitol es considera un cosubstrat excel·lent que permet augmentar la productivitat 1.35 vegades en comparació a la utilització del metanol com a única font de carboni. D'altra banda, l'inconvenient del sorbitol és la baixa  $\mu_{\max}$  que presenta en comparació amb les velocitats que es podrien registrar, treballant amb altres fonts de carboni, fent així que el procés de producció sigui més efectiu. Es decideix utilitzar com a cosubstrat el glicerol, que tot i que en situacions actua com a repressor del promotor AOX, permetrà treballar a  $\mu$  5 vegades superiors. Es realitzen cultius en semicontinu mantenint la concentració de metanol fixada en 2 g l<sup>-1</sup> (valor optimitzat prèviament). A l'escollir la  $\mu$  de treball es consideren les aportacions realitzades per altres autors, recomanant treballar a valors de  $\mu$  al voltant de  $\mu_{\max}/2$ , per així evitar la repressió del promotor AOX. En aquest treball es realitzen diferents cultius on la  $\mu$  es manté fixada en 0.1, 0.05 i 0.02 h<sup>-1</sup> mitjançant l'addició exponencial preprogramada de glicerol concentrat. Al treballar a la  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup> tant el valor d'activitat lipolítica màxima com la productivitat volumètrica obtinguda són similars als valors registrats a l'utilitzar el sorbitol. Tanmateix, la productivitat específica i el  $Y_{P/X}$  són gairebé 2 vegades inferiors. D'altra banda, a l'augmentar la  $\mu$  la productivitat disminueix de forma severa. Es conclou que per evitar la repressió del promotor AOX la relació establerta entre les velocitats específiques de creixement ha de ser inferior a 6 ( $\mu_{\text{Gli}} \mu_{\text{Met}}^{-1}$ ), degut que al superar aquest valor s'observa una clara repressió del promotor AOX.

Arribats a aquest punt es decideix realitzar el canvi d'escala de les condicions més productives: utilització del sorbitol com a cosubstrat mantenint la concentració de metanol fixada a 2 g l<sup>-1</sup>. Amb col·laboració amb la PPF del departament d'Enginyeria Química de la UAB, es realitzen varis cultius utilitzant el reactor UD50 (B. Braun, Melsungen, Alemanya) a un volum inicial de treball corresponent a 30 l. Després d'estimar un favorable canvi d'escala (obtenció de  $k_{La}$  superior, similitud geomètrica, etc) es reproduïen les condicions obtingudes al millor dels processos. Durant aquest

primer cultiu s'obtenen valors de productivitat volumètrica i específica 2.8 vegades inferiors als obtinguts prèviament en 5 l. Aquesta disminució pot ser deguda a les característiques del sistema que poden dificultar la mescla d'aquest, juntament amb les característiques del substrat inductor, el metanol. Es realitzen experiments per comprovar la mescla del metanol al reactor UD50 mostrant un gradient màxim de  $0.5 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ l}^{-1}$  a les diferents alçades. Davant d'aquest resultat es realitza una modificació al sistema d'addició del metanol, addicionant-lo de forma submergida a mitja alçada del reactor (prèviament aquesta es realitzava pel capçal del reactor). Després d'aquesta modificació els resultats milloren en un 48%, en comparació a l'addició pel capçal del reactor. Tot i així serà necessari continuar investigant en aquesta línia, ja que la productivitat encara és un 38 % inferior en comparació a treballar a 5 l.

Finalment es treballa amb una nova construcció genètica del fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* que inclou la coexpressió del gen *HAC1*. Es treballa amb 2 soques, la primera coexpressa el gen *HAC1* de forma induïble sota el promotor AOX i la segona ho realitza de forma constitutiva sota el promotor GAP. Quan s'utilitza la soca que coexpressa el gen de forma induïble, es troben millores significatives (augment de 1.5 vegades de la productivitat) al realitzar una estratègia amb substrats mixtes (sorbitol i metanol) a les condicions prèviament optimitzades. Quan s'utilitza la soca que coexpressa el gen de forma constitutiva, no es presenten millores en el procés de producció. Tanmateix a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni els resultats obtinguts no presenten millores, i inclús són inferiors als trobats prèviament a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni.



Capítol 1:

# INTRODUCCIÓ



# 1 INTRODUCCIÓ

## 1.1 Sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants.

L'expressió gènica és el procés pel qual tots els organismes procariotes o eucariotes transformen la informació codificada als àcids nucleics en proteïnes necessàries pel seu desenvolupament i funcionament. Actualment la demanda de noves proteïnes recombinants està augmentat de forma considerable, així com la seva producció en el menor temps possible. La indústria demanda proteïnes actives per l'ús biotecnològic, de forma de cada vegada es produeixen més molècules o proteïnes en sistemes biològics. Els sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants estan basats en sistemes procariotes o bé eucariotes, presentant cadascun d'ells avantatges i inconvenients. Alhora d'escollir el sistema d'expressió més convenient serà necessari considerar diferents aspectes que inclouen tant la productivitat del sistema com la bioactivitat de la proteïna d'interès, així com les característiques físico-químiques. Alhora serà important valorar aspectes econòmics i de bioseguretat del sistema (Yin *et al.*, 2007).

### 1.1.1 Sistemes procariotes.

Dintre dels sistemes procariotes es troba l'organisme per excel·lència *Escherichia coli* la que ha estat àmpliament estudiada (apareixen 280060 entrades a *Pubmed* a finals del mes de febrer del 2011.) Aquesta bactèria presenta grans avantatges referent a l'elevada velocitat específica de creixement ( $\mu_{\max}=0.4 \text{ h}^{-1}$ ) i el relatiu baix cost dels seus cultius, però tanmateix presenta limitacions com la impossibilitat de realitzar modificacions post-translacionals (N- i O-glicosilacions, fosforilacions, formació de ponts disulfur). Aquestes modificacions són importants per les estructures terciàries i quaternàries de les proteïnes i, per tant, per a la seva activitat, estructura i estabilitat. També es poden presentar problemes de plegament de les proteïnes, degut a la manca de les xaperones adequades pel seu plegament. Una altra limitació important és l'optimització dels codons més adients per a l'expressió d'una determinada proteïna. No obstant això, s'estan desenvolupant diferents estratègies per corregir aquestes limitacions (Sahdev *et al.*, 2008). Tot i així *E. coli* ha estat utilitzat com a sistema d'expressió per a moltes proteïnes en escala de grams litre<sup>-1</sup> (Georgiou i Segatori, 2005).

La utilització del sistema procariota *Bacillus subtilis* permet evitar algunes de les limitacions que presenta l'organisme anterior. Aquest és un microorganisme reconegut com a generalment segur (GRAS: Generally Regarded As Safe) i presenta alguns d'aquests avantatges: no produeix lipopolisacàrids al medi, subproducte típic d'*E. coli* que pot produir desordres degeneratius en humans i animals, és de fàcil manipulació genètica i pot ser fàcilment transformat, pot secretar proteïnes plegades al medi, el que facilita en gran part el procés de purificació, i pot créixer fins a altes densitats cel·lulars en medis senzills i barats.

Tot i així encara presenta limitacions comunes amb *E. coli* com serien la generació de gran quantitat de proteases que provocaran la degradació de les proteïnes expressades, la inestabilitat dels plàsmids i en ocasions la impossibilitat d'expressar algunes proteïnes o de fer-ho a nivells acceptables.

A banda d'aquests sistemes procariotes, n'han aparegut d'altres d'alternatius en els últims anys com ara *Pseudomonas fluorescens* i *Ralstonia eutropha*. Tot i que poden ser prometedores alternatives a *E. coli* encara hi ha poc coneixement sobre aquests sistemes (Georgiou i Segatori, 2005).

## **1.1.2 Sistemes eucariotes.**

### **1.1.2.1 Els llevats.**

Els llevats com a sistema d'expressió comparteixen amb els sistemes procariotes la simplicitat de cultiu, les velocitats relativament altes de creixement i uns baixos costos, amb la disponibilitat d'un sistema que permet que proteïnes expressades intracel·lularment siguin secretades al medi. Al ser sistemes eucariotes tenen la possibilitat de produir proteïnes solubles que hagin experimentat les modificacions post-translacionals necessàries per la seva funcionalitat. Els llevats són cèl·lules més fàcilment manipulables genèticament que les cèl·lules animals i es poden cultivar fins a altes densitats cel·lulars. Altres avantatges serien la presència de promotors forts que permeten conduir l'expressió de la proteïna d'interès i facilitar l'obtenció de grans



quantitats de productes. No obstant això aquests sistemes difereixen de les cèl·lules animals en la forma en què N- i O- glicosil·len les proteïnes d'interès. Malgrat tot, s'estan produint avanços per humanitzar aquestes glicosil·lacions (Hamilton *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

*Saccharomyces cerevisiae* és un organisme eucariota unicel·lular conegut com el llevat del pa o de la cervesa. Ha estat modificat genèticament per expressar diferents gens heteròlegs durant gairebé 25 anys (91923 entrades a *Pubmed* a finals del mes de febrer 2011). Degut a la seva solvència econòmica i al complir totes les regulacions de bioseguretat per aplicacions a humans, s'ha utilitzat per la producció de medicines com la vacuna de l'hepatitis B (DiMiceli *et al.*, 2006). Tanmateix aquest organisme presenta algunes limitacions ja que acostuma a hiperglicosilar les proteïnes i les N-glicosil·lacions acaben en un enllaç  $\alpha 1,3$ -manosa potencialment al·lèrgic.

Existeixen sistemes alternatius per evitar aquests desavantatges. Actualment *Pichia pastoris* (3208 entrades a *Pubmed* a finals del mes de febrer 2011) (Cregg *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2006) i *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) (9235 entrades a *Pubmed* a finals del mes de febrer 2011) (Giga-Hama i Kumagai, 1999; Kumar i Singh, 2004) es presenten com a sistemes habituals d'expressió de proteïnes recombinants, així com una alternativa a *S. cerevisiae*.

Tanmateix existeixen altres llevats anomenats “no convencionals” que també s'han establert com a sistemes d'expressió, com per exemple: *Arxula adenivorans* (Terentiev *et al.*, 2004), *Hansenula polymorpha* (Kulkarni *et al.*, 2006), *Kluyveromyces lactis* (Donnini *et al.*, 2004; van Ooyen *et al.*, 2006), *Yarrowia lipolytica* (Madzak *et al.*, 2004). Tots ells presenten menys de 1000 entrades a *Pubmed* a finals de febrer del 2011. Boer *et al.*, (2007) fan una bona descripció d'aquests sistemes i dels seus avantatges i aplicacions.

### 1.1.2.2 Els fongs filamentosos.

Els fongs filamentosos també han estat explotats com a sistema per a la producció de proteïnes recombinants (van Hartingsveldt *et al.*, 1987; Sims *et al.*, 2005). Tenen la capacitat de secretar grans quantitats de proteïnes extracel·lulars. *Aspergillus niger* i

*Aspergillus oryzae* han estat utilitzats en el camp de l'alimentació des de fa temps i estan reconeguts com a segurs, tanmateix la producció de proteïnes heteròlogues es troba limitada. El sistema de secreció dels fongs filamentosos és poc conegut en comparació amb el dels llevats. Tot i així, a la bibliografia es poden trobar bones revisions d'aquest tòpic (Punt *et al.*, 2002).

### 1.1.2.3 El sistema cèl·lules d'insecte-baculovirus.

Aquest sistema d'expressió es basa en la infecció per baculovirus de cèl·lules d'insecte. La infecció per baculovirus està limitada als insectes, per tant no són perillosos ni per humans ni per bestiar o aviram. Cal insertar el gen d'interès en un vector de transfecció que s'incorpora al genoma del baculovirus. S'han expressat molts gens heteròlegs amb aquest sistema (Lecina *et al.*, 2006; Douris *et al.*, 2006).

Un dels majors avantatges d'aquest sistema d'expressió és la capacitat de processament de les proteïnes expressades, i està considerat com una bona eina per a l'expressió de glicoproteïnes. Els productes expressats tenen una conformació semblant a la forma nativa, els processos post-translacionals es donen correctament, no hi ha contaminació per endotoxines i la proteïna d'interès és transportada correctament.

Aquest sistema presenta algunes deficiències, així com que cada síntesi requereix la infecció d'una nova cèl·lula i això fa que aquest sistema sigui inferior en capacitat de cultiu en discontinu als sistemes d'expressió procariotes o basats en llevats.

Així mateix les cèl·lules d'insecte i les de mamífer difereixen en els seus patrons de glicosil·lació, en la longitud dels oligosacàrids i en el contingut de manoses (Kost i Condreay, 1999; Marheineke *et al.*, 1998), per això la bioactivitat de les proteïnes produïdes poden diferir de les natives. Malgrat aquests inconvenients, s'han transformat cèl·lules d'insecte amb gens constitutius de mamífer i es poden expressar glicoproteïnes humanitzades en línies cel·lulars d'insectes.

#### 1.1.2.4 Sistemes d'expressió basats en cèl·lules de mamífer.

Aquests sistemes d'expressió presenten alguns avantatges respecte als anteriors sistemes ja que organitzen la síntesi, el processament i la secreció de la proteïna glicosilada particularment de les proteïnes eucariotes. Per tant la qualitat i l'eficàcia d'aquests sistemes per a l'expressió de proteïnes eucariotes és superior a la d'altres sistemes d'expressió (Jain i Kumar, 2008). Tanmateix, una de les principals limitacions són els baixos nivells d'expressió (Houdebine 2009).

El sistema pot utilitzar-se per l'expressió transitòria basats en cèl·lules COS (COS TES), o bé per a l'expressió estable basats en cèl·lules d'ovari de hàmmster xinés (CHO SES) (Edwards i Aruffo, 1993; Davis *et al.*, 1990; Hanai *et al.*, 2004).

Malgrat que els elevats costos, la complexitat de la tecnologia i la potencial contaminació amb virus animals poden ser factors limitants per la utilització dels sistemes basats en cèl·lules de mamífers, aquests han estat àmpliament utilitzats per expressar moltes proteïnes heteròlogues incloent proteïnes estructurals de virus i pèptids bioactius per anàlisis específics (Gasser i Mattanovich, 2007; Jain i Kumar, 2008).

#### 1.1.2.5 Animals transgènics.

Els animals transgènics es presenten com a un bon sistema de producció de proteïnes farmacèutiques recombinats, ja que tot i que sigui menys costos produir-les a partir de microorganismes com bacteris o llevats, aquest no realitzen varies de les modificacions post-traduccionals que són requerides pel correcte funcionament *in-vivo* de les proteïnes d'interès. Per aquest motiu, és importat arribar a produir altes concentracions de proteïnes recombinats en animals que funcionin com a bioreactors (Melo *et al.*, 2007). Aquestes proteïnes d'alt valor biomèdic es poden produir en varis fluids biològics com la sang, l'orina, el líquid seminal, saliva i la llet en funció del promotor que s'utilitzi a la construcció (Dyck *et al.*, 2003). Per exemple s'ha obtingut eritropoietina humana recombinat (Zbikowska *et al.*, 2002a) i  $\alpha$ -1-antitripsina humana (Zbikowska *et al.*, 2002b) en orina de ratolí mitjançant el promotor de la uromodulina.

No obstant degut a la gran quantitat de volum que es pot obtenir i la facilitat de la seva recollida, la llet és utilitzada com a vehicle d'expressió de proteïnes de valor biomèdic en animals transgènics. La glàndula mamària pot expressar més de 2 g de proteïna recombinat per litre de llet (van Berkel *et al.*, 2002). Per exemple de la llet d'ovelles transgèniques es va obtenir l'expressió de l'alfa antitripsina (Wright *et al.*, 1991) i de factors de coagulació VIII i IX (Niemann *et al.*, 1999), alhora la llet de conill transgènics s'està utilitzant per a la producció de calcitonina (McKee *et al.*, 1998). Un dels principals inconvenients és la dificultat de purificar la proteïna d'interès d'altres de procedència animal. També cal prendre especial precaució en comprovar que patògens animals actius en humans no es troben presents en les preparacions proteiques.

A nivell industrial la principal desavantatge en l'ús dels animals transgènics és el temps requerit per assegurar nivells de producció, els quals es troben entre els 3 i 32 mesos depenent de l'espècie, temps en el que es requereix el manteniment de l'animal sense obtenir beneficis (Yin *et al.*, 2007). Alhora la complexa tasca de generar un animal transgènic i els estrictes controls als que han de ser sotmesos els productes obtinguts mitjançant animals transgènics fan que aquesta tecnologia encara no es trobi implementada a nivell industrial.

#### **1.1.2.6 Sistemes d'expressió basats en plantes transgèniques.**

Les plantes han estat modificades genèticament per produir valuoses proteïnes i han demostrat el seu enorme valor com a bioreactors per generar anticossos monoclonals per malalties humanes i animals (Ko i Koprowski, 2005).

Les plantes ofereixen diversos avantatges: no poden contenir patògens animals, tenen un baix cost de producció i són sistemes fàcilment escalables. Les proteïnes poden acumular-se en diferents parts de la planta (fulles, llavors), que poden ser emmagatzemades fàcilment. Pel contrari també presenten algunes limitacions: glicosilen les proteïnes de manera diferent a com ho fan els animals, la purificació de les proteïnes a partir de plantes pot ser una tasca laboriosa i tenen baixes eficiències de transformació i expressió (Yin *et al.*, 2007).

Utilitzar plantes per produir proteïnes no desperta controvèrsies ètiques però sí preocupació per la virtual disseminació de les proteïnes si les plantes són cultivades a camp obert. Les plantes haurien de ser estèrils per evitar disseminar el gen transgènic. Es podrien cultivar les plantes en hivernacles però així s'encaririen els costos de producció, que són un dels principals atractius d'aquest sistema. Es proposen diferents alternatives per solucionar aquests inconvenients, entre elles cultivar cèl·lules de plantes (Houdebine 2009).

El potencial comercial de les plantes transgèniques no es pot obviar i s'estan desenvolupant alguns sistemes en animals model com a vacunes “sense agulla” per prevenir malalties en bestiar i humans (Giudice i Campbell, 2006).

## **1.2 *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió**

Al final de la dècada dels 60, davant dels excedents de l'indústria petroquímica, es planteja la utilització del metanol com a font de carboni pel creixement de microorganismes. Els microorganismes capaços de créixer amb aquest substrat són bacteris i llevats on els segons destaquen per un contingut superior en vitamines, lípids, àcids nucleics i aminoàcids.

Aquests llevats són anomenats metil·lotròfics per la seva capacitat d'emprar el metanol com a única font de carboni. L'estudi d'aquests es desenvolupa per poder realitzar la comercialització dels mateixos en forma de proteïna unicel·lular (SCP - single cell protein) (Cereghino i Cregg, 2000) i per poder estudiar els compartiments específics de degradació d'aquests substrats, els peroxisomes (Faber *et al.*, 1995).

Un d'aquests llevats és *P. pastoris*, que és el protagonista del treball experimental presentat en aquest treball.

Posteriorment, amb la crisi del petroli dels 70, disminueix l'interès per la producció de biomassa amb *P. pastoris* degut a l'encariment del metanol, no fent viable econòmicament el bioproces. Però els estudis realitzats durant la dècada dels 80, per la

Phillips Petroleum Co. en col·laboració amb el Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates Inc (SIBIA, La Jolla, CA, USA) aconsegueixen aïllar els gens i promotors d'aquest llevat, permetent plantejar protocols de manipulació genètica per l'expressió i producció de proteïnes heteròlogues, fent de *P. pastoris* un sistema alternatiu d'expressió als clàssics de *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir d'aquests avanços sorgeix l'interès per part de Invitrogen Co. per aquest sistema d'expressió i aconsegueix una llicència per poder explotar-lo comercialment fins a data d'avui (Cereghino i Cregg, 2000). Fins a l'actualitat, emprant aquest sistema biològic, s'han expressat més de 500 proteïnes (Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

*P. pastoris* combina la capacitat de créixer en un medi mínim a elevades densitats cel·lulars amb la secreció de la proteïna produïda al medi de cultiu, simplificant de forma important el seu procés de purificació. A més a més, permet realitzar algunes de les modificacions post-traduccionals dels organismes eucariotes com són el plegament de proteïnes, processat proteolític, la glicosil·lació i la formació de ponts de disulfur. Dins de totes aquestes capacitats cal destacar la que potser fa de *P. pastoris* un microorganisme hoste diferenciat, l'existència d'un promotor fortament regulat, el corresponent al gen de l'alcoholoxidasa, *PAOX1* (Cregg *et al.*, 2000)

### 1.2.1 Avantatges al treballar amb *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* ha esdevingut un dels sistemes més utilitzats per a l'expressió de proteïnes heteròlogues per diferents factors (Lin *et al.*, 2002), entre ells els més importants són:

- Com qualsevol llevat, *P. pastoris* és un microorganisme unicel·lular de fàcil manipulació i cultiu. La seva similitud amb *S. cerevisiae* fa que totes les tècniques de manipulació genètica desenvolupades per aquest últim siguin fàcilment aplicables a *P. pastoris*.

- No produeix fenòmens de hiperglicosilació de les proteïnes heteròlogues com *S. cerevisiae*, disminuint les respostes immunogèniques de les proteïnes d'organismes superiors.
- En tractar-se d'un microorganisme eucariota li aporta un gran nombre d'avantatges ja que es capaç de realitzar modificacions post-traduccionals (plegament, enllaços disulfur, glicosil·lació, etc...) a les proteïnes expressades.
- S'aconsegueixen grans nivells d'expressió de proteïnes hostes intra i extracel·lulars en medi sintètic i barat.
- L'existència del promotor de l'expressió del gen d'AOX de fàcil manipulació, simple, eficient i fortament regulat per la presència de metanol al medi. Aquesta és sens dubte una de les principals propietats que justifiquen el seu èxit.
- La gran preferència de *P. pastoris* per un creixement respiratori facilita enormement que s'aconsegueixi arribar elevades densitats cel·lulars en comparació amb els llevats fermentatius.
- Aquest sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues té força èxit ja que es caracteritza per ser un mètode ràpid, fàcil i barat (Invitrogen, 2006) comparat amb els sistemes d'expressió d'eucariotes superiors, com la utilització de cèl·lules d'insectes o mamífers.
- *P. pastoris* no excreta pràcticament proteïnes natives al medi extracel·lular, facilitant d'aquesta forma la recuperació i posterior procés de purificació d'aquelles proteïnes produïdes (quan la seva expressió és extracel·lular).
- En tractar-se d'un microorganisme haploide, qualsevol modificació genètica es manifesta fenotípicament a generacions posteriors.

### 1.2.2 El metabolisme del metanol en *P. pastoris*

*P. pastoris* presenta la particularitat de ser un llevat metilotròfic, que és capaç de créixer en aquest substrat com a única font de carboni. No és l'únic gènere de llevats metilotròfics, també ho són *Hansenula*, *Candida* i *Torulopsis* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Tots comparteixen un mecanisme d'assimilació del metanol amb uns enzims únics.

D'aquest punt parteix la base conceptual de la utilització de *P. pastoris* com a sistema d'expressió: alguns enzims necessaris per al metabolisme del metanol només són presents a nivells substancials quan les cèl·lules creixen en metanol (Egli *et al.*, 1980; Veenhuis *et al.*, 1983).

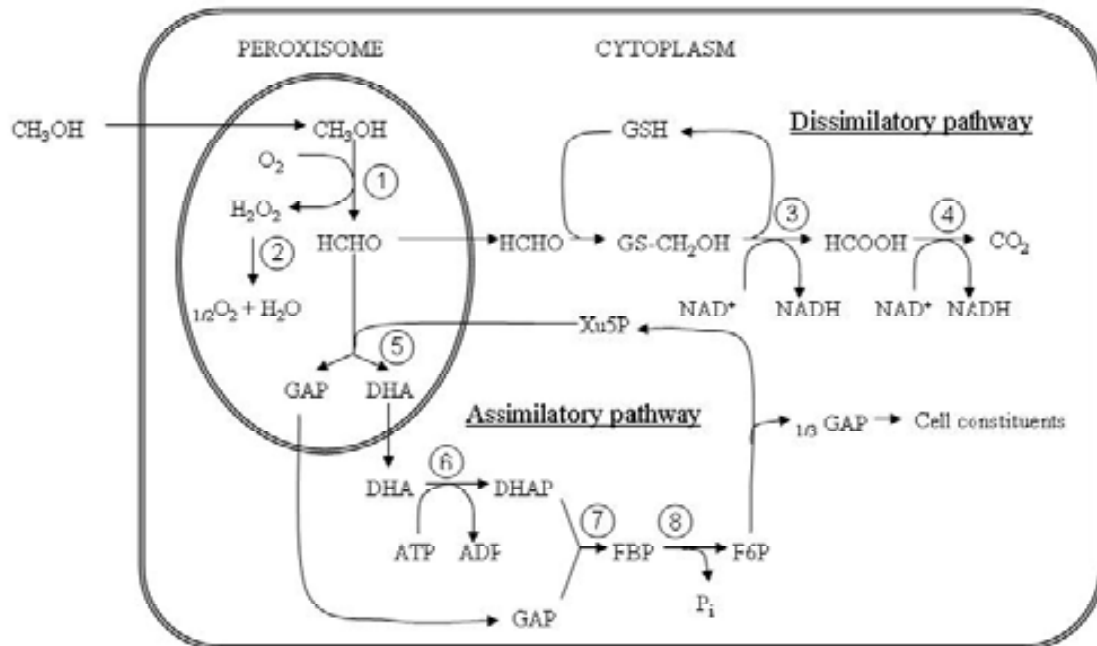
L'enzim alcohol oxidasa (AOX) catalitza el primer pas en l'assimilació del metanol, la seva oxidació a formaldehid i peròxid d'hidrogen (Harder i Veenhuis, 1989). L'AOX, així com els altres dos enzims involucrats en els primers passos de l'assimilació del metanol (la catalasa i la dihidroxiacetona sintasa -DHAS-), estan continguts als peroxisomes.

El peròxid d'hidrogen generat en el primer pas del metabolisme del metanol es degrada a aigua i oxigen amb ajuda de la catalasa.

Pel que fa al formaldehid, part abandona el peroxisoma i s'oxida a format i diòxid de carboni al citosol per donar energia, i una altra part s'assimila a constituents cel·lulars. Aquesta última via comença amb la condensació del formaldehid al peroxisoma catalitzada per la DHAS. Els productes d'aquesta condensació: el gliceraldehid 3-fosfat i la dihidroxiacetona abandonen el peroxisoma i entren a la via citoplasmàtica de regeneració de la xilulosa 5-monofosfat. Per cada tres cicles es genera una molècula neta de gliceraldehid 3-fosfat.

L'AOX i la DHAS estan presents en quantitats considerables durant el creixement cel·lular en metanol però no són detectables en presència d'altres fonts de carboni. En cèl·lules induïdes amb metanol l'AOX pot arribar a representar el 30% de la proteïna total soluble de la cèl·lula.





**Figura 1.1:** Representació esquemàtica del metabolisme del metanol en llevats metilotròfics. En el peroxisoma: 1: AOX; 2: catalasa; 5:DHAS. Al citoplasma: 3:formaldehyd deshidrogenasa; 4: format deshidrogenasa; 6: dihidroxiacetona quinasa; 7: fructosa 1,6-bifosfat aldolasa; 8: fructosa 1,6-bifosfat fosfatasa. Font: Cereghino i Cregg (2000).

### 1.2.3 Promotors

L'alcohol oxidasa és el primer enzim responsable de l'assimilació del metanol i té com a funció la reacció enzimàtica d'oxidació del metanol a formaldehid (Harder i Veenhuis, 1989). *P. pastoris* té dos gens de l'alcohol oxidasa que codifiquen la producció d'aquest enzim. El primer és el gen de l'alcohol oxidasa 1 (*AOX1*), responsable del 90% de l'enzim produït per la cèl·lula, i el segon, el gen de l'alcohol oxidasa 2 (*AOX2*) el responsable de la resta. Hi ha tres tipus de fenotips de *P. pastoris* dependent del grau d'assimilació del metanol. La primera és la salvatge o també anomenada fenotip  $\text{Mut}^+$  (**M**ethanol **u**tilitzation **p**lus) i la resta depenen del grau de deleció dels gens descrits:  $\text{Mut}^s$  (**M**ethanol **u**tilitzation **s**low) per deleció del gen *AOX1* i  $\text{Mut}^-$  (**M**ethanol **u**tilitzation **m**inus) per deleció d'ambdós gens. El promotor que regula la síntesis del gen *AOX1* (*pAOX1*) s'utilitza per controlar l'expressió de proteïnes recombinants, ja que és un promotor molt fort i altament regulat.

Tot i que una gran varietat de proteïnes s'han produït de forma satisfactòria utilitzant el promotor AOX, ens podem trobar en situacions en que l'ús d'aquest promotor no sigui el més adequat (Shen *et al.*, 1998). Per exemple, al treballar amb flascons agitats o microplaques, el substrat inductor (metanol) s'evapora ràpidament presentant dificultats en mantenir aquest substrat més o menys a una concentració coneguda, sent difícil realitzar càlculs relacionat amb el consum del substrat. Alhora el metabolisme del metanol requereix alts nivells d'oxigen (fenotip Mut<sup>+</sup>), i l'expressió de proteïnes recombinats es pot veure greument afectada per limitacions d'aquest. També cal tenir present la toxicitat i la inflamabilitat d'aquest substrat, dificultant la presència d'aquest als laboratoris. Valorant les limitacions que presenta l'ús d'aquest promotor, en els últims anys s'han realitzat esforços per tal d'evitar l'ús del metanol, i així desenvolupar promotors alternatius.

Una alternativa a la utilització del promotor AOX, és la utilització del promotor constitutiu gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (*pGAP*), el qual ha estat utilitzat prèviament per produir proteïnes recombinants en *P. pastoris* (Waterham *et al.*, 1997). Aquest promotor permet l'expressió constitutiva de proteïnes recombinants, i per tant no és necessari utilitzar el metanol com a agent inductor de l'activitat d'aquest. Tot i així, cal destacar que l'ús de promotors constitutius no són una bona opció per la sobreexpressió de proteïnes, presentant toxicitat cel·lular. Hohenblum *et al.*, (2004) i Menendez *et al.*, (2004), utilitzen el promotor constitutiu *pGAP* i obtenint nivells de proteïna recombinant, similars als obtinguts mitjançant la utilització del promotor AOX. El substrats utilitzats de forma més habitual per aquest promotor són la glucosa o el glicerol, tanmateix Döring *et al.*, (1998), obtenen activitats dues vegades superiors de rPEPT2 a l'utilitzar glucosa, en comparació amb la utilització de glicerol i metanol.

Una altra alternativa ha estat la derivada de l'aïllament del gen de la formaldehid deshidrogenasa i del seu promotor (*pFLD1*) (Shen *et al.*, 1998). Aquest promotor controla l'expressió del gen FLD1, el qual codifica un enzim involucrat en la degradació del formaldehid. Aquest enzim és clau en el metabolisme del metanol i també en el metabolisme de la metilamina quan aquesta és utilitzada com a font de nitrogen. Es creu que l'enzim FLD té un important paper alhora de protegir a les cèl·lules dels efectes tòxics del formaldehid, si aquest s'acumula. L'avantatge d'utilitzar aquest promotor, es

que la seva expressió pot estar induïda tan pel metanol com a font de carboni, o bé per la metilamina com a font de nitrogen. Per tant, mitjançant la utilització d'aquest promotor, el metanol pot ser substituït per alguna altre font de carboni com la glucosa o el glicerol (Shen *et al.*, 1998) o el sorbitol (Resina *et al.*, 2004). Resina *et al.*, (2004) han demostrat la importància d'aquest promotor obtenint produccions similars de lipasa del fong *Rhizopus oryzae* (ROL), emprant sorbitol i metilamina, com a fonts de carboni i de nitrogen respectivament, que les obtingudes amb el promotor AOX , emprant el metanol com a única font de carboni.

L'any 2003, es va descriure la utilització del promotor de ICL1 (isocitrate lyase) per la producció de dextranasa de *Penicillium minoluteum* (Menendez *et al.*, 2003), emprant com a agent inductor l'acetat.

La productivitat d'un sistema recombinant depèn de molts factors genètics i fisiològics com són: el codó emprat pel gen expressat, el nombre de còpies del gen, una transcripció eficient resultat de la utilització de promotors forts, el pèptid senyal de secreció, procés de producció en el reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi i finalment la secreció a l'exterior de la cèl·lula.

Per tant, la simple inserció del gen de la proteïna d'interès en un vector i la transformació a l'hoste no és una garantia de tenir un procés viable. El nivell d'expressió per una determinada proteïna d'interès esta condicionat per propietats inherents a la mateixa com son la seqüència d'aminoàcids, la seva estructura terciària i el lloc on s'expressa (Hohenblum *et al.*, 2004). Com aquests factors són independents, és difícil optimitzar el sistema per a obtenir la perfecta expressió.

Un cop salvades aquestes dificultats s'ha de plantejar la producció a escala industrial per poder fer rentable la comercialització del producte i en aquesta situació s'han de tenir en compte altres factors claus per obtenir una bona rendibilitat: optimització de les estratègies operacionals, la composició del medi, la definició de paràmetres claus de producció, etc.

### 1.3 Producció de proteïnes heteròlogues en *P. pastoris*.

#### 1.3.1 El medi i les condicions de cultiu.

La majoria de treballs publicats que utilitzen *P. pastoris* com a sistema d'expressió utilitzen medis de cultiu, tant complexos com definits, descrits als protocols d'Invitrogen (*Pichia* Fermentation Process Guidelines, Invitrogen Co., San Diego, CA). La producció de proteïnes heteròlogues a gran escala i la necessitat de poder millorar la reproductibilitat entre lots requereix la utilització de medis definits amb preferència respecte als medis complexos.

El medi basal definit per Invitrogen ha estat considerat com un medi estàndard per a *P. pastoris* i es complementa amb l'addició de sals traça i biotina (micronutrients), segons les especificacions d'Invitrogen. No obstant això, presenta diferents limitacions, entre elles; la precipitació de sals i l'elevada càrrega iònica.

Com a alternativa s'han proposat altres medis com l'especificat per D'Anjou i Daugulis (2000) o el descrit per Brady *et al.*, (2001) que pretenen superar les limitacions del medi basal estàndard d'Invitrogen. En ambdós casos la concentració de sals presents al medi és inferior al medi estàndard. En el cas de Brady *et al.*, (2001) la redefinició del medi va permetre millorar la viabilitat cel·lular i la posterior purificació de la proteïna d'interès.

Una altra paràmetre important dins la formulació dels medis és la font de nitrogen. Normalment aquest element s'addiciona a partir d'hidròxid d'amoni, que s'utilitza paral·lelament pel control del pH del medi, o bé s'addiciona des de l'inici del cultiu. Es poden utilitzar altres fonts de nitrogen com extracte de llevat o casaminoàcids però representen addicionar al medi un agent complexa que pot no ser desitjable per a la producció a gran escala. Cos *et al.*, (2006b), emprant el medi basal estàndard d'Invitrogen, han determinat la composició elemental del microorganisme produint ROL ( $\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.62}\text{N}_{0.18}\text{S}_{0.0006}$ ) per cultius en semicontinu, estimant que el nitrogen s'exhaureix a partir d'una concentració de biomassa d'uns  $50 \text{ g l}^{-1}$ . Si tenim en compte que la manca de nitrogen està directament relacionada amb l'augment de l'activitat

proteolítica i en conseqüència amb la degradació de la proteïna heteròloga extracel·lular, és convenient realitzar addicions puntuals de la font de nitrogen per garantir-ne el no exhauriment. Aquest suplement convé realitzar-lo amb cura perquè una concentració excessiva de nitrogen pot provocar la inhibició del creixement cel·lular (Yang *et al.*, 2004).

Referent al pH, el rang de treball habitual està entre les 5 i 6 unitats, tot i que *P. pastoris* pot créixer en un rang de pH entre 3 i 7 (Cregg *et al.*, 1993). Aquest rang no afecta significativament el creixement així que es pot utilitzar la variació del pH per millorar alguns inconvenients, com els fenòmens de proteòlisi del producte d'interès (Curvers *et al.*, 2001). Sovint s'escull un pH de 5.5 per minimitzar l'efecte de les proteases en el medi (Kobayashi *et al.*, 2000b) i afavorir l'estabilitat de la proteïna heteròloga.

Referent a la temperatura, les condicions òptimes per al creixement i la producció en *P. pastoris* són 30°C, per sobre dels 32°C l'expressió de les proteïnes s'atura i el creixement disminueix. Alguns autors proposen treballar a temperatures inferiors per afavorir la producció de proteïnes heteròlogues. Entre ells, Li *et al.*, (2001) treballant a 23°C han augmentat tres vegades la producció de la proteïna d'anticongelant de l'areng i Jahic *et al.*,(2003) han demostrat que implementant un perfil decreixent de temperatura aconseguen disminuir l'activitat de les proteases i la lisi cel·lular.

En cultius amb elevada densitat cel·lular, la formació d'escumes és una problemàtica habitual per les necessitats d'agitació i cabal d'aire associades als requeriments de transferència d'oxigen. Generalment, solucions de tipus mecànic són insuficients per poder eliminar les escumes pel que cal addicionar en el medi algun agent antiescumejant. S'ha generalitzat l'ús d'aquests en base a silicones però cal anar en compte amb les concentracions i tipus escollits per evitar efectes negatius en el creixement del llevat i en la transferència d'oxigen. Referent als requeriments d'oxigen, es treballa per sobre del 20% d'aire. Aquest percentatge s'aconsegueix mitjançant l'addició d'aire a partir d'un difusor, a un cabal entre 0.5-2 l min<sup>-1</sup>, i agitant el medi de cultiu en torn a les 900-1000 rpm. Aquests valors s'utilitzaran al treballar amb el fenotip Mut<sup>s</sup>, ja que si es treballa amb el fenotip Mut<sup>+</sup>, els requeriments d'oxigen es troben en valors superiors.

### 1.3.2 L'estratègia de cultiu en semicontinu

La productivitat d'un sistema depèn de molts factors genètics i fisiològics però també de l'optimització de l'estratègia de cultiu. *P. pastoris* pot créixer fins a elevades concentracions cel·lulars (fins a 150 g l<sup>-1</sup>) en bioreactor sota condicions controlades. El cultiu estàndard està definit per al promotor AOX com a element regulador de l'expressió i inclou diferents fases de cultiu encaminades a aconseguir elevades densitats cel·lulars i una bona inducció de l'expressió.

Davant les possibles estratègies de cultiu en semicontinu, existeix la possibilitat d'utilitzar el metanol com a única font de carboni, o bé la utilització de substrats mixtes utilitzant el metanol juntament amb una font de carboni alternativa. La utilització de substrats mixtes inicialment va ser recomanada a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, ja que presenta una velocitat específica de creixement molt inferior en metanol a la que presenta el fenotip Mut<sup>+</sup>, disminuint així la productivitat del procés (Thorpe *et al.*, 1999; Files *et al.*, 2001).

A la bibliografia es troben varis estudis que remarquen els avantatges que proporciona la utilització de substrats mixtes a nivell de producció utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> (Thorpe *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2005; Ramon *et al.*, 2007). Cal remarcar que l'estratègia de substrats mixtes s'utilitza també al treballar amb el fenotip Mut<sup>+</sup> ja que la presència d'un cosubstrat permetrà reduir el consum del metanol, presentant avantatges operacionals (Jungo *et al.*, 2007a; Jungo *et al.*, 2007b; Çelik *et al.*, 2009; Çalik *et al.*, 2009).

Per tant, en general l'estratègia de cultiu en semicontinu es du a terme en tres fases:

#### 1.3.2.1 Fase discontinua amb glicerol

L'objectiu d'aquesta fase és l'obtenció ràpida de la quantitat de biomassa, prèvia a la inducció, per assolir la màxima productivitat possible. La concentració de glicerol en aquesta fase és de 40 g l<sup>-1</sup> (concentracions superiors podrien inhibir el creixement; (Invitrogen Corporation CA USA 2006)). La velocitat específica màxima de creixement

de és de  $0.18 \text{ h}^{-1}$  (Cos *et al.*, 2005a) i el rendiment biomassa substrat ( $Y_{X/S}$ ) correspon a  $0.5 \text{ g}_X \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ , per tant generalment s'obté una concentració final de  $20 \text{ g l}^{-1}$  de biomassa al finalitzar aquesta fase. La finalització d'aquesta fase es pot observar per un augment sobtat del oxigen dissolt en el medi de cultiu.

### 1.3.2.2 Fase de transició

La fase de transició té com a objectiu l'assoliment final de la concentració de biomassa desitjada prèvia a la inducció i facilitar, el més ràpidament possible, el canvi metabòlic per començar la degradació del substrat inductor (Curvers *et al.*, 2001). S'han descrit moltes estratègies per aconseguir aquest propòsit usant el metanol com a únic substrat: alguns autors mantenen un cabal d'addició de glicerol fix (Chiruvolu *et al.*, 1998), altres mantenen un nivell de glicerol de zero per no tenir una inhibició sobre el promotor *AOXI* (Minning *et al.*, 2001) i altres realitzen una addició exponencial decreixent de glicerol per obtenir un nivell de creixement limitat (Kobayashi *et al.*, 2000a) (Kobayashi *et al.*, 2000b). Sigui quina sigui l'estratègia seguida, la majoria dels autors aturen aquesta fase quan s'assoleixen aproximadament els  $30 \text{ g l}^{-1}$  de biomassa. Tal i com s'ha indicat anteriorment, l'addició de glicerol es complementa amb un cabal de metanol per afavorir l'activació del promotor AOX. L'experiència del grup d'investigació ha permès constatar que una de les millors estratègies passa per fer una addició preprogramada de glicerol, en condicions de substrat limitant, simultàniament a una addició constant de metanol.

Al treballar mitjançant la utilització de substrats mixtes, també existeixen diferents formes de realitzar aquesta etapa. Ramon *et al.*, (2007) a l'utilitzar metanol i sorbitol com a substrats mixtes, un cop es finalitza el glicerol, introdueixen un pols de  $5 \text{ g l}^{-1}$  de metanol i  $10 \text{ g l}^{-1}$  de sorbitol. Jungo *et al.*, (2007a) a l'utilitzar glicerol com a cosubstrat, introdueixen al reactor una mescla de metanol i glicerol dues hores abans de la finalització del discontinu de glicerol mantenint la  $\mu$  en  $0.06 \text{ h}^{-1}$ . D'altra banda, a l'utilitzar el sorbitol com a cosubstrat al finalitzar-se la primera fase addicionen al reactor durant 1h un cabal  $20 \text{ g l}^{-1}$  glicerol al 50% ( $\text{g g}^{-1}$ ) Posteriorment addicionen un pols de metanol de  $1.5 \text{ g l}^{-1}$  i es disminueix en un període de 3h el cabal de glicerol de  $20$  a  $0 \text{ g l}^{-1}$  (Jungo *et al.*, 2007b). Çelik *et al.*, (2009) a l'utilitzar el sorbitol com a

cosubstrat, un cop es finalitza la primera fase en discontinu amb glicerol inicien una addició exponencial preprogramada d'una solució de glicerol al 50% a condicions limitants. Posteriorment addicionen un pols de metanol de 1.5 g l<sup>-1</sup>, i quan aquest es consumit inicien la fase d'inducció. Per tant, aquest autors, tot i incloure el sorbitol a la fase d'inducció, la transició es realitzada amb glicerol.

### 1.3.2.3 Fase d'inducció

Arribats a la fase d'inducció en la que es durà a terme la producció de la proteïna d'interès, la millor estratègia ha de ser ajustada en cada cas i és funció de la proteïna expressada. Cos *et al.*, (2006b) i Potvin *et al.*, (2010) en presenten una extensa revisió.

Una de les estratègies d'inducció més comuna utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> és aquella en què, una vegada transcorreguda la fase de transició, s'alimenta metanol com a única font de carboni. Si la densitat cel·lular és molt elevada, no es pot mantenir durant suficient temps el cultiu a una velocitat específica màxima de consum de substrat ja que la consigna d'oxigen dissolt no es pot mantenir per sobre del 30%, tal i com recomana Invitrogen, i consegüentment s'ha d'alimentar el metanol en condicions limitants. Aquesta estratègia es coneix comunament com a cultiu en semicontinu en condicions de metanol limitant.

El manual de fermentacions de l'empresa Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EEUU) recomana controlar l'addició de metanol si s'empra aquesta estratègia basant-se en el senyal d'oxigen dissolt del medi. Aquest esquema de control presenta però diferents inconvenients. Si la concentració de metanol assolís valors elevats i inhibitoris, la senyal d'oxigen dissolt augmentaria i la resposta del sistema seria la d'alimentar més substrat. Aquesta situació portaria a valors encara més alts de senyal i a acumulacions indesitjades de substrat.

Altres estratègies estan basades en el manteniment d'una concentració de metanol fixada al llarg de la fase d'inducció (Surribas 2008; Cos *et al.*, 2006b) o bé una alimentació exponencial de metanol per tal de mantenir una velocitat de creixement determinada en condicions limitants (Zhang *et al.*, 2000b).



D'altra banda també s'ha estudiat l'addició mixta de substrats. Majoritàriament s'aplica a soques Mut<sup>s</sup> malgrat que també hi ha alguns exemples on s'ha aplicat a fases d'inducció de soques Mut<sup>+</sup> (Jungo *et al.*, 2007a; Çelik *et al.*, 2009). Generalment es coalimenten metanol i glicerol, que és un substrat repressor del promotor *AOX1*. La naturalesa repressora del glicerol fa que s'hagin cercat altres substrats per coalimentar amb el metanol i evitar reprimir el promotor *AOX*. S'han reportat millores en la productivitat de cultius de soques Mut<sup>s</sup> amb alimentacions mixtes de sorbitol i metanol (Xie *et al.*, 2005; Ramon *et al.*, 2007).

Alhora a l'utilitzar el promotor induïble FLD durant la fase d'inducció generalment es realitzen addicions exponencials preprogramades. Resina *et al.*, (2005) troben les millors produccions de la proteïna heteròloga d'interès al realitzar una addició exponencial d'una solució que conté sorbitol i metilamina

A l'utilitzar el promotor constitutiu GAP generalment durant la fase d'inducció s'utilitza glucosa o glicerol, no tenint resultats conclouents sobre la millora d'un sobre l'altre. Zhang *et al.*, (2009) realitzen una extensa revisió sobre les estratègies de cultiu emprades utilitzat aquest promotor.

#### **1.4 El monitoratge del cultiu.**

La *Food and Drug Administration* (FDA) ha desenvolupat un programa adreçat a impulsar la Tecnologia Analítica del Procés (PAT). El PAT no només persegueix la implementació de nous instruments de mesura sinó que pretén ser un sistema de disseny, anàlisi i control de la producció a través de mesures en el temps de les variables crítiques per a la qualitat i el correcte desenvolupament del procés. No és només una anàlisi del procés de cultiu sinó que també va dirigit a la supervisió de les matèries primeres i als processos de purificació que influeixen en la qualitat final del producte. Així doncs, el que es pretén amb el PAT és guanyar coneixement sobre la influència de les diferents variables del procés sobre la qualitat del producte i utilitzar immediatament

aquest coneixement per supervisar i controlar el procés. La qualitat no pot ser només testada als productes sinó que ha de ser construïda durant el procés o ser-hi per disseny.

El primer objectiu d'aquesta iniciativa és la de definir la "Qualitat per al disseny", és a dir, utilitzar el coneixement generat del procés per localitzar les variables crítiques i poder redissenyar-lo de manera que es faci més robust a les inherents variabilitats i distorsions d'aquestes variables. Un exemple específic seria el de redissenyar la primera fase de creixement cel·lular per tal de poder assegurar que els nivells de biomassa finals abans de començar la inducció seran iguals, independentment de la variabilitat en la quantitat i qualitat de l'inòcul utilitzat (Gnoth *et al.*, 2007).

El segon objectiu que plantegen és el d'utilitzar tècniques matemàtiques per localitzar quines són les variables crítiques. Els enginyers de bioprocessos prefereixen models mecanístics amb diferents variables que cal mesurar per tal de validar el model proposat. La consecució d'aquestes dades analítiques constitueix sovint un dels principals colls d'ampolla i d'aquí la importància del PAT per afavorir la recerca en aquesta línia. Per exemple, encara no està disponible una lectura directa en línia de la biomassa aplicable de manera universal, tot i que han aparegut diverses tècniques potencials. No obstant això, que no es pugui mesurar aquesta variable no vol dir que no es pugui obtenir informació del bioprocés. El PAT proposa també utilitzar tècniques d'anàlisi multivariables per estimar les variables clau del procés a partir de la informació que actualment ja se'n genera analíticament.

Finalment, l'obtenció d'informació en línia d'un procés només té sentit si s'utilitza per corregir-lo en cas que s'observin desviacions del curs desitjat. Fins ara per assegurar la qualitat d'un producte s'intentava repetir exactament el mateix procés. Aquesta aproximació no tenia en compte la variabilitat que es pot donar durant l'operació, en les matèries primeres i els productes intermitjos i no constitueix una estratègia òptima des del punt de vista de control del procés (Känsäkoski *et al.*, 2006). A partir de les mesures en línia es poden prendre decisions i portar a terme correccions, en forma de control retroalimentat automàtic, per tal de reaccionar ràpidament i evitar que el procés surti d'especificacions. Un exemple seria controlar directament l'evolució de la biomassa mitjançant la modulació de l'alimentació (Gnoth *et al.*, 2007) enlloc de fer un control de la velocitat específica de creixement.

Malgrat les directrius del PAT, no s'han utilitzat de manera comuna mètodes de mesura sofisticats ja que la disponibilitat de sensors en línia per al monitoratge del processos és relativament baixa. Alguns requeriments específics dificulten el disseny de sensors aptes per als bioprocessos com serien: la necessitat de condicions asèptiques, la possibilitat de mesurar un elevat nombre d'analits, la capacitat d'analitzar concentracions baixes de l'analit en una matriu complexa, la necessitat que l'analitzador no contamine el procés ni que cap dels seus components vessi dintre el procés, la disponibilitat d'una bona freqüència d'anàlisi amb un retard curt. A banda hi ha altres restriccions addicionals que tampoc faciliten aquesta tasca (Clementschietsch i Bayer 2006): no han de presentar problemes d'embrutiment per precipitació de components del medi damunt l'element sensor i així aconseguir que puguin funcionar durant setmanes sense necessitat de recalibrar-se o que es puguin recalibrar *in situ*. Per aquest motiu, i en sintonia amb les directrius de la FDA, s'han de desenvolupar o aplicar sistemes analítics que permetin mesurar i controlar variables significatives en els bioprocessos.

Addicionalment, Känsäkoski *et al.*, (2006) fan un recull de les necessitats existents per a la millora del control i l'optimització dels bioprocessos que queden recollides en els següents punts:

- Modelitzar els bioprocessos i desenvolupar tècniques de simulació.
- Desenvolupar eines per modelitzar i/o analitzar els bioprocessos des d'un punt de vista de fluxos metabòlics.
- Incorporar noves mesures analítiques.
- Aplicar anàlisis *on-line* combinades amb modelització.
- Incorporar mesures analítiques *in situ*.
- Desenvolupar estratègies de control dinàmic.
- Desenvolupar eines informàtiques per al control supervisor.

Totes aquestes mesures no s'han d'aplicar només a la fase de producció sinó també durant la purificació, que tradicionalment constitueix la fase més crítica des del punt de vista econòmic i de qualitat del producte. No obstant això, la recerca actual, especialment en l'àmbit de la fisiologia cel·lular, ha evidenciat la connexió entre la fase

de producció i purificació. Així doncs treballar per augmentar el control i millorar la qualitat durant la producció ajudarà a reduir la variabilitat en la purificació i la posterior qualitat del producte final.

El PAT doncs va sorgir com una reacció per evidenciar les discrepàncies entre les possibilitats actuals de supervisió i control de processos i la seva aplicació en els processos industrials i es presenta com un marc de recerca i innovació molt important. En els cultius de *P. pastoris* el metanol esdevindrà doncs una variable clau a mesurar per poder garantir la reproductibilitat del procés.

Un del aspectes més importants en l'expressió amb el sistema de *P. pastoris* utilitzant el promotor AOX és la concentració de metanol. Monitorar i controlar aquesta variable és de gran importància degut al seu possible efecte inhibidor (Zhang *et al.*, 2000b) i també a la seva gran influència en la productivitat del sistema. D'altra banda, el monitoratge d'aquest substrat també pot ajudar a evitar perills operacionals durant la producció a gran escala (Jahic *et al.*, 2006).

La concentració de substrat es pot controlar de manera relativament senzilla i indirecta mitjançant dos grans grups de mètodes: amb la mesura de la concentració d'oxigen dissolt o amb la implementació d'un esquema de control de metanol en llaç obert basat en un model de creixement. Ambdós metodologies tenen l'inconvenient que es poden donar grans desviacions de la consigna de substrat i per això sorgeix la necessitat de determinar directament la concentració de metanol del medi de cultiu. El metanol també es pot mesurar de forma directa, utilitzant sondes específiques per aquest substrat, el que permetran realitzar un control de la concentració d'aquest més rigorós.

Malgrat que la concentració de metanol és una variable clau en el control i la optimització dels processos de producció amb *P. pastoris*, hi ha altres variables, com la biomassa i la proteïna d'interès, a ser monitoritzades.

Una estratègia molt comuna amb *P. pastoris* i també en d'altres sistemes d'expressió és la obtenció d'una elevada densitat cel·lular prèvia a l'inici de la inducció. Gnoth *et al.*, 2007) mostren la dispersió obtinguda en els nivells de biomassa abans i al final de la inducció en diferents repeticions d'un mateix cultiu d'*E. coli*. Aquesta variabilitat es

tradueix també en una gran dispersió en els nivells finals de proteïna d'interès. Així doncs, la quantitat i també la qualitat de la proteïna d'interès produïda depenen en gran mesura de la qualitat del procés productiu i de l'evolució de les seves variables, entre elles la biomassa. La qualitat del procés és una variable molt lligada a la seva reproductibilitat.

## 1.5 Lipases

### 1.5.1 Definició

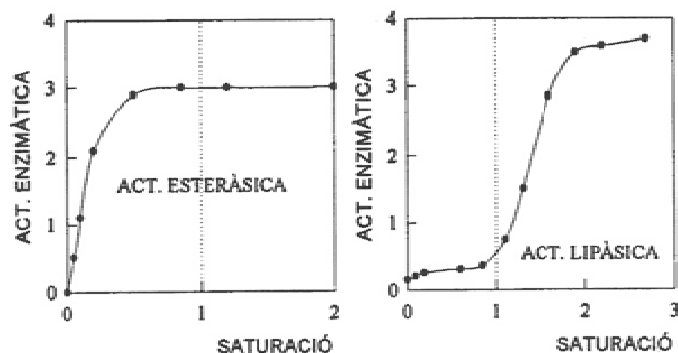
Les lipases són glucoproteïnes i es defineixen com a trigliceridhidrolases que catalitzen la degradació dels triglicèrids a diglicerids amb la conseqüent formació de monoglicerids i àcids grassos. A part dels substrats naturals com esters i triglicèrids insolubles, les lipases catalitzen la síntesi i la hidròlisi enantio i regioselectiva d'un ampli ventall d'esters naturals o sintètics (Bornscheuer 1995; Santaniello *et al.*, 1993).

A la natura les lipases tenen un rol molt important, catalitzant el primer pas del metabolisme dels greixos i olis, que no podrien ser consumits sense ser prèviament hidrolitzats.

En l'última dècada les lipases han despertat grans expectatives en altres reaccions com són la resolució de mescleres racèmiques de compostos quirals, la interesterificació o intercanvi del grup acil entre triglicèrids i un àcid gras o un èster d'un àcid gras (Jaeger *et al.*, 1994) i la síntesi de productes enantiomèricament purs (Gil *et al.*, 1997).

La diferència entre les lipases i la resta d'enzims que també poden hidrolitzar esters és la necessitat d'una interfase orgànic-aquosa per realitzar la seva funció catalítica. Les esterases, per exemple, no hidrolitzen esters insolubles, o ho fan molt lentament. L'activitat esteràsica és funció de la concentració de substrat, tal com descriu la cinètica de Michaelis-Menten, arribant a la velocitat màxima de reacció molt abans que el medi es trobi saturat de substrat, de manera que la formació d'una emulsió substrat-aigua no afecta a la velocitat de reacció. En canvi, les lipases quasi no presenten activitat en condicions de saturació, i és quan s'excedeix a concentracions superiors a la solubilitat

de substrat i té lloc la formació d'una emulsió, que es produeix un augment bruscat en l'activitat enzimàtica (figura 1.2). Aquest fenomen es coneix com activació interfacial.



**Figura 1.2:** Velocitats de reacció en funció de la concentració de substrat.

Aquesta reacció no es pot descriure mitjançant una cinètica tipus Michaelis-Menten, ja que el procés d'hidròlisi té diverses etapes (Verger 1997). En primer lloc, la lipasa s'adsorbeix sobre la fase orgànica, seguit de la formació del complex enzim-substrat, i finalment s'alliberen els productes a la fase aquosa i es produeix la regeneració de l'enzim.

### 1.5.2 Obtenció

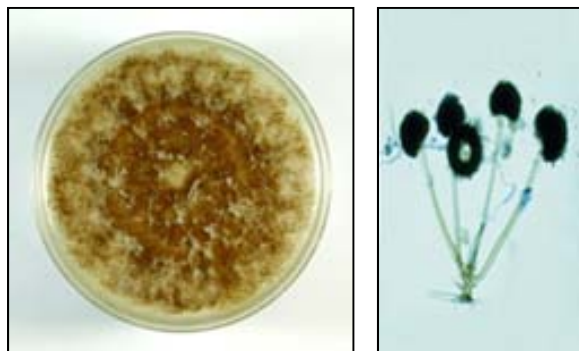
Les lipases poden ser produïdes per animals, plantes o microorganismes (Antonian 1988; Khachatourians i Hui, 1995). Les primeres lipases utilitzades eren extreïdes del pàncrees dels mamífers (generalment del porc). Però els productors més interessants a nivell industrial són els microorganismes com els llevats i els bacteris. Els principals productors de lipasa comercial són *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas sp.*, i sobretot *Rhizopus sp.*, *Candida rugosa* i *Candida antàrtica*.

Un gran nombre d'empreses que comercialitzen enzims a nivell industrial, estan dedicant molts esforços per aconseguir microorganismes superproductors d'aquestes proteïnes i, que al mateix temps, siguin classificades com "inofensives" (GRAS). En el cas de la lipasa, *Novo Nordisk* ha desenvolupat processos de producció d'aquest enzim a

escala industrial, utilitzant *Aspergillus niger* com a microorganisme hoste i utilitzant els gens de *Rhizomucor miehei* i de *Humicola lanuginosa* (Boel, 1991).

### 1.5.3 La lipasa nativa de *Rhizopus oryzae* (ROL)

El fong *Rhizopus oryzae* (figura 1.3), es troba en el seu estadi natural en el fruit de la palma. D'aquest fong se n'ha aïllat una lipasa extracel·lular coneguda amb el nom de ROL (*Rhizopus oryzae* Lipase) (Hiol *et al.*, 2000). La ROL nativa és una proteïna de 392 aminoàcids dividits en uns 26 primers aminoàcids que conformen la seqüència senyal, seguits d'una pro-regió de 97 aminoàcids i finalment els 269 aminoàcids que contenen la seqüència de la proteïna madura (Beer *et al.*, 1998). La proteïna madura té un pes molecular de 32 KDa, presenta 4 punts potencials de N- glicosil·lació i tres ponts disulfur (entre els aminoàcids 152 - 391, el 163 - 166 i el 358 - 367) (BenSalah *et al.*, 2006). L'enzim natiu és estable a 30°C a pH entre 4.5 i 7.0.



**Figura 1.3:** Fong *Rhizopus oryzae*

Les lipases són àmpliament utilitzades a la indústria, especialment al sector farmacèutic (Lopez *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2005). També es poden utilitzar per realitzar resolucions de les mescles racèmiques, degut a la seva alta selectivitat i especificitat (Oliveira *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2007). Altres aplicacions de les lipases es troben en la producció de biosulfactants pels aliments, en la indústria cosmètica (Dossaf *et al.*, 2002; Plou *et al.*, 2002), en la producció de biodièsel (Matasumoto *et al.*,

2001), en la síntesi d'antitumorals, antioxidants, i compostos fluororgànics, en la construcció de bisensors (Hasan *et al.*, 2006), i en un gran nombre d'altres aplicacions interessants.

## 1.6 Revisió de l'obtenció heteròloga de ROL

Els treballs previs realitzats amb ROL comencen amb l'expressió aconseguida per Beer *et al.*, (1996) emprant el sistema d'expressió de *E. coli*. Aquest sistema d'expressió provoca la formació de cossos d'inclusió que dificulten la detecció de l'activitat de l'enzim. La formació dels cossos d'inclusió és una resposta davant de la toxicitat de ROL pel microorganisme. La purificació posterior permet assolir una concentració de 10 a 15 mg de ROL activa per litre, però encareix substancialment el procés productiu.

Posteriorment, s'ha pogut vèncer aquesta limitació mitjançant els treballs de Di Lorenzo *et al.*, (2005) que han permès obtenir una ROL activa i correctament plegada amb la soca de *E. coli origami* (DE3).

Resultats semblants s'han obtingut amb el llevat *S. cerevisiae* que ha permès obtenir de forma extracel·lular la ROL però assolint nivells de producció del producte actiu inferiors (Takahashi *et al.*, 1998) .

Els primers en produir ROL en *P. pastoris* han estat Minning *et al.*, (1998). Aquest han produït, sota el control del promotor *AOX1*, 60 mg per litre de cultiu en un volum de fermentació de cinc litres. Les característiques de la proteïna obtinguda són 30kDa, un pH òptim d'activitat de 8.1 a 30°C i un punt isoelèctric al voltant de 9.3.

En els darrers anys, aquest procés ha estat àmpliament estudiat en el grup d'enginyeria de bioprocessos i de biocatàlisi aplicada del departament d'Enginyeria Química de la UAB, intentant identificar i optimitzar el bioprocés per a poder reduir els seus colls d'ampolla, estudiant des d'aspectes genètics i fisiològics a operacionals i de monitorització i control ( Minning *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2004; Resina *et al.*, 2004; Cos *et al.*, 2005b; Resina *et al.*, 2005; Cos *et al.*, 2006a; Cos *et al.*, 2006b; Marx *et al.*, 2006).



Cos *et al.*, (2006a) han realitzat experiments, demostrant la importància de mantenir una determinada concentració de metanol en el cultiu per poder incrementar la productivitat del procés utilitzant el metanol com a única font de carboni. Han comprovat que la concentració de substrat és un dels paràmetres claus en la producció de ROL emprant *P. pastoris* sota el promotor *AOXI* per a una soca Mut<sup>s</sup>. Ramon *et al.*, (2007), realitzen una primera aproximació en la producció de ROL amb *P. pastoris* mitjançant una estratègia en semicontinu utilitzant substrats mixtes (sorbitol i metanol).



## 1.7 **Bibliografia**

Antonian E. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids*. 1988;23(12):1101-1106.

Boer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G. Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;77:513-523.

Beer HD, Wohlfahrt G, Schmid RD, McCarthy JEG. The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochem. J.* 1996;319:351-359.

Beer HD, McCarthy JEG, Bornscheuer UT, Schmid RD. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression.* 1998;1399:173-180.

BenSalah A, Mosbah H, Fendri A, Gargouri A, Gargouri Y, Mejdoub H. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;260:241-248.

Boel E, Høge-Jensen B, Wöldike H, Gormsen E, Chistensen M, Andreasen F, Thin L. Cloning and expression of important fungal lipases. *Engineering, GBF Monograph.* 1991;16:207-219.

Bornscheuer UT. Lipase-catalysed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 1995;17:578-586.

Brady CP, Shimp RL, Miles AP, Whitmore M, Stowers AW. High-Level production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2001;23:468-475.

Çalik P, Çelik E, Oliver SG. Recombinant protein production by Mut<sup>+</sup> strain of *Pichia pastoris* using dual carbon sources: methanol and sorbitol. *New Biotechnol.* 2009;25:141-146.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000;24:45-66.

Chen Y, Krol J, Cino J, Freedman D, White C, Komives E. Continuous production of thrombomodulin from a *Pichia pastoris* fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996;67:143-148.

Chiruvolu V, Eskridge KM, Cregg JM, Meagher MM. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris*. Appl. Biochem. Biotechnol. 1998;75:163-173.

Clementschtisch F, Bayer. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. Microb. Cell Fact. 2006;5:19.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. Biotechnol. Bioeng. 2006a;95:145-154.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. Microb. Cell Fact. 2006b;5:1-20.

Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. Heterologous protein production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. Biochem. Eng. J. 2005a;26:86-94.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. J. Biotechnol. 2005b;116:321-335.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 2000;16:23-52.

Curvers S, Brixius P, Klauser T, Thömmes J, Weuster-Botz D, Takors R, Wandrey C. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1 Fermentation. Biotechnol. progr. 2001;17:495-502.

Çelik E, Çalık P, Stephen GO. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. Yeast. 2009;26:473-484.

D'Anjou MC, Daugulis AJ. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. Biotechnol. Lett. 2000;22:141-146.

D'Anjou, M. C. i Daugulis, A. J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. Biotechnol. Bioeng. 2001;72:1-11.

Davis SJ, Ward HA, Puklavec MJ, Willis AC, Williams AF, Barclay AN. High level expression in Chinese hamster ovary cells of soluble forms of CD4 T lymphocyte glycoprotein including glycosylation variants. J. Biol. Chem. 1990;265:10410-10418.

Di Lorenzo M, Hidalgo A, Haas M, Bornscheuer UT. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. Appl. Env. Microbiol. 2005;71:8974-8977.

DiMiceli L, Pool V, Kelso JM, Shadomy SV, Iskander JV. Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). Vaccine. 2006;24:703-707.

Donnini C, Farina F, Neglia B, Compagno MC, Uccelletti D, Goffrini P, Palleschi C. Improved production of heterologous proteins by a glucose repression-defective mutant of *Kluyveromyces lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 2004;70:2632-2638.

Döring F, Klapper M, Theis S, Daniel H. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998;250:531-535.

Dossat V, Combes D, Marty A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using continuous solvent-free-process. J. Biotechnol. 2002; 97: 117-124.

Douris V, Swevers L, Labropoulou V, Andronopoulou E, Georgoussi Z, Iatrou K. Stably Transformed insect cell lines: Tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. Adv. Virus Res. 2006;68:113-56.

Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. Trends Biotechnol. 2003;21:394-9.

Edwards CP, Aruffo A. Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Opin. Biotechnol. 1993;4:558-563.

Egli T, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. Archives Microbiol. 1980;124:115-121.

Faber KN, Harder W, Ab G, Veenhuis M. Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. Yeast. 1995;1:1331-1344.

Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. Curr. Opin. Biotechnol. 2005;16:538-545.

Gil N, Bosch MP, Guerrero A. Chemoenzymatic Synthesis of (R)-(+)- $\alpha$ -(4-Fluorophenyl)-4(2-pyrimidinyl)-1-piperaziebutanol and (R)-(+)- $\alpha$ -(4-Fluorophenyl)-4-methyl-1-piperaziebutanol as Potencial Antipsychotic Agents. *Tetrahedron*. 1997;53(44):15115-15122.

Gasser B, Mattanovich D. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale?. *Biotechnol. Lett.* 2007;29:201-212.

Giga-Hama Y, Kumagai H. Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999;30:235-244.

Giudice EL, Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver Rev.* 2006;58:68-89.

Gnoth S, Jenzsch M, Simutis R, Lubbert A. Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *J. Biotechnol.* 2007;132:180-186.

Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang YW, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li HJ, Choi BK, Hopkins D, Wischnewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*. 2006;313:1441-1443.

Hanai N, Nagata K, Kawajiri A, Shiromizu T, Saitoh N, Hasegawa Y, Murakami S, Inagaki M. Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett.* 2004;568:83-88.

Harder W, Veenhuis M. Metabolism of one carbon compounds. In: *The Yeasts* (Ed. by Rose AH & Harrison JS). 1989. pp. 289-316. London: Academic Press.

Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006; 39:235-251.

Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *FEBS Lett.* 2000;440:356-360.

Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 2004;85:367-375.

Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals *Comp. Immunol. Microb.* 2009;32:107-121.

Invitrogen Corporation CA USA . A Manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. K1710-01. Version F. 2006.

Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 1994;15:29-63.

Jain E, Kumar A. Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. Biotechnol. Adv. 2008;26:46-72.

Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactors cultures. Microb Cell Fact. 2003;2(1):6.

Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Enfors SO. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnol. Progr. 2006;22:1465-1473.

Jungo C, Marison I, von Stockar U. 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. 2007a;128:824-837.

Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, von Stockar U. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. J. Biotechnol. 2007b;131(1):57-66.

Känsäkoski M, Kurkinen M, von Weymarn N, Niemelä P, Neubauer P, Juuso E, Eerikäinen T, Turunen S, Aho S, Suhonen P. Process analytical technology (PAT) needs and applications in the bioprocess industry. 2006. VTT Working Papers, 60.

Kim MW, Kim EJ, Kim JY, Park JS, Oh DB, Shimma Y, Chiba Y, Jigami Y, Rhee SK, Kang HA. Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. J. Biol. Chem. 2006;281:6261-6272.

Khachatourians GG, Hui YH. Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: versatile catalyst in nature and the laboratory. F. Biotech. Microorg. 1995;549-588.

Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. J. Biosci. Bioeng. 2000a;89:55-61.

- Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *J. Biosci. Bioeng.* 2000b;90:280-288.
- Ko K, Koprowski H. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res.* 2005;111:93-100.
- Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999;10: 428–433.
- Kulkarni PS, Raut SK, Patki PS, Phadke MA, Jadhav SS, Kapre SV, Dhorje SP, Godse SR. Immunogenicity of a new, low-cost recombinant hepatitis B vaccine derived from *Hansenula polymorpha* in adults. *Vaccine.* 2006;24:3457–3460.
- Kumar R, Singh J. Expression and secretion of a prokaryotic protein streptokinase without glycosylation and degradation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 2004;21: 1343–1358.
- Lecina M, Soley A, Gracia J, Espunya E, Lazaro B, Cairo JJ, Godia F. Application of *on-line* OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *J. Biotechnol.* 2006;125:385-394.
- Li ZJ, Xiong F, Lin QS, D'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DSC, Hew CL. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein expres. purif.* 2001;21:438-445.
- Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotech.* 2002;13:329-332.
- López N, Pérez R, Vázquez F, Valero F, Sánchez A. Immobilization of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2002;77;175–182.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22:249-270.
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.* 2004;8:63–81.



Marheineke K, Grunewald S, Christie W, Reilander H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett.* 1998;441:49–52.

Marx H, Sauer M, Resina D, Vai M, Porro D, Valero F, Ferrer P, Mattanovich D. Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;264:40-47.

Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001;57: 515–520.

McKee C, Gibson A, Dalrymple M, Emslie L, Garner I, Cottingham I. Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nat Biotechnol.* 1998;16:647-51.

Menendez J, Valdes I, Cabrera N. The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast.* 2003;20:1097-1108.

Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet.* 2007;48(1):47-61.

Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnol.* 1998;66:147-156.

Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solà C, Schmid RD, Valero F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2001;86:59-70.

Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E, Paul D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.* 1999;8: 237-247.

Oliveira P, Jares F, Ikegaki M. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen an (R,S)-ketopren by microbial lipases from native and commercial sources. *Braz. J. Microbiol.* 2006; 37:329–337.

Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pator, Bernabé M, Christensen M, Comelles F, Parra JL, Ballesteros A. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J. Biotechnol.* 2002; 96:55–66.

Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 2002;20:200-206.

Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem. Eng. J.* 2010. Article in press, Corrected proof.

Ramon R, Feliu JX, Cos O, Montesinos JL, Berthet FX, Valero F. Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 2004;26:1447-1452.

Ramon R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2007;130:39-46

Resina D, Cos O, Ferrer P, Valero F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;91:760-767.

Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J. Biotechnol.* 2004;109:103-113.

Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 2008;307:249-264.

Santaniello E, Ferraboschi P. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 1993;15:367-381.

Shen SG, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 1998;216: 93-102.

Shin G, Lee K, Kim T, Shin H, Lee Y. Lipase-catalyzed production of optically active (S)-flurbiprofen in aqueous phase reaction system containing chiral succinyl  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2005; 33:93-98

Sims AH, Gent ME, Lanthaler K, Dunn-Coleman NS, Oliver SG, Robson GD. Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:2737-2747.

Surribas, A. Memòria de tesi doctoral. Milliores en el sistema de producció d'una lipasa de *Rhizopus oryzae* en *Pichia pastoris* mitjançant tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu alternatives. 2008. Universitat Autònoma de Barcelona.

Takahashi S, Ueda M, Atomi H, Beer HD, Bornscheuer UT, Schmid RD, Tanaka A. Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 1998;86:164-168.

Terentiev Y, Pico AH, Boe RE, Wartmann T, Klabunde J, Breuer U, Babel W, Suckow M, Gellissen G, Kunze G. A wide-range integrative yeast expression vector system based on *Arxula adenivorans*-derived elements. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2004;31: 223–228.

van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EK, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat Biotechnol. 2002;20:484-7.

van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CM, Pouwels PH, van den Hondel CA. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. Mol. Gen. Genet. 1987;206:71–75.

van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Res. 2006;6:381–392.

Veenhuis M, Van Dijken JP, Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. Adv. Microb. Physiol. 1983;24:1-82.

Verger R. Interfacial activation of lipase: facts and artifacts. Trends Biotechnol. 1997;15:32-38.

Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene. 1997;186:37-44.

Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmot I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Biotechnology (NY). 1991;9:830-4.

Xie JL, Zhou QW, Pen D, Gan RB, Qin Y. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. Enzyme Microb. Biotechnol. 2005;36:210-216.

Yadav JS, Subba BV, Padmavani B, Venugopal CH, Bhaskar A. Enzymatic kinetic resolution of racemic 4-tetrahydropyrans by *Candida rugosa* lipase. *Tetrahedron Lett.* 2007; 48: 4631–4633.

Yang J, Zhou X, Zhang Y. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Lett.* 2004;26:1013-1017.

Yin JC, Li GX, Ren XF, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 2007;127:335-347.

Zhang W, Inan M, Meagher MM. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000a;5:275-287.

Zhang WH, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, Serotype A. *Biotechnol. Bioeng.* 2000b;70: 1-8.

Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, Pan YW, Tan YH, Fu CY, Tu FZ. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* 2009;36:1611–1619.

Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Chang R, Drews R, Lubon H, Hammond D, Soukharev S. The use of the uromodulin promoter to target production of recombinant proteins into urine of transgenic animals. *Transgenic Res.* 2002a;11:425-435.

Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Lubon H, Hammond D, Soukharev S. Uromodulin promoter directs high-level expression of biologically active human alpha-1-antitrypsin into mouse urine. *Biochem J.* 2002b;365:7-11.

Zhou JM, Tang YX, Fang DY, Zhou JJ, Liang Y, Guo HY, Jiang LF. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes.* 2006;33:27–32.

# Capítol 2:

## OBJECTIU



## 2 OBJECTIU

L'objectiu global d'aquest treball és el de millorar la productivitat de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* mitjançant la utilització de substrats mixtes. Alhora aquest es pot classificar en diferents petits objectius:

- Comprovar la funcionalitat d'un sistema de 48 milibioreactors treballant en paral·lel amb *P. pastoris* utilitzant els promotors induïbles AOX i FLD, i el promotor constitutiu GAP.
- Optimització de la producció de ROL utilitzant com a cosubstrats el sorbitol i el glicerol. Estudi de l'efecte de la concentració del substrat inductor i de la velocitat específica de creixement sobre la proteïna d'interès.
- Validació d'un sistema SIA per l'anàlisi de sorbitol en línia.
- Canvi d'escala del procés més productiu passant de treballar de escala laboratori (5 l) a escala pilot (50 l).
- Optimització de la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* aplicant tècniques d'enginyeria genètica. Efecte sobre la producció de ROL de la coexpressió del gen *HACI* de forma induïble i constitutiva.





Capítol 3:

**MATERIALS I**  
**MÈTODES**



## 3 MATERIALS I MÈTODES

En aquest apartat es recullen tots els materials, equipaments i protocols d'anàlisis utilitzats en la realització d'aquest treball.

### 3.1 Solucions

#### 3.1.1 Solució 500 X Biotina (0.02%)

Dissoldre 20 mg de Biotina (Sigma, ref: 47868) en 100 ml d'aigua destil·lada. Filtrar en condicions estèrils i guardar a 4 ° C. El temps de caducitat d'aquesta solució és de 1 any.

#### 3.1.2 Solució antiescumejant

Dissoldre 10 mg d'antiescumejant (Antifoam 204, nº batch:035K01501, Sigma) en un litre d'aigua destil·lada. La concentració òptima d'AF al medi de cultiu és al voltant de 10 mg/l. Per tant, s'ha de tenir en compte que només amb 5 ml d'aquesta solució d'AF s'aconsegueix la concentració òptima dins els 5 litres del reactor. Cal vigilar en no addicionar grans quantitats d'AF, ja que altera l'equilibri de l'oxigen dissolt entre la fase líquida i gasosa, dificultant la seva transferència.

#### 3.1.3 Solució tampó Tris-HCl 400 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 7.25 (Anàlisi activitat lipolítica)

El volum final de la solució serà de 1l. Abans de regular el pH amb l'àcid clorhídric, s'afegeix el clorur de calci. Aquesta solució serà utilitzada per l'anàlisi d'activitat lipolítica.

Nom component	Pes (g)	Proveïdor
Clorur de calci anhidre	1.11	
Tris (hidroximetil) aminometà	48.4	Panreac
Àcid clorhídric 37%	Fins ajustar pH a 7.25	

### 3.1.4 Solució de sals traça

Pesar les quantitats indicades en la següent taula, per a preparar 1l de solució:

Nom component	Pes (g)	Proveïdor
Sulfat de Coure pentahidratat	6.0	Merck
Iodur de Sodi	0.08	Panreac
Sulfat de Manganès monohidratat	3.0	Panreac
Molibdat de Sodi dihidratat	0.2	Panreac
Àcid Bòric	0.02	Panreac
Clorur de Cobalt	0.5	Merck
Clorur de Zinc	20.0	Panreac
Sulfat de Ferro heptahidratat	65.0	Panreac
Biotina	0.2	Sigma
Àcid Sulfúric (96%)	5 ml	Panreac

Dissoldre'ls en aigua destil·lada fins arribar al volum final d'un litre. Un cop realitzada la mescla, cal filtrar-la a la cambra de flux amb un filtre estèril de 0.22 µm (Millipore, Bedford, USA). Aquesta solució s'emmagatzema a 4 °C i té una durada aproximada d'un any.

## 3.2 Medis de cultiu

### 3.2.1 Medi per a cultius en flascons agitats

Per la preparació d'un litre de dissolució, s'utilitzen les quantitats indicades:

Nom component	Pes (g)	Proveïdor
Glucosa	20	Quimivítia
Peptona	20	Oxoid
Extracte de llevat	10	Oxoid

S'afegeixen  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  de zeozina per seleccionar els transformats. Per realitzar l'esterilització dels compostos, la glucosa s'esterilitza separatament de la resta de components.

### 3.2.2 Medi per a cultius en *discontinu*

Per a la preparació d'un litre de dissolució, s'utilitzen les concentracions indicades:

Nom component	Pes (g)	Proveïdor
Sulfat d'amoni	25	Panreac
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.7	DIFCO
Antiescumejant 204	5 gotes	Sigma

Depenent de l'estratègia escollida s'addicionaran diferents fonts de carboni. Altres medis de cultiu utilitzats es troben detallats en els capítols corresponents.

### 3.2.3 Medi per a cultius en *semicontinu*

Medi extret del manual que subministra Invitrogen (*Pichia* fermentation process guidelines, invitrogen), medi sintètic utilitzat per a cultius en semicontinu. Per a la preparació de 3.2 l de dissolució s'utilitzen les concentracions indicades a continuació:

Nom component	Concentració ( $\text{g l}^{-1}$ )	Proveïdor
Àcid ortofosfòric (85%)	$26.7 \text{ ml l}^{-1}$	Panreac
Sulfat de calci	0.93	Panreac
Sulfat de potassi	18.2	Panreac
Sulfat de magnesi heptahidratat	14.9	Panreac
Hidròxid de potassi	4.13	Panreac
Antiescumejant 204	5 gotes	Sigma
Glicerol	40	Panreac

En funció de l'estratègia escollida s'addicionaran diferents substrats durant la fase d'inducció i transició. Altres medis de cultiu utilitzats es troben detallats en els capítols corresponents.

### 3.2.4 Composició substrats a la fase d'inducció

La solució d'addició de metanol durant la fase d'inducció estarà composta per: metanol pur, sals traça 5 ml l<sup>-1</sup> i biotina 2 ml l<sup>-1</sup>.

La solució d'addició de sorbitol durant la fase d'inducció exponencial preprogramada estarà composta per : sorbitol 300 g l<sup>-1</sup>, sals traça 5 ml l<sup>-1</sup> i biotina 2 ml l<sup>-1</sup>.

La solució d'addició de glicerol durant la fase d'inducció exponencial preprogramada estarà composta per : glicerol 550 g l<sup>-1</sup>, NHCl<sub>4</sub> 204 g l<sup>-1</sup>, sals traça 5 ml l<sup>-1</sup> i biotina 2 ml l<sup>-1</sup>.

La solució d'addició de sorbitol durant la fase d'inducció utilitzada en els capítols 7 (*Canvi d'escala per a la producció de lipasa de ROL en el sistema d'expressió de Pichia pastoris mitjançant l'ús de substrats mixtes*) i 8 (*Efecte de la coexpressió del gen HAC1 de Pichia pastoris sobre la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup>*) d'aquest document estarà composta per: sorbitol 300 g l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 108 g l<sup>-1</sup>, sals traça 5 ml l<sup>-1</sup> i biotina 2 ml l<sup>-1</sup>. En aquests cultius el nitrogen requerit es addicionat de forma exponencial juntament amb la font de carboni.

### 3.3 Soques de treball

Les soques utilitzades en aquest treball són les següents:

Soca	Promotor	Actuació	nº còpies ROL	nº còpies HAC	Nomenclatura
KM100_1	AOX2	induïble	una		Mut <sup>s</sup> <sub>s</sub>
X33clon 7	AOX1	induïble	una	cap	Mut <sup>+</sup> <sub>s</sub>
X33500_1	AOX1	induïble	múltiples		Mut <sup>+</sup> <sub>m</sub>
GS115	FLD	induïble	una		pFLD
GS115	GAP	constitutiu	una		pGAP
KM100_1	AOX2	induïble	una	una	HACI <sub>IND</sub> -Mut <sup>s</sup> <sub>s</sub>
KM100_1	GAP	constitutiu	una	una	HACI <sub>CONS</sub> -Mut <sup>s</sup> <sub>s</sub>

Els subíndexs “s” i “m” emprats en aquesta taula fan referència a l’inicial de les sigles en anglès de una còpia o múltiples còpies, *singlecopy* i *multicopy*, respectivament.

### 3.4 Tècniques microbiològiques

#### 3.4.1 Preparació plaques de Petri (YPD)

Per preparar un total d’1 litre (aprox. 20 – 30 plaques):

1. Dissoldre 10 g d’extracte de llevat, 20 g de peptona i 20 g d’agar en 900 ml d’aigua destil·lada.
2. Esterilitzar durant 30 minuts a 121°C.
3. Amb l’ampolla calenta (35-40 °C), afegir 100 ml de solució de glucosa (200 g l<sup>-1</sup>) estèril.
4. Omplir les plaques de Petri, en condicions estèrils, i esperar que solidifiquin al refredar-se.

### 3.4.2 Determinació de la concentració de biomassa total

Per la mesura de la concentració de biomassa total (suma de la viable i no viable) existent al fermentador s'han emprat l'anàlisi del pes sec.

#### 3.4.2.1 Anàlisi del pes sec

1. Recollir en un tub 5 ml de mostra i centrifugar a 6240 g (Megafuge 1.0, Heraeus, Barcelona, Espanya) durant 5 minuts.
2. Separar la solució del pèl·let.
3. Resuspendre el pèl·let en 5 ml de solució isotònica (NaCl 0.9% en pes) i repetir la centrifugació.
4. Repetir els passos de separació, centrifugació i separació 3 vegades.
5. Resuspensió del pèl·let resultant en 5 ml de solució isotònica.
6. Passar la solució resultant per un filtre de microfibra de vidre (Whatman GF/F, Maidstone, Regne Unit), prèviament tarat en sec.
7. Rentar amb 10 ml d'aigua destil·lada per assegurar que només queda la biomassa i perquè es dissolguin les possibles sals d'alguns components del medi.
8. Els filtres amb biomassa es deixen durant 24 hores a 100°C.
9. Un cop secs, es posen en un dessecador amb sílica gel fins assoliment de pes constant.
10. La concentració de biomassa es pot calcular com la diferència de pes entre la tara del filtre i el pes final amb biomassa dividint aquest valor pel volum de mostra utilitzat.

### 3.5 Mètodes analítics

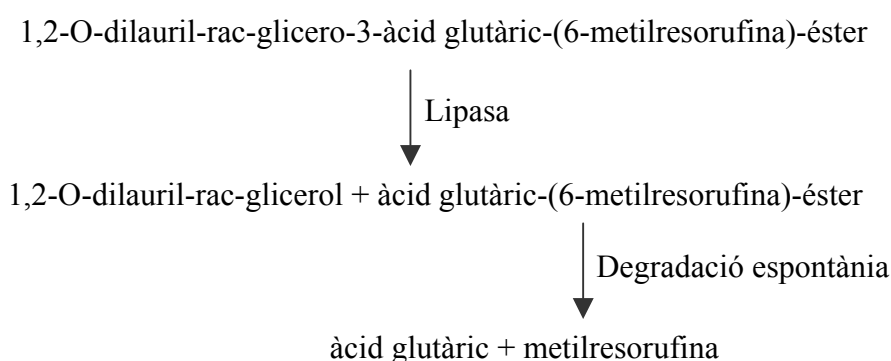
#### 3.5.1 Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular

Aquesta anàlisi està basada en una modificació del test (nº 1821792, LIP kit, Roche, Mannheim, Alemanya) desenvolupat per a la detecció de la lipasa humana. El pH i la



temperatura fixades pel test han estat modificades atesa la diferent naturalesa de la lipasa, utilitzant les condicions on la lipasa de ROL presenta la màxima activitat (pH: 7.4 i 30 °C) (Minning, Schmidt-Dannert, Schmid, 1998).

Las lipases es defineixen com triagliceridhidrolases que catalitzen la degradació dels triglicèrids a diglicèrids (alguns inestables) amb la posterior formació de monoglicèrids i àcids grassos, com a productes finals. El mètode utilitzat es basa en la degradació d'un substrat cromòfor específic per a la lipasa, el 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-àcid glutàric-(6-metilresorufina)-èster.



**Figura 3.1:** Reacció utilitzada per a la quantificació de l'activitat lipolítica.

En solució alcalina, l'èster es degrada sota l'acció catalítica de la lipasa formant-se el 1,2-O-dilauril-rac-glicerol i l'àcid glutàric-(6-metilresorufina)-èster, producte intermedi inestable. Aquest últim es degrada espontàniament en àcid glutàric i metilresorufina, compost de color vermell, el qual és directament proporcional a l'activitat lipolítica existent a la mostra. L'aparició del producte de color és mesura fotomètricament.

L'activitat lipolítica de la lipasa es calcula com la velocitat d'aparició del producte de color, la metilresorufina. Per tant, es correlacionarà el pendent de la recta d'aparició de producte amb l'activitat lipolítica del medi (*annex 11.2*)

La metodologia analítica és la següent:

1. Recollir 1.5 ml de mostra.
2. Centrifugar la mostra 1-2 min a 17000 g. (Biofuge fresco, Thermo scientific, Waltham, Estats Units)
3. Realitzar la dilució necessària perquè el valor obtingut es trobi inclòs en el rang de mesura de l'anàlisi, depenent del moment de l'extracció de la mostra.
4. La reacció és durà a terme en una cubeta (mod. 101302000, Sudelab SL, Barcelona, Espanya) en les quals s'introduiran:
  - 500 µl tampó Tris-HCl (400 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 7.25)
  - 500 µl mostra
  - 300 µl reactiu (LIP kit , Roche, Mannheim, Alemanya)
5. Per la determinació de la velocitat de producció de metilresorufina mitjançant el mètode ja descrit, s'utilitza un espectrofotòmetre (Cary 300, Varian Inc., Palo alto, USA)
6. Per realitzar el càlcul de l'activitat lipolítica, s'empra la recta de calibració, inclosa a l'*annex 11.2*.

### 3.5.2 Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular

L'activitat lipolítica intracel·lular va ser mesurada a partir dels sobrenedants centrifugats de cèl·lules lisades. Les cèl·lules van ser disruptades mecànicament utilitzant el disruptor One Shot (Constant Systems Ltd, Daventry, UK). Inicialment es recullen mostres del cultiu i són centrifugades a 6240 g (Megafuge 1.0, Heraeus, Barcelona, Espanya) durant 10 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant per altres anàlisis i es renten les cèl·lules amb tampó PBS (8 g l<sup>-1</sup> de NaCl; 0.2 g l<sup>-1</sup> KCl, 1.44 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0.24 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4) per duplicat.

Es mesura la densitat òptica de la mostra un cop ha estat resuspesa per segona vegada i abans de la disruptió cel·lular. Posteriorment es disrupten les cèl·lules seguint les

instruccions del fabricant a una pressió de 2.85 KBar i amb un sol pas de disrupció. Es manté el sistema experimental a una temperatura d'aproximadament 4°C.

La suspensió que en resulta es centrifuga per tal de separar-ne la fracció insoluble a 6000 rpm durant 10 min i a 4°C (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa). La fracció soluble és la que s'utilitza per fer l'anàlisi d'activitat lipolítica intracel·lular.

### **3.5.3 Quantificació de proteïnes**

Per a la quantificació de proteïna total s'ha utilitzat el kit comercial de Pierce basat en el mètode de Bradford (Bradford, 1976) seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode colorimètric es basa en la reacció dels aminoàcids bàsics i aromàtics de les proteïnes amb el reactiu Coomassie G-250 que genera un complex proteïna-colorant que es pot mesurar a 595 nm. L'absorbància es mesura en plaques de 96 pous utilitzant l'espectrofotòmetre Microplate Reader 2001 (Whittaker Bioproducts Inc., Walkersville, MD, USA).

### **3.5.4 Activitat proteàsica**

L'activitat proteàsica del sobrenedant de les mostres es va analitzar utilitzant el Kit d'anàlisi d'activitat proteàsica QuantiCleave™ Fluorescent (Pierce, Rockford, Estats Units), d'acord amb les instruccions del fabricant.

### **3.5.5 SDS- PAGE**

Els gels de proteïnes de poliacrilamida sodi dodecil sulfat (SDS) al 12% es van dur a terme en un unitat Mini-Protean II (BioRad, CA, USA) seguint el protocol recomanat pel fabricant d'acord amb el protocol de Laemmli (1970).

### **3.5.6 Western Blot**

El Western Blot es va portar a terme després de la transferència de la proteïna des del gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocel·lulosa utilitzant una cèl·lula de

transferència electroforètica Mini Trans-Blot durant 90 min a 400 mA (BioRad, CA, USA). Un cop la transferència va ser completada es va incubar en un buffer bloquejant ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g l<sup>-1</sup>, KCl 0.2 g l<sup>-1</sup>,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g l<sup>-1</sup>, NaCl 8 g l<sup>-1</sup>, Tween20 1 ml l<sup>-1</sup> i llet en pols al 5%) durant 12 h a 4°C. Per a la detecció de la ROL les membranes es van incubar en una solució al 3% de llet en pols amb l'anticòs primari, un anticòs de rata anti-ROL a una dilució de 1:100 durant 90 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es realitza un rentat de la membrana ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g l<sup>-1</sup>, KCl 0.2 g l<sup>-1</sup>,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g l<sup>-1</sup>, NaCl 8 g l<sup>-1</sup>, Tween 20 1 ml l<sup>-1</sup>) tres vegades durant 10 min. Posteriorment es realitza la incubació amb l'anticòs secundari, anti-rata (Anti-mouse IgG whole molecule alkaline-phosphatase, Sigma-Aldrich) produït en cabra a una dilució 1:5000 en una solució als 3% de llet en pols durant 1h a temperatura ambient. Posteriorment es realitza el rentat de la membrana tres vegades i el senyal va ser revelat amb un reactiu específic per l'anticòs secundari (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (BioRad)) fins a identificar les bandes. La reacció va ser aturada mitjançant el rentat amb aigua destil·lada.

### 3.5.7 Zimograma

El zimograma es va realitzar partint dels gels SDS-PAGE abans de ser tenyits. El SDS del gel s'elimina al submergir-lo en una solució 2.5 % Triton X-100 durant 1 h a temperatura ambient. Posteriorment el gel es renta dues vegades amb Tris-HCl 20 mM a pH 7 durant 15 min i s'incuba amb una solució de 100 µM MUF-butyrate al mateix pH i Tris-HCl a la mateixa concentració durant 30 segons. Posteriorment el gel s'exposa a llum UV amb l'objectiu de detectar les bandes fluorescents. Posteriorment si es requereix el gel pot ser tenyit utilitzant Commassie G250 col·loïdal amb l'objectiu de detectar el pes molecular de les bandes actives.

### 3.5.8 Determinació de la concentració de glicerol i sorbitol

El glicerol i el sorbitol són determinats per HPLC amb l'equip HP 1050 líquid chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant la columna de bescanvi iònic IC Sep ICE-COREGEL 87H3 (Transgenomic). Com a fase mòbil

s'utilitza una solució d'àcid sulfúric 6 mM amb un volum d'injecció de 20 µl i el temps de l'anàlisi correspon a 40 min. Les dades són quantificades i tractades pel programari comercial Chromeleon 6.80 Software (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). La desviació estàndard residual (RSD) d'aquest mètode és del 3 % .

### 3.5.9 Determinació de la concentració de metanol

El metanol és analitzat per cromatografia de gasos amb l'equip HP 5890 gas chromatography (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna capil·lar Tracil TR-FFAP de 25m x 0.53 mm X 1 µm (Tracer-Teknokroma, St. Cugat del Vallès, Barcelona, Espanya) i equipat amb un injector automàtic (HP 7376) amb un detector de tipus FID. Les condicions d'operació són 200°C i 280°C per l'injector i el detector, respectivament. La temperatura interior del forn segueix un perfil que comença a 40 °C (2 min), a un increment constant de 20°C min<sup>-1</sup> fins arribar a 200 °C, mantenint-se a aquesta temperatura final durant 5 minuts. El temps total de mesura és d'uns 15 minuts. S'utilitza un cabal gasós de 9 ml min<sup>-1</sup> de heli per arrossegar la mostra per l'interior de la columna. El gas combustible del detector és l'hidrogen.

La mesura es porta a terme amb un patró intern d'isopropanol de concentració coneguda (4 g l<sup>-1</sup>) barrejat al 50 % (v/v) amb la mostra prèviament filtrada amb un filtre de 0.45 µm (Durapore, Millipore, Bedford, USA). Les dades són quantificades i tractades pel programari comercial Millennium 32 software (Waters Corporation, Mildford)

L'anàlisi de metanol també es durà a terme on-line mitjançant una sonda introduïda al interior del reactor, descrita en l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisi de metanol en línia* d'aquest treball.

### 3.5.10 Determinació de la concentració d'amoni

La concentració d'amoni és mesurada utilitzant un test colorimètric comercial (Dr. Lange LCK302 kit , Düsseldorf, Alemanya). El principi de mesura es basa en que els ions d'amoni a pH 12.6 reaccionen amb els ions d'hipoclorit i salicilat en presència de sodi nitroprusit com a catalitzador per formar l'indofenol blau. El rang de mesura

d'aquest kit és entre 60-167 mg/l d'amoni. Les possibles interferències del mètode poden ser ions metàl·lics com Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>. S'ha de tenir en compte que en cap dels medis de fermentació utilitzats es superen les concentracions crítiques d'aquests compostos que podrien provocar interferència en la mesura.

S'utilitzen 0.2 ml de mostra que es mesclen en un vial d'un únic ús que cal agitar vigorosament i esperar uns 15 minuts perquè la reacció arribi a la seva fi. A continuació, es mesura l'absorbància a 550 nm de la solució directament del vial en l'aparell subministrat per Dr. Lange (model CADAS, Dr. Lange, Düsseldorf, Alemanya). Aquest equip disposa ja internament del calibratge entre absorbància i concentració d'amoni, mostrant directament el resultat en unitats de concentració (mg l<sup>-1</sup>). La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és al voltant del 8% del rang de mesura.

### 3.5.11 Determinació de la concentració de metilamina

La metilamina es analitzada per HPLC (Hewlett Packard 1090) amb un detector tipus UV/VIS utilitzant una columna Hypersil AA-ODS (Hewlett Packard, Palo Alto, Estats Units) treballant amb una precolumna Hypersil ODS. L'eluent A correspon a; 20 mM acetat sòdic, 0.3% (v/v) tetrahidrofura (THF), 0.018% (v/v) trietilamina (TEA). L'eluent B correspon a; 10 mM acetat sodi, 40% (v/v) metanol, 40% (v/v) acetonitril.

### 3.6 Equipament emprat

L'equipament emprat per a la realització del treball experimental es recull a la figura 3.1. En aquesta figura s'inclou tot l'equipament que ha estat necessari per poder realitzar la monitorització i estratègies de control.

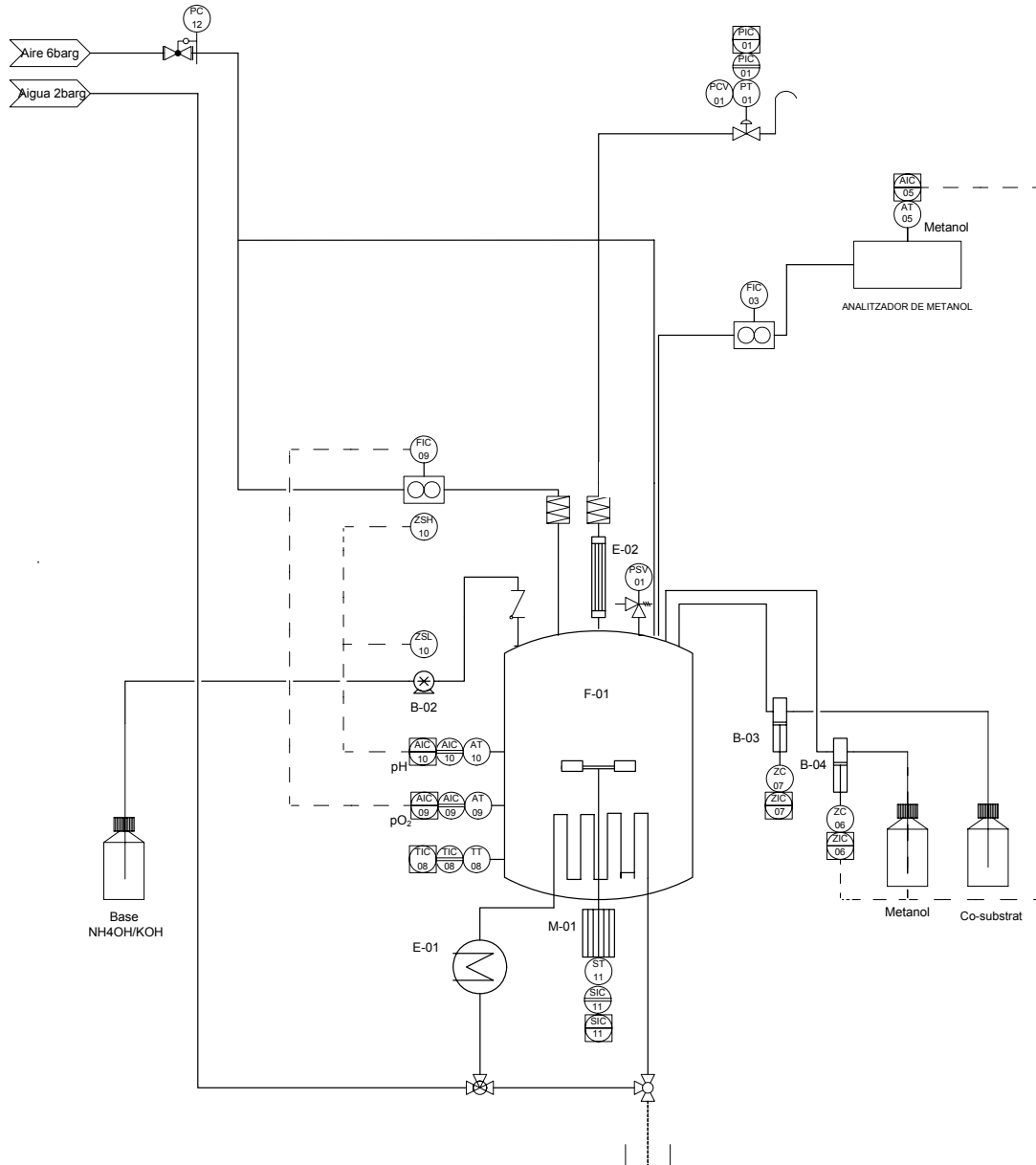
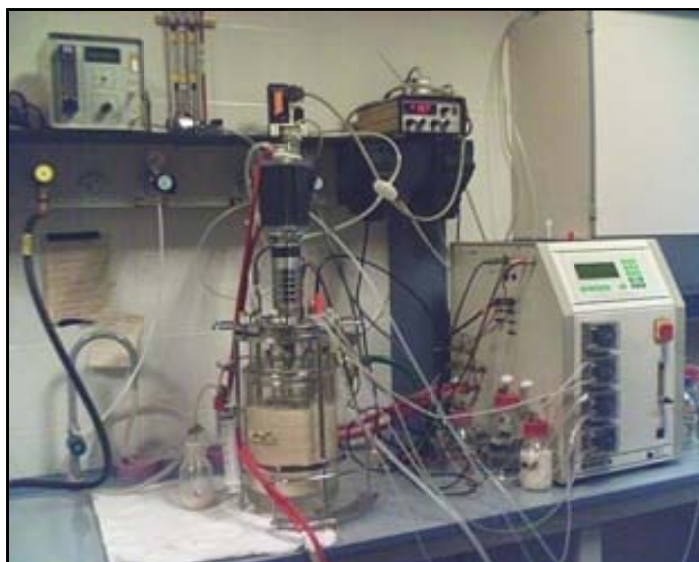


Figura 3.1: Diagrama de procés del muntatge experimental.

### 3.6.1 Fermentador

Aquest és l'element principal del sistema en qüestió, espai físic on es realitzen els cultius. Aquest equip (F-01), Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya), equip comercial (figura 3.2). Aquest equip consta de tres mòduls: un de cultiu que inclou la cuba de fermentació, les sondes que monitoritzen el procés i el sistema d'agitació; el segon mòdul, la DCU, on s'adquireix la informació corresponent a les sondes i on es troben implementats els controladors de pH (AIC-10), pO<sub>2</sub> (AIC-09), temperatura (TIC-08) i agitació (SIC-11) i finalment el mòdul de maniobra, que inclou tot l'aparellatge elèctric, pneumàtic i hidràulic que permet mantenir constants els paràmetres bàsics del cultiu.



**Figura 3.2:** Fermentador Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya)

A més a més, hi ha una sèrie d'equips associats que permeten realitzar la resta de la monitorització, llaços i accions de control que són:

### 3.6.2 Sistema d'addició de substrats

Per a la realització d'algunes de les etapes vinculades al procés fermentatiu: addició preprogramada per mantenir una velocitat de creixement constant i implementació dels



llaços de control de substrat. Amb aquesta finalitat es disposa de les microburetes motoritzades (B-03 i B-04) model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya) que mitjançant l'ordre donada des d'un ordinador dispensen de forma periòdica les quantitats establertes per l'estratègia programada.



**Figura 3.3:** Microburetes motoritzades model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya)

Previ a la utilització de les microburetes durant els cultius es realitza una esterilització química de les xeringues i els tubs implicats. Per a la esterilització es realitzen cicles de 10 injeccions dels següent substrats amb el següent ordre: aigua, àcid clorhídric (1M), aigua, hidròxid de sosa (1M), aigua, etanol (70% (v/v)), aigua.

### 3.6.3 Control i anàlisi de la concentració de metanol en línia

El llaç de control la concentració de metanol en el medi de cultiu pels cultius realitzats amb soques que empren aquest substrat com a font de carboni utilitza l'analitzador de metanol (Methanol detector and sensor unit, Raven Biotech Inc., Vancouver, Canadà). Aquest equip es compon d'una sonda (figura 3.4 B) per l'interior de la qual circula un cabal constant d'aire sintètic que arrossega el metanol el qual es difon a través d'una membrana específica per compostos volàtils. El cabal d'aire sec es manté constant mitjançant un manoreductor i un rotàmetre. Aquest corrent d'aire arrossega el metanol, fins l'element de detecció. Aquest sensor donarà com a resposta una senyal de voltatge que correspondrà a la concentració de metanol present en el cultiu (figura 3.4 A). Prèviament a l'utilització del aparell en fermentacions, es realitza

el calibrat d'aquest per trobar una relació entre el voltatge i la concentració de metanol (*annex 11.1*). L'aparell té un temps de resposta de 120 segons. Aquesta mesura es recollida per un ordinador que aplica una llei de control determinada i que envia l'acció corresponent a una microbureta motoritzada (B-04) model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya) que dispensa la quantitat corresponent per fer realitat l'objectiu de control.



**Figura 3.4:** Detector de metanol (A) i sonda (B) (Raven Biotech INC, Vancouver, Canadà).

Per poder realitzar el control en línia de la concentració de metanol, s'ha utilitzat un controlador combinat desenvolupat per Cos *et al.*, (2006). Aquest està format per dos blocs, el primer basat en el balanç de substrat entorn al cultiu que permet establir el consum del metanol que té el microorganisme, i el segon de tipus PI, per poder respondre davant de pertorbacions i de canvis de consigna, descrit en la següent equació (Equació 3.1):

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \underbrace{\frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt}}_{\text{consum}} + \underbrace{K_p \left( (\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \varepsilon_t \right)}_{PI} \quad (\text{eq. 3.1})$$

On;

F: Cabal d'alimentació (l h<sup>-1</sup>).

M<sub>0</sub>: Concentració de metanol al aliment (g l<sup>-1</sup>).

M: Concentració de metanol a l'interior del bioreactor (g l<sup>-1</sup>).

V: Volum de medi a l'interior del bioreactor (l).

$K_p$ : Guany del controlador proporcional.

$\tau_i$ : Paràmetre de l'efecte integral.

$\varepsilon$ : Diferència entre el valor de la consigna i la concentració de metanol en el medi de cultiu.

Aquest sistema de control, inclou el càlcul del consum de metanol durant tot el cultiu, i permet superar desviacions no desitjades, o bé canvis en la consigna de la concentració de metanol durant el cultiu, ja que aquest algorisme inclou el terme de control retroalimentat de tipus PI de velocitat (Cos *et al.*, 2006).

La combinació d'aquesta estratègia permet fixar els paràmetres de control al llarg de tota la fermentació, fet difícil de realitzar en el cas d'altres controladors utilitzats en el grup d'investigació (Cos, 2005) que davant d'un sistema no-lineal com el proposat obliguen a modificar els paràmetres del controlador en funció del temps. En els experiments realitzats en aquest treball s'han utilitzat com a paràmetre de guany del controlador el valor de  $0.08 \mu\text{l l g}^{-1} \text{min}^{-1}$ , i com a paràmetre de l'efecte integral de 2.5 minuts.

#### 3.6.4 Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol)

Davant la no existència de sensors específics de sorbitol o glicerol s'empra una estratègia d'addició preprogramada amb l'objectiu de controlar, en llaç obert, la velocitat específica de creixement del microorganisme durant la fase d'inducció.

Si es considera que hi ha un pseudo – estat estacionari per cada instant de temps, a partir del balanç de substrat a la fase en semicontinu, es pot obtenir la relació entre la velocitat específica de creixement, el cabal de substrat addicionat i la biomassa en cada instant (equació 3.2).

$$\mu(t) = \frac{Y_{x/s} u(t) S_0}{V(t) X(t)} \quad (\text{eq. 3.2})$$

Si a més s'integra el balanç de biomassa en la fase d'inducció s'obté la equació 3.3.

$$X(t) V(t) = X(t_0) V(t_0) \exp [\mu(t-t_0)] \quad (\text{eq. 3.3})$$

I combinant i reordenant les equacions 3.2 i 3.3, s'obté el cabal ( $u(t)$ ) que cal addicionar per poder mantenir la velocitat específica de creixement constant (equació 3.4).

$$u(t) = \frac{\mu(t) [X(t_0) V(t_0)]}{Y_{X/S} S_0} \exp [\mu(t-t_0)] \quad (\text{eq. 3.4})$$

Aquest cabal depèn del volum inicial ( $V(t_0)$ ), de la concentració de biomassa inicial ( $X(t_0)$ ) i de  $Y_{X/S}$  que es considera constant al llarg de la fermentació i que es determina a partir dels experiments realitzats en discontinu. Aquests valors es troben especificats als capítols corresponents.

Si no es complís la hipòtesi plantejada serà necessari modificar els cabals d'addició del cosubstrat. Per això cal fer un seguiment de la concentració d'aquest compost en el medi de cultiu mitjançant HPLC. Amb aquesta dada i mitjançant el balanç del cosubstrat es pot quantificar el consum en cada un dels intervals de temps i reajustar el cabal consumit en cada moment.

### 3.6.5 Equipament informàtic

Tots els anteriors equips estan monitoritzats i controlats per un maquinari que fa de suport per poder implementar tot el programari necessari per poder dur a totes les estratègies de control proposades i per poder recollir en forma de base de dades la informació vinculada a cada cultiu.

El programari emprat per poder realitzar la implementació de les diferents estratègies és el programari Visual Basic 6.0 i el potent programari de càlcul MATLAB 6.5.0.1.80913a Release 13.

## 3.7 Cultius amb *Pichia pastoris*

### 3.7.1 Cultius en flascons agitats

Les soques utilitzades en aquest treball experimental són conservades en petites quantitats (crio-vials de 1 o 2 ml) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un medi ric en glicerol, tal com recomana el manual de Invitrogen (*Pichia* fermentation manual). D'aquests se n'agafen 10 o 20  $\mu\text{l}$ , que s'estenen sobre la placa de petri en condicions estèrils. La placa s'ha de mantenir durant 48 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tapada amb parafilm o amb paper d'alumini per tal d'evitar que la contínua circulació d'aire a dins de l'estufa assequi l'agar.

A continuació, es prepara un litre del cultiu tal com s'ha explicat en l'apartat 3.2.1. *Medis de cultiu en flascons agitats*. S'autoclava el medi preparat dins de flascons agitats d'un litre de capacitat amb taps d'alumini a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 30 minuts.

Es deixen refredar i s'afegeix, en condicions estèrils,  $100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  de zeozina per seleccionar els transformats. S'inoculen i s'introdueixen a l'orbital a  $30^{\circ}\text{C}$  i 200 rpm durant 40 hores.

### 3.7.2 Cultius en fermentador d'un litre

Per treballar a densitats cel·lulars superiors s'utilitza un fermentador model Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya) amb una cuba de 1.5 litres. Les condicions de treball per aquest cultius són de temperatura i agitació fixades a  $30^{\circ}\text{C}$  i a 500 rpm, respectivament. El pH es mesura mitjançant una sonda introduïda al interior del reactor (mod. InPro 3030/3100, CRISON Inpro, Alella, Espanya) i es manté a un valor de 5.5 mitjançant l'addició de KOH 1M o bé d'amoníac (30%) depenent del cultiu a realitzar. El percentatge d'oxigen dissolt en el medi es mesura mitjançant una sonda d'oxigen (mod. 33187703, Mettler Toledo, Küsnacht, Suïssa). La regulació del cabal d'aire que permet mantenir un mínim del 20% d'oxigen dissolt, es realitza mitjançant l'addició d'aquest cabal entre 1 i  $2\text{ l min}^{-1}$  mitjançant un cabalímetre màssic (Bronkhorst HYTEC, Ruurol, Holanda) incorporat al sistema controla la quantitat d'aire que s'introdueix dins del fermentador entre un rang de  $0\text{--}10\text{ l min}^{-1}$ . Les sondes de pH i d'oxigen dissolt es calibren per cada cultiu. Com a medi de fermentació s'utilitzaran els descrits en l'apartat

*3.2 Medis de cultiu.* El medi s'esterilitza juntament amb el reactor i les sals traça, la biotina i el metanol, s'afegeixen un cop esterilitzada la resta, filtrant-les amb un filtre estèril de 0.45 µm (Millipore). L'inòcul es realitza a partir del cultiu en flascons agitats tal com s'ha descrit a l'apartat *3.7.1 Cultius en flascons agitats*. Aquest cultiu es centrifuga (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa) a 5000 g durant 10 minuts. Les cèl·lules es resuspenen amb 50 ml de solució isotònica estèril i s'inocula el fermentador.

### 3.7.3 Cultiu en fermentador de 5 litres

S'han realitzat els cultius en semicontinu amb el fermentador B. Braun model Biostat B (B.Braun, Melsungen, Alemanya) amb una cuba de 5 litres. Les condicions de treball per aquest cultius són de temperatura fixada a 30°C i agitació fixada entre 800-1000 rpm. El pH es mesura mitjançant una sonda introduïda al interior del reactor (mod. InPro 3030/3100, CRISON Inpro, Alella, Espanya) i es manté a un valor de 5.5 mitjançant l'addició d'amoniac (30%) durant la fase de creixement amb glicerol. Un cop finalitzada aquesta fase, la base es canvia per KOH 5M, per tal d'evitar interferències amb la sonda de metanol. El percentatge d'oxigen dissolt en el medi es mesura mitjançant una sonda d'oxigen (mod. 33187703, Mettler Toledo, Küsnacht, Suïssa), aquest es manté per sobre del 20% mitjançant un cabal d'aire de 4 l min<sup>-1</sup> per la fase de creixement en glicerol i de 2 l min<sup>-1</sup> per les posteriors fases. Un cabalímetre màssic (Bronkhorst HYTEC, Ruurol, Holanda), incorporat al sistema, controla la quantitat d'aire que s'introdueix dins del fermentador entre un rang de 0 –10 l min<sup>-1</sup>. Les sondes de pH i d'oxigen dissolt es calibren per cada cultiu. Com a medi de fermentació s'utilitzen els descrits en l'apartat *3.2 Medis de cultiu*. El medi s'esterilitza amb el reactor i les sals traça i la biotina s'afegeixen un cop esterilitzada la resta, filtrant-les amb un filtre estèril de 0.45 µm (Millipore). L'inòcul es realitza a partir d'un cultiu en flascons agitats tal com s'ha descrit a l'apartat *3.7.1 Cultius en flascons agitats*. Aquest cultiu es centrifuga (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa) a 11300 g durant 30 minuts. Les cèl·lules es resuspenen amb 50 ml de solució isotònica estèril i s'inocula el fermentador.

A l'utilitzar el sorbitol com a cosubstrat els cultius presenten 3 fases: la primera un cultiu en discontinu de  $40 \text{ g l}^{-1}$  de glicerol, la segona una fase de transició i la tercera una fase d'inducció. Un cop esgotat el glicerol en el medi de cultiu de la primera fase, s'inicia la fase de transició. S'afegeixen al cultiu dues addicions puntuals de  $5 \text{ g l}^{-1}$  de metanol i  $10 \text{ g l}^{-1}$  de sorbitol, esterilitzats prèviament. Un cop finalitzada la fase de transició, indicada per un augment al senyal de  $p\text{O}_2$  degut a l'esgotament dels substrats, s'inicia la fase d'inducció. S'activa el control de metanol, i per realitzar el control de la concentració d'aquest al interior del reactor, es posarà en marxa l'estratègia de control descrita a l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisi de la concentració de metanol en línia* desenvolupat per Cos *et al.*, (2006). El sorbitol s'introduirà al interior del reactor, mitjançant una addició exponencial preprogramada, equació descrita en l'apartat 3.6.3 *Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol)*, d'aquest treball. Al arribar als  $40 \text{ g l}^{-1}$  de biomassa al interior del reactor, s'afegeix la font de nitrogen en forma de clorur d'amoni 4M, per evitar limitacions d'aquest durant el cultiu (Cos *et al.*, 2005).

A l'utilitzar el glicerol com a cosubstrat els cultius presenten 2 fases: la primera un cultiu en discontinu de  $40 \text{ g l}^{-1}$  de glicerol i una segona una fase d'inducció. A l'utilitzar el glicerol com a cosubstrat no es realitzarà fase de transició degut a que es continuarà utilitzant el glicerol com a font de carboni en la posterior fase. L'estratègia d'addició dels substrats es realitzarà de la mateixa forma que s'addicionen a l'utilitzar el sorbitol com a cosubstrat.

A l'utilitzar el metanol com a única font de carboni, els cultius inclouran 3 fases: una primera fase corresponent a un discontinu amb glicerol de  $40 \text{ g l}^{-1}$ , una segona fase de transició i una tercera fase d'inducció. La fase de transició tindrà una durada de 5 h, modificant la seqüència proposada prèviament per Katahura *et al.*, (1998). Durant les primeres dues hores l'addició de glicerol correspon a  $300 \mu\text{l min}^{-1}$ . Posteriorment aquesta disminueix a  $160 \mu\text{l min}^{-1}$  durant la tercera hora, a  $100 \mu\text{l min}^{-1}$  durant la quarta hora i finalment a  $65 \mu\text{l min}^{-1}$  durant la cinquena hora. D'altra banda, l'addició del metanol s'inicia a la tercera hora i es manté constant a un cabal de  $100 \mu\text{l min}^{-1}$  fins al final d'aquesta fase (3h). Aquesta estratègia permet l'adaptació del metabolisme de *P. pastoris* al metanol, substrat que s'utilitzarà com a única font de carboni en l'etapa d'inducció.

Aquestes estratègies d'addició de substrats seran necessàries per a mantenir les concentracions establertes dels substrats en cada cultiu i emprant com a elements actuadors dues microburetes automàtiques esterilitzades químicament prèviament a la seva utilització.

### 3.8 Càlculs

En aquest apartat es presenten les bases teòriques i les eines utilitzades pel càlcul d'alguns paràmetres que ajuden a interpretar i obtenir més informació dels cultius.

#### 3.8.1 Càlcul de la $\mu$ , $q_s$ i $q_p$

A partir de les principals variables de seguiment durant la fermentació, la concentració de biomassa, de substrat i d'enzim es poden calcular les velocitats específiques de creixement ( $\mu$ ), de consum de substrat ( $q_s$ ) i de producció de lipasa expressada com unitats d'activitat ( $q_p$ ), respectivament.

Aquestes variables poden donar informació molt valuosa per analitzar a posteriori l'evolució de la fermentació, per relacionar-les amb l'estat fisiològic del microorganisme i per a la detecció de canvis de comportament.

Es suavitzen aquestes dades experimentals mitjançant rutines matemàtiques (Matlab 6.1 Curvefit Toolbox, The Mathworks Inc., Natick, USA).

Durant el cultiu la quantitat de biomassa augmenta de tal forma que el volum de la fase aquosa es redueix progressivament. Algunes dades experimentals, com l'activitat lipolítica extracel·lular i la concentració de substrats, es determinen únicament a partir dels sobrenedants. Així doncs cal tenir en compte el volum ocupat per la biomassa a l'hora d'expressar les concentracions determinades en la fase líquida en funció del volum total del bioreactor (Borzani 2003). Els valors expressats al llarg d'aquest treball corresponen a les concentracions de substrat i activitat lipolítica determinades per unitat de volum de brou de cultiu. Els cabals de substrat adicionats es determinen a partir de les alimentacions de les microburetes, així com també el cabal de base introduït al



sistema. El volum del fermentador s'estima a partir del volum inicial i el còmput de les addicions successives de substrats i extraccions puntuals significatives. Es descompten els volums retirats del bioreactor, que es poden entrar informàticament per a la correcció del volum.

Les velocitats específiques es calculen a partir de les dades recollides i els balanços de matèria del cultiu mitjançant un programari desenvolupat anteriorment pel grup d'investigació (Cos *et al.*, 2005; Cos 2005).

A continuació s'indiquen els corresponents balanços per cultius en discontinu i semicontinu.

### 3.8.1.1 Cultiu en discontinu

#### Biomassa

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.5}$$

#### Substrat

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.6}$$

#### Producte

$$q_p = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.7}$$

### 3.8.1.2 Cultiu en semicontinu

El procés en semicontinu es caracteritza per l'entrada de substrat amb la corresponent variació de volum ja que no hi ha cap corrent de sortida.

### Biomassa

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} + \frac{F}{V} \quad \text{eq. 3.8}$$

El càlcul de la  $\mu$  per a un cultiu en semicontinu depèn del cabal de substrat addicionat, el volum, la biomassa i la variació d'aquesta última al llarg del temps.

### Substrat

$$q_s = -\left(\frac{dS}{dt} + \frac{F \cdot (S - S_0)}{V}\right) \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.9}$$

Per al càlcul de  $q_s$  s'ha de conèixer el valor de la biomassa, el cabal addicionat, el volum, la diferència de concentracions de substrat entre l'aliment i a l'interior del bioreactor, i la variació de la concentració d'aquesta al llarg del temps.

### Producte

$$q_p = \left(\frac{dP}{dt} + \frac{F \cdot P}{V}\right) \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.10}$$

Per determinar la  $q_p$  és necessari conèixer la concentració de producte a l'interior del fermentador, juntament amb la seva evolució al llarg del temps, el cabal d'alimentació, el volum i la concentració de la biomassa.

### 3.8.2 Càlculs dels valors mitjans

En molts casos serà de gran ajut conèixer els valors mitjans d'algunes d'aquestes variables calculades en un període o etapa de la fermentació. La metodologia de càlcul és integrar l'evolució d'aquesta variable en el temps pel període desitjat i dividint aquest valor per al increment de temps, com s'indica a l'equació 3.11.

$$\bar{x} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \int_{t_1}^{t_2} x(t) \cdot dt \quad \text{eq. 3.11}$$

En molts casos però, només es disposa de valors puntuals a certs moments del cultiu i no com es requereix per aquest càlcul, una funció que depengui del temps. Per tant, en aquests casos s'ha d'aproximar els valors puntuals mitjançant una equació i posteriorment realitzar la integració d'aquesta en el període de temps desitjats. El procediment utilitzat doncs, és molt similar al seguit per al càlcul de les derivades. Igualment cal traçar una funció de “*splines*” suavitzada que aproximi els punts de l'evolució temporal de la variable que es desitja conèixer el valor mig.

### 3.8.3 Càlcul dels rendiments

Els rendiments són paràmetres molt importants ja que representen l'eficàcia de conversió d'una variable respecte una altre. Per exemple, el rendiment substrat/biomassa, ens dóna la idea en quin tant per u de cada gram de substrat passa directament a biomassa. Es poden calcular en un interval determinat de la fermentació, sent rendiments parcials o pel contrari per tota la fermentació, anomenant-se rendiments totals. És important entendre que aquests coeficients no es mantenen constants durant tota la fermentació, ja que canvien amb rapidesa segons les necessitats energètiques del microorganisme. Alguns autors (Pirt,1985) han deduït l'estreta relació existent entre el rendiment biomassa/substrat i el coeficient de manteniment.

A continuació es presenta la forma de càlcul dels diferents rendiments, en tots el casos per a cultius en discontinu o semicontinu.

#### 3.8.3.1 Rendiment biomassa / substrat ( $Y_{X/S}$ )

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{eq. 3.12}$$

### 3.8.3.2 Rendiment producte / biomassa ( $Y_{P/X}$ )

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad \text{eq. 3.13}$$

### 3.8.4 Càlcul de les productivitats

La productivitat es pot definir com la relació entre la quantitat de producte obtingut amb els factors per obtenir-la en un determinat període de temps. De forma més concreta en el cas dels bioprocessos la productivitat volumètrica es defineix com la quantitat de producte format per unitat de volum i temps. Anàlogament, la productivitat específica es calcula com la quantitat de producte format per unitat de massa cel·lular i temps.

Evidentment, i de manera semblant als rendiments, es pot calcular el seu valor per un període de temps o per tot el cultiu, tot i que és aquest últim el que potser és més útil ja que conté una informació més valuosa.

La metodologia de càlcul és senzilla,

$$\text{Productivitat Volumètrica} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{eq. 3.14}$$

$$\text{Productivitat específica} = \frac{\Delta P}{\Delta X \Delta t} \quad \text{eq. 3.15}$$

on

$\Delta P$ : Increment de productivitat (UA l<sup>-1</sup>).

$\Delta t$ : Increment de temps (h).

$\Delta X$ : Increment de la concentració de biomassa (g l<sup>-1</sup>).

### 3.9 **Bibliografia**

Borzani W. Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnol. Lett.* 2003;25:1953-1956.

Bradford MM. *Anal. Biochem.* 1976;72:248–254.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnol. Bioeng.* 2006;95:145-154.

Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. Heterologous protein production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochem. Eng. J.* 2005;26:86-94.

Cos O. Memòria de tesi doctoral. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. 2005. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y, Suga K-I. Effect of methanol concentration on the production of human b2- glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferment Bioeng.* 1998;86:482–487.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227-680.

Minning S, Schmidt-Danner, C, Schmid RD. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnol.* 1998;66:147-156.

Pirt S.J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* Blackwell Scientific Publications. 1985. Oxford. ISBN: 0632081503.



# Capítol 4:

## Optimització del sistema de producció de ROL en *Pichia pastoris* utilitzant un sistema de 48 milibioreactors agitats treballant en paral·lel

---

Realitzat en col·laboració amb:

Technical University of Munich  
Institute of Biotechnical Engineering







## 4 Optimització del sistema de producció de ROL en *Pichia pastoris* utilitzant un sistema de 48 milibioreactors agitats treballant en paral·lel

### 4.1 RESUM

La realització de nous processos biològics requereix llargues etapes d'optimització del procés de producció abans d'arribar a produccions a escales superiors. En aquest capítol es presenta un sistema de 48 milibioreactors agitats amb un volum màxim de treball de 15 ml que possibilita la realització de diverses condicions de cultiu a la vegada, disminuint el temps requerit durant les primeres etapes d'investigació (selecció dels clons més productius, dels medis de cultiu, dels substrats òptims, etc), substituint els clàssic sistema de flascons agitats. Aquest sistema millora el sistema de flascons agitats, en el sentit que possibilita el control del pH, la monitorització del pO<sub>2</sub> i un sistema de presa de mostres automàtic que permetrà realitzar un seguiment exhaustiu del creixement cel·lular. Aquest treball es realitza en col·laboració amb el grup liderat pel Prof. Weuster-Botz de la Universitat Tècnica de Munich (Garching, Alemanya).

S'utilitzen soques de *P. pastoris* productores de ROL sota promotors induïbles (AOX i FLD), i sota el promotor constitutiu GAP. Al treballar amb el promotor AOX s'utilitza metanol i sorbitol com a fonts de carboni, i al treballar amb el promotor FLD s'utilitza sorbitol com a font de carboni i metilamina com a font de nitrogen i agent inductor a la producció. Finalment a l'utilitzar el promotor constitutiu GAP s'utilitza glucosa com a font de carboni.

Inicialment es realitzen cultius en discontinu utilitzant el glicerol com a font de carboni amb el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*, per avaluar el creixement dels microorganisme sota el nou sistema. Es realitza un canvi d'escala favorable obtenint valors similars als obtinguts prèviament per altres autors treballant a escales de 5 l.

Posteriorment es realitzen cultius en discontinu utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* amb metanol com a única font de carboni, i alhora utilitzant substrats mixtes (sorbitol i metanol). A l'utilitzar el metanol com a única font de carboni no es registra

un augment de la densitat òptica, D'altra banda el cultiu que contenia sorbitol va presentar un lleuger augment de la densitat òptica durant les primeres hores de cultiu, associat al consum del sorbitol. El problema principal restava en la pèrdua del metanol per *stripping* a la sortida dels reactors a una velocitat de  $0.5 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Posteriorment es decideix realitzar cultius mitjançant una estratègia en semicontinu incloent una primera fase de creixement amb glicerol per tal d'obtenir biomassa, i posteriorment s'inicia la fase de producció, on el metanol i el sorbitol són afegits al llarg del cultiu. A l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup> s'addiciona el metanol suposant una  $q_{\text{sMet}}$  corresponent a  $0.06 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ g}_{\text{X}}^{-1} \text{ l}^{-1}$  i amb el fenotip Mut<sup>s</sup> corresponent a  $0.024 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ g}_{\text{X}}^{-1} \text{ l}^{-1}$ . A l'utilitzar el sorbitol (fenotip Mut<sup>s</sup>) aquest s'addiciona suposant un consum corresponent a  $0.022 \text{ g}_{\text{Sor}} \text{ g}_{\text{X}}^{-1} \text{ l}^{-1}$ . Alhora es realitzen cultius en discontinu amb metanol com a font de carboni (fenotip Mut<sup>+</sup>) i utilitzant substrats mixtes (sorbitol i metanol) (fenotip Mut<sup>s</sup>). Independentment de l'estratègia escollida, en tots els cassos s'addiciona el metanol corresponent a la pèrdua d'aquest per *stripping*. En tots els cultius realitzats en semicontinu s'observen acumulacions dels substrats, no registrant-se augments en la densitat òptica, alhora al realitzar cultius en discontinu, tampoc es registren augments en la densitat òptica. S'analitza l'activitat lipolítica dels cultius, no obtenint activitat en cap de les condicions testades. Per tant, es descarta la utilització del sistema de 48 milibioreactors per treballar amb soques induïbles amb metanol.

Posteriorment es treballa amb el promotor alternatiu induïble FLD. Es realitzen cultius en discontinu estudiant l'efecte de les diferents proporcions dels substrats (sorbitol/metilamina). No s'observa un augment de la densitat òptica en cap de les condicions provades. Aquest fet es relaciona amb la fase de latència presentada (aprox. 10 h) pels microorganismes abans no inicien el consum dels substrats. Es registra una disminució en la densitat òptica després de 10 h de cultiu, associada a la lisi cel·lular i adherència de la biomassa a les parets dels milibioreactors. Es troba una estreta relació entre la  $\mu$  registrada i la funcionalitat del sistema de 48 milibioreactors, no trobant-se resultats favorables a  $\mu$  inferiors a  $0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Es descarta la utilització de promotors induïbles amb el sistema de milibioreactors, i finalment s'estudia el promotor constituïu GAP per a la producció de ROL amb *P. pastoris* que permetrà treballar a  $\mu$  superiors a l'utilitzar com a font de carboni la glucosa. Es realitzen cultius en discontinu obtenint augments de la densitat òptica

equivalents a sistemes de treball amb volums superiors. No es detecta activitat lipolítica, però tot i així, l'activitat lipolítica obtinguda a volums superiors de treball (1 l) es troba molt per sota dels nivells registrats al treballar amb el promotor AOX. Per tant, el sistema de 48 milibioreactors es proposarà com una eina útil per optimitzar el procés de producció de ROL amb *P. pastoris* utilitzant el promotor constitutiu GAP, un cop la soca hagi estat optimitzada mitjançant eines d'enginyeria genètica, per millorar els problemes d'expressió que actualment presenta. Posteriorment es podrà realitzar la selecció del clon més productiu i es dissenyarà l'estratègia més eficient utilitzant el sistema de 48 milibioreactors.

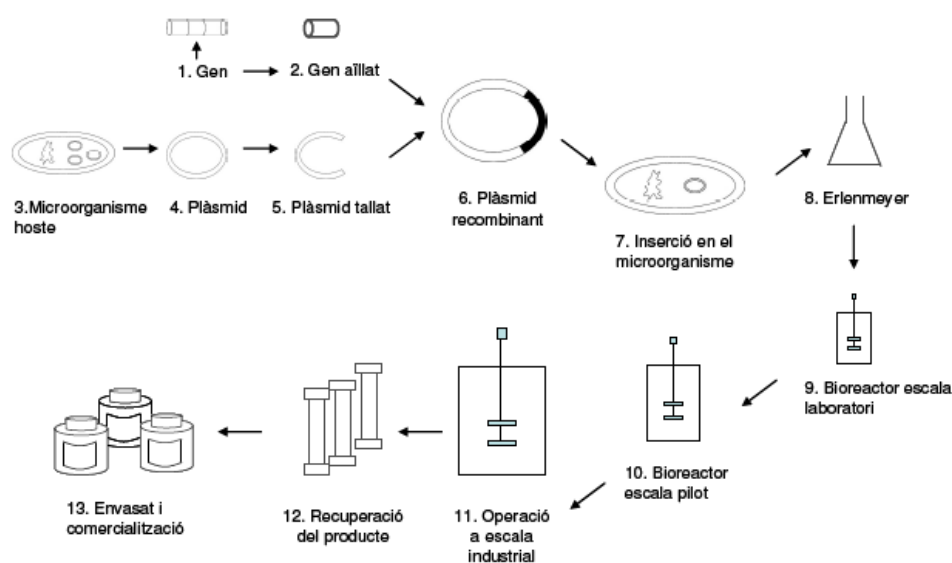


## 4.2 INTRODUCCIÓ

Al desenvolupar un nou procés o producte amb activitat biològica, els quals s'obtenen a partir de processos biològics, es requereix de diferents passos abans no s'arriba a produccions industrials. Aquestes primeres etapes inclouen entre altres; enginyeria genètica per tal d'expressar el producte d'interès de forma recombinat, selecció de la soca més efectiva, optimització del medi de cultiu, determinació dels paràmetres cel·lulars (de creixement, d'expressió, metabolisme, etc), optimització del procés de producció, avaluació de la qualitat del producte obtingut, etc. Totes aquestes determinacions requereixen llargs períodes d'investigació, degut a la complexitat del procés a desenvolupar. A la vegada, també és important dur a terme els diferents passos mirant de que les condicions siguin semblants a com seran en el procés final, per tal de poder determinar biomassa final generada, generació de subproductes, toxicitat d'aquests, etc, i que els processos siguin repetitius.

Cal tenir present totes les fases que implica la realització d'un procés, des del moment que s'inicia el procés biològic, fins a la comercialització del producte. Doran (1998), mostren de forma genèrica les etapes que poden incloure el desenvolupament d'un bioproces. A la figura 4.1, les primeres etapes (1-7) estan relacionades amb la manipulació genètica de l'organisme hoste, on s'hi incorpora ADN provinent d'un altre organisme que li proporcioni la capacitat de produir una determinada molècula. Les tasques d'enginyeria genètica són realitzades a petita escala, habitualment per biòlegs moleculars, que en termes de bioprocés, tenen com a paràmetres principals l'estabilitat de les soques obtingudes i el nivell d'expressió del producte desitjat. Després del clonatge, les característiques de les soques i la seva productivitat es mesuraran en funció de l'ambient de cultiu (etapa 8), de manera que seran necessàries tasques d'optimització de tal ambient de cultiu (medi, temperatura, pH si es pot controlar), realitzant els anàlisis cinètics i de productivitat pertinents. Una vegada conegudes les condicions òptimes del cultiu a petita escala comença el procés de canvi d'escala, començant per un reactor a escala laboratori (500 ml - 5 l), equipat amb instrumentació per a seguir i ajustar temperatura, pH, concentració d'oxigen dissolt, velocitat d'agitació i altres variables del procés. En aquesta etapa (etapa 9) s'obté informació sobre les necessitats d'oxigen, característiques de generació d'espuma, entre altres, i també caldrà decidir l'estratègia de cultiu (continu, discontinu, semicontinu, perfusió). En les etapes següents (etapes 10-11), s'augmentarà

progressivament el volum dels bioreactors, tenint com a objectiu que el canvi del disseny, geometria, sistemes d'agitació i aeració no afectin significativament al creixement i productivitat òptimes establertes a escala laboratori. Una part molt important del procés la constitueix la recuperació del producte (etapa 12). El cultiu resultant de la fermentació es sotmet a una sèrie de passos per tal d'obtenir el producte final amb la puresa desitjada, en funció de la naturalesa del producte (intracel·lular/extracel·lular), i dels seus contaminants. Cal tenir en compte que la purificació pot suposar una part molt important del cost total del procés, arribant-se en determinats casos fins el 80-90% del cost del procés. Una vegada el producte ha estat aïllat i purificat de forma suficient, aquest pot ser envasat i comercialitzat (etapa 13).



**Figura 4.1:** Etapes pel desenvolupament d'un bioprocés fins a la comercialització d'un producte biotecnològic (Doran, 1998).

Un altre element a tenir en compte en el desenvolupament de bioprocessos és l'elevada importància del factor temps, ja que les empreses intenten minimitzar els mesos dedicats al desenvolupament, per a facilitar l'entrada del procés en la fase productiva i la ràpida comercialització del producte, tan bon punt supera les fases clíniques i rep la corresponent aprovació. En alguns casos aquesta pressió per iniciar la fase comercial provoca que es desenvolupin processos de forma subòptima, de manera que quan aquests operen a escala de producció, el volum (i per tant, el cost) de l'equipament de procés emprat sigui major al que es requeriria si s'hagués realitzat una millor aproximació a l'òptim d'operació. Parlant des del punt de vista de l'equipament emprat, de forma general es pot considerar que les etapes de desenvolupament d'un determinat producte d'origen biotecnològic, consten d'unes primeres fases d'experimentació a petita escala on el nombre d'experiments a

realitzar és molt elevat, i a continuació, una vegada identificades les molècules/clons d'interès, es procedeix cap a majors escales, acostant-se progressivament a la que serà l'escala de producció.

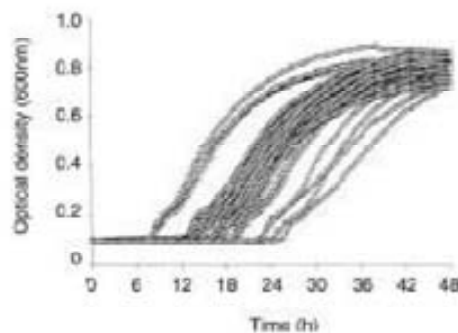
El clàssic sistema utilitzat mitjançant l'ús de flascons agitats en els primers passos alhora de generar d'un nou producte, es troba limitat, en el sentit que no presenten sistemes de monitorització ni control de variables com per exemple, el pH o  $pO_2$ . Per tal de superar aquestes limitacions diferents empreses comercials han desenvolupat sistemes per poder garantir aquest producte al mercat. Aquests sistemes haurien de ser automatitzats, que permetessin realitzar les primeres fases d'estudi dels processos, en les condicions finals i que aquests garanteixin una repetitivitat, per així emprar el mínim temps possible i així accelerar el procés de desenvolupament dels bioprocessos i facilitar el llançament del nou producte al mercat.

Mentre que en les primeres etapes de selecció existeixen robots que permeten l'anàlisi d'activitats d'un nombre molt elevat de cèl·lules i molècules en temps reduïts, a escala comercial pràcticament no existeixen productes amb un concepte similar al de HTS (*High Throughput Screening*; anàlisi d'alt rendiment) a nivell de minibioreactors, que permeti realitzar de forma fiable i en petits volums (d'uns pocs mil·lilitres) les proves que habitualment es realitzen o bé en sistemes de cultiu sense seguiment de les variables crítiques o bé en bioreactors de volums més elevats, que fan que els processos d'elecció siguin lents i tinguin associat un cost elevat.

Així doncs, es considera que seria interessant disposar de sistemes de múltiples minibioreactors agitats i monitoritzats que permetin realitzar les primeres fases del desenvolupament del bioprocés de forma ràpida, sistemàtica i amb informació rellevant sobre l'evolució de les principals variables de cultiu, de forma que es pugui passar a les següents etapes del procés (amb bioreactors de volum superior) amb un coneixement real de les capacitats d'un determinat cultiu en relació a les principals variables del cultiu. D'aquesta manera, en els subseqüents canvis d'escala es podrà discriminar entre aquells efectes directament relacionats al mateix, i els provocats pels canvis en les condicions ambientals del cultiu.

Cal indicar que el desenvolupament i la utilització dels minibioreactors no implicaria una substitució total dels bioreactors convencionals, ja serà necessari continuar efectuant els estudis de canvi d'escala, però sí que permetria la realització de sèries d'experiments molt més àmplies en un temps menor, menors costos, i amb resultats rellevants que, per tant, permetrien millorar de forma notable la quantitat i qualitat de les dades obtingudes en les primeres etapes de desenvolupament de bioprocés, abans de passar a les següents on ja s'emprarien bioreactors convencionals, a partir de l'extens coneixement previ adquirit. Existeixen diferents sistemes comercials, que implementen la utilització de milibioreactors. A continuació es presenta un resum de les característiques principals dels diferents equips disponibles al mercat:

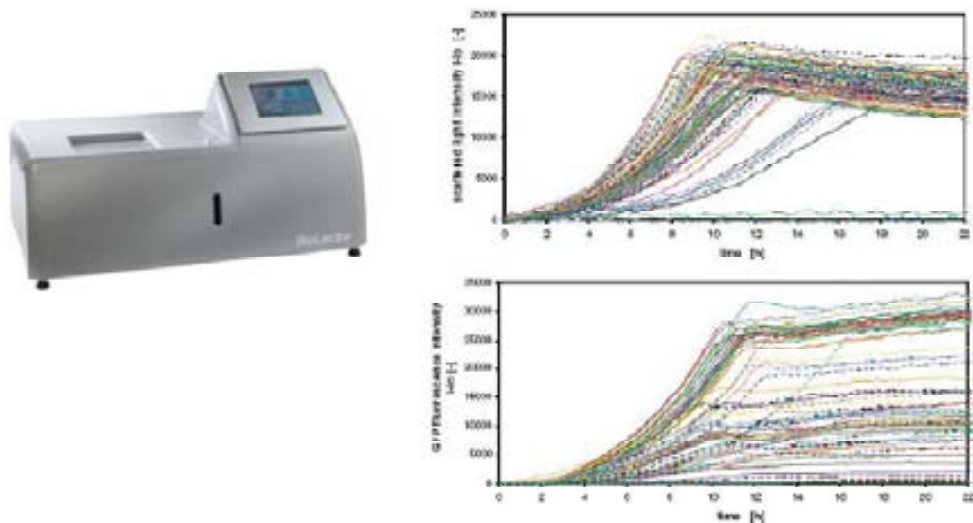
– **Bioscreen C MBR** (Oy Growth curves, Helsinki, Finlàndia) és un sistema per a l'automatització de treball microbiològic, que permet el cultiu en microplaques fins a 200 pous de cultiu, amb una capacitat de 400 µl cadascun. L'equip disposa d'un sistema d'agitació orbital de la placa, control de temperatura i mesura d'absorbància a diferents longituds d'ona. És adequat per cultius amb bacteris i llevats. No permet ni la mesura ni control de la concentració d'oxigen dissolt. Les mesures en línia de creixement es realitzen a partir de la turbolesa del medi, sense donar cap informació addicional sobre l'estat metabòlic del cultiu. A la figura 4.2 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. Concretament les corbes de creixement que es mostren corresponen a cultius de *Salmonella*, dels quals s'estudia els temps de latència després de tractaments tèrmics.



**Figura 4.2:** A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves, Finlàndia). A la dreta, corbes de creixement (evolució de l'absorbància a 600 nm en el temps) per a cultius de *Salmonella* obtinguts amb aquest equip. Font: Stephens *et al.*, (1997), i [www.bioscreen.fi](http://www.bioscreen.fi).



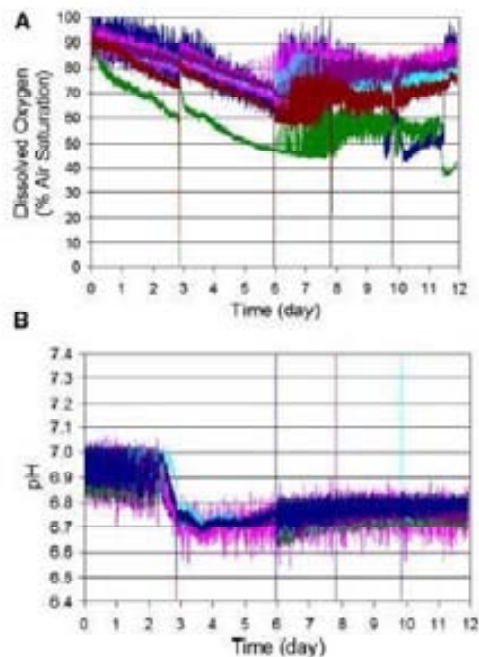
– **Biolector**<sup>®</sup> (m2p-labs, Aachen, Alemanya). En aquest cas es tracta d'un lector de plaques multipou, amb capacitat per plaques de 48 i 96 pous amb un volum de treball compres entre 100 i 2000  $\mu$ l. L'agitació és realitza mitjançant placa agitadora orbital situada sota els minibioreactors que es mou juntament amb aquests. L'equip té la capacitat de seguir, individualment per cada minibioreactor, pH, oxigen dissolt i absorbància. Aquest sistema, tot i no presentar agitadors individuals per cada un dels minibioreactors permet garantir l'aireació suficient per a soques com *P. pastoris*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, entre d'altres. La figura 4.3 mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas es mostren les corbes de creixement per a 96 clons diferents de *Hansenula polymorpha* (es segueix la terbolesa a partir de la llum dispersada), així com la producció de GFP (s'empra el canal de mesura de fluorescència, que alternativament pot ser utilitzat per a seguir o l'oxigen dissolt o el pH).



**Figura 4.3:** A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Biolector (m2p-labs, Aachen, Alemanya). A la dreta, corbes de creixement de *Hansenula polymorpha* seguint a dalt el creixement dels cultius per la terbolesa de la suspensió cel·lular (scattered light intensity) i a baix, emprant el canal de mesura de fluorescència que pot ser emprat per a seguir el pH o l'oxigen dissolt, per a seguir l'expressió de GFP (green fluorescent protein).

Font: [www.dasgip.com](http://www.dasgip.com) (distribuïdor equip actual).

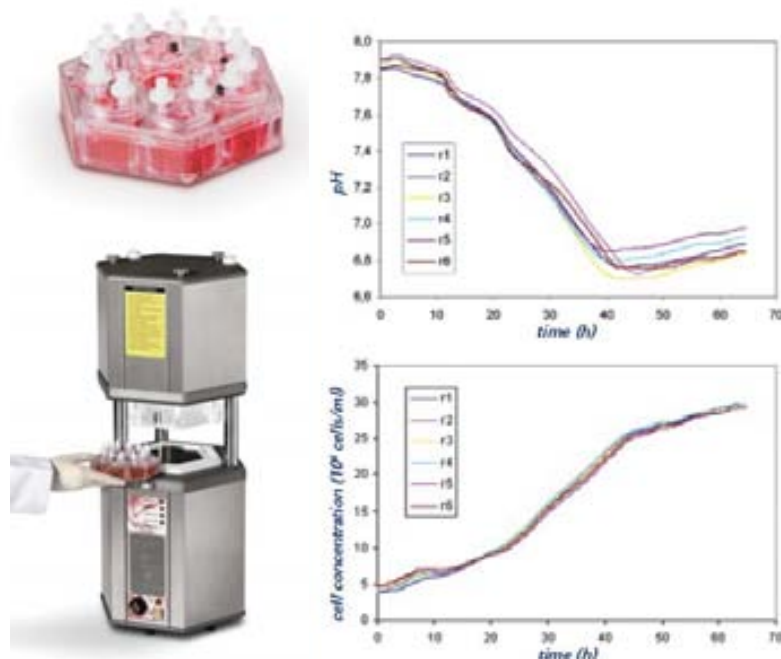
– **Micro 24 Bioreactor**<sup>®</sup> (MicroReactor Technologies, Mountain View, Estats Units; actualment part de Pall Life Sciences). Sistema amb 24 minibioreactors que poden operar en paral·lel, amb capacitat de controlar diferents temperatures a cadascuna de les posicions. El conjunt de minibioreactors està inclòs en una placa d'un sol ús, que s'agita mitjançant una placa agitadora externa que es mou juntament amb els minibioreactors. Cadascun d'ells té uns 10 ml de volum (volum de treball entre 3 i 7 ml), de forma tubular, efectuant-se l'aeració a través de membranes permeables a gasos. El seguiment de pH i d'oxigen dissolt es du a terme mitjançant membranes amb fluoròfors incorporats. A la figura 4.4 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas, es mostren les corbes de seguiment per a 24 cultius a una única condició amb cèl·lules de CHO, on es monitoritza l'oxigen dissolt i l'evolució del pH.



**Figura 4.4:** A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Micro 24 Bioreactor<sup>®</sup> (MicroReactor Technologies, Mountain View, Estats Units). A la dreta, corbes de seguiment per a 24 cultius de CHO a les mateixes condicions. A dalt seguiment de l'oxigen dissolt (dissolved oxygen) en el temps, i a baix, seguiment de l'evolució del pH en el temps.

Font: Chen *et al.*, (2009); [www.applikon-bio.com](http://www.applikon-bio.com) (nota: Applikon ha estat el distribuïdor de l'equip durant els darrers anys fins a l'adquisició de l'empresa per part de Pall).

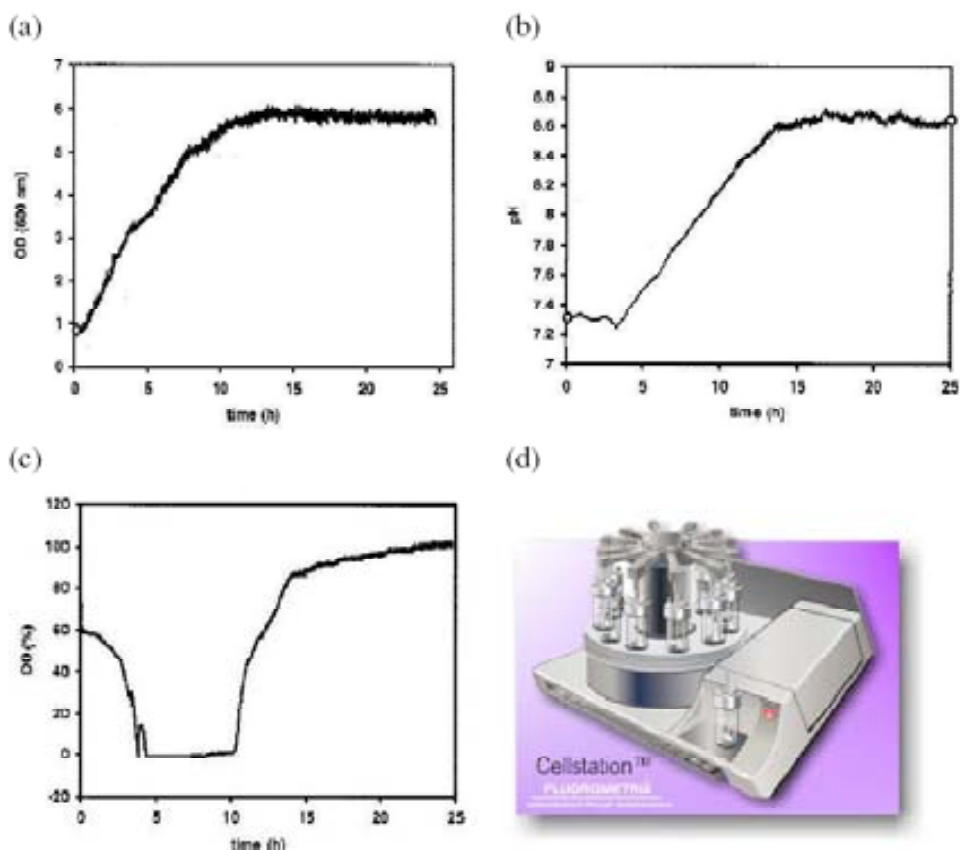
– **HexaScreen** (HexaScreen Culture Technologies S.L., Barcelona, Spain; actualment distribuït per Telstar Technologies, Barcelona, Spain). Sistema amb 6 minibioreactors d'un sol ús amb un volum de treball de 10-15 ml. Permet mesures i control sobre l'agitació, el pH, el  $pO_2$  i facilita l'adquisició d'indicadors addicionals de creixement i metabolisme cel·lular. Cal destacar, que els estudis realitzats amb aquest sistema es centren en cultius amb cèl·lules animals, no obtenint resultats favorables per cultius realitzats amb *P. pastoris*, ja que el sistema no presenta la capacitat per subministrar l'oxigen necessari per garantir el creixement del microorganisme. A la figura 4.5 es mostra una imatge de l'equip (estació de treball i placa composta per 6 minireactors), així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar els cultius. En aquest cas es mostren les corbes de seguiment per a 6 cultius d'hibridomes treballant sota idèntiques condicions de cultiu, on es monitoritza l'evolució del pH i la concentració cel·lular ( $10^5$  cèl·lules  $ml^{-1}$ )



**Figura 4.5:** A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors HexaScreen (HexaScreen Culture Technologies S.L., Barcelona, Spain; actualment distribuït per Telstar Technologies, Barcelona, Spain). A dalt el sistema de 6 minireactors de 15 ml de capacitat equipats amb filtres a l'entrada i sortida d'aire. A baix el sistema HexaScreen. A la dreta, corbes de seguiment per a 6 cultius d'hibridoma a les mateixes condicions. A dalt el seguiment de l'evolució del pH en funció del temps, i a baix, el seguiment de l'evolució de la concentració de cèl·lules en el temps.

Font: Soley (2010); [www.telstar-lifesciences.com](http://www.telstar-lifesciences.com).

– **Cellstation<sup>TM</sup>** (Fluorometrix, USA). El concepte d'aquest producte és d'un sistema de múltiples bioreactors (12 en paral·lel) on es controlen paràmetres com l'agitació, oxigen dissolt i pH, i es segueix l'evolució de la concentració cel·lular a partir de l'absorbància. En aquest cas, els reactors utilitzats no són d'un sol ús i, per tant, requereixen neteja i esterilització en cada ús. El volum de treball d'aquest correspon a 35 ml. A la figura 4.6 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas, es mostren les corbes de seguiment per a un cultiu de *E. coli* realitzades durant la validació tecnològica del sistema, on es segueix l'evolució del cultiu mitjançant l'absorbància a 600 nm, el seguiment del pH (que mostra una basificació progressiva fins que aquesta s'estabilitza quan el cultiu arriba a un *plateau* de creixement), i de l'oxigen dissolt que en aquest cas evidencia limitacions al sistema d'aeració.



**Figura 4.6:** (a) Evolució temporal de l'absorbància (OD) a 600 nm, (b) evolució temporal del pH, (c) evolució temporal de l'oxigen dissolt, i (d) imatge del sistema de minibioreactors Cellstation<sup>TM</sup> (Fluorometrix, USA).

Font: Kostov *et al.*, (2001); [www.fluorometrix.com](http://www.fluorometrix.com).

– **MiniBioreactor** (Applikon Biotechnology B.V., Schiedan Holanda). Es un sistema compostat per 4 minibioreactors en paral·lel d'un volum de treball entre 200 i 800 ml. Aquest sistema presenta característiques similars amb els bioreactors de volums superiors (agitació amb pales tipus Rushton, entrada d'aire i substrats, control i monitorització de pH, temperatura, pO<sub>2</sub>, biomassa, etc). La figura 4.7, mostra el sistema de reactors. Aquest sistema es comercialitzarà a partir de l'Abril 2011.



**Figura 4.7:** Imatge del sistema Minibioreactor (Applikon Biotechnology B.V., Schiedan Holanda).

Font: [www.applikon-bio.com](http://www.applikon-bio.com)

A part dels sistemes comercials que presenta el mercat, a la bibliografia existeixen diferents treballs en aquesta mateixa línia, on l'objectiu ha estat disminuir el volum de treball per a dur a terme processos en paral·lel optimitzant el desenvolupament d'aquests (Kostov *et al.*, 2001; Lamping *et al.*, 2003; Vallejos *et al.*, 2006; Harms *et al.*, 2006; Betts *et al.*, 2006).

També hi ha hagut un gran interès en augmentar el nombre de bioreactors en paral·lel de forma eficient, per tal de poder realitzar diferents condicions de cultiu al mateix temps, evitant així el consum de temps que suposaria realitzar els experiments de forma individual. Un factor important que s'ha hagut de tenir en compte, és el de garantir la reproductibilitat dels bioprocessos. El problema més important relacionat amb la reproductibilitat dels processos ha estat relacionat amb el sistema d'addició d'aire al sistema, havent de ser igual per a tots els bioreactors.

Davant d'aquesta problemàtica Puskeiler *et al.*, (2005), desenvolupen un sistema d'agitadors magnètics, utilitzant un cabal d'aire entrant. Utilitzen un volum de treball de 10 ml (volum màxim 15 ml), i els estudis de  $k_{La}$  realitzats per aquets autors determinen un valor de  $k_{La}$  corresponent a  $0.4 \text{ s}^{-1}$ . Els 48 milibioreactors (ordenats amb 6 files i 8 columnes) disposen d'un agitador magnètic, que permet agitar a la mateixa velocitat tots els reactors (Weuster-Botz *et al.*, 2005). Per tant, aquest sistema permetrà l'optimització eficient de processos tant en discontinu com en semicontinu, ja que si es compara amb el temps que requeriria un cultiu realitzat a escala laboratori on el temps i el treball humà és molt superior, aquest sistema redueix considerablement el temps requerit per a dur a terme el procés (Knorr *et al.*, 2007). Puskeiler *et al.*, (2005), realitzen experiments en paral·lel (48 bioreactors) utilitzant estratègies tant en discontinu com en semicontinu amb *Escherichia coli* obtenint resultats reproduïbles.

Recentment Kusterer *et al.*, (2008) equipen el bloc de bioreactors amb 48 reactors d'un sol ús, disposant cada un d'ells agitadors mecànics, sensors de pH i de  $pO_2$ , permetent la monitorització i control d'ambdós paràmetres. Prèviament Knorr *et al.*, (2007), realitzen amb èxit el procés de canvi d'escala utilitzant el mateix sistema, pel procés industrial en semicontinu per produir riboflavina amb *Bacillus Subtilis*. Posteriorment Vester *et al.*, (2009), realitza un estudi exhaustiu de diferents soques productores de riboflavina, utilitzant diferents estratègies de procés. Aquests estudien el comportament de les diferents soques en el bloc de reactors, amb un volum de treball de 10 ml. Les soques seleccionades com a més productives es cultiven en reactors a volums de 3 i 6 l de treball, obtenint resultats similars en totes les escales utilitzades. Kusterer *et al.*, (2008) realitzen estudis utilitzant *Saccharomyces cerevisiae*, obtenint el mateix perfil de creixement per una escala de 10 ml i de 20 litres. Per tant, es realitza favorablement el canvi d'escala.

Tal i com expliquen els anteriors autors, aquesta tècnica pot ser utilitzada per realitzar la selecció de diferents clons, permeten treballar en condicions similars a les que ens trobaríem en el processos industrials, facilitant la realització de rèpliques dels cultius garantint la reproduïbilitat dels processos. Alhora cal destacar que aquest sistema permetrà treballar en condicions similars a les que ens trobaríem en les posteriors etapes, sobretot pel que fa a les taxes de transferència d'oxigen.

Per tant, observant que el sistema de 48 milibioreactors permet treballar de forma satisfactòria tant amb llevats com amb bacteris, l'objectiu ha estat avaluar la funcionalitat de l'equip de 48 milibioreactors, desenvolupat pel grup liderat pel Dr. Weuster-Botz, durant una estada a Alemanya als laboratoris del TUM (*Technical University of Munich*), per a la producció de lipases de *Rhizopus oryzae* amb diferents soques de *P. pastoris*. Aquest sistema permetrà avaluar diverses condicions en el mateix temps possibilitant la disminució del temps de les primeres fases de desenvolupament del procés biològic, alhora que permetrà reduir costos degut al baix volum de treball utilitzat.

En aquest treball s'utilitzaran diferents construccions genètiques de *P. pastoris*: sota el promotor AOX ( $Mut^+$  i  $Mut^s$ ), i utilitzant promotors alternatius (FLD i GAP). Es realitzaran diferents estratègies de cultiu en discontinu i en semicontinu, en funció de la soca utilitzada. S'avaluaran les diferències en quan al creixement i la producció en funció de les condicions de cultiu emprades i es compararan amb els valors prèviament obtinguts a escales de treball superiors (Ramon *et al.*, 2007; Cos *et al.*, 2006; Resina *et al.*, 2005). Els problemes que inicialment es poden preveure es relacionen amb les limitacions d'oxigen a l'utilitzar el fenotip  $Mut^+$  de *P. pastoris*. Tot i així el sistema permet la utilització d'oxigen pur en el cas que fos necessari el subministrament d'aquest. Per la resta de soques utilitzades, inicialment no es preveuen problemes destacats.

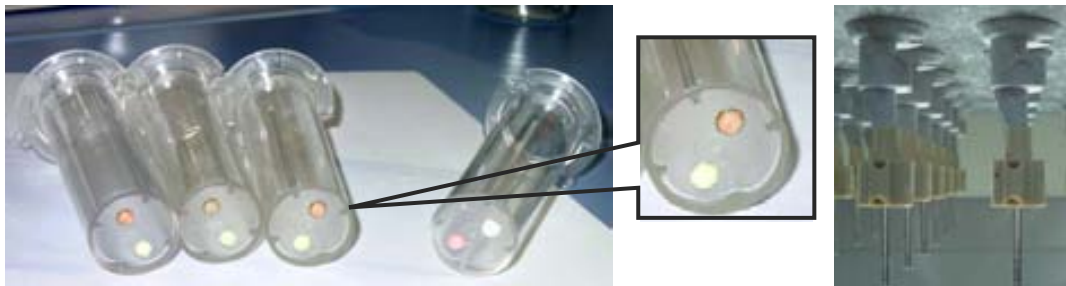




## 4.3 MATERIALS I MÈTODES

### 4.3.1 Bioreactors a escala mil·lilitre

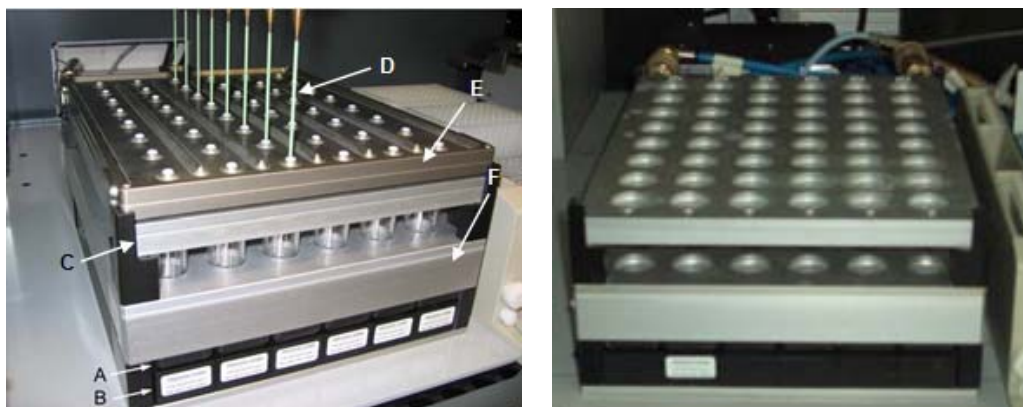
Es van utilitzar reactors d'un sol ús (Mini-Reaktor HTBD, PreSens, Regensburg, Alemanya) prèviament esterilitzats de poliestirè (H+P-Labortechnik, Oberschleißheim, Alemanya). Aquests presenten 4 deflectors, tenen una capacitat màxima de 15 ml i són equipats de forma individual amb un agitador mecànic (figura 4.8). L'oxigen dissolt i el pH es monitoritzen a partir de les lectures de l'evolució de la fluorescència mitjançant dos sensors químics immobilitzats a la part inferior de cada un dels bioreactors (figura 4.8 ampliada).



**Figura 4.8:** A l'esquerra de la imatge es troben els milibioreactors (Mini-Reaktor HTBD, PreSens, Regensburg, Alemanya) utilitzats on s'hi observa a la part inferior d'aquest la presència de dos sensors químics que permeten la monitorització del pH i de l'oxigen dissolt (imatge ampliada). A la dreta de l'imatge s'observen els agitadors mecànics que disposen cada un dels milibioreactors. Tot i trobar-se situats a dalt de la imatge, aquests quan estan operatius es troben situats a la part inferior del suport metàl·lic

Els milibioreactors es troben emmagatzemats en bosses per mantenir-se estèrils. Es retiren de les bosses a una cambra de treball estèril i es col·loquen en les respectives posicions al bloc de reactors. Aquests milibioreactors operen en un bloc de bioreacció per a 48 reactors (figura 4.9), que inclouen en la part inferior 6 lectors de fluorescència que disposen de 8 llums d'excitació i receptors de fotodíodes per a mesurar el pH i l'oxigen dissolt (figura 4.9 A i B). El sistema disposa d'un sistema de fred al capçal dels milibioreactors per evitar l'evaporació del fluid (figura 4.9 C), i d'un sistema de 8 xeringues disposades en paral·lel que permetran introduir substrats o extreure mostres dels milibioreactors (figura 4.9 D). Després de cada addició de base o àcid es realitza la

neteja de les xeringues automàtica amb aigua, al manipular mostres biològiques es realitza un cicle de neteja amb etanol al 70% (v/v) per evitar contaminacions dels cultius.



**Figura 4.9:** A l'esquerra de la imatge es troba el bloc en funcionament. Es pot observar: 6 receptors dels senyal (A) dels sensors químics que proporcionen mesures de pH i oxigen dissolt (B), sistema de fred (C), sistema de 8 xeringues en paral·lel per extreure o addicionar fluids als milibioreactors (D), unitat de distribució de gas estèril pels milibioreactors (E) i sistema d'escalfament per mantenir la temperatura dels cultius a 30°C (F). A l'esquerra de la imatge es pot observar el bloc de 48 reactors sense la tapa superior en que permet veure com quedarien disposats els milibioreactors en la superfície de treball.

Cada un dels 48 milibioreactors estèrils d'un sol ús disposats en la unitat magnètica, s'omplen amb 12 ml de medi de cultiu inoculat en un ambient estèril. Posteriorment es tanca la part superior mitjançant la unitat de distribució de gas estèril (figura 4.9 E) connectada amb els agitadors, i posteriorment es trasllada a la taula de treball del robot (Gènesi PSR 150, Tecan, Crailsheim, Alemanya). A la taula de treball s'hi troben les diferents unitats implicades en el procés (figura 4.10): dispensador d'aigua per realitzar la neteja de les xeringues (A), recollida de residus (B), bloc de bioreactor (C), dispensador d'àcids, bases, substrats, antiescumejant i etanol (D), sistema de neteja per la microplaca en la que es realitzaran les lectures de densitat òptica (Columbus Washer, TECAN, Crailsheim, Alemanya) (E), sistema de xeringues mecanitzades (RSP 150, TECAN, Crailsheim, Alemanya) (F), braç mecanitzat que permetrà l'extracció i addició de substrats als milibioreactors i la mobilització de la microplaca (G), espectrofotòmetre per realitzar lectures de la microplaca (Fluostar Galaxy, bmg labtech, Offenburg, Alemanya) (H), unitat de control del sistema de gasos (WMR 4008, Westphal Mess-und

Regelungstechnik, Ottobrunn, Alemanya) (I), bombes connectades a les xeringues que permetrà l'aspiració i expulsió dels fluids (J), el sistema d'entrada de gasos a la taula de treball (K) i cabalímetres massics (Brooks Instruments, Veenendaal, Països Baixos) (L).



**Figura 4.10:** Diferents unitats implicades en el sistema de treball de 48 milibioreactors (laboratori de recerca a la Universitat tècnica de Munich).

Un cop el bloc es troba a la taula de treball, s'inicia l'agitació, fixada a 2800 rpm i s'inicia l'aïreació (aire estèril). El cabal d'aire es regula mitjançant cabalímetres massics i una unitat de control, que permet regular el cabal d'entrada. El cabal d'aire per a tot el bloc és de  $4.8 \text{ l min}^{-1}$ , el que correspon a  $0.1 \text{ l min}^{-1}$  per cada un dels bioreactors ( $8.3 \text{ vvm}$ ). S'enriqueix el cabal d'entrada amb oxigen pur ( $1 \text{ l min}^{-1}$  d'oxigen pur i  $3.8 \text{ l min}^{-1}$  d'aire), si el percentatge d'oxigen dissolt no es manté per sobre del 20 %. La temperatura de cultiu es manté a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  mitjançant la unitat encamisada, i la temperatura de la part superiors dels reactors es manté a  $4^\circ\text{C}$ , per tal de reduir l'evaporació dels components, especialment si es treballa amb compostos volàtils.

### 4.3.2 Control en paral·lel del procés

La comunicació entre els dispositius es realitza mitjançant el programari DASGIP fedbatch-XP 1.0.0.213 (DASGIP, Jülich, Alemanya), les addicions de les xeringues es controlant mitjançant el programari TECAN Gemini 3.40SP1 (TECAN, Crailsheim, Alemanya) i la comunicació amb el lector de microplaques es realitza mitjançant el programari LabView (Versió 6.1, National Instruments, Munic, Alemanya).

Les mostres s'extreuen aproximadament cada 4 h i es retira un volum de 10 µl de cada un dels bioreactors per realitzar l'anàlisi de la densitat òptica. Aquest volum es transferit a una microplaca, la qual és transportada mitjançant un braç mecànic al lector de microplaques. Un cop la lectura s'ha realitzat, el mateix braç mecànic transporta la microplaca a la posició on es realitzarà el rentat d'aquesta, la qual es reutilitzarà en els posteriors anàlisi.

Quan l'estratègia és en discontinu, els substrats s'addicionen manualment a l'inici del cultiu. D'altra banda, quan l'estratègia és en semicontinu, s'afegeixen addicions programades cada minut dels substrats implicats (explicades en detall en l'apartat de resultats d'aquest capítol). Es realitzen addicions intermitents d'entre 2-7 µl d'antiescumejant diluït amb aigua destil·lada en una proporció 1:4. S'afegeixen a cada un dels bioreactors 70 µl h<sup>-1</sup> d'aigua estèril per tal de compensar els efectes de l'evaporació del medi (Kusterer *et al.*, 2008). La biomassa final dels reactors es determina mitjançant anàlisis de pes sec (explicats en el Capítol 3: Material i mètodes d'aquest document) i el volum final del reactor és estimat de forma gravimètrica al finalitzar el cultiu.

Per tal d'assegurar l'esterilitat en el bioprocés, les agulles encarregades de treure mostra a cada un dels reactors, es netegen amb aigua després de cada addició, i es realitza un cicle de neteja amb etanol 70% (v/v) al finalitzar el procés de presa de mostra.

### 4.3.3 Monitoratge de l'oxigen dissolt i el pH

Es realitzen lectures individuals per cada un dels reactors de l'oxigen dissolt i el pH, mitjançant la mesura de fluorescència en funció dels temps dels dos sensors químics situats a la part inferior de cada un del bioreactors. Les mesures tant del pH com l'oxigen dissolt es prenent 6 vegades per minut per cada un dels reactors. Serà necessari realitzar un calibrat previ al cultiu per al pH (varis punts) i del oxigen dissolt (un únic punt; 100%). L'efecte de la temperatura es compensa electrònicament.

### 4.3.4 Medis utilitzats en els cultius

En aquest treball s'utilitzen diferents medis de cultiu, en funció de les soques utilitzades. Els medis de cultiu seran els següents:

- Medi A: conté les següents concentracions per litre d'aigua destil·lada:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) 26.7 ml,  $\text{CaSO}_4$  0.93 g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  18.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14.9 g, KOH 4.13 g, 4.35 ml de sals traça, 2 ml  $\text{l}^{-1}$  biotina i 0.1 ml  $\text{l}^{-1}$  d'antiescumejant (Mazu DF 7960).
- Medi B: conté les següents concentracions per litre d'aigua destil·lada:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g, YNB 3.4 g (Detroit, MI, USA), 4.35 ml de sals traça, 2 ml  $\text{l}^{-1}$  biotina i 0.1 ml  $\text{l}^{-1}$  d'antiescumejant (Mazu DF 7960).
- Medi C: conté les següents concentracions per litre d'aigua destil·lada:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.88 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.144 g, 1 ml de sals traça, 1 ml  $\text{l}^{-1}$  biotina (400 mg  $\text{l}^{-1}$ ) i 0.1 ml  $\text{l}^{-1}$  d'antiescumejant (Mazu DF 7960) (D'Anjou i Daugulis, 2001).

A tots els cultius s'hi afegeixen 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de zeozina, per tal d'evitar possibles contaminacions degut a les característiques del sistema de 48 milibioreactors. Durant el cultiu el pH es manté a 6, mitjançant l'addició de KOH 1 M o Amoníac al 30%, en

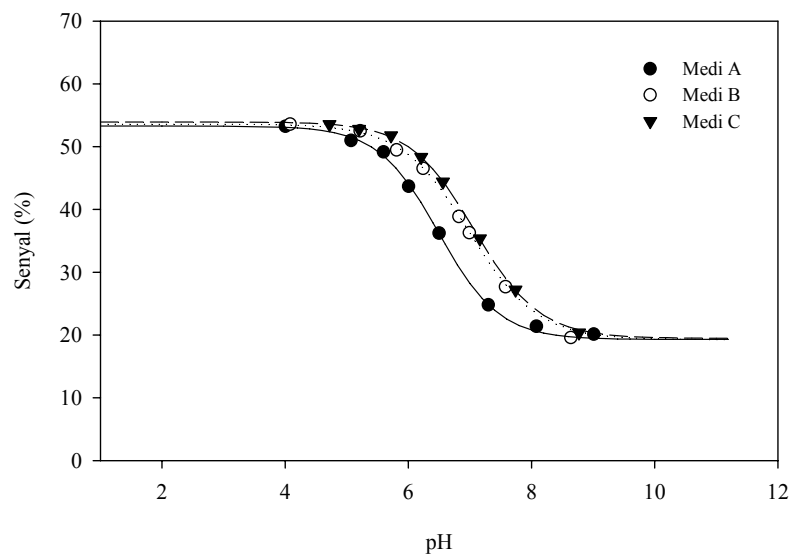
funció del medi de cultiu utilitzat. La resta de fonts de carboni (metanol, sorbitol i glicerol) i nitrogen (metilamina), s'afegeixen en funció de l'estratègia portada a terme.

## 4.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.4.1 Calibrat dels sensors químics per les mesures de pH

Prèviament a l'inici dels cultius es necessària la realització d'un calibrat per cada un dels medis de cultiu que s'utilitzaran. Per realitzar el calibrat, és necessari ajustar cada un dels medis a 8 pH diferents dintre del rang 4-9. Posteriorment es registren els valors del senyal dels sensors a cada un dels pH, i s'obté el perfil mostrat a la figura 4.11. Es pren l'equació 4.1 per ajustar els punts experimentals, trobant 4 paràmetres per cada un dels medis a utilitzar (a, b i c). A la taula 4.1 es troben resumits els paràmetres trobats per cada un dels medi de cultiu.

$$\text{Senyal}(\%) = \left( \frac{a - b}{1 + \exp\left(\frac{\text{pH} - c}{d}\right)} \right) \quad \text{eq. 4.1}$$



**Figura 4.11:** Calibrat dels sensors de pH del sistema. Els bioreactors s'emplen de medi prèviament ajustat al pH corresponent en un rang comprès entre 4 i 9.

Tal i com mostra la figura 4.11, el rang de pH òptim de treball es troba entre 6 i 8, degut a l'augment del pendent en aquest tram de pH. Treballs previs realitzats amb *P. pastoris* per a la producció de ROL (Cos *et al.*, 2005; Ramon *et al.*, 2007; Surribas 2008) utilitzen un pH de treball corresponent a 5.5. Cal destacar que en aquest treball, no

s'utilitza aquest valor degut a la disminució del pendent (figura 4.11), i s'augmenta fins a 6. Prèviament a la realització dels cultiu a escala mil·lilitre, es realitzen cultius a volums superiors (2 l) mantenint el pH fixat a 6, no registrant-se diferències significatives ni el creixement ni en la producció de ROL.

**Taula 4.1:** Valors dels diferents paràmetres de l'equació 4.1 pels diferents medis utilitzats.

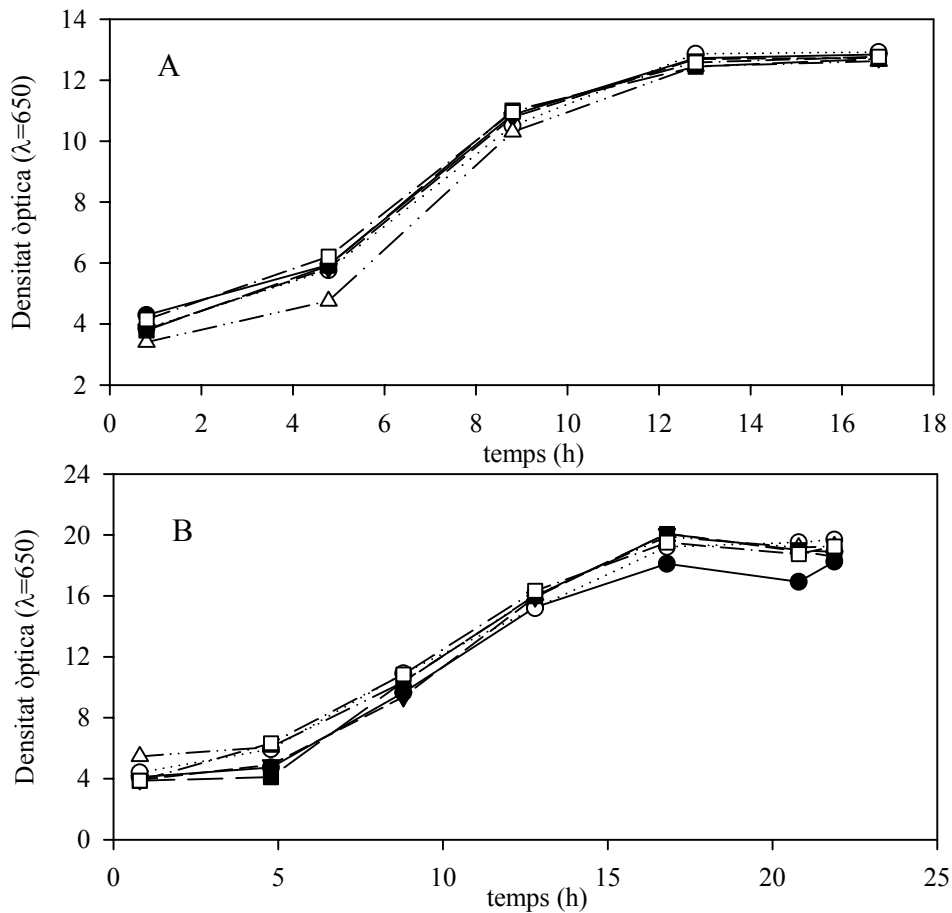
	Paràmetres equació			
	a	b	c	d
<b>Medi A</b>	53.3	19.3	6.5	0.5
<b>Medi B</b>	53.9	16.7	7.1	0.6
<b>Medi C</b>	53.6	19.3	7.0	0.6

#### 4.4.2 Experiments emprant estratègies en discontinu i semicontinu mitjançant l'ús del promotor induïble AOX

S'inicia l'estudi realitzant cultius en discontinu utilitzant el glicerol com a font de carboni. Es treballa amb el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* a un volum de treball de 12 ml, utilitzant el medi de cultiu A. En aquests cultiu s'avalua el creixement dels microorganismes al sistema de 48 milibioreactors, avaluant així l'efectivitat del procés de canvi d'escala. Degut a la utilització dels glicerol, no s'analitza l'activitat lipolítica, ja que el promotor AOX es troba reprimat per la presència del glicerol en el medi de cultiu.

La figura 4.12 mostra l'evolució de la densitat òptica, expressada en unitats d'absorbància, al llarg del temps utilitzant dues concentracions inicials de glicerol, 20 (figura 4.12 A) i 40 (figura 4.12 B) g l<sup>-1</sup>. A cada una de les figures es poden observar 6 perfils corresponents a les 6 repeticions realitzades per cada una de les condicions estudiades. Cal remarcar la reproduïbilitat dels cultius presentant un error màxim de  $\pm 1.0$ , en les mesures de densitat òptica a l'utilitzar el glicerol com a font de carboni. Per tant, aquest primer experiment mostra la capacitat de reproduir els experiments sota les mateixes condicions hidrodinàmiques.





**Figura 4.12:** Evolució de la densitat òptica en cultius realitzats en discontinu a partir de concentracions inicials de 20 (A) i 40 (B) g l<sup>-1</sup> de glicerol utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*.

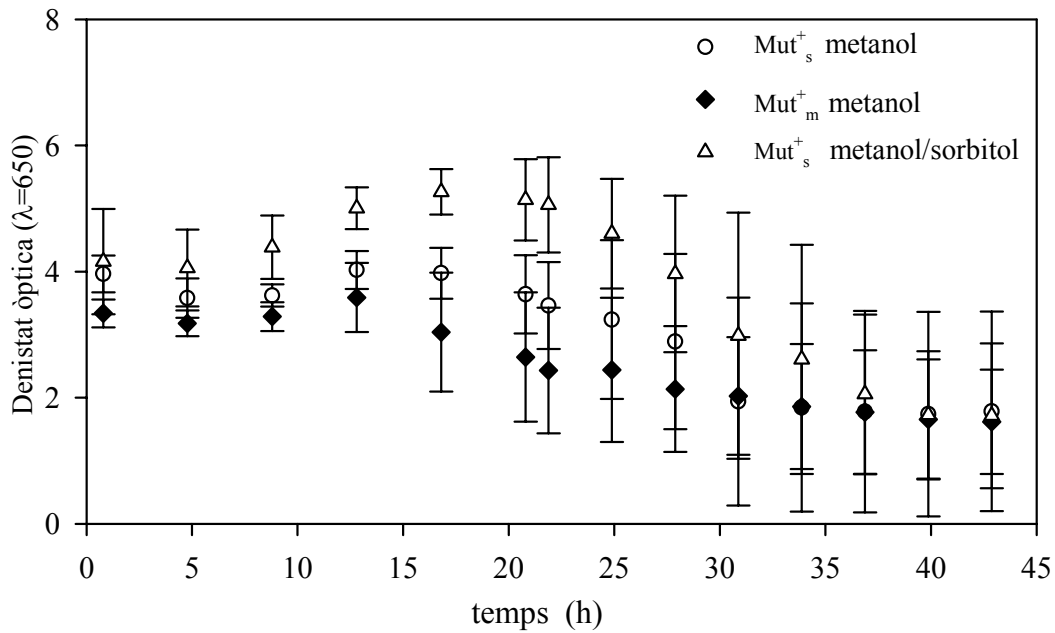
Quan la concentració inicial de glicerol correspon a 20 g l<sup>-1</sup> (figura 4.12 A), aquest va ser consumit aproximadament després de 12 h de cultiu. S'analitza el pes sec a la mostra inicial i final del cultiu, obtenint 2.5 g l<sup>-1</sup> de biomassa a l'inici del cultiu i 11.7 g l<sup>-1</sup> de biomassa al finalitzar el cultiu. El  $Y_{X/S}$  correspon a 0.46 g<sub>X</sub> g<sub>Gli</sub><sup>-1</sup> i la  $\mu_{\max}$  registrada sota aquestes condicions correspon a 0.18±0.03 h<sup>-1</sup>.

Alhora quan la concentració inicial de glicerol correspon a 40 g l<sup>-1</sup> (figura 4.12 B) aquest va ser consumit aproximadament després de 18 h de cultiu. Es realitzen anàlisis de pes sec a la mostra inicial i final del cultiu, obtenint 2.7 g l<sup>-1</sup> de biomassa a l'inici del cultiu i 22.7 g l<sup>-1</sup> de biomassa al finalitzar el cultiu. El  $Y_{X/S}$  correspon a 0.5 g<sub>X</sub> g<sub>Gli</sub><sup>-1</sup> i la  $\mu_{\max}$  obtinguda sota aquestes condicions correspon a 0.15±0.02 h<sup>-1</sup>.

Cal destacar que en ambdós cultius els valors obtinguts són similars als obtinguts per Cos *et al.*,(2005) al treballar volum de 2 l. Per tant, cal destacar que els resultats obtinguts utilitzant els sistema de milibioreactors a les condicions de treball establertes, reproduïen els resultats prèviament obtinguts a escales superiors de treball.

A l'observant un comportament favorable a l'utilitzar el glicerol com a font de carboni, es decideix establir noves condicions de cultiu utilitzant diferents fonts de carboni, alhora inductores a la producció, i així avaluar tant el creixement com la productivitat al sistema de milibioreactors. Per tant, es realitzen cultius mitjançant una estratègia en discontinu utilitzant diferents fonts de carboni (metanol i sorbitol). S'utilitzen diferents fenotips de *P. pastoris*, el Mut<sub>s</sub><sup>+</sup> i Mut<sub>m</sub><sup>+</sup>, els quals presenten una assimilació ràpida del metanol, i els diferencia el nombre de còpies del gen de la ROL, sent d'una única còpia pel fenotip Mut<sub>s</sub><sup>+</sup>, i de diverses còpies pel fenotip Mut<sub>m</sub><sup>+</sup>.

La figura 4.13 mostra l'evolució de la densitat òptica per cada una de les condicions testades on cada una presenta 6 rèpliques. A tots els cultius realitzats la concentració inicial de metanol és de 10 g l<sup>-1</sup>, i quan s'utilitza sorbitol ( $\Delta$ ) aquesta també correspon a 10 g l<sup>-1</sup>. Es pot observar que a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni (símbols: o i  $\blacklozenge$ ), independentment del fenotip utilitzat, l'augment de la densitat òptica al llarg del cultiu és gairebé inexistent, presentant una tendència a disminuir a partir de les 20 h de cultiu, probablement deguda a la lisis cel·lular i adhesió de la biomassa a les parets del milibioreactor. D'altra banda, el cultiu que utilitza el sorbitol com a cosubstrat ( $\Delta$ ) presenta un lleuger augment de la densitat òptica durant les primeres 16 h de cultiu, presentant posteriorment un comportament similar a la resta de fenotips utilitzats. És important destacar que el pO<sub>2</sub> es manté per sobre del 10 % en totes les condicions testades i el pH es manté al voltant del valor de la consigna (pH=6).



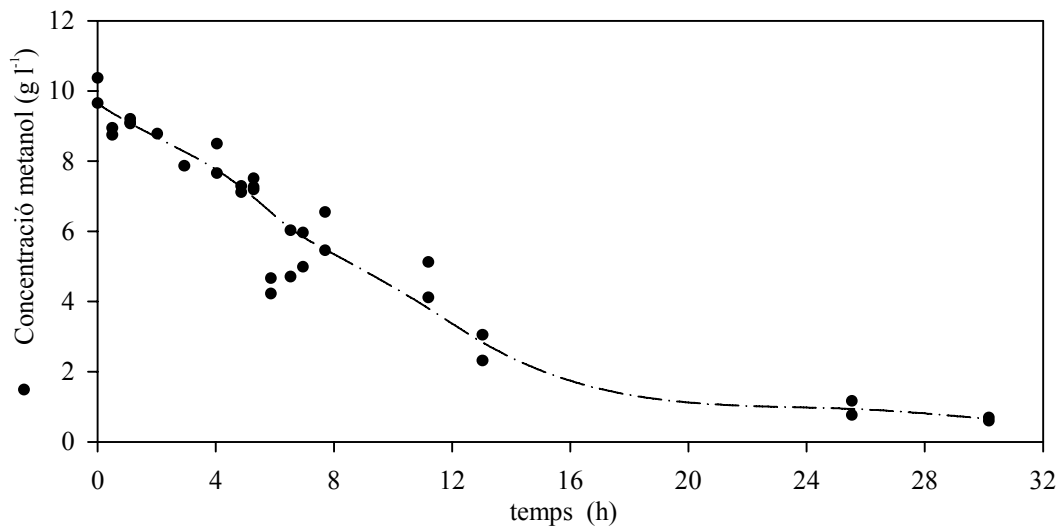
**Figura 4.13:** Evolució de la densitat òptica en cultius realitzats en discontinu utilitzant diferents fenotips ( $Mut_s^+/Mut_m^+$ ) de *P. pastoris* sota diferents fonts de carboni (sorbitol i metanol/metanol) utilitzant el medi A.

A les 30 h de cultiu s'analitza la concentració de substrats pels diferents experiments, trobant que la concentració de metanol al medi de cultiu correspon a  $0 \text{ g l}^{-1}$  en tots els reactors. D'altra banda, la concentració de sorbitol es troba al voltant de  $3.2 \pm 1.1 \text{ g l}^{-1}$ . Prèviament Ramon *et al.*, (2007) descriuen que a l'utilitzar el fenotip  $Mut^+$  de *P. pastoris* mitjançant substrats mixtes (sorbitol i metanol) el metanol es consumeix inicialment i quan aquest s'ha exhaurit es consumeix el sorbitol. Suposant que el primer substrat ha consumir-se és el metanol a una  $\mu_{max}$  aproximada de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (Cos *et al.*, 2005), i el rendiment  $Y_{X/S}$  correspon a  $0.2 \text{ g}_X \text{ g}_{Met}^{-1}$ , durant les primeres hores de cultiu s'hauria de registrar un augment de la densitat òptica. Per tant, sembla que existeix un problema amb el metanol, ja que desapareix però no es registra un augment de la densitat òptica. L'augment de la densitat òptica observada al cultiu que conté sorbitol (figura 4.13;  $\Delta$ ), probablement és degut a la presència del sorbitol, ja que els cultius que no en disposen no s'observa aquest augment. La  $\mu$  registrada en aquest cultiu entre les 4.8 h i les 16.8 h correspon a  $0.022 \text{ h}^{-1}$ , valor similar a l'obtingut a escales superiors a l'utilitzar el sorbitol com a substrat. Alhora a les 30 h de cultiu es realitzen anàlisis d'activitat lipolítica en tots els cultius no obtenint activitat en cap de les condicions provades.

El sistema de milibioreactors es troba obert per la part superior, presentant forats d'aproximadament de 2 mm de diàmetre, pel que hi entraran les agulles per extreure mostres, per addicionar base, aigua estèril per compensar l'evaporació i com a sortida de gasos. Per tant és probable que degut a la característica dels sistema, el metanol s'evapori i es perdi per la sortida de gasos dels milibioreactors, tot i que la part superior d'aquests es trobi refrigerada a partir d'un sistema de fred, equivalent a un sistema de condensació. Cal destacar que s'utilitza un elevat cabal d'aire (8.33 vvm) el que pot afavorir a la pèrdua del metanol per la sortida dels milibioreactors. D'altra banda, l'elevat cabal d'aire afavorirà al manteniment de l'esterilitat dels cultius, evitant en gran part les possibles contaminacions.

Per comprovar realment si existeix la pèrdua de metanol per la sortida dels milibioreactors, es realitza un experiment amb una concentració inicial de metanol de 10 g l<sup>-1</sup> utilitzant el medi A, sense biomassa i mantenint les condicions d'aireació, on s'analitzarà la concentració del metanol al llarg del temps.

La figura 4.14 mostra l'evolució del metanol al llarg del temps, on es pot observar que inicialment la concentració d'aquest correspon 10 g l<sup>-1</sup> i després de 30 h d'operació aquesta es veu reduïda a una concentració de 0.59 g l<sup>-1</sup>. Es pot observar també que després de 5 h la concentració de metanol es veu reduïda a la meitat. Per tant, el metanol desapareix a una velocitat de 0.5 g<sub>Met</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Cal destacar que *P. pastoris*, presenta una fase de latència al incorporar-se en un nou medi de cultiu, i amb un nou substrat a metabolitzar d'aproximament 5 h, el que permetrà al microorganisme adaptar-se a les noves condicions. Per tant, quan el microorganisme tingui adaptada la maquinaria metabòlica per iniciar el consum del metanol, únicament quedarà en el medi de cultiu aproximadament la meitat del substrat del disponible inicialment. Davant aquesta problemàtica es plantejarà una solució per tal de poder utilitzar el metanol amb el sistema de 48 milibioreactors.



**Figura 4.14:** Evolució de la concentració de metanol al llarg del temps als milibioreactors on s'utilitza el medi A sense biomassa.

D'acord amb els resultats obtinguts prèviament, a l'utilitzar el glicerol no es presenten problemes de creixement i es reproduïxen els paràmetres cinètics trobats a escales de treball superior. Per tant, es decideix planificar una estratègia en semicontinu, el que inclourà una primera fase de creixement amb glicerol (40 g l<sup>-1</sup>), i posteriorment es realitzaran addicions de metanol el qual serà utilitzat com a única font de carboni, a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup>, i addicions de metanol i sorbitol com a substrats mixtes, a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup>.

Durant l'etapa d'inducció es realitzen diferents addicions de metanol, en funció del fenotip utilitzat. La  $q_{sMet}$  mitjana trobada per Cos *et al.*, (2005) en cultius en semicontinu a un volum de treball de 5 l correspon a 0.14 g<sub>Met</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub> i a 0.024 g<sub>Met</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup><sub>s</sub>. Pel fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub>, el valor que es prendrà com a valor de referència de la  $q_{sMet}$  serà de 0.06 g<sub>Met</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, degut a les limitacions del volum del reactor. Es prenent aquests valors de referència, suposant que la  $\mu$  mitjana durant el semicontinu correspondrà a 0.036 i 0.005 h<sup>-1</sup> (Cos *et al.*, 2005), a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub> i Mut<sup>s</sup><sub>s</sub>, respectivament. Per tant, el cabal d'addició inicial a la fase d'inducció serà de 15.2  $\mu$ l h<sup>-1</sup> a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub> i de 5.1  $\mu$ l h<sup>-1</sup> a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup><sub>s</sub> (el cabal d'addició es calcula cada hora en funció de la  $\mu$  suposada per cada fenotip). El volum inicial dels milibioreactors es redueix a 10 ml quan es realitza una estratègia en semicontinu. Alhora s'addicionen inicialment 6.3

$\mu\text{ l h}^{-1}$  per compensar la pèrdua del metanol per *stripping* ( $0.5\text{ g}_{\text{Met}}\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ), valor que augmentarà a mesura que augmenti el volum total del milibioreactor.

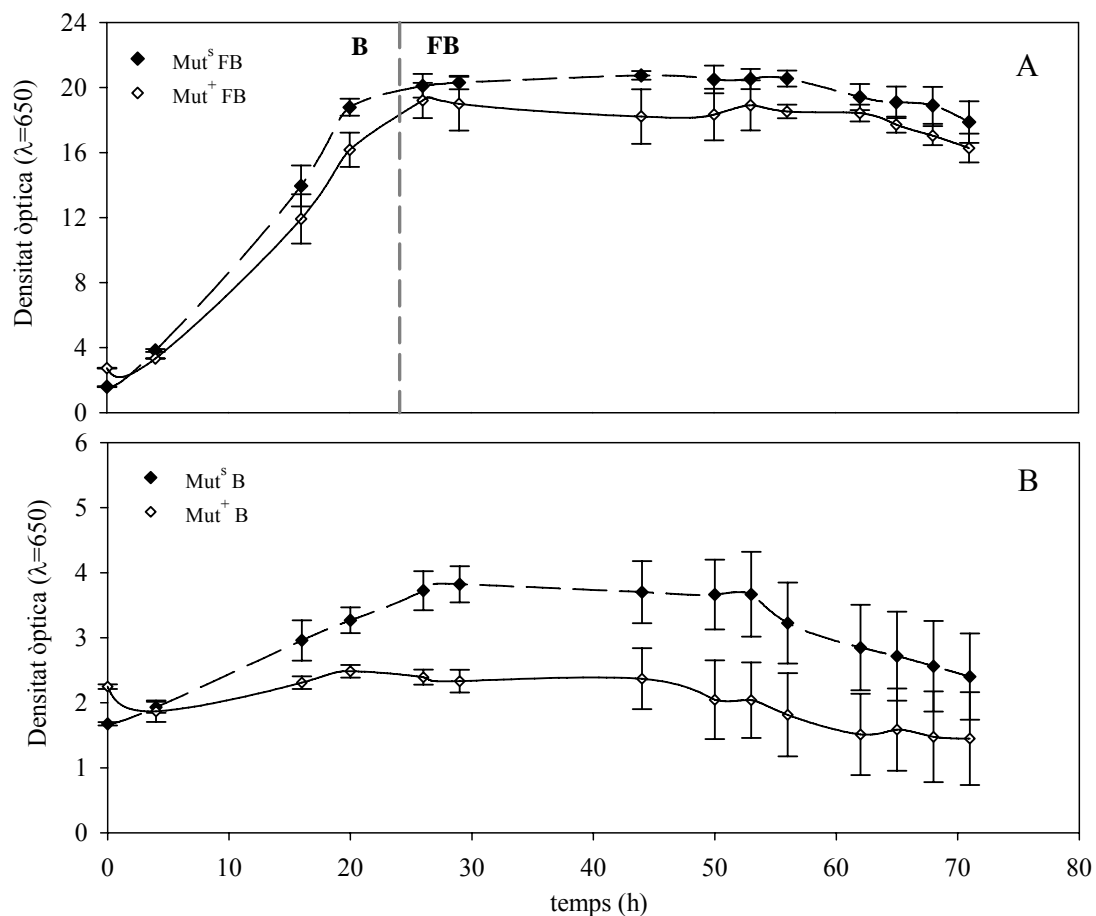
A més a més al treballar amb el fenotip Mut<sup>s</sup>, s'utilitzarà el sorbitol com a cosubstrat, ja que prèviament Ramon *et al.*, (2007) han demostrat els avantatges que presenta la utilització d'aquest cosubstrat per a la producció de ROL amb aquest fenotip. Per tant, el sorbitol s'addiciona suposant un consum de  $0.02\text{ g}_{\text{Sor}}\text{ g}_{\text{X}}^{-1}\text{ h}^{-1}$  (Resina *et al.*, 2009) i suposant una  $\mu$  de  $0.01\text{ h}^{-1}$  (Ramon *et al.*, 2007). Per tant, el cabal d'addició inicial a la fase d'inducció serà de  $20.0\text{ }\mu\text{ l h}^{-1}$  (aquest valor també es calcularà cada hora en funció de l'augment de la biomassa suposat).

Alhora es realitzaran cultius en discontinu amb els fenotips Mut<sup>+</sup><sub>s</sub> i Mut<sup>s</sup><sub>s</sub>. A l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub> la concentració inicial de metanol serà de  $10\text{ g l}^{-1}$ , i a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup><sub>s</sub> les concentracions inicials de sorbitol i metanol correspondran també a  $10\text{ g l}^{-1}$ . En aquests cultius el volum inicial dels milibioreactors correspon a  $12\text{ ml}$ , i es realitzen addicions de metanol corresponents a  $7.6\text{ }\mu\text{ l h}^{-1}$  per tal de compensar l'*stripping* del metanol.

A la figura 4.15, es pot veure l'evolució de la densitat òptica en funció del temps pels cultius realitzats mitjançant una estratègia en semicontinu (A) i en discontinu (B) pels diferents fenotips.

A la figura 4.15 A s'observen dues etapes, una corresponent al discontinu de glicerol (les primeres 23 h) i una corresponent a l'etapa d'inducció. Es pot observar un augment de la densitat òptica durant les primeres hores, corresponent al consum del glicerol arribant a una biomassa final corresponent a  $20.3\pm 1.2\text{ g l}^{-1}$  a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup><sub>s</sub> i de  $17.6\pm 0.6\text{ g l}^{-1}$  a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup><sub>s</sub>. Quan tot el glicerol és consumit s'inicia la fase d'inducció i s'addicionen els substrats corresponents, tal i com s'ha indicat anteriorment. Durant les posteriors hores, l'augment registrat de la densitat òptica és gairebé nul per ambdós fenotips utilitzats, no registrant-se els valors de  $\mu$  prèviament suposats. Es decideix, per tal d'evitar acumulacions dels substrats (sorbitol i metanol) fins a nivells tòxics, disminuir els cabals d'addició. L'addició de metanol es redueix a  $8\text{ }\mu\text{ l h}^{-1}$  (addició corresponent a la pèrdua per *stripping*) i la del sorbitol es redueix a  $10\text{ }\mu\text{ l h}^{-1}$  (suposant un consum de  $0.01\text{ g}_{\text{Sor}}\text{ g}_{\text{X}}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ). Tot i reduir les addicions dels substrats, el

metanol s'acumula fins a  $12.7 \pm 2.0 \text{ g l}^{-1}$  a les 72 h de cultiu. Aquesta acumulació indica que el consum del metanol ha estat gairebé nul per ambdós fenotips estudiats. Cal tenir en compte, que el metanol al superar els  $10 \text{ g l}^{-1}$ , presenta efectes tòxics pel microorganisme, inhibint el creixement. Alhora el sorbitol s'acumula fins a una concentració màxima de  $22.8 \text{ g l}^{-1}$ . Tot i així, cal destacar que aquest substrat no presenta efectes tòxics pel microorganisme fins als  $50 \text{ g l}^{-1}$ .



**Figura 4.15:** Evolució de la densitat òptica en cultius emprant una estratègia en semicontinu (A) i en discontinu (B) pels fenotips  $Mut_s^+$  i  $Mut_s^-$ . A l'utilitzar el fenotip  $Mut_s^+$ , s'utilitza com a font de carboni el metanol, D'altra banda, a l'utilitzar el fenotip  $Mut_s^-$ , s'utilitzen el sorbitol i el metanol com a fonts de carboni, independentment de l'estratègia emprada.

Per tant, no s'observa un augment en la densitat òptica durant la fase d'inducció, independentment del fenotip i estratègia utilitzada. És important destacar la disminució de la densitat òptica observada durant les últimes hores d'inducció. Aquesta disminució pot ser conseqüència de l'augment del volum del milibioreactors, alhora associada amb la possible lisis cel·lular deguda a les condicions estressants del medi de cultiu. També

al finalitzar els cultius, part de la biomassa restava enganxada a les parets dels milibioreactors, el que emmascara les lectures de la densitat òptica. És important destacar, que les dificultats presentades en el creixement no són conseqüència de limitacions d'aire, ja que el  $pO_2$  es manté per sobre del 10% en tots els cultius, i alhora el pH es manté al voltant de la consigna seleccionada. Les dificultats presentades en quant al creixement del microorganisme poden venir donades per les acumulacions registrades del metanol en els cultius, actuant com a inhibidor del creixement. Tot i no haver observat un bon creixement es realitzen anàlisis d'activitat lipolítica de les mostres finals dels cultius, no obtenint activitat lipolítica representativa.

La figura 4.15 B mostra el perfil de la densitat òptica dels cultius realitzats en discontinu. Els substrats, tant el sorbitol com el metanol, es troben en els milibioreactors a l'inici del cultiu, i el metanol s'afegeix a un cabal de  $8 \mu\text{l h}^{-1}$ , per tal de compensar les pèrdues del metanol per *stripping*. Per tant, en aquest cas l'addició del metanol serà la mateixa independentment del fenotip utilitzat, ja que únicament es realitza la compensació de la pèrdua.

A l'utilitzar el fenotip Mut<sup>s</sup> (◆) (figura 4.15 B), a les 70 h de cultiu el sorbitol és consumit però d'altra banda el metanol correspon a  $4.2 \pm 1.5 \text{ g l}^{-1}$ . Es registra un augment en la densitat òptica obtenint una  $\mu$  de  $0.027 \text{ h}^{-1}$  durant les primeres hores de cultiu (les primeres 29 h). D'altra banda, a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup> (◇) (figura 4.15 B), no es registra un augment de la biomassa durant el cultiu. La concentració inicial de metanol correspon a  $10 \text{ g l}^{-1}$ , i a les 70 h de cultiu aquesta es troba a  $8.2 \pm 2.2 \text{ g l}^{-1}$ . Per tant no es registra un consum del metanol sota aquestes condicions de treball. Alhora en ambdós cultius realitzats es registren disminucions de la densitat òptica durant les últimes hores de cultiu.

Es pot concloure que a l'utilitzar el metanol, o bé el sorbitol i el metanol com a substrats mixtes, s'obtenen problemes relacionats amb el creixement cel·lular, i no s'obté activitat lipolítica en cap de les condicions testades. L'estratègia de compensació per l'*stripping* haurà de ser estudiada per tal d'evitar les acumulacions del metanol al medi de cultiu. Quan es realitza l'estratègia en semicontinu, no es poden prendre com a referents les velocitats específiques de consum de substrats obtingudes a escales superiors de treball (5 l), mostrant de forma clara que el canvi d'escala no es realitza de



forma satisfactòria. Per tant, serà necessària la realització de posteriors estudis perquè la utilització del sistema de 48 milibioreactors per a la producció de ROL amb *P. pastoris* utilitzant fenotips induïbles amb metanol sigui possible.

Tot i així, existeix la possibilitat de treballar amb sistemes alternatius per a la producció de ROL amb *P. pastoris* que no requereixen la utilització de metanol. Posteriorment es realitzen experiments treballant amb el promotor FLD induïble tant amb metanol com amb metilamina i el promotor GAP constitutiu (producció no induïble).

#### 4.4.3 Cultius realitzats en discontinu amb el promotor induïble FLD

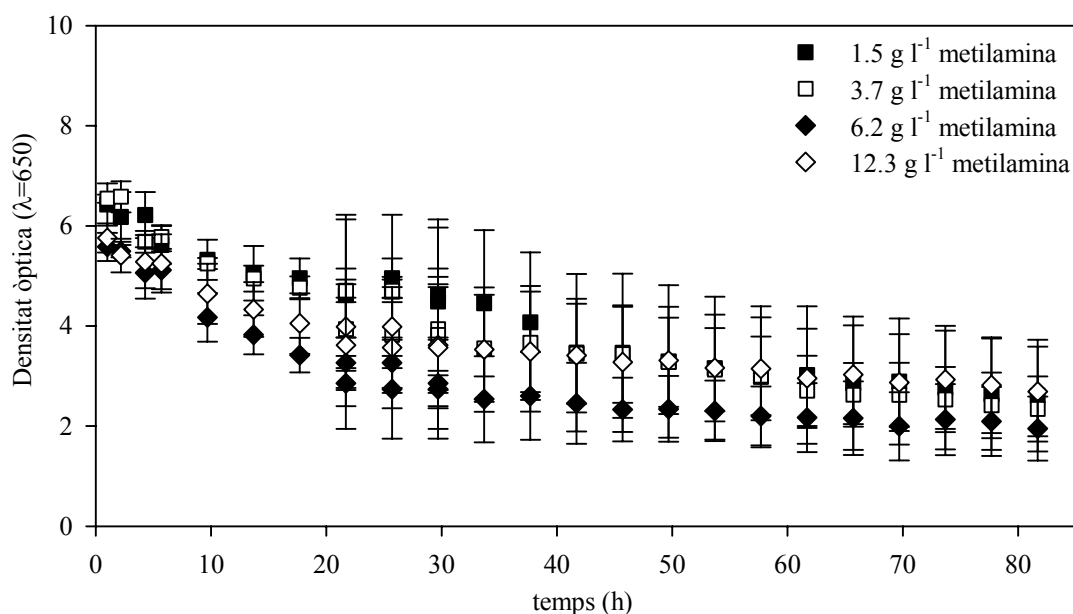
A l'utilitzar el promotor FLD de *P. pastoris* per a la producció de ROL s'utilitza una estratègia de substrats mixtes descrita prèviament per Resina *et al.*, (2004). Aquest promotor és induït mitjançant la utilització de metilamina en el medi de cultiu de forma que s'evita la utilització del metanol com a agent inductor, i el sorbitol s'utilitza com a font de carboni. La utilització d'ambdós substrats és necessària, ja que la metilamina actua com a agent inductor i alhora com a font de nitrogen, i el sorbitol com a font de carboni.

Resina *et al.*, (2004), realitzen cultius en discontinu utilitzant una relació entre els substrats de 0.4 g metilamina g sorbitol<sup>-1</sup>. Posteriorment Resina *et al.*, (2005) realitzen diferents cultius en semicontinu utilitzant durant la fase d'inducció una relació fixada entre ambdós substrats corresponent a 0.118 g metilamina g sorbitol<sup>-1</sup>, creixent sota diferents velocitats específiques de creixement. Els nivells de productivitat més elevats s'obtenen al treballar propers a la  $\mu_{\max}$  (0.02 h<sup>-1</sup>).

Es decideix realitzar un estudi sobre l'efecte de la relació d'ambdós substrats en el medi de cultiu sobre la producció de ROL en *P. pastoris*. Es pren com a referència la relació utilitzada per Resina *et al.*, (2004), i es realitzen diferents cultius en discontinu augmentant i disminuint aquesta proporció, de manera que s'utilitzen les següents

relacions: 0.15, 0.37, 0.62 i 1.2 g metilamina g sorbitol<sup>-1</sup>. De cada una de les condicions provades es realitzen 6 rèpliques.

La figura 4.16 mostra l'evolució de la densitat òptica en funció del temps, i en funció de les diferents proporcions de substrats inicials utilitzades. No s'aprecien diferències significatives en el comportament dels cultius en funció de la relació de substrats utilitzada, i en general no s'observa un augment en la densitat òptica. La concentració de substrats obtinguda a les 82 h de cultiu és similar a les concentracions inicials, no consumint-se al llarg del temps.



**Figura 4.16:** Evolució de la densitat òptica en funció dels temps en cultius en discontinu utilitzant el promotor FLD de *P. pastoris*. La concentració inicial de sorbitol correspon a 10 g l<sup>-1</sup> per tots els cultius realitzats i concentració inicial de metilamina es canvia, utilitzant el medi de cultiu C.

El medi de cultiu utilitzat és el mateix que utilitzen Resina *et al.*, (2004) (medi C), els quals utilitzen un volum de treball de 1 l. Aquest autors, determinen al realitzar cultius en discontinu, la presència de gairebé 15 h de fase de latència abans els microorganismes no inicien el seu creixement, així com el consum dels substrats a l'utilitzar sorbitol i metilamina. La  $\mu$  obtinguda sota les condicions de treball d'aquests investigadors correspon a 0.025 h<sup>-1</sup>. És probable que degut a les condicions de treball emprades en aquest sistema (agitació; 2800 rpm; aireació; 8.33 vvm), el manteniment

cel·lular no sigui possible durant les primeres 15 h aproximades de latència. La figura 4.16 mostra una clara disminució de la densitat òptica a partir de les 10 h de cultiu. Aquesta disminució pot ser conseqüència de la lisi cel·lular, i similar al que s'havia observat prèviament al finalitzar els cultius utilitzant el metanol com a font de carboni, on la biomassa quedava adherida a les parets del milibioreactor, emascarant les mesures de la densitat òptica.

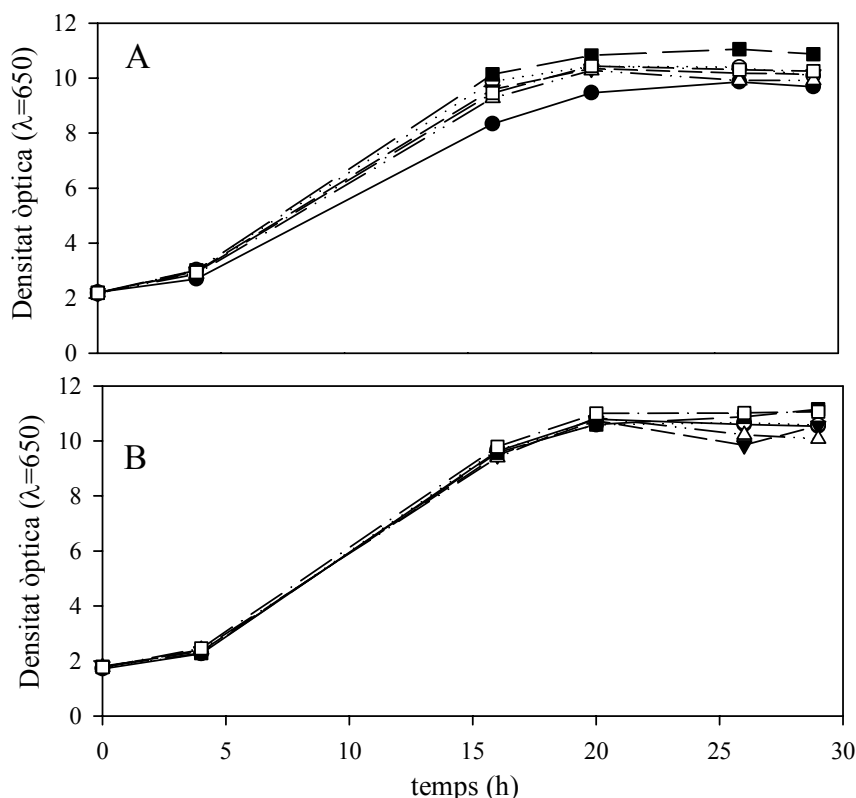
Sembla que el creixement cel·lular i obtenció de producte recombinat d'interès al treballar amb soques induïbles, ja sigui amb metanol o bé amb metilamina, al sistema de 48 milibioreactors no es realitza de forma satisfactòria. És probable que un dels factors que estigui afectant de forma negativa són les baixes velocitats específiques de creixement. Tal i com s'ha vist anteriorment a l'utilitzar glicerol com a font de carboni on la  $\mu$  es trobava entre 0.18 i 0.15 h<sup>-1</sup>, els resultats obtinguts eren similars als obtinguts a escales de treballs superiors, donant-se el canvi d'escala de forma favorable. Alhora altres treballs presents a la bibliografia treballant amb el sistema de 48 milibioreactors, obtenen canvis d'escala favorables al treballar amb *Escherichia coli* ( $\mu = 0.4$  h<sup>-1</sup>; Puskeiler *et al.*, 2005), *Streptomyces tendae* ( $\mu = 0.1$  h<sup>-1</sup>; Hortsch *et al.*, 2010), *Saccharomyces cerevisiae* ( $\mu = 0.2$  h<sup>-1</sup>; Kusterer *et al.*, 2008), on totes les velocitats específiques de creixement són superiors a les emprades en aquest treball.

Davant la impossibilitat de treballar amb soques induïbles amb el sistema de 48 milibioreactors, es decideix treballar amb el promotor constitutiu GAP, el que permetrà treballar a velocitats específiques de creixement més elevades.

#### 4.4.4 Cultius realitzats amb el promotor GAP

S'utilitza el promotor constitutiu GAP per a la producció de ROL amb *P. pastoris*, el que permetrà utilitzar glucosa com a font de carboni, i possibilitarà augmentar la velocitat específica de creixement trobant-se el valor de  $\mu_{\max}$  al voltant de 0.193 h<sup>-1</sup> (Mattanovich *et al.*, 2009). Es realitzen per tant cultius en discontinu utilitzant la glucosa com a font de carboni a una concentració inicial de 20 g l<sup>-1</sup>, on s'estudiarà l'efecte, tant en el creixement com en la producció, de dos medis de cultiu minerals, el medi C (figura 4.17 A) i el medi A (figura 4.17 B)

La figura 4.17 mostra l'evolució de la densitat òptica al llarg del temps de les 6 rèpliques realitzades per cada un dels medis de cultius utilitzats. Inicialment es pot observar que la utilització dels diferents medis no presenta diferències significatives, obtenint comportaments molt similars independentment del medi de cultiu utilitzat. També cal destacar la reproduïbilitat dels cultius obtenint una desviació màxima de la densitat òptica corresponent a 0.6 unitats.



**Figura 4.17:** Evolució de la densitat òptica en cultiu realitzats en discontinuu utilitzant el promotor constitutiu de *P. pastoris* per a la producció de ROL amb el medi de cultiu C (A) i el medi de cultiu A (B) utilitzant glucosa com a font de carboni.

Referent a les variables monitoritzades durant el procés, el pH es manté en tots els cultius a la consigna seleccionada, i el pO<sub>2</sub> es manté superior al 10% durant tot el cultiu. Quan s'utilitza el medi C la biomassa final obtinguda correspon a  $9.20 \pm 0.53 \text{ g l}^{-1}$ , i a l'utilitzar-se el medi A aquesta correspon a  $10.27 \pm 0.48 \text{ g l}^{-1}$ . La  $\mu_{\text{max}}$  obtinguda a l'utilitzar el medi C correspon a  $0.10 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , i a l'utilitzar el medi A aquesta correspon a  $0.12 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ . Cal destacar que els valors registrats de la  $\mu$  són inferiors als trobats a

escales de treball corresponents a 1 l ( $0.193\text{h}^{-1}$ ; Mattanovich *et al.*, 2009). Tot i així degut a un problema informàtic, no s'extreuen mostres entre les 4 i 16 hores de cultiu, el que dificulta realitzar el càlcul de la  $\mu_{\max}$  obtinguda, trobant-se en aquest període el màxim augment de biomassa.

El  $Y_{X/S}$  treballant amb el sistema de milibioreactors correspon a  $0.40 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$  a l'utilitzar el medi C i correspon a  $0.34 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$  a l'utilitzar el medi A, trobant-se per sota al valor obtingut al realitzar els cultius en flascons agitats de 1 l de capacitat màxima ( $0.5 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$ ). Aquesta diferència pot venir donada per la presència de biomassa adherida a les parets dels milibioreactors, el que modificaria el valor de biomassa final registrada.

Es realitzen anàlisis d'activitat lipolítica a les 15 i 29 h de cultiu, no obtenint-se activitat lipolítica en les mostres analitzades. Per tant amb el sistema de milibioreactors s'obté un bon creixement cel·lular, però la producció del producte recombinant d'interès no és favorable. Cal destacar però que experiments prèviament realitzats amb flascons agitats de 1 l, es detecten nivells d'activitat lipolítica específica de  $0.006 \text{ UA OD}_{650}^{-1}$  a les 19 h de cultiu, sent molt inferior als valors trobats prèviament amb flascons agitats per Cos *et al.*, (2005) amb el fenotip  $\text{Mut}_s^-$  ( $1.8 \text{ UA OD}_{650}^{-1}$ ) i  $\text{Mut}_s^+$  ( $0.2 \text{ UA OD}_{650}^{-1}$ ) de *P. pastoris*. Per tant la baixa productivitat de la soca és deguda a una deficient expressió de ROL sota aquest promotor, fent-se necessària una optimització prèvia de la soca aplicant tècniques d'enginyeria genètica, abans de realitzar una optimització del procés de producció.

Per tant, el bloc de 48 milibioreactors es presenta com un bon sistema per optimitzar el procés de producció de ROL amb *P. pastoris* utilitzant el promotor constitutiu GAP.



## 4.5 CONCLUSIONS

- El disseny del sistema de 48 milibioreactors no és adequat per a la utilització de compostos volàtils (metanol), presentant deficiències al sistema de refredament en la part superior dels milibioreactors, registrant-se pèrdues de  $0.5 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .
- La utilització de substrats mixtes amb el promotor AOX (metanol/sorbitol) o amb el promotor FLD (metilamina/sorbitol) de *P. pastoris* no possibilita el creixement al sistema de milibioreactors.
- La realització de cultius en semicontinu permet obtenir un creixement satisfactori durant la primera fase del cultiu amb glicerol, sense ser favorable durant la posterior fase d'inducció, no obtenint-se ni creixement ni activitat lipolítica.
- La utilització de glicerol com a font de carboni en cultius en discontinu permet reproduir els valors obtinguts a escales superiors de treball (1.5 l), tant en el creixement com en el  $Y_{X/S}$ , garantint in favorable canvi d'escala.
- El bloc de 48 reactors es presenta com a un sistema vàlid per a la optimització del sistema de producció de ROL mitjançant la utilització del promotor constitutiu GAP de *P. pastoris*.
- Sembla que pot existir una relació entre la velocitat específica de creixement dels microorganismes i la funcionalitat del bloc de 48 milibioreactors, trobant resultats satisfactoris al treballar a  $\mu$  superiors de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.6 **BIBLIOGRAFIA**

Betts J, Doig S, Baganz F. Characterization and application of a miniature 10 mL stirred-tank bioreactor, showing scaledown equivalence with a conventional 7 L reactor. *Biotechnol Prog.* 2006;22:681–688.

Chen A, Chitta R, Chang D, Amanullah A. Twenty-four well-plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102:148–160.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol.* 2005;116:321–335.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb. Cell Fact.* 2006;5:17.

D'Anjou MC, Daugulis AJ. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 2001;72:1–11.

Doran PM. *Principios de ingeniería de los bioprocesos.* Editorial Acribia S.A. Zaragoza 1998.

Harms P, Kostov Y, French J, Soliman M, Anjanappa M, Ram A, Rao G. (2006) Design and performance of a 24-station high throughput microbioreactor. *Biotechnol Bioeng* 93:6–13.

Hortsch R, Stratmann A, Weuster-Botz D. New milliliter-Scale stirred tank bioreactors for the cultivation of Mycelium forming microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 2010;106(3):443–451.

Knorr B, Schlieker H, Hohmann H-P, Weuster-Botz D. Scaledown and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng J.* 2007;33:263–274

Kostov Y, Harms P, Randers-Eichhorn L, Rao G. Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(3):346–352

Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, Weuster-Botz D. Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioproc Biosyst Eng.* 2008;31:207–215.



Lamping SR, Zhang H, Allen B, Shamlou PA. Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chem Eng Sci.* 2003;58:747–758

Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F, Gasser B. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact* 2009, 8:29.

Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. Development, parallelization and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng.* 2005;89:512–523.

Ramon R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2007;130:39–46.

Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J Biotechnol.* 2004;109:103–113.

Resina D, Cos O, Ferrer P, Valero F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;91:760–767.

Resina D, Maurer M, Cos O, Arnau C, Carnicer M, Marx H, Gasser B, Valero F, Mattanovich D, Ferrer F. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *New Biotechnol.* 2009; 25(6):396–403.

Soley, A. Memòria de tesi doctoral. Disseny i desenvolupament de minireactors amb instrumentació per a l'optimització de cultius cel·lulars. 2010. Universitat Autònoma de Barcelona.

Stephens PJ, Joynson JA, Davies KW, Holbrook R, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 1997;83:445–455.

Vallejos J, Kostov Y, Ram A, French J, Marten M, Rao G. Optical analysis of liquid mixing in a minibioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93:906–911.

Vester A, Hans M, Hohmann HP, Weuster-Botz D. Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84:71–76.

Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John G, Arnold M. Methods and milliliter scale devices for highthroughput bioprocess design. *Bioproc Biosys Eng.* 2005;28:109–119.

# Capítol 5:

## Producció de ROL recombinant amb *P. pastoris* mitjançant la utilització de sorbitol i metanol com a cosubstrats en semicontinu

---

Parts d'aquest capítol es troben publicades en:

**Arnau C**, Ramon R, Casas C, Valero F. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme Microb Technol* 2010;46:494-500.

Horstkotte B, **Arnau C**, Valero F, Elsholz O and Cerdá V. Monitoring of sorbitol in *Pichia pastoris* cultivation applying sequential injection analysis. *Biochemical Engineering Journal* 2008;42:77-83.



## 5 Producció de ROL recombinant amb *P. pastoris* mitjançant la utilització de sorbitol i metanol com a cosubstrats en semicontinu

### 5.1 RESUM

Prèviament a aquest treball, Cos *et al.*, (2005) realitzen cultius amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* per a la producció de lipases de *Rhizopus oryzae*. Aquests autors utilitzaven el metanol com a única font de carboni, el que els permetia obtenir valors de  $q_p$  superiors als registrats amb el fenotip Mut<sup>+</sup> i majors facilitats operacionals, però aquests no es mantenien al llarg del cultiu, sinó que disminuïen fins arribar a valors de zero a les poques hores d'haver registrat el valor màxim.

Posteriorment, Ramon *et al.*, (2007) van realitzar un primer cultiu utilitzant el sorbitol com a cosubstrat. La utilització del sorbitol els permetia arribar a valors similars de  $q_p$ , però com a efecte més important, permetia mantenir els valors de  $q_p$  sense que presentessin una important disminució.

Continuant amb aquest treball, es realitza l'estudi sistemàtic de l'efecte de la concentració de metanol i la velocitat específica de creixement en cultius en semicontinu utilitzant el sorbitol com a cosubstrat. Es realitzen diferents cultius on la consigna de metanol és manté a 0.5, 2 i 4 g·l<sup>-1</sup>, controlada mitjançant un algoritme de control predictiu combinat amb un controlador PI. Alhora es realitza l'addició del sorbitol, mitjançant una addició exponencial programada, mantenint la velocitat específica de creixement en les següents consignes: 0.01 i 0.02 h<sup>-1</sup>. S'analitzen l'activitat lipolítica,  $Y_{P/X}$ , la  $q_p$ , productivitat volumètrica i específica, i alhora la  $q_s$  de sorbitol i metanol. Els resultats obtinguts permeten determinar la concentració de metanol com a paràmetre clau per a la producció de ROL, trobant els valors més elevats al mantenir la concentració fixada a 2 g l<sup>-1</sup> en el medi de cultiu. Cal destacar que els efectes de la  $\mu$  utilitzada no representa diferències significatives en quan a la productivitat del procés, trobant-se valors similars en ambdues velocitats provades sota la mateixa consigna de metanol.

Finalment s'estudia la funcionalitat d'un sistema SIA per a la determinació en línia de sorbitol, i així poder implementar un sistema de control de sorbitol, que permetrà treballar a concentracions fixades de sorbitol. Es realitza una primera aproximació, que permet la determinació del sorbitol en cultius utilitzant substrats mixtes.

## 5.2 INTRODUCCIÓ

El llevat metilotròfic *P. pastoris* ha estat extensament estudiat ja que és un sistema d'expressió per a proteïnes recombinats molt efectiu (Macauley *et al.*, 2005). Aquest sistema d'expressió utilitza promotors fortament induïbles amb metanol. En aquest treball s'ha utilitzat el fenotip Mut<sup>s</sup>, ja que presenta avantatges durant el procés de producció, en referència al menor consum d'oxigen vinculat al menor consum de metanol, i alhora presenta una menor sensibilitat al metanol residual en el medi, en comparació amb el fenotip Mut<sup>+</sup> (Stratton *et al.*, 1998). Degut a aquestes característiques es pot estimar un procediment de canvi d'escala menys complicat que a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup>, tant per l'emmagatzematge del metanol als laboratoris de producció, com pels requeriments d'alts cabals d'oxigen. Tanmateix, el fenotip Mut<sup>s</sup>, al produir ROL, presenta una baixa velocitat específica de creixement (0.004 h<sup>-1</sup>) utilitzant el metanol com a font de carboni, factor que limita en gran part la productivitat del procés (Cos *et al.*, 2006b).

Per tal d'augmentar la densitat cel·lular, i així augmentar la productivitat del procés, tot disminuint la duració de la fase d'inducció, s'han utilitzat sistemes d'alimentació de fonts de carboni utilitzades com a cosubstrats juntament amb el metanol durant la fase de producció (Files *et al.*, 2001). Aquest tipus d'estratègia s'ha utilitzat majoritàriament pel fenotip Mut<sup>s</sup>, degut a la seva capacitat limitada d'assimilar el metanol, el qual dona com a resulta llargues fases d'inducció (mínim de 100 h). Autors com Loewen *et al.*, (1997) i Brierley *et al.*, (1990), realitzen els primers experiments utilitzant estratègies en semicontinu mitjançant l'ús de substrats mixtes (metanol i glicerol). Addicions limitants de glicerol garanteixen un augment en el creixement cel·lular, tot permetent la inducció de la producció de les proteïnes recombinats (Thorpe *et al.*, 1999). Tanmateix, cal tenir present que un excés de glicerol reprimirà l'activitat del promotor AOX conclouent en baixes productivitats de la proteïna recombinats d'interès (Thorpe *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2005).

Per tant, la utilització d'altres cosubstrats diferents al glicerol poden millorar les limitacions d'aquest, produint augments en les productivitats dels processos mitjançant estratègies en semicontinu (Jungo *et al.*, 2007). El sorbitol pot considerar-se un excel·lent cosubstrat per a la producció de proteïnes recombinats mitjançant *P. pastoris*.

A diferència del glicerol, les acumulacions del sorbitol en el medi de cultiu durant la fases d'inducció, no afecten al nivell d'expressió de proteïnes recombinants. De fet, experiments realitzats per Resina *et al.*, (2005), els quals utilitzen el promotor *FLD* (formaldehid deshidrogenasa) per a la producció de lipases de *Rhizopus oryzae*, obtenen la màxima producció al treballar amb una acumulació de sorbitol en el medi de cultiu de fins a 8 g l<sup>-1</sup>, en front dels cultius realitzats utilitzant la mateixa estratègia, però mantenint el sorbitol limitant durant la fase d'inducció. Experiments realitzats en flascons agitats, demostren que el sorbitol presenta efectes inhibitoris per al creixement cel·lular quan les acumulacions d'aquest superen els 50 g l<sup>-1</sup> (Jungo *et al.*, 2007). Així doncs, el control de l'acumulació de sorbitol durant la fase de producció serà menys crítica que en cultius on s'utilitzi una mescla de glicerol i metanol. Altres autors com Sreekrishna *et al.*, (1997), implementen l'ús de sorbitol i metanol en estratègies en semicontinu per a la producció de MMP (*matrix metalloproteinase*). A més a més, Thorpe *et al.*, (1999), realitzen cultius en semicontinu, comparant l'efecte de les mescles sorbitol-metanol i glicerol-metanol per a la producció recombinant d'una proteïna anticongelant (srAFP) mantenint la concentració de metanol durant la fase d'inducció entre 1-2 g l<sup>-1</sup>. Tot i que els rendiments obtinguts eren inferiors a l'utilitzar el sorbitol, aquesta disminució va ser compensada per les superiors velocitats específiques de producció obtingudes, tot i arribar a nivells de biomassa finals inferiors.

D'altra banda, autors com Ian i Meagher (2001), comparen l'efecte de diferents cosubstrats (glucosa, glicerol, etanol, acetat, sorbitol, manitol, trehalosa i alanina) sobre el creixement cel·lular i la producció de  $\beta$ -galactosidasa utilitzant els fenotips Mut<sup>+</sup> i Mut<sup>-</sup> en flascons agitats, per tal de mirar de promoure la utilització del fenotip Mut<sup>-</sup>. Aquests conclouen que el sorbitol, l'alanina, el manitol i la trehalosa, es comporten com a excel·lents cosubstrats, no presentant efectes negatius sobre l'activitat del promotor AOX, a diferència de la utilització de glucosa, glicerol i etanol.

Varis autors han utilitzat diferents estratègies de cultiu en semicontinu, utilitzant mescles de metanol i sorbitol. Per exemple, Thorpe *et al.*, (1999) realitzen l'addició dels dos substrats durant la fase d'inducció, mirant de mantenir la concentració de metanol per sota de 2 g l<sup>-1</sup> i el sorbitol sota condicions limitants no utilitzant cap control en línia, realitzen un control manual dels cabals d'addició. Boze *et al.*, (2001), realitzen durant la fase d'inducció, una addició exponencial preprogramada d'ambos substrats (control en



llaç obert). Xie *et al.*, (2005), addicionen metanol al cultiu durant la fase d'inducció per tal de mantenir la concentració d'aquest a  $5 \text{ g l}^{-1}$ , mitjançant l'ús d'un algorisme de control lligat a mesures realitzades on-line. El sorbitol és controlat de forma manual, no obtenint acumulacions d'aquest durant la fase d'inducció.

Jungo *et al.*, (2007), realitzen un estudi quantitatiu de la influència de la relació de metanol-sorbitol per a la producció recombinant d'avidina mitjançant l'ús del fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Aquests investigadors demostren que utilitzant una estratègia amb substrats mixtes, s'arriben a obtenir valors de producció similars, i en alguns casos superiors, a quan l'estratègia de cultiu és realitza mitjançant la utilització única del metanol. A més a més, la introducció del sorbitol com a cosubstrat presenta importants avantatges operacionals, així com que les acumulacions d'aquest en el medi de cultiu no afecten a la productivitat del producte recombinant d'interès, ja que aquest no és repressor del promotor AOX. Alhora la presència d'aquest, disminueix el consum d'oxigen i el calor generat durant el cultiu, en comparació amb els cultius on el metanol o bé el glicerol són utilitzats com a úniques fonts de carboni. Tal i com puntualitzen aquests mateixos autors, l'entalpia de combustió del sorbitol és un 8 % inferior a la del glicerol, i un 30% inferior a la del metanol. Per tant, per una mateixa velocitat específica de creixement, la calor de combustió generada en un cultiu on s'utilitzi sorbitol/metanol com a substrats, serà inferior al que generaran cultius realitzats amb glicerol/metanol o bé utilitzant únicament el metanol. Cal destacar que tant la reducció del consum d'oxigen com la reducció del calor de combustió, presenten grans avantatges alhora de realitzar cultius a grans densitats cel·lulars de *P. pastoris*, especialment al treballar a grans escales, ja que garantir una correcta transferència d'oxigen al reactor, així com refredar el reactor per tal de controlar la temperatura del procés, són dues de les principals limitacions alhora de dur a terme processos amb *P. pastoris* a gran escala (Hensing *et al.*, 1995; Schilling *et al.*, 2001; Jenzsch *et al.*, 2004).

Çelic *et al.*, (2009), realitzen una estratègia similar per a la producció recombinant de eritropoietina humana (RHuEPO) utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Durant la fase d'inducció, el metanol es addicionat exponencialment a una  $\mu$  determinada (0.02 0.03 i  $0.04 \text{ h}^{-1}$ ), i el sorbitol es addicionat en forma de pols al finalitzar la fase de transició ( $50 \text{ g l}^{-1}$ ). A diferència de realitzar els cultius amb el metanol com a única font de carboni, a l'introduir del sorbitol en el procés, disminueixen la fase de latència

presentada a l'iniciar la fase d'inducció, augmenten 1.8 vegades la quantitat de proteïna recombinant produïda, redueixen la producció de proteases 1.2 vegades, disminueixen el consum d'oxigen 2 vegades, i obtenen rendiments  $Y_{P/X}$  1.4 vegades superiors.

Ramon *et al.*, (2007), realitzen una primera aproximació per a la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, aplicant una estratègia en semicontinu amb la utilització de substrats mixtes, obtenint productivitats més elevades que les trobades utilitzant el metanol com a única font de carboni. A més a més, l'estratègia utilitzada on el metanol es manté a 0.5 g l<sup>-1</sup> i el sorbitol és limitant, ha permès augmentar la producció de la proteïna d'interès recombinant, tot eliminat les dràstiques reduccions observades en la velocitat específica de producció a l'inici de la fase d'inducció quan el metanol era utilitzat com a única font de carboni (Cos *et al.*, 2006a).

Altres autors (Minning *et al.*, 2001), indiquen que la producció de ROL disminueix la  $\mu$  registrada per *P. pastoris*, utilitzant el metanol com a substrat en comparació amb una soca no productora. Alhora altres estudis (Marx *et al.*, 2006; Resina *et al.*, 2007), indiquen que la sobre-expressió de ROL, planteja un problema important relacionat amb la fisiologia de les cèl·lules de *P. pastoris*, provocant una acumulació de proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic, el que activarà la resposta de proteïnes mal plegades (UPR). És important destacar la relació que pot presentar aquest efecte amb la  $\mu$  registrada durant el cultiu, observant-se una major UPR a l'augmentar la  $\mu$  de treball.

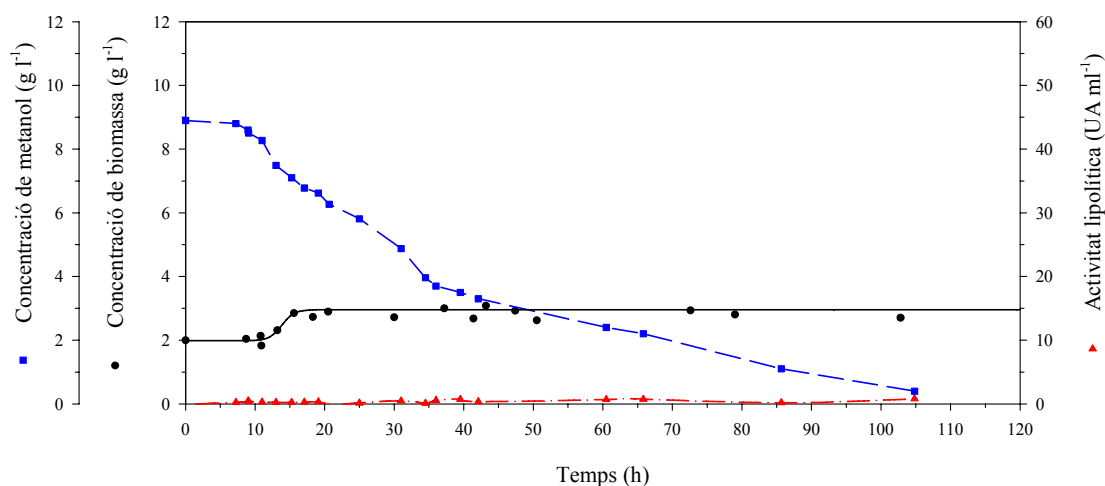
Després de realitzar una visió global de l'estat de la qüestió i dels camps de treball realitzats, es decideix continuar amb el treball iniciat per Ramon *et al.*, (2007), elaborant un estudi sistemàtic en semicontinu, de com la concentració de metanol residual en el medi i la  $\mu$  de treball utilitzada, en funció de l'addició de sorbitol, poden afectar sobre la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*. Per tant, es treballarà amb 3 consignes de metanol (0.5, 2 i 4 g l<sup>-1</sup>), les quals es mantindran fixades durant la fase d'inducció, i a dues  $\mu$  (0.02 i 0.01 h<sup>-1</sup>), que vindran regulades per l'addició del sorbitol. Mitjançant aquest estudi, s'obtiniran les condicions òptimes per a la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* utilitzant una estratègia de substrats mixtes.

## 5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.3.1 Cultiu en discontinu usant com a únic substrat el metanol

L'objectiu principal d'aquest capítol, és verificar els avantatges que presenta la utilització de substrats mixtes en el procés de producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*.

Inicialment es realitza un cultiu amb el fenotip Mut<sup>s</sup> en discontinu utilitzant el metanol com a única font de carboni (figura 5.1). Aquest cultiu, permet apreciar les limitacions que presenta aquest fenotip, alhora de metabolitzar metanol. S'observa l'aturada del creixement cel·lular produït a les 16 hores de cultiu amb uns nivells de producció residuals (1 UA ml<sup>-1</sup>). Per tant, es descarta l'ús individual del metanol amb aquest fenotip com a única font de carboni, al presentar una deficiència important en el creixement, i consegüentment en la producció.

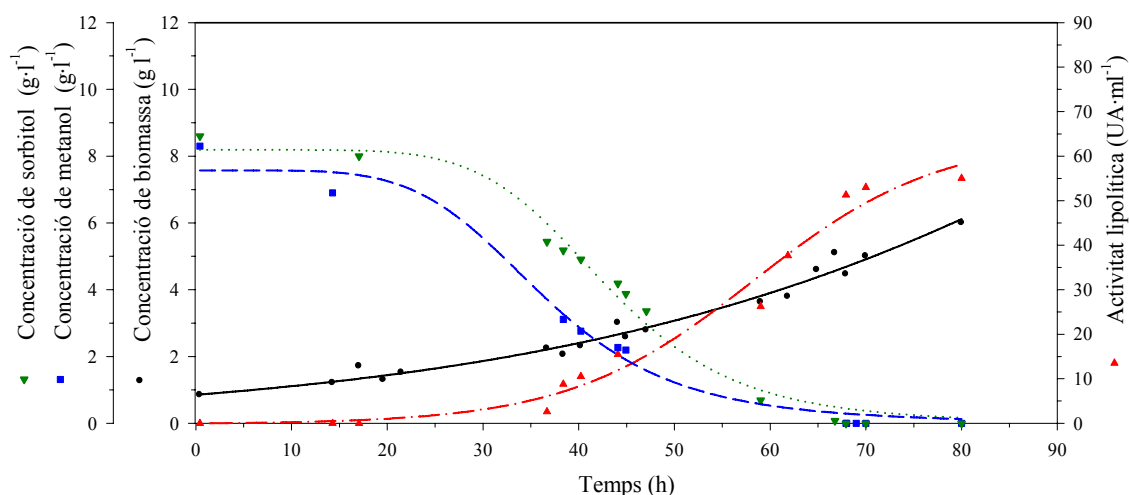


**Figura 5.1:** Evolució de la concentració de biomassa, metanol i activitat lipolítica per una fermentació en discontinu de la soca Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* emprant com a únic substrat el metanol.

A l'analitzar l'evolució de la concentració de metanol, es pot observar una disminució entre les 8 i les 15 hores associada al consum d'aquest. Posteriorment, l'eliminació del metanol es produïda probablement, pels requeriments associats al

manteniment del microorganisme i majoritàriament per l'arrossegament del metanol de la fase vapor (*stripping*).

Posteriorment, es realitza un experiment sota les mateixes condicions de cultiu, però utilitzant en aquest cas, metanol i sorbitol com a cosubstrats. Les concentracions inicials d'aquests corresponen a 10 g l<sup>-1</sup>.



**Figura 5.2:** Evolució de la concentració de biomassa, sorbitol, metanol i activitat lipolítica per un cultiu en discontinu amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats .

A l'incloure el sorbitol en el medi de cultiu, es presenten diferències significatives en el transcurs del cultiu (figura 5.2). La utilització del sorbitol com a cosubstrat, permet assolir nivells de biomassa superiors, fins als 5 g l<sup>-1</sup>, registrant una  $\mu$  de 0.022 h<sup>-1</sup>. L'assimilació simultània dels dos substrats permet el creixement del microorganisme, el qual no era possible en presència de metanol com a únic substrat i també presenta destacades millores en els valors d'activitat lipolítica, arribant a obtenir un màxim de 53 UA ml<sup>-1</sup>. Cal recordar, que al treballar únicament amb metanol, l'activitat restava en valors residuals, al voltant d'1 UA ml<sup>-1</sup>. La productivitat i la productivitat específica augmenten fins arribar a obtenir un màxim de 757 UA l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> i 151 UA g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivament (taula 5.1), els quals eren inexistents en presència de metanol com a únic substrat.

El mateix experiment en discontinu ha estat realitzat per Ramon *et al.*, (2007), usant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* per a la producció de ROL. En aquest cultiu el consum dels substrats es realitza de forma seqüencial (creixement diàuxic), consumint-se en primer lloc el metanol i en segon lloc el sorbitol. L'activitat lipolítica augmenta fins a un valor màxim de 10.4 UA ml<sup>-1</sup>. Cos *et al.*, (2005), realitzen un cultiu en discontinu amb la mateixa soca productora de ROL (Mut<sup>+</sup>), però utilitzant el metanol com a única font de carboni a una concentració inicial de 10 g l<sup>-1</sup>. En aquestes condicions l'activitat lipolítica màxima registrada va ser de 6.1 UA ml<sup>-1</sup>. Si es comparen els resultats que obtenen ambdós autors treballant amb el fenotip Mut<sup>+</sup>, és pot veure un augment significatiu (1.7 vegades) de l'activitat lipolítica màxima registrada al treballar amb el sorbitol com a cosubstrat.

A la taula 5.1, es troben resumides les dades més significatives pels diferents cultius realitzats. Es pot observar que a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup>, tot i assolir nivells d'activitat i de Y<sub>p/x</sub> lleugerament superiors emprant substrats mixtes (taula 5.1), els nivells de productivitat i productivitat específica són inferiors. Per tant, Ramon *et al.*, (2007) conclouen que la utilització de substrats mixtes en soques Mut<sup>+</sup>, no millora de forma significativa la producció de proteïna heteròloga de ROL.

**Taula 5.1:** Recull comparatiu dels paràmetres i variables associats a la producció en discontinu dels fenotips de *P. pastoris* produint ROL sota el control del promotor pAOX1. Els paràmetres resultants han estat calculats en base a l'activitat lipolítica màxima. (\*<sup>1</sup> Cos et al., 2005), (\*<sup>2</sup> Ramon et al., 2007).

Fenotip	Mut <sup>+</sup> * <sup>1</sup>	Mut <sup>+</sup> * <sup>2</sup>	Mut <sup>s</sup>	Mut <sup>s</sup>
Conc. metanol (g l <sup>-1</sup> )	10	10	10	10
Conc. sorbitol (g l <sup>-1</sup> )	-	10	-	10
Act. lipolítica max. (UA ml <sup>-1</sup> )	6.1	10.4	1.0	53.0
Y <sub>p/x</sub> (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	1413	1825	333	10600
Productivitat (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	201	153	8	757
Productivitat esp. (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	47	27	3	151

D'altra banda, si es compara l'efecte de la utilització del sorbitol com a cosubstrat entre els dos fenotips estudiats, es pot veure que presenta una major influència en el

fenotip Mut<sup>s</sup> (taula 5.1). Alhora, els valors registrats de producció utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> amb substrats mixtes, es troben entre 4 i 6 vegades superiors als trobats pel fenotip Mut<sup>+</sup>, sota les mateixes condicions de cultiu (taula 5.1).

Tenint present els resultats obtinguts en els cultius realitzats en discontinu, es planteja la necessitat de seleccionar un fenotip per a poder centrar la investigació en base a la capacitat productiva i realitzar el treball d'optimització de l'estratègia de cultiu. La selecció del fenotip es realitza tenint en compte els següents paràmetres:

1. Els valors obtinguts de productivitat,  $Y_{P/X}$  i productivitat específica.
2. Aspectes operacionals de l'estratègia de cultiu, principalment fent referència a les necessitats d'oxigen pels diferents fenotips i la dinàmica de consum de metanol del cultiu.

L'experiència del grup d'investigació amb el fenotip Mut<sup>+</sup> ens indica que operacionalment és més senzilla emprar una soca amb una velocitat de consum de metanol lenta (Mut<sup>s</sup>), que no una que sigui més elevada (Mut<sup>+</sup>). El cultiu d'aquesta última implica treballar amb un microorganisme amb una velocitat de consum d'oxigen molt elevada que dificulta l'operació del procés per la generació d'escumes, l'arrossegament del metanol present i la necessitat de tenir un controlador de la concentració de metanol que pugui operar amb una dinàmica prou ràpida. Tots aquests aspectes dificulten l'operativitat del procés i afavoreixen la desestabilització del mateix, i a més, poden provocar una difícil reproductibilitat dels experiments (Ramon *et al.*, 2007).

Tenint present els resultats prèviament obtinguts per Cos *et al.*, (2005) i Ramon *et al.*, (2007), i els resultats obtinguts en els cultius realitzats en discontinu, el fenotip que s'escull per a continuar aquest treball, valorant els aspectes relacionats amb el punt 1 i 2, és el Mut<sup>s</sup>.

### 5.3.2 Estratègia per realitzar els cultius en semicontinu utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup>

Per poder portar a terme cultius en semicontinu s'ha de definir una estratègia per realitzar l'addició del metanol i del sorbitol al fermentador, i així estudiar l'efecte de la  $\mu$  i de la concentració de l'agent inductor (metanol), sobre la productivitat del procés en semicontinu.

L'addició del sorbitol, es realitzarà de forma exponencial, tal i com s'ha explicat en l'apartat 3.6.3. *Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol)*. A l'equació 5.1 es poden veure els paràmetres que caldrà utilitzar per a dur a terme l'addició exponencial. Serà necessària la realització de cultius amb sorbitol en discontinu, per tal de determinar el  $Y_{X/S}$  i el valor de la  $\mu_{\max}$  per aquest substrat, per tal de poder dur a terme l'addició.

$$u(t) = \frac{\mu(t) [X(t_0) V(t_0)]}{Y_{X/S} S_0} \exp [\mu (t - t_0)] \quad \text{eq. 5.1}$$

Aquest cabal depèn del volum inicial ( $V(t_0)$ ), de la concentració de biomassa inicial ( $X(t_0)$ ), de la concentració de sorbitol inicial ( $S_0$ ), del  $Y_{X/S}$  i de la  $\mu$ . Es realitzen diferents experiments en discontinu utilitzant la soca Mut<sup>s</sup>, amb diferents concentracions de sorbitol, per tal de trobar la velocitat màxima específica de creixement ( $\mu_{\max}$ ) i el  $Y_{X/S}$ . Es parteix de la hipòtesis que el responsable majoritari del creixement del microorganisme en la fase d'inducció és el sorbitol, com ja s'ha comentat anteriorment. Aquest cultius s'han realitzat utilitzant el medi de cultiu que s'usarà posteriorment als experiments en semicontinu.

Es realitzen tres cultius en discontinu utilitzant diferents concentracions inicials de sorbitol, 51.4, 35.8 i 26.7 g l<sup>-1</sup>. A la taula 5.2, es troben recollits els valors calculats per a cada un dels cultius de la  $\mu$  i del rendiment biomassa/substrat ( $Y_{X/S}$ ).

**Taula 5.2:** Recull comparatiu dels paràmetres i variables associats al creixement en discontinu per la soca Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* usant com a únic substrat el sorbitol amb diferents concentracions inicials

Nom fermentació	DS-1	DS-2	DS-3
Conc. sorbitol inicial (g l <sup>-1</sup> )	51.4	35.8	26.7
Conc. biomassa final (g l <sup>-1</sup> )	17.5	13.1	12.4
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.016	0.020	0.021
$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> g <sub>Sor</sub> <sup>-1</sup> )	0.31	0.34	0.40

En el cultiu en discontinu DS-1 s'observa que el valor de  $\mu$ , és inferior al registrat en els cultius DS-2 i DS-3. Cal destacar que en DS-1 el consum de sorbitol és més lent que als altres dos cultius, sobretot durant les primeres hores de cultiu. Aquest fet sembla indicar que es pot presentar una inhibició per substrat al treballar amb la concentració inicial de sorbitol de 51.4 g l<sup>-1</sup>.

Per tant, davant dels resultats trobats en els diferents cultius, la velocitat específica de creixement obtinguda es troba al voltant de 0.02 h<sup>-1</sup>. Tot i que s'espera que la  $\mu_{\max}$  en els cultius en semicontinu es trobi per sobre d'aquest valor, degut a l'aportació energètica del metanol, el qual estarà present en el medi de cultiu. Experiments realitzats per Cos *et al.*, (2006a) en semicontinu utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, on la concentració de metanol es troba fixada en 0.5 g l<sup>-1</sup> durant la fase d'inducció, es registra un valor de  $\mu_{\text{mitjana}}$  de 0.003 h<sup>-1</sup>.

El valor de  $Y_{X/S}$ , que s'utilitzarà pels posteriors experiments en semicontinu, serà de 0.3 g<sub>X</sub> g<sub>Sor</sub><sup>-1</sup>. Tot i que als experiments en discontinu realitzats en aquest apartat (DS-1, DS-2 i DS-3), el valor es troba en 0.31, 0.34 i 0.40 g<sub>X</sub> g<sub>Sor</sub><sup>-1</sup>, experiments realitzats per Resina *et al.*, (2005), utilitzant com a principal font de carboni el sorbitol, obtenen un valor d'aquest paràmetre inferior i igual a 0.3 g<sub>X</sub> g<sub>Sor</sub><sup>-1</sup>, al treballar en semicontinu. Si no es complissin els valors trobats en els cultius en semicontinu, serà necessari recalculer els cabals d'addició de sorbitol durant el cultiu. Per això, és necessari realitzar un seguiment de la concentració d'aquesta font de carboni en el medi de cultiu mitjançant anàlisis en l'HPLC.



### 5.3.3 Estratègia d'addició del metanol

Per dissenyar l'estratègia d'addició de metanol, es parteix del coneixement del comportament de la soca Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* en metanol com a únic substrat (Cos *et al.*, 2006a). A la taula 5.3, es pot veure l'evolució dels diferents paràmetres per les concentracions fixades de metanol a 0.5, 1 i 1.75 g l<sup>-1</sup>. Aquests experiments verifiquen que la inducció per la producció de la proteïna heteròloga ROL, és més ràpida al treballar a concentracions baixes de metanol (0.5 g l<sup>-1</sup>). En aquest cas la producció de la proteïna s'inicia a la primera hora d'inducció, i la  $q_p$  arriba a un màxim de 376 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a les 3 hores d'inducció. Malauradament, a partir d'aquest moment aquesta disminueix, i a les 38 hores d'inducció el valor de la  $q_p$  és inferior a 10 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Per tant, tot i no aconseguir mantenir els valors màxims registrats, aquesta arriba a un màxim a les 3 hores d'inducció.

**Taula 5.3:** Recull comparatiu dels paràmetres i variables associats al creixement en discontinu per la soca Muts de *P. pastoris* usant com a únic substrat el metanol amb diferents concentracions inicials. (Cos *et al.*, 2006a)

Consigna metanol (g l <sup>-1</sup> )	0.5	1	1.75
Activitat lip. màx.(UA ml <sup>-1</sup> )	137	490	150
$q_{p \max}^*$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	376	440	60
$Y_{P/X}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	3917	11236	3017
Productivitat vol. (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1996	4901	1228
Productivitat esp. (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	57	112	25

\*Calculat durant la fase d'inducció

Cos *et al.*, (2006a), indiquen que al mantenir la concentració de metanol a 1 g l<sup>-1</sup> durant la fase d'inducció, es registra la màxima activitat lipolítica (taula 5.3). En aquest cas, entre les 30 i 50 hores de cultiu, no s'aprecia cap registre significatiu de proteïna recombinant extracel·lular, tot i que el microorganisme estigui consumint metanol. A partir de les 50 hores i durant les 40 hores restants hi ha un increment pràcticament lineal d'activitat fins arribar a un valor màxim de 490 UA ml<sup>-1</sup>. A partir de les 90 hores de fermentació i fins al final d'aquesta la producció de ROL resta totalment aturada.

Quan la concentració de metanol es manté a  $1.75 \text{ g l}^{-1}$  durant la fase d'inducció, el valor màxim d'activitat registrada és de  $150 \text{ UA ml}^{-1}$ , inferior a l'obtinguda quan la concentració de metanol es mantenia a  $1 \text{ g l}^{-1}$  (Cos *et al.*, 2006a). Al treballar a una concentració fixada de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  la  $q_p$  presenta un màxim a les 13 hores d'inducció i al treballar a  $1 \text{ g l}^{-1}$ , la  $q_p$  presenta un màxim a les 38 hores d'inducció, però en ambdós casos, disminueix fins a fer-se pràcticament nul·la. Quan la concentració es troba fixada a  $1.75 \text{ g l}^{-1}$ , no s'aprecien de forma significativa màxims ni mínims d'aquest paràmetre. En aquest cas la  $q_p$  es manté constant entre les 40 i 120 hores de cultiu, presentant una lleugera disminució d'aquest paràmetre a partir de les 130 hores, però registrant valors molt inferiors als obtinguts amb la resta de consignes utilitzades.

Un cop analitzats els antecedents dels comportaments de la soca Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, en les diferents concentracions fixades de metanol, s'escullen tres concentracions d'aquest substrat per realitzar el posterior estudi en semicontinu, utilitzant una estratègia amb substrats mixtes. Amb aquesta estratègia es preveu vèncer les limitacions presentades per la soca Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* a l'usar el metanol com a únic substrat, premissa verificada als experiments realitzats en discontinu.

La primera concentració escollida és de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  de metanol a la fase d'inducció del cultiu, degut a la ràpida producció de la proteïna heteròloga ROL. La segona concentració seleccionada per continuar aquest treball serà de  $2 \text{ g l}^{-1}$  de metanol. Tot i no ser la concentració amb la que s'obtenen valors màxims d'activitat lipolítica ni de productivitat als experiments realitzats per Cos *et al.*, (2006a), aquesta concentració pot apropar-se al comportament observat en l'experiment on la concentració de metanol està fixada a  $1.75 \text{ g l}^{-1}$ , i presenta l'avantatge de mantenir un valor de  $q_p$  constant durant gran part de la fase d'inducció. També es realitzarà un cultiu a  $4 \text{ g l}^{-1}$ , per veure l'efecte de la concentració fixada més elevada en el procés de producció.

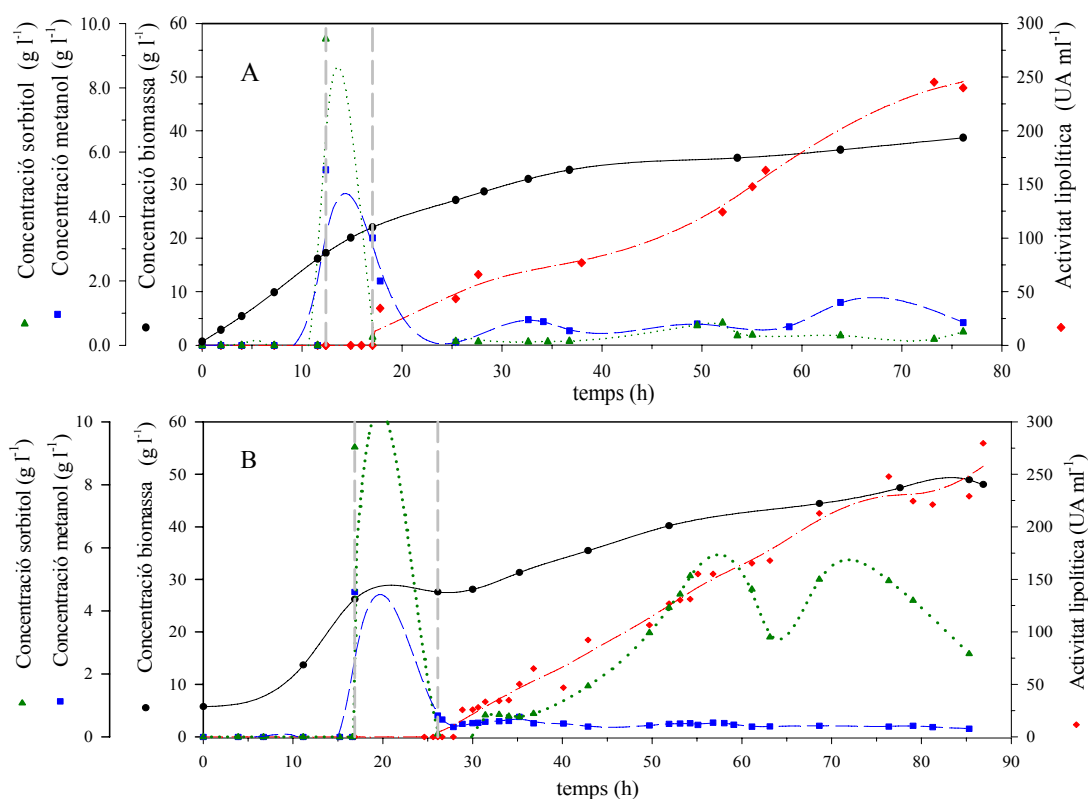
Per realitzar el control de la concentració de metanol durant els cultius en semicontinu, es durà a terme un control de tipus PI (actua en funció del senyal rebut de la concentració en línia i de la consigna seleccionada) combinat amb un control predictiu, que permetrà establir el consum del microorganisme en funció del temps partint del balanç de matèria del metanol prèviament descrit per Cos *et al.*, (2006a) i explicat en l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisi de metanol en línia* d'aquest treball. Per dur

a terme la mesura de la concentració de metanol a l'interior del reactor en línia durant els cultius en semicontinu, s'utilitza una sonda de metanol en línia (Raven Biotech Inc., Vancouver, Canadà) descrita també en l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisis de metanol en línia*.

### 5.3.4 Evolució dels diferents cultius realitzats

Tots els cultius presentaran una primera fase en discontinu de consum de glicerol, i una posterior fase de transició, comú per tots els experiments realitzats, explicades en detall a l'apartat 3.7.3 *Cultius en fermentador a 5 litres*. La fase d'inducció en tots els cultius s'iniciarà mitjançant l'estratègia d'addició exponencial programada amb sorbitol (control en llaç obert), per tal de mantenir la  $\mu$  al valor desitjat, explicat prèviament en l'apartat 3.6.3. *Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol)*. De la mateixa forma, per tal de mantenir la concentració de metanol en la consigna desitjada s'utilitza un algorisme de control descrit prèviament per Cos *et al.*, (2006a) i explicat en l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisis de metanol en línia*, en l'apartat materials i mètodes d'aquest treball. En tots els cultius la concentració residual de metanol en el medi de cultiu és manté en el valor de la consigna amb desviacions inferiors al 15%, demostrant la robustesa del sistema de control de metanol i per tant de les avantatges de la implementació de la tecnologia analítica de procés (PAT) pel monitoratge i control del sistema *P. pastoris*.

A la figura 5.3 s'observa el comportament del cultiu quan la consigna de metanol es trobava fixada a  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ , treballant a les diferents  $\mu$ , les quals venen marcades pel cabal de sorbitol afegit en llaç obert.



**Figura 5.3:** Evolució dels diferents paràmetres en cultius en semicontinu amb el fenotip Mut<sup>s</sup> utilitzant una estratègia de substrats mixtes mantenint la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$  (A) /  $0.02 \text{ h}^{-1}$  (B) i la concentració de metanol fixada a  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ .

Fent referència a la fase de transició, es pot veure que a la figura 5.3 A, la concentració de metanol no s'esgota abans d'iniciar la fase d'inducció a diferència de la figura 5.3 B, en la que aquest s'esgota fins arribar a zero. Degut a problemes operacionals, es decideix iniciar la transició en el primer cultiu abans de que es finalitzi la concentració de metanol, no presentant aquest fet cap efecte negatiu sobre el cultiu.

Tal i com es pot observar, l'augment de la biomassa és progressiu durant tot el cultiu, arribant a una biomassa final de  $38.7 \text{ g l}^{-1}$  quan la  $\mu$  era fixada a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , i de  $48.0$  quan la  $\mu$  era fixada a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . La  $\mu$  mitjana durant la fase d'inducció va ser de  $0.012 \text{ h}^{-1}$  en el primer cas i de  $0.016 \text{ h}^{-1}$  al segons cas. Quan la consigna de  $\mu$  era de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , el sorbitol es va mantenir limitant durant tot el cultiu, però d'altra banda quan la consigna de  $\mu$  era de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , el sorbitol es va acumular fins a una concentració màxima de  $5 \text{ g l}^{-1}$ , conseqüència de treballar propers al valor de la  $\mu_{\max}$ . Per tal de corregir les acumulacions d'aquest substrat, es disminueix el cabal i es fixa el nou cabal

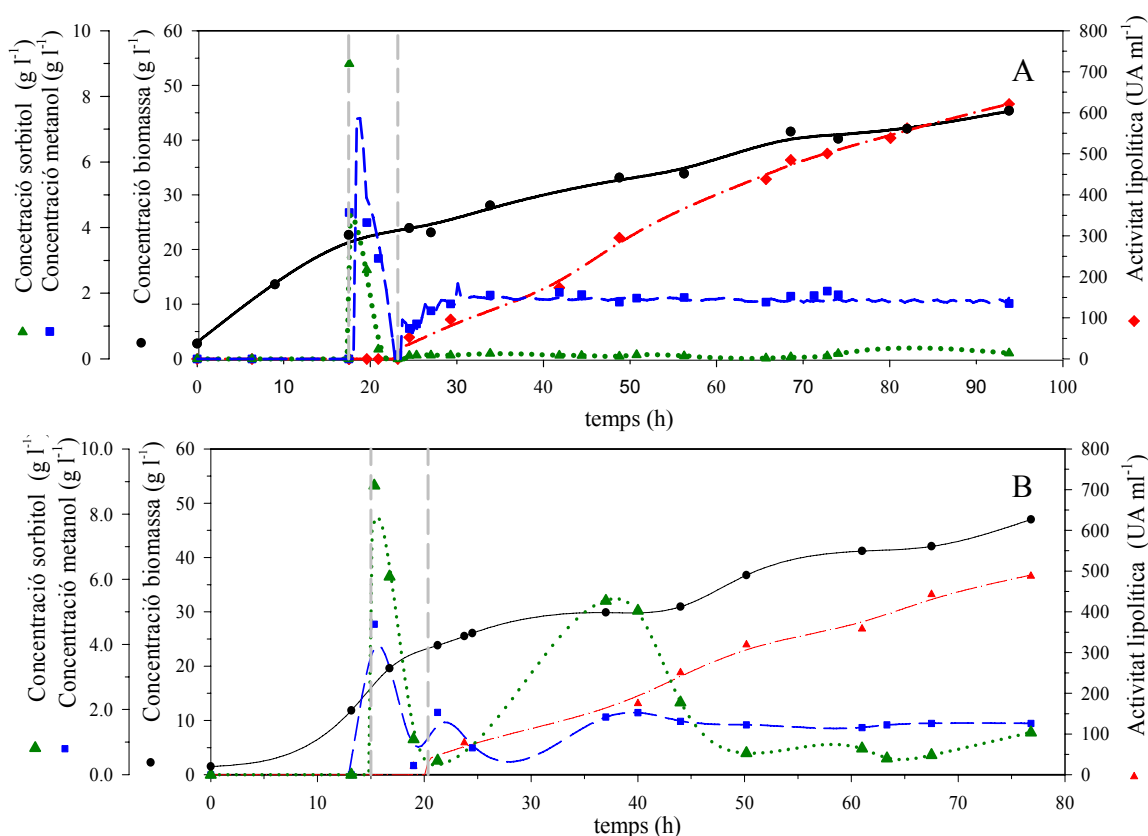
corresponent a la biomassa i volum obtinguts en el moment que es registra l'acumulació.

La concentració de metanol, es manté en ambdós cultius al voltant de la consigna seleccionada, exceptuant les ultimes hores del cultiu en el que la  $\mu$  es fixada a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , en les que el metanol s'acumula durant les ultimes hores d'inducció fins a un màxim de  $1.3 \text{ g l}^{-1}$  (figura 5.3 A).

Fent referència al producte recombinant d'interès, l'activitat lipolítica augmenta progressivament als dos cultius arribant a un màxim de  $216.3 \text{ UA ml}^{-1}$  quan la  $\mu$  era  $0.01 \text{ h}^{-1}$  i a  $279.5 \text{ UA ml}^{-1}$  quan la  $\mu$  era  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Per tant, a l'utilitzar la  $\mu$  més elevada, l'activitat màxima registrada augmenta 1.3 vegades. Cal destacar, que si es realitza el càlcul d'unitats d'activitat per grams de biomassa generats, és pot veure que per ambdós cultius el resultat és molt similar ( $5653.1$  versus  $5816.9 \text{ UA gx}^{-1}$ ), presentant les cèl·lules una similar capacitat de producció.

A la figura 5.4, es pot observar el comportament dels cultius quan la consigna de metanol es troba fixada a  $2 \text{ g l}^{-1}$ , a les dues velocitats específiques de creixement;  $0.01 \text{ h}^{-1}$  (A) i  $0.02 \text{ h}^{-1}$  (B). Quan la  $\mu$  va ser fixada en  $0.01 \text{ h}^{-1}$  la biomassa final obtinguda, va ser de  $45.4 \text{ g l}^{-1}$  i quan va ser fixada en  $0.02 \text{ h}^{-1}$  va ser de  $47.0 \text{ g l}^{-1}$ . En aquests cultius es pot veure una tendència similar a la observada quan la consigna de metanol era de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ , en el sentit de que es registren acumulacions de sorbitol fins a un màxim de  $5.5 \text{ g l}^{-1}$ , al treballar a la  $\mu$  més elevada, i D'altra banda, quan la  $\mu$  era de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , no s'observen acumulacions d'aquest substrat, restant limitant durant tot el cultiu. Si es realitza el càlcul mig de la  $\mu$  durant els cultius, s'obté un valor de  $0.013 \text{ h}^{-1}$  en el primer cas, i de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  al segon cas. En aquest cas, la concentració de metanol es troba al voltant de la consigna, no representant-se acumulacions d'aquest substrat.

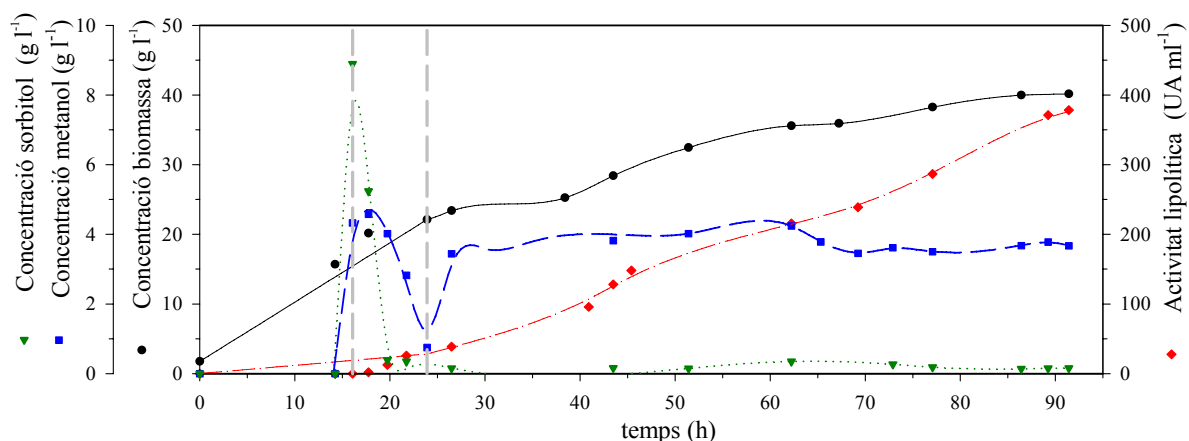
Fent referència a l'activitat lipolítica, es pot veure una evolució creixent durant tot el cultiu, presentant valors màxims de  $621.2$  i  $487.5 \text{ UA ml}^{-1}$  (taula 5.4), quan la  $\mu$  era de  $0.01$  i  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , respectivament. Per tant, contràriament al que s'havia observat en els cultius on la consigna de metanol era de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ , el valor d'activitat lipolítica registrada augmenta 1.3 vegades quan la  $\mu$  de treball és inferior.



**Figura 5.4:** Evolució dels diferents paràmetres en cultius en semicontinu amb el fenotip Mut<sup>s</sup> utilitzant una estratègia de substrats mixtes mantenint la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ (A) /  $0.02 \text{ h}^{-1}$  (B) i la concentració de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$ .

També al realitzar la comparació de l'activitat lipolítica registrada per grams de biomassa, es pot veure que en el cultiu creixent a  $0.01 \text{ h}^{-1}$  aquest valor correspon a  $13688.8 \text{ UA g}_x^{-1}$  i quan el creixement es troba en  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , aquest correspon a  $10369.1 \text{ UA g}_x^{-1}$  (taula 5.4). Per tant si es comparen els resultats obtinguts per ambdues consignes de metanol, el pot veure que al fixar la concentració de metanol en  $2 \text{ g l}^{-1}$ , la producció de lipasa per unitat de biomassa es troba entre 2.5 i 1.7 vegades superior a la trobada a la consigna de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ , al mantenir la  $\mu$  a  $0.01$  i  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , respectivament (taula 5.4).

Finalment, per tal de comprovar els efectes del metanol sobre la producció de ROL a concentracions superiors, es decideix realitzar un últim cultiu on la consigna de metanol és manté a  $4 \text{ g l}^{-1}$  i la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$  (figura 5.5). Al treballar amb aquesta consigna, es decideix realitzar un únic cultiu, ja que com prèviament s'ha pogut observar la  $\mu$  no presenta millores significatives, a diferència de l'efecte de la concentració de metanol.



**Figura 5.5:** Evolució dels diferents paràmetres de cultiu en semicontinu amb el fenotip Mut<sup>s</sup> utilitzant una estratègia de substrats mixtes mantenint la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$  i la concentració de metanol a  $4 \text{ g l}^{-1}$ .

En aquest cultiu la biomassa final obtinguda va ser de  $40.5 \text{ g l}^{-1}$ , presentant una  $\mu$  mitjana durant la fase d'inducció de  $0.015 \text{ h}^{-1}$ . Aquest valor es troba per sobre de la consigna seleccionada, degut a una sobre estimació dels cabals de sorbitol a l'inici de la fase d'inducció. El sorbitol es manté limitant durant tot el cultiu no presentant acumulacions. La concentració de metanol es manté al voltant de la consigna durant tot el cultiu. Fent referència a l'activitat lipolítica, aquest augmenta progressivament durant tot el cultiu, obtenint un màxim de  $378.2 \text{ UA ml}^{-1}$ .

Si es comparen els nivells d'activitat lipolítica màxima obtinguts als diferents cultius realitzats, es pot observar que l'activitat màxima s'obté al treballar a  $2 \text{ g l}^{-1}$  (taula 5.4). Per una consigna de metanol, per sobre o per sota d'aquesta, els valors disminueixen en 1.6 vegades si la consigna és de  $4 \text{ g l}^{-1}$ , i 2.8 vegades si la consigna és de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  (taula 5.4). Cal destacar que al treballar a  $4 \text{ g l}^{-1}$ , l'activitat lipolítica màxima registrada augmenta 1.7 vegades, en comparació amb la consigna de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ . Alhora, al treballar a  $4 \text{ g l}^{-1}$  s'obté un valor corresponent a  $9423.1 \text{ UA g}_x^{-1}$ , superior que a l'utilitzar una consigna de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ , i inferior a la consigna de  $2 \text{ g l}^{-1}$ .

**Taula 5.4:** Comparació dels paràmetres de producció obtinguts a l'utilitzar les diferents estratègies de cultiu (diferents consignes de metanol i velocitats específiques de creixement).

$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
Consigna metanol (g l <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	2.0	2.0	4.0
Activitat lip. màx. (UA ml <sup>-1</sup> )	216.3	279.5	621.2	487.5	378.2
Y <sub>p/x</sub> (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	5653.1	5816.9	13688.8	10369.1	9423.1
Productivitat vol. (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2953.8	3217.0	6623.6	6345.6	4168.4
Productivitat esp. (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	77.2	67.0	146.0	135.0	103.9

\* Valors calculats durant la fase d'inducció

### 5.3.5 Comparació dels resultats obtinguts en les diferents condicions

Un cop s'ha observat el comportament de les fermentacions per cada una de les condicions provades, es passarà a realitzar les comparacions entre tots els cultius realitzats. A la figura 5.6 es pot observar el comportament dels paràmetres més representatius pels cultius realitzats a les diferents condicions de treball.

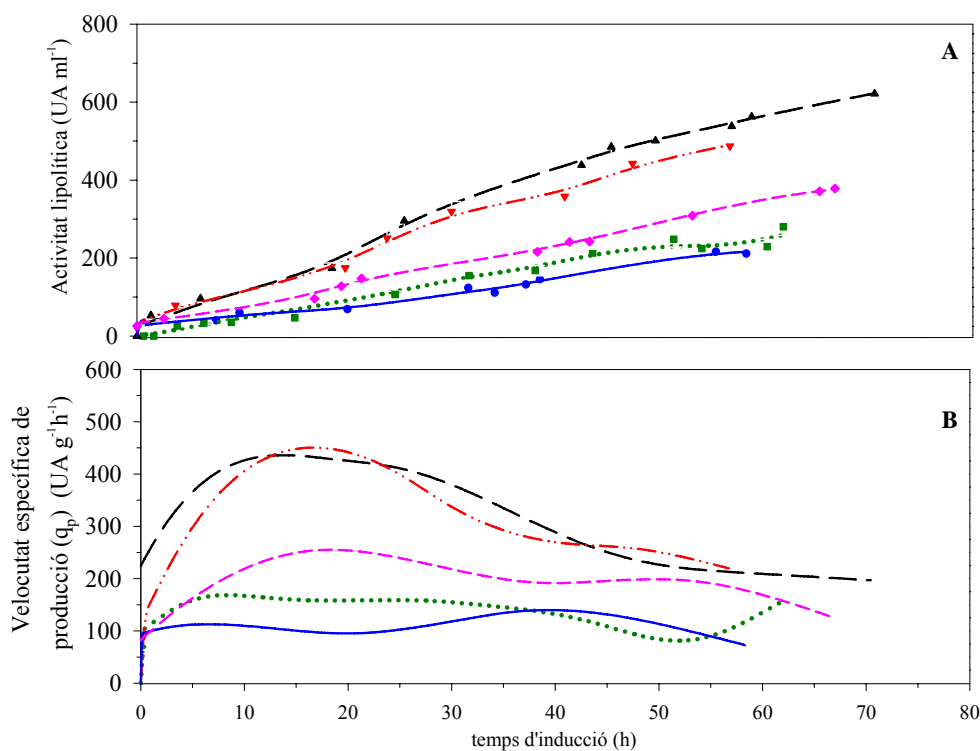
A la figura 5.6 A, es pot observar el perfil de l'activitat lipolítica registrat per cada una de les condicions provades. Es pot observar, que la consigna de metanol utilitzada afecta de forma clara i significativa sobre la producció de ROL. Tanmateix, sota la mateixa consigna de metanol, l'efecte de la  $\mu$  no presenta diferències significatives. Al comparar l'augment registrat en funció de la consigna de metanol utilitzada, es pot observar que a l'utilitzar la consigna de 2 g l<sup>-1</sup>, l'augment registrat és de 2.9 i 1.8 vegades a l'utilitzar la  $\mu$  corresponent a 0.01 i 0.02 h<sup>-1</sup>, respectivament en comparació als valors obtinguts quan la consigna era de 0.5 g l<sup>-1</sup> de metanol.

D'altra banda, si es comparen els resultats obtinguts quan es treballa a la mateixa concentració de metanol per les diferents  $\mu$ , es pot veure que els augments registrats es troben al voltant de 1.3 vegades, no presentant una diferència significativa, en comparació a l'efecte de la consigna de metanol.



Al observar el cultiu realitzat a  $4 \text{ g l}^{-1}$ , és pot veure una disminució als valors d'activitat lipolítica registrada, en comparació als valors obtinguts a  $2 \text{ g l}^{-1}$ . Cal destacar, que experiments realitzats per Surribas (2008), on s'estudiava l'efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL amb el fenotip  $\text{Mut}^+$  de *P. pastoris*, varen observar un comportament similar. Els valors màxims de producció els varen obtenir al treballar a la concentració de  $2 \text{ g l}^{-1}$ , obtenint valors inferiors a la consigna de  $5 \text{ g l}^{-1}$ .

Per tant, es pot veure amb claredat que l'efecte de la consigna de metanol serà el paràmetre clau, alhora de maximitzar la producció de ROL amb el fenotip  $\text{Mut}^s$  de *P. pastoris*.



**Figura 5.6:** Evolució dels diferents paràmetres representatius en cultius en semicontinu mitjançant l'ús de substrats mixtes utilitzant diferents consignes de metanol i velocitats específiques de creixement. (A) Activitat lipolítica. (B) Velocitat específica de producció. (Els diferents símbols corresponen a les següents condicions provades: (—)  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . (.....)  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . (— —)  $2 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . (— · —)  $2 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . (— - -)  $4 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ .

A la figura 5.6 B, es pot veure l'evolució de la velocitat específica de producció presentada en cada una de les condicions provades. Es poden observar dues tendències clares, en funció de la consigna de metanol utilitzada. Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'efecte de la  $\mu$  és molt inferior a l'efecte que presenta la concentració de metanol sobre el producte recombinant d'interès. Quan la consigna de metanol és de 2 g l<sup>-1</sup>, la  $q_p$  augmenta durant les primeres hores d'inducció arribant a un màxim al voltant de 400 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, el qual es manté entre les primeres 8 i 25 h d'inducció, en ambdós casos. Posteriorment, aquests valors presenten una disminució estabilitzant-se al voltant de 200 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. D'altra banda, quan la consigna utilitzada és de 0.5 g l<sup>-1</sup>, el valor de la  $q_p$  es manté estable durant tota l'etapa d'inducció, en ambdós casos. Però cal destacar que el valor màxim registrat és de 145.6 i 185.2 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> quan la  $\mu$  és de 0.01 i 0.02 h<sup>-1</sup>, respectivament. Finalment, a l'utilitzar la consigna de 4 g l<sup>-1</sup>, el comportament de la  $q_p$  és més similar al observat quan la consigna és de 2 g l<sup>-1</sup>, obtenint un màxim de 241.7 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, durant les primeres hores d'inducció, manifestant una disminució a partir de les 35 h, estabilitzant-se al voltant de 160 UA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Per tant, es pot observar que el comportament de la  $q_p$ , és significativament diferent per les tres concentracions provades.

Cal destacar que a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni, al treballar amb el fenotip Mut<sup>+</sup>, és pot observar una típica inhibició per substrat (Cos *et al.*, 2006b; Schenk *et al.*, 2007). En aquest cas, a l'utilitzar substrats mixtes amb el fenotip Mut<sup>s</sup>, les diferents consignes de metanol utilitzades, no afectaran de forma tant clara al creixement cel·lular, ja que aquest es troba majoritàriament controlat per l'addició del sorbitol. Tanmateix, cal destacar que la  $q_p$  és veu fortament influenciada per la consigna de metanol utilitzada, ja que el valor màxim obtingut quan la consigna és de 2 g l<sup>-1</sup>, és 3 vegades superior a l'obtingut quan la consigna és de 0.5 g l<sup>-1</sup>, i 1.8 vegades superior quan és de 4 g l<sup>-1</sup>. Com s'ha comentat anteriorment, a la consigna de 2 g l<sup>-1</sup>, es pot observar una disminució després de 30 h d'inducció, no presentada amb la mateixa força en la resta de condicions trobades. Però tot i així, el valor mig de la  $q_p$  registrat en 2 g l<sup>-1</sup>, és 2.8 i 1.5 vegades superior als registrats quan la consigna de metanol és de 0.5 i 4 g l<sup>-1</sup>, respectivament (taula 5.5).

A la taula 5.5, es poden observar els valors obtinguts relacionats amb el producte d'interès dels diferents processos. Pel que fa a la productivitat tant volumètrica com

específica, les millores presentades per l'efecte de la  $\mu$  es troben entre el 5 - 10 % per a la mateixa la consigna de metanol, indicant el lleu efecte de la  $\mu$  utilitzada sobre la productivitat del procés. Però d'altra banda, quan es comparen els resultats obtinguts al treballar a les diferents concentracions de metanol sota la mateixa  $\mu$ , es troba que s'obté el doble tant de productivitat específica com volumètrica al comparar les consignes de 0.5 i 2 g l<sup>-1</sup> de metanol. D'altra banda al comparar els consignes de 2 i 4 g l<sup>-1</sup>, tant productivitat específica com volumètrica presenten millores de 1.4 i 1.6 vegades respectivament.

Referent a  $Y_{p/x}$  el comportament és similar amb lleugeres millores al comparar els cultius realitzats sota la mateixa concentració de metanol (taula 5.5), però presenta diferències importants al comparar les diferents consignes utilitzades. Al comparar les concentracions de 2 i 0.5 g l<sup>-1</sup> de metanol, es poden observar millores en l' $Y_{p/x}$  de 2.4 i 1.8 vegades al treballar a les diferents  $\mu$  0.01 i 0.02 h<sup>-1</sup> respectivament. D'altra banda en la mateixa taula es poden comparar els resultats obtinguts a les concentracions de 2 i 4 g l<sup>-1</sup> obtenint-se valors 1.5 vegades superiors al treballar a 2 g l<sup>-1</sup>.

**Taula 5.5:** Comparació dels paràmetres de producció obtinguts a l'utilitzar les diferents estratègies de cultiu (diferents consignes de metanol i velocitats específiques de creixement).

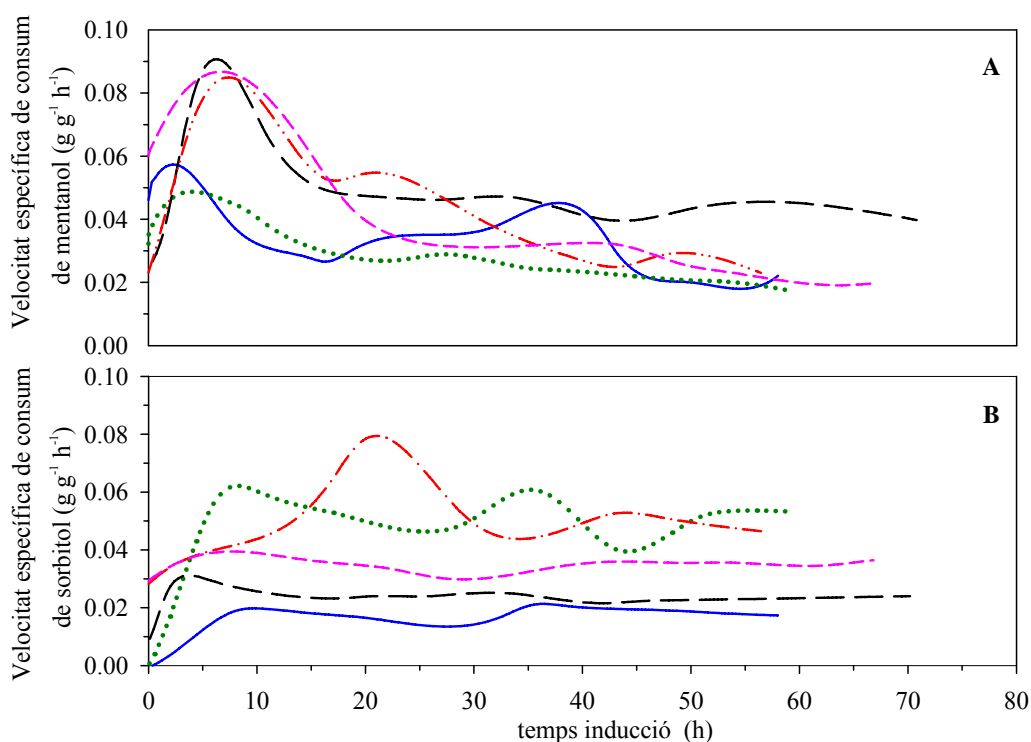
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
Consigna metanol (g l <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	2.0	2.0	4.0
Activitat lip. màx.(UA ml <sup>-1</sup> )	216.3	279.5	621.2	487.5	378.2
qp <sub>max</sub> * (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	145.6	185.2	433.0	451.4	241.7
qp <sub>mig</sub> * (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	109.7	138.2	306.3	326.1	198.2
$Y_{p/x}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	5653.1	5816.9	13688.8	10369.1	9423.1
Productivitat vol. (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2953.8	3217.0	6623.6	6345.6	4168.4
Productivitat esp. (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	77.2	67.0	146.0	135.0	103.9

\* Valors calculats durant la fase d'inducció

Per tant, l'efecte de la velocitat específica de creixement és molt inferior, en comparació amb l'efecte que presenten les variacions la concentració residual de metanol en el medi de cultiu. D'altra banda, cal destacar, que els cultius realitzats a la  $\mu$  més baixa, presenten avantatges operacionals, no presentant acumulacions de sorbitol,

conseqüència de les limitacions d'un control en llaç obert. Per tant, es pot concloure que les condicions òptimes, tant des del punt de vista de producció com operacional, són en les que la concentració de metanol és manté fixada en  $2 \text{ g l}^{-1}$ , i la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ .

A la figura 5.7 A, es pot veure l'evolució de la velocitat específica de consum de metanol presentada en cada una de les condicions provades. Es pot observar un comportament similar, en el sentit que en tots els casos, es presenta un augment (més pronunciat a l'augmentar la concentració de metanol), durant les primeres hores d'inducció, i posteriorment es registra una important disminució, sent més pronunciada al treballar a concentracions superiors de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$ . També s'observa una relació entre la consigna de metanol i la velocitat específica de consum d'aquest, presentant valors superiors de consum, a l'augmentar la concentració remenen en el medi de cultiu, fins a l'arribar a la concentració que semblaria presentar efectes inhibitoris, ( $4 \text{ g l}^{-1}$ ), on la  $q_{\text{SMet}}$  mitjana registrada tornarà a disminuir lleugerament (taula 5.6).



**Figura 5.7:** Evolució dels diferents paràmetres representatius en cultius en semicontinu mitjançant l'ús de substrats mixtes utilitzant diferents consignes de metanol i velocitats específiques de creixement. (A) Velocitat específica de consum de metanol. (B) Velocitat específica de consum de sorbitol. Els diferents símbols corresponen a les següents condicions proves: (—)  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . (·····)  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . (— —)  $2 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . (- · - ·)  $2 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . (- - -)  $4 \text{ g l}^{-1}$  metanol i  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ .

Al treballar amb la consigna de metanol de  $2 \text{ g l}^{-1}$ , la tendència que presenten la  $q_{\text{sMet}}$  (figura 5.7 A) i  $q_p$  (figura 5.6 B) són similars, tot i que la disminució que presenta la  $q_p$  és menys acusada que la que presenta la  $q_{\text{sMet}}$ . A partir de l'observació d'aquest perfil, es pot veure que existeix una relació entre la  $q_{\text{sMet}}$  i la  $q_p$ , indicant que una major velocitat de consum de metanol afavoreix a la producció de ROL.

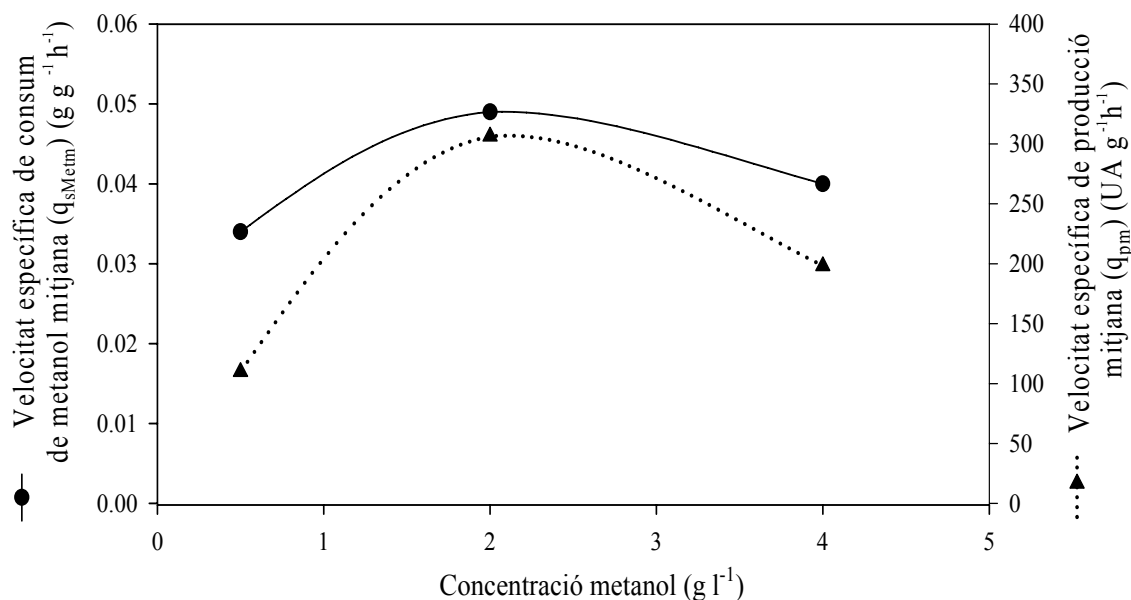
A la figura 5.7 B, es pot veure l'evolució de la velocitat específica de consum de sorbitol presentada en cada una de les condicions provades. Les acumulacions d'aquest substrat s'observen quan la  $\mu$  utilitzada és la més elevada ( $0.02 \text{ h}^{-1}$ ). Al presentar-se acumulacions d'aquest substrat en el medi, provoquen augments en la  $q_{\text{sSor}}$  (figura 5.7 B), disminuint a la que es corregeix l'acumulació d'aquest. Per contra, en els cultius on no hi han acumulacions de sorbitol, la  $q_{\text{sSor}}$  es manté estable durant tot el cultiu. En el cultiu on la concentració de metanol va ser fixada en  $4 \text{ g l}^{-1}$ , la  $q_{\text{sSor}}$ , es troba una mica per sobre dels resultats trobats per a la mateixa  $\mu$  fixada, ja que es va realitzar una sobreestimació dels cabals de sorbitol afegit. Tot i així, les acumulacions registrades no superen els  $5 \text{ g l}^{-1}$ , estant per tant lluny de la concentració inhibidora, de  $50 \text{ g l}^{-1}$ .

**Taula 5.6:** Comparació de les diferents velocitats específiques de consum pels diferents substrats i de la velocitat específica de creixement mitjana pels diferents cultius realitzats amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de amb *P. pastoris* produint ROL. (Valors calculats durant la fase d'inducció)

$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>
<b>Consigna metanol (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>2.0</b>	<b>2.0</b>	<b>4.0</b>
$q_{\text{sMet max}} \text{ (g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.057	0.049	0.091	0.085	0.086
$q_{\text{sMet mig}} \text{ (g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.034	0.029	0.049	0.045	0.041
$q_{\text{sSorb max}} \text{ (g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.021	0.062	0.030	0.079	0.039
$q_{\text{sSorb mig}} \text{ (g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.017	0.049	0.025	0.052	0.035
$\mu_{\text{mig}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.012	0.016	0.013	0.020	0.015

La figura 5.8, permet relacionar de forma clara, el comportament de les velocitats mitjanes de consum de metanol i de producció, en funció de la consigna de metanol utilitzada. Els perfils mostren un caràcter similar, trobant-se els valors òptims per a la

concentració de 2 g l<sup>-1</sup>, trobant valors inferiors, tant a l'augmentar com al disminuir aquesta concentració. Cal destacar, que la variació en la  $q_{sMet}$  mitjana, presenta un efecte important sobre la  $q_p$  mitjana obtinguda.



**Figura 5.8:** Efecte de la concentració de metanol sobre la velocitat específica de producció i la velocitat específica de consum de metanol per a la producció de ROL sota el control del promotor AOX en bioreactors on la  $\mu$  és de 0.01 h<sup>-1</sup>.

### 5.3.6 Comparació amb resultats obtinguts utilitzant el metanol com a única font de carboni

En molts dels casos trobats a la bibliografia, els autors utilitzen el metanol com a única font de carboni al treballar amb *P. pastoris* sota el promotor AOX. En treballs previs realitzats amb el fenotip Mut<sup>s</sup> per a la producció de ROL utilitzant el metanol com a única font de carboni en l'etapa d'inducció, on aquest es manté fixat en 0.5 g l<sup>-1</sup>, el valor de  $q_p$  màxim obtingut és 2 vegades superior a l'obtingut utilitzant els substrats mixtes, per a les mateixes condicions, però cal destacar, que aquest valor disminueix fins arribar a zero, a les poques hores d'inducció (Cos *et al.*, 2006a). Per contra, la  $q_p$  mitjana obtinguda és 2.1 vegades superior, a l'utilitzar l'estratègia de cultiu amb

substrats mixtes, ja que en aquest cas, el valor de la  $q_p$  es manté gairebé estable durant tot el procés, i no es presenta cap aturada.

Quan el metanol va ser utilitzat com a única font de carboni, els valors màxims de productivitat i rendiments es van obtenir al treballar a la consigna de  $1 \text{ g l}^{-1}$ , i al augmentar ( $1.75 \text{ g l}^{-1}$ ) o al disminuir ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) aquesta (taula 5.3), els valors relacionats amb la productivitat disminueixen significativament (Cos *et al.*, 2006a). Quan s'introdueix el sorbitol com a cosubstrat i es manté la consigna de metanol en  $2 \text{ g l}^{-1}$ , els resultats obtinguts de  $Y_{p/x}$  són similars, però al comparar els valors de productivitat específica i volumètrica, s'obtenen millores de 1.3 vegades. Aquestes millores probablement es troben relacionades amb l'augment de la  $\mu$  a l'utilitzar el sorbitol com a cosubstrat ( $0.004$  vers  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ).

Cal destacar que al treballar amb substrats mixtes, no es presenta la fase de latència d'aproximadament 20 h obtinguda per Cos *et al.*, (2006a), abans no es registren nivells d'activitat lipolítica significatius (més de  $50 \text{ UA ml}^{-1}$ ), ja que amb el sorbitol a les poques hores d'inducció, s'obtenen valors d'activitat per sobre d'aquest valor (figura 5.6 A). També, els valors registrats de  $q_p$  màxima a les dues condicions òptimes són similars (sobre  $440 \text{ UA g}^{-1} \text{ l}^{-1}$ ), tot i que a l'utilitzar l'estratègia amb substrats mixtes, el valor de  $q_p$  és manté durant tota la fase de producció, mai registrant valors inferiors a  $200 \text{ UA g}^{-1} \text{ l}^{-1}$ , arribant a zero a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni. Al comparar els valors mitjans obtinguts de  $q_p$ , es pot veure que el valor mitjà d'aquest durant la fase d'inducció, a l'utilitzar substrats mixtes és 2.2 vegades superior ( $326.1$  vers  $148 \text{ UA g}^{-1} \text{ l}^{-1}$ ) que a l'utilitzar únicament el metanol.

Referent a la  $q_{s\text{Met}}$ , quan el metanol va ser utilitzat com a única font de carboni (Cos *et al.*, 2006a), el valor mitjà d'aquest paràmetre durant la fase de producció va ser similar, independentment de la consigna de metanol amb la que es va treballar (al voltant de  $0.027 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). D'altra banda, a l'utilitzar l'estratègia de cultiu, utilitzant substrats mixtes, el valor de la  $q_{s\text{Met}}$  mitjana obtinguda és superior en totes les condicions utilitzades (taula 5.6), degut a l'efecte sinèrgic de l'ús mixte de substrats. Per tant, el sorbitol, sembla que presenta un efecte positiu sobre consum de metanol.

Es poden observar més diferències significatives entre la utilització de substrats mixtes i la utilització de metanol com a única font de carboni, ja que Cos *et al.*, (2006a), presenta la millor producció per a la consigna de metanol de 1 g l<sup>-1</sup>, però en aquestes condicions la  $q_{sMet}$  mitjana és inferior que per a la resta de condicions utilitzades. Per contra, els experiments realitzats en aquest capítol, la  $q_{sMet}$  mitjana, presenta una clara relació amb la producció de ROL (figura 5.8), presentant els valors més elevats de  $q_{sMet}$  mitjana, en les condicions on la producció és màxima.

Cal destacar que prèviament Cereghino i Cregg (2000), treballant amb *P. pastoris* demostren que els nivells de transcripció inicials del promotor AOX1 poden augmentar entre 3 i 5 vegades al treballar en condicions limitants de metanol, a diferència de treballar amb excés de metanol en el medi de cultiu. Alhora Cos *et al.*, (2006a), troben que indirectament els seus resultats confirmen el treball realitzat pels primers autors, ja que mitjançant l'anàlisi del pendent que presenta la  $q_p$  durant les primeres hores d'inducció (2h), es pot realitzar un anàlisi indirecte de la producció de ROL. Aquests autors, troben que quan la concentració és de 0.5 g l<sup>-1</sup>, el pendent registrat durant les primeres hores d'inducció, és 5 vegades superior que al treballar a 1 g l<sup>-1</sup> (106 versus 20.5 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-2</sup>). D'altra banda, al incloure el sorbitol com a cosubstrat, el major pendent registrat en la  $q_p$  durant les primeres hores d'inducció, es troba quan la concentració residual del metanol en el medi de cultiu es troba a 2 g l<sup>-1</sup> (100 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-2</sup>), disminuint al treballar a 0.5 g l<sup>-1</sup> (40 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-2</sup>) i a 4 g l<sup>-1</sup> (50 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-2</sup>). Per tant la utilització del sorbitol com a cosubstrat, ha permès treballar obtenint velocitats màximes d'inducció similars a les obtingudes utilitzant el metanol com a única font de carboni a la consigna de 0.5 g l<sup>-1</sup>. Però alhora presenta una altra millora en el procés de producció, disminuint de forma important l'aturada de la producció obtinguda després de registrar el valor màxim, sota aquestes condicions de treball.

D'altra banda, és necessària la realització d'estudis relacionats amb els nivells de transcripció dels enzims involucrats en el procés de producció, per tal de veure si tal com determinen Cereghino i Cregg (2000), els nivells de transcripció dels enzims implicats són superiors al treballar a baixes concentracions de metanol residual. Tot i així, inicialment tot sembla indicar que la utilització del sorbitol com a cosubstrat, presenta avantatges en el procés de producció, no fent-se evident aquesta afirmació, ja que el pendent registrat en la  $q_p$  durant les primeres hores d'inducció, és 2.5 vegades



superior al treballar a  $2 \text{ g l}^{-1}$  en comparació amb mantenir la concentració de metanol a  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  utilitzant el sorbitol com a cosubstrat. Alhora és important tenir present que els valors obtinguts del pendent de la  $q_p$  durant les primeres hores d'inducció al mantenir la consigna a  $2 \text{ g l}^{-1}$ , és similar a l'obtinguda per Cos *et al.*, (2006a), al treballar a la consigna de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  de metanol. Per tant, a l'utilitzar el sorbitol, s'obtenen pendents similars, el que es podria traduir a nivells de transcripció similars, però en el cas del sorbitol, aquests es mantenen no arribant a bloquejar el sistema d'expressió observat en el cultiu de Cos *et al.*, (2006a).

Estudis realitzats per Marx *et al.*, (2006), posposen que en *P. pastoris*, la sobre-expressió de ROL potencia la UPR (unfolded protein response). La UPR s'activarà a l'acumular-se proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic. En la mateixa línia de treball, Resina *et al.*, (2007) demostren que la sobre-expressió i secreció de ROL mitjançant *P. pastoris* sota el control del promotor *PFLDI*, indueix l'activació de la UPR. De la mateixa forma, l'elevada  $q_p$  obtinguda a l'inici dels cultius quan el metanol va ser utilitzat com a única font de carboni, sota el control del promotor AOX1, pot provocar l'acumulació de proteïnes mal plegades o un volum excessiu de proteïna, el qual pot resultar en estrès cel·lular, considerant-se aquesta una de les possibles causes de l'aturada de la  $q_p$  a les poques hores d'inducció. Per tant, es podria dir que aquest problema amb l'ús del sorbitol com a cosubstrat es minimitza, ja que el valor de la  $q_p$  durant la fase d'inducció es manté gairebé constant presentant una lleugera disminució, però mai arribant a valors de zero. Tot i que, seran necessaris, tal i com s'ha comentat prèviament, estudis dels nivells de transcripció dels enzims involucrats per tal de poder fonamentar aquesta informació, i així poder veure la influència del sorbitol com a cosubstrat sobre els nivells d'activació de la producció de ROL.

### 5.3.7 Monitoratge del sorbitol en cultius amb *P. pastoris* aplicant la tècnica d'anàlisi d'injecció seqüencial (SIA)

Davant de la possibilitat de realitzar experiments mantenint una concentració fixada de sorbitol a l'interior del reactor, el que pot presentar efectes positius sobre la producció de ROL, es planteja implementar en un futur un sistema automàtic d'anàlisi per tal de poder monitoritzar i controlar la concentració de sorbitol, mitjançant un sistema similar a l'utilitzat amb el control de la concentració de metanol. Resina *et al.*, (2009), demostren que els millors resultats de producció de ROL, els obtenen al treballar amb excés de sorbitol (8 g l<sup>-1</sup>). Al treballar en aquestes condicions l'activitat lipolítica màxima registrada durant la fase d'inducció és 7 vegades superior a les trobades al treballar amb aquest limitant. La implementació del sistema automàtic d'anàlisi que es proposa en aquest treball permet avaluar la influència de l'excés de sorbitol, sobre el producte recombinant d'interès, mantenint el sorbitol fixat a una concentració òptima. La implantació d'aquest sistema permetrà aplicar les tecnologia PAT per ambdós substrats, garantint una major repetitivitat dels cultius.

En la majoria dels casos, la determinació del sorbitol es realitza *off-line* mitjançant l'ús d'HPLC per a mostres de medis de cultiu (Thorpe *et al.*, 1999; Boze *et al.*, 2001) o per a mostres biològiques (Kiyoshima *et al.*, 2002; Hallsworth i Magan., 1997). D'altra banda, els beneficis que produiria una determinació multi-component es troba en contradicció amb el temps d'anàlisi de les mostres i els costos de manteniment i reactius necessaris. Usant l'electroforesi capil·lar no s'obtenen millores satisfactòries, ni en la freqüència de mostreig ni en el pretractament de la mostra (Soga i Ross., 1999; Pospisilová *et al.*, 2007), i els sistemes que utilitzen sensors enzimàtics (Wu *et al.*, 2001; Mataix i Luque de Castro., 2000), estan limitats per seu temps de vida i robustesa.

Els mètodes anteriorment explicats comporten limitacions importants al realitzar un seguiment en línia del bioprocés. Les metodologies de flux discontinu són adients per l'automatització de procediments analítics complexos, ja que presenten l'avantatge de la integració de totes les etapes del procés analític en un únic equip; inclòs pot implementar-ne un pretractament de la mostra si fos necessari, resolen en gran part els problemes que presenten altres mètodes analítics. Dintre de les metodologies de flux, la tècnica d'anàlisi per injecció seqüencial (*Sequential Injection Analysis*, SIA), està

caracteritzada com a estratègia d'automatització robusta, amb un baix consum de solucions, una alta versatilitat en funció d'altres possibles analits a determinar, una alta precisió i una minimització considerable del volum de mostra requerit per realitzar l'anàlisi.

Per tant en aquest treball, es realitzarà una primera aplicació d'aquesta tècnica de flux per tal d'analitzar la concentració de sorbitol de les mostres de fermentació, i així poder arribar a implementar un sistema d'anàlisi de sorbitol en línia amb l'objectiu final d'avaluar l'efecte de la concentració de sorbitol sobre la producció de ROL amb *P. pastoris*.

El grup del professor Victor Cerdà, del departament de Química de la Universitat de les Illes Balears, i el professor Olaf Elsholz, del Research Center of Bioprocess Engineering and Analytical Techniques de la Universitat de Ciències Aplicades d'Hamburg, havien desenvolupat prèviament un sistema SIA per la determinació del glicerol en mostres de cultiu treballant amb *P. pastoris* (Horstkotte *et al.*, 2007). Davant la seva experiència es contacte amb el Dr. Cerdà, per tal d'inciar un treball conjuntament als que ells desenvolupessin un analitzador automàtic basat en la tècnica SIA similar per analitzar sorbitol, el qual seria testat als nostres laboratoris en un procés biològic amb *P. pastoris*.

La tècnica SIA, es basa en el concepte de la dispersió i penetració mútua de les zones de mostra i reactiu. El fonament de l'anàlisi per injecció seqüencial es basa en la mescla seqüencial de la mostra amb els reactius. Aquesta metodologia de flux presenta avantatges degut a la integració de dos elements bàsics: una microbureta automàtica, que permetrà dispensar volums perfectament coneguts, i una vàlvula sel·lectora. Quan aquests elements actuen de forma sincronitzada es pot realitzar la mesura de volums prefixats de mostra i reactiu utilitzant una única microbureta automàtica. Aquest instrument, és a la vegada l'element propulsor que gestiona els fluids i l'element impulsor d'aquests fluids al sistema de flux. Les operacions bàsiques comuns com la injecció de la mostra, la injecció del reactiu, la mescla de reactiu i mostra, el rentat del detector i l'acondicionament posterior, poden realitzar-se mitjançant un analitzador per injecció seqüencial.

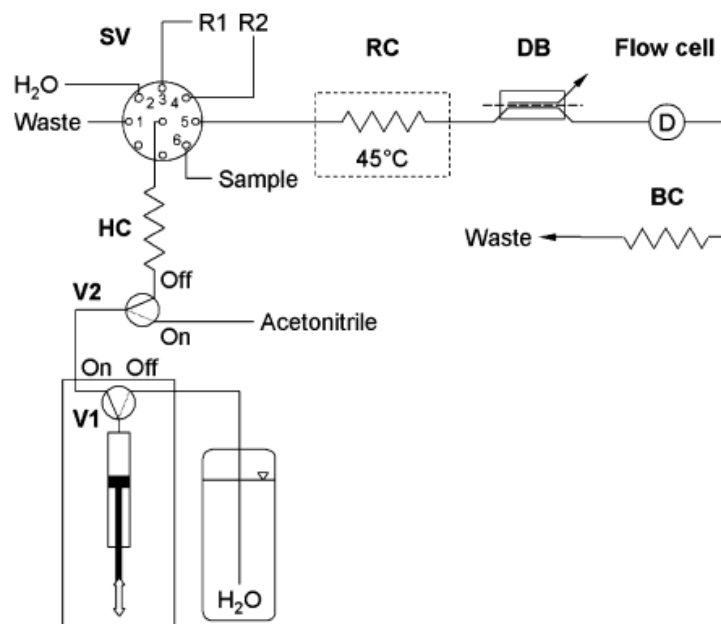
La tècnica SIA està basada en al mesura de volums exactes de la solució portadora, reactius i mostra, aspirats per etapes en un tub d'acumulació amb una microbureta a través d'una vàlvula sel·lectora. Aquesta microbureta requerirà un control precís per executar moviments d'impulsió o aspiració, parada o posta en marxa (Ruzicka i Marshall, 1990).

Prèviament a l'explicar el funcionant detallat del sistema d'anàlisi desenvolupat, cal fer referència a les reaccions que es duen a terme per tal de determinar la concentració del sorbitol en el bioreactor. Es duran a terme dues reaccions acoblades; la primera on el polialcohol s'oxida a formaldehid mitjançant l'acció del periodat (*Malaprade Reaction*) (White *et al.*, 1974; Lee i Frasc., 2001), i la segona on el formaldehid produït reacciona amb acetilacetona i amoníac, donant com a producte 2,4-diacetil-1,4-dihidrolutidine (DDL) de un groc intens que absorbeix a  $\lambda_{\max} = 412$  nm (*Hantzsch Reaction*). La reacció requereix una temperatura de 45°C per a dur-se a terme (Nash *et al.*, 1953).

Els avantatges d'aquest mètode d'anàlisi, és que la quantificació del formaldehid permet una alta selectivitat, si es compara amb la quantificació del consum de periodat (Jie *et al.*, 1998; Horstkotte *et al.*, 2007).

El sistema SIA desenvolupat, tal i com es pot observar a la figura 5.9, està constituït per una vàlvula sel·lectora de 8 ports (SV), i una microbureta model Bu 4S (Crison Inst. S.A, Alella, Spain) equipada amb una xeringa de 2500  $\mu$ l de volum (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland). Una vàlvula de tres vies (V1), permet la connexió amb el tub d'acumulació (HC) o alternativament amb el reservori d'aigua, per tal reomplir la microbureta. El sistema de control que s'estableix entre els diferents mòduls del sistema automàtic es realitza mitjançant connectors RS232C connectats en sèrie. Una segona vàlvula de tres vies (V2) és utilitzada per afegir l'acetonitril per tal de netejar els tubs i eliminar les bombolles d'aire que es puguin acumular. Entre el tub d'acumulació (HC) i el detector (D), es troba el tub de reacció (RC) amb l'objectiu de millorar el flux axial de la solució per augmentar el grau de mescla al sistema i, per tant, el grau de reacció. Aquest tub es troba submergit en un bany a una temperatura de 45°C per tal d'accelerar la velocitat de la reacció. A continuació, i abans de la etapa de detecció, s'instal·la un sistema de desgasificació (DB) per tal d'eliminar les bombolles que es generin en el tub de reacció. Per a la detecció és s'utilitza un espectrofotòmetre USB-2000 (D) equipat

amb un cel·la de flux. Finalment es va utilitzar un sistema de pressió (BC), per tal d'aplicar pressió al sistema i així permetre que les bombolles traspassessin la membrana del desgasificador amb més facilitat. Tots els tubs que es van utilitzar en aquest sistema són resistents als agents químics utilitzats (ETFE: EtilTetraFluoroEtil; PEEK: PoliEterEterCetona; FEP: EtilPropilFluorat; PTFE: PoliTetraFluorEtil).



**Figura 5.9:** Sistema SIA desenvolupat per l'anàlisi de sorbitol. SV: Vàlvula sel·lectora de 8 vies (R1:reactiu 1; R2: reactiu 2; H<sub>2</sub>O: entrada d'aigua; Waste: sortida cap al dispensador de residus; Sample: entrada de la mostra); HC: tub d'acumulació; V2: vàlvula addició acetoni-tril; V1: vàlvula de tres vies; RC: tub de reacció; DB:desgasificador; D: detector; BC:sistema de pressió.

Els primer reactiu (R1), correspon a l'addició de 0.2 (v/v%) acetilacetona a una solució mare de 2 mol l<sup>-1</sup> d'acetat d'amoní, 40 mmol l<sup>-1</sup> fosfat potàssic i 0.3 v/v % d'àcid acètic glacial ajustat a un pH de 6.0. El segon reactiu (R2), conté 100 mmol l<sup>-1</sup> periodat sòdic. La seqüència d'anàlisi es realitza en tres etapes. La primera és l'aspiració de la mostra i dels reactius cap al HC: inicialment s'aspiren 30 µl de mostra, posteriorment s'aspiren 300 µl d'aigua, després 140 µl de R1 i finalment 70 µl de R2. L'aspiració de l'aigua és realitza per diluir la mostra. En la segona etapa aquests volums resten en el tub d'acumulació (HC), fins que són desplaçats cap al tub de reacció, el qual es troba a 45 °C. La reacció es du a terme durant 60 s, i finalment, en la tercera etapa, la solució es desplaça fins al detector (D). Després de cada anàlisi i amb l'objectiu

d'eliminar les possibles bombolles d'aire acumulades en el tub d'acumulació (HC), s'aspiren 200 µl d'acetonitril, descarregant-se en el dispensador de residus. L'acetonitril, degut al seu caràcter hidrofòbic, presenta una major afinitat cap a les parets dels tubs i cap a les bombolles, desplaçant-les i així netejant el sistema d'aire.

Per tal d'implementar l'anàlisi al bioprocés, es realitza un cultiu en discontinu utilitzant el sorbitol i el metanol com a fonts de carboni, a concentracions inicials corresponents a 10 g l<sup>-1</sup>. S'extreuen manualment mostres cada 80 minuts, i són centrifugades, posteriorment el sobrenedant restant és utilitzat per l'anàlisi *off-line*. En el moment que es van realitzar aquest experiments, no es disposava d'un sistema d'extracció de mostra lliure de biomassa en discontinu, així que les mostres van ser extretes de forma manual, tractades i posteriorment es van analitzar mitjançant el sistema SIA i el mètode estàndard de referència: l'HPLC.

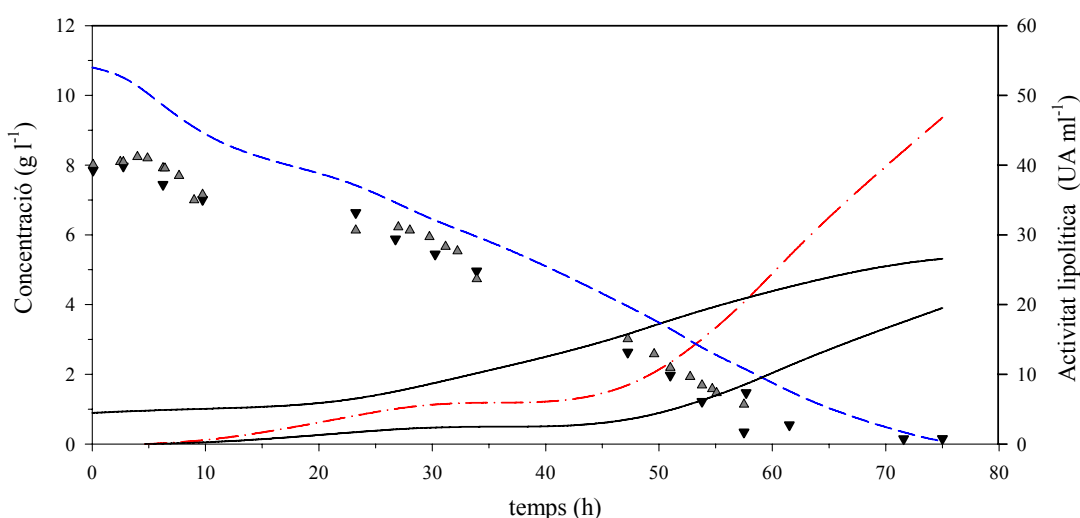
Prèviament es realitza l'estudi de les possibles interferències obtingudes en el senyal analític pels components del medi de cultiu, així com possibles metabòlits presents també en el medi de cultiu. Aquests substàncies es proven a concentracions similars a les reals, o bé més elevades. Es descarten inhibicions produïdes pels següents substrats, fins a les concentracions indicades: formaldehid (20 g l<sup>-1</sup>), àcid fòrmic (6 g l<sup>-1</sup>), àcid acètic (5 g l<sup>-1</sup>), àcid tartàric (10 g l<sup>-1</sup>), àcid oxàlic (10 g l<sup>-1</sup>), àcid pirúvic (2 g l<sup>-1</sup>), glucosa (1 g l<sup>-1</sup>), galactosa (1 g l<sup>-1</sup>), lactosa (10 g l<sup>-1</sup>), sacarosa (10 g l<sup>-1</sup>) i metanol (10 g l<sup>-1</sup>). És important destacar la importància de que el metanol no sigui interferent, ja que els cultius es realitzaran amb presència de metanol, degut a l'utilització d'una estratègia de substrats mixtes.

A la figura 5.10, es pot observar el comportament del cultiu realitzat. Es pot veure l'evolució del metanol, la biomassa i l'activitat lipolítica. Alhora es poden veure les concentracions de sorbitol obtingudes amb el sistema SIA i amb la cromatografia líquida

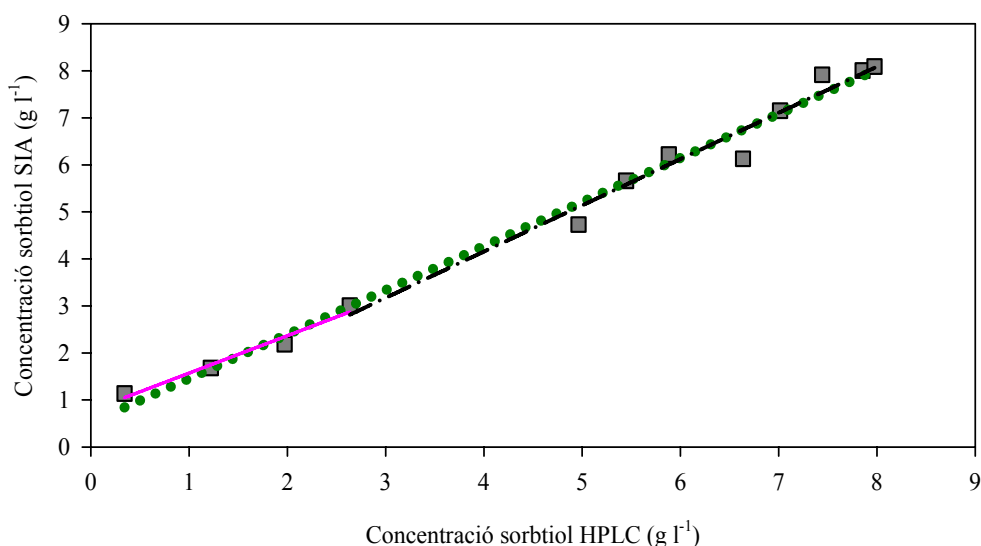
Per avaluar la qualitat del sistema SIA desenvolupat s'han comparat els resultats obtinguts en ambdós mètodes: el sistema SIA i el mètode de referència (HPLC). A la figura 5.11, es pot observar la comparació de mètodes mitjançant el test estadístic de la regressió lineal. On es considera que no existeixen diferències significatives entre dos

mètodes analítics quan la ordenada en l'origen ( $y_0$ ) no difereix significativament de 0 i el pendent (a) de 1, amb un coeficient de correlació pròxim a 1.

Es pot observar una correlació satisfactòria en les concentracions compreses entre 2 i 8 g l<sup>-1</sup>, presentant una desviació mitjana del 6 %. En aquest interval de concentracions, els valors obtinguts amb el SIA presenten una augment mitjà de 0.12 g l<sup>-1</sup>, en comparació amb els valors obtinguts amb el mètode de referència, l'HPLC.



**Figura 5.10:** Evolució de la biomassa (—), activitat lipolítica (- · -), metanol (- · -). Els símbols (▼) corresponen a la concentració de sorbitol determinada per HPLC i (▲) corresponen a la concentració de sorbitol determinada pel sistema SIA.



**Figura 5.11:** Validació del sistema SIA en front al mètode de referència (HPLC), mitjançant el test de la regressió lineal. Es presenten diferents ajustos lineals en tres intervals de concentració de sorbitol: totes les dades (- · -); entre els 2-8 g l<sup>-1</sup> (.....) i entre els 0-2 g l<sup>-1</sup> (—).

D'altra banda, per concentracions inferiors a 2 g l<sup>-1</sup>, amb el sistema SIA s'obtenen concentracions superiors a les que es determinen per l'HPLC. Aquesta sobreestimació pot ser deguda a la presència de subproductes del procés no coneguts, probablement no presents durant les primeres hores del procés, que són interferents positius en alguna de les etapes del mètode (per exemple, reacció o detecció), així com les variacions de les concentracions dels components del medi de cultiu en el transcurs de les hores.

La taula 5.7 mostra els resultats dels diferents ajustos lineals presentats a la figura 5.11, pels diferents intervals de concentració considerats. Tal i com s'avançava prèviament, es pot veure que entre les concentracions 2-8 g l<sup>-1</sup>, l'ordenada d'origen és més propera a zero que considerant totes les dades, o bé considerant les dades compreses entre 0-2 g l<sup>-1</sup>. Alhora el pendent que es troba més proper a 1, torna a ser en l'ajust de les dades entre 2-8 g l<sup>-1</sup>, corroborant per tant que l'anàlisi del sorbitol mitjançant el sistema SIA es realitzaria de forma més satisfactòria en aquest últim interval de concentracions.

**Taula 5.7.** Recull de les dades obtingudes després de realitzar el test de la regressió lineal entre les resultats analítics obtingudes amb el mètode de referència (HPLC) i el sistema SIA desenvolupat, en tres seccions (amb totes les dades; entre les dades compreses entre 0-2 g l<sup>-1</sup> i entre les dades compreses entre 2-8 g l<sup>-1</sup>). Trobant-se a l'eix de les ordenades les dades obtingudes amb el sistema SIA i en l'eix de les abscisses les dades obtingudes amb l'HPLC.

Ajust lineal ( $y = y_0 + ax$ )	$y_0$	$a$	$r^2$
Totes les concentracions	0.5 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0.99 (n=12)
Entre 0-2 g l <sup>-1</sup> sorbitol	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.4	0.97 (n=4)
Entre 2-8 g l <sup>-1</sup> sorbitol	0.2 ± 1.0	1.0 ± 0.2	0.97 (n=9)

Es pot concloure que el sistema SIA presentat es podria aplicar de forma satisfactòria a l'anàlisi del sorbitol en cultius en discontinu per *P. pastoris*. A més a més el sistema SIA, es podria implementar en el procés, possibilitant un sistema de control d'aquest substrat en llaç tancat, permeten dur a terme fermentacions a consignes de sorbitol fixades, i així estudiar l'efecte de l'acumulació del sorbitol sobre la productivitat del procés. Cal destacar que el sistema permet l'obtenció de informació cada 3.5 minuts,



temps de duració d'un anàlisi, el que permetria establir un sistema de control vàlid. Finalment, caldrà establir el nombre de mostres a extreure per implementar el sistema de control, tenint present el consum de volum que es consumeixi per cada anàlisi, ja que tot i que el volum necessari per l'anàlisi és només de 30  $\mu\text{l}$ , s'ha de tenir present el volum mort del sistema, en les etapes d'ambientació i aspiració de la mostra.



## 5.4 CONCLUSIONS

- La implementació d'una estratègia PAT, aplicada a un sistema de substrats mixtes, ha permès controlar la concentració de metanol i la velocitat específica de creixement, representant una eina de gran utilitat alhora de realitzar cultius reproduïbles, per tal de produir el producte recombinant d'interès en un procés industrial.
- El paràmetre clau per a la producció de ROL utilitzant el sorbitol com a cosubstrat, és la consigna de metanol utilitzada. La concentració òptima trobada és de 2 g l<sup>-1</sup>, concentracions inferiors disminueixen entre 2 i 3 vegades la  $q_p$  màxima obtinguda, de la mateixa forma en la que concentracions superiors també presenten valors 1.8 vegades inferiors, presentant una resposta típica d'inhibició per substrat.
- No s'obtenen diferències significatives entre els cultius realitzats sota la mateixa consigna de metanol, a les diferents  $\mu$  provades.
- Al comparar els resultats utilitzant una estratègia amb substrats mixtes amb la utilització del metanol com a única font de carboni, la producció de ROL i el  $Y_{P/X}$  són 1.25 vegades superiors i la productivitat específica i volumètrica són 1.35 vegades superiors a l'utilitzar substrats mixtes. Alhora la utilització d'ambdós substrats durant la fase d'inducció, afavoreix el perfil obtingut de la  $q_p$ , eliminat la dràstica disminució fins a valors de zero, trobats a l'utilitzar el metanol com a única font de carboni.
- El sistema dut a terme mitjançant la utilització del sorbitol, utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* per a la producció de ROL, sembla que soluciona parcialment les limitacions fisiològiques detectades en altres bioprocessos.
- La utilització d'un sistema automàtic d'anàlisi basat en la tècnica SIA, permet la determinació del sorbitol en cultius utilitzant substrats mixtes. L'aplicació d'aquest sistema d'anàlisi en línia, permetria implementar un sistema de control

en llaç tancat, per tal de poder treballar a diferents consignes de sorbitol, i veure l'efecte de l'acumulació d'aquest sobre la productivitat dels cultius.

## 5.5 BIBLIOGRAFIA

Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Ann NY Acad Sci* 1990;589:350-362.

Boze H, Celine L, Patrick CH, Fabien R, Christine V, Yves C, et al. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochem* 2001;36:907-913.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:45-66.

Çelik E, Çalik P, Oliver SG. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast* 2009;26:473-484.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer, P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol* 2005;116:321-335.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnol Bioeng* 2006a;95:145-154.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters. A review. *Microb Cell Fact* 2006b;5:17.

Files D, Ogawa M, Scaman CH, Baldwin SA. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb Technol* 2001;29:335-340.

Hallsworth JE, Magan N. A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose. *J. Microbiol. Methods* 1997;29:7-13.

Hensing, M.C.M., Rouwenhorst, R.J., Heijnen, J.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 1995. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. G.* 67 (3), 261-279.

Horstkotte B, Werner E, Kazemi A, Cornelissen G, Elsholz O, Cerdà V, Luttmann R. Sequential injection analyzer for glycerol monitoring in yeast cultivation medium. *Talanta* 2007;71:941-947.

Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 2001;92:585-589.

Jie N, Yang D, Zhang Q, Yang J, Song Z. Fluorometric determination of periodate with thiamine and its application to the determination of ethylene glycol and glycerol, *Anal. Chim Acta* 1998;359:87-92.

Jenzsch, M., Lange, M., Bar, J., Rahfeld, J.-U., Lubbert, A., 2004. Bioreactor retrofitting to avoid aeration with oxygen in *Pichia pastoris* cultivation processes for recombinant protein production. *Chem. Eng. Res. Des.* 82 (A9), 1144-1152.

Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, Von Stockar U. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2007;131:57-66.

Kiyoshima A, Kudo K, Nishida N, Ikeda N. HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis, *Forensic Sci. Int.* 2002;125:127-133.

Lee CH i Frasch CE. Quantification of bacterial polysaccharides by the purpald assay: measurement of periodate-generated formaldehyde from glycol in the repeating unit, *Anal. Biochem.* 2001;296:73-82.

Loewen MC, Liu X, Davies PL, Daugulis AJ. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:480-486.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005;22:249-270.

Marx H, Sauer M, Resina D, Vai M, Porro D, Valero F, et al. Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. *Fems Microbiol Lett* 2006;264:40-47.

Mataix E i Luque de Castro MD. Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection, *Talanta* 2000;51:489-496.

Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2001;86:59-70.

Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction, *Biochem. J* 1953;53:416-421.

Pospíšilová M, Poláček M, Šafař J, Petříšková I. Determination of mannitol and sorbitol in infusion solutions by capillary zone electrophoresis using on column complexation with borate and indirect spectrophotometric detection, *J. Chromatogr* 2007;1143:258–263.

Ramon R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2007;130:39-46.

Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J Biotechnol* 2004;109:103–113.

Resina D, Cos O, Ferrer P, Valero F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLDI* promoter. *Biotechnol Bioeng* 2005;91:760–767.

Resina D, Bollók M, Khatri KN, Valero F, Neubauer P, Ferrer P. Transcriptional response of *Pichia pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microb Cell Fact* 2007;6:21.

Resina D, Maurer M, Cos O, Arnau C, Carnicer M, Marx H, et al. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLDI* promoter. *New Biotechnol* 2009;25(6):396- 403.

Ruzicka, J., Marshall G. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Anal. Chim Acta* 1990;237:329-343.

Schenk J, Marison IW, Von Stockar U. A simple method to monitor and control methanol feeding of *Pichia pastoris* fermentations using mid-IR spectroscopy. *J Biotechnol* 2007;128:344–353.

Schilling, B.M., Goodrick, J.C., Wan, N.C., 2001. Scale-up of a high cell density continuous culture with *Pichia pastoris* X-33 for the constitutive expression of rh-chitinase. *Biotechnol. Prog.* 17, 629–633.

Soga T i Ross GA. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.* 1999;837: 231–239.

Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 1997;190:55-62.

Stratton J, Chiruvolu V, Meagher MM. High cell-density fermentation. In: Higgins DR, Cregg JM, editors. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ: Humana Press;1998, 103;p.107-120.

Surribas, A. Memòria de tesi doctoral. Millores en el sistema de producció d'una lipasa de *Rhizopus oryzae* en *Pichia pastoris* mitjançant tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu alternatives. 2008. Universitat Autònoma de Barcelona.

Thorpe ED, D'Anjou MC, Daugulis A. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 1999;21:669-672.

White DA, Mizada DS, Nakamura RM. Characterization of the periodate oxidation of glycerol and related compounds, and application toward determination of serum triglyceride concentrations, *Clin. Chem* 1974;20:645-648.

Wu CH, Scampavia L, Ruzicka J, Zamost B. Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system. *Analyst* 2001;126:291-297.

Xie JL, Zhou QW, Pen D, Gan RB, Qin Y. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme Microb Technol* 2005;36:210-216.



# Capítol 6:

## Efecte del glicerol com a substrat mixte sobre la producció de ROL en *P. pastoris* en cultius en semicontinu

---

Aquest capítol es troba publicat a:

**Arnau C**, Casas C, Valero F. The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. Biochem. Eng. J. 2011; Submitted.



## 6 Efecte del glicerol com a substrat mixte sobre la producció de ROL en *P. pastoris* en cultius en semicontinu

### 6.1 RESUM

En aquest treball s'estudia l'efecte de la velocitat específica de creixement del fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* per a la producció de ROL utilitzant un sistema d'addició de substrats mixtes, metanol i glicerol. El glicerol permetrà treballar a  $\mu$  superiors a les que es poden registrar creixent amb sorbitol, el que permetrà augmentar la productivitat del procés.

Es realitzen diferents cultius en semicontinu on la  $\mu$  es manté fixada en 0.02, 0.05 i 0.1 h<sup>-1</sup>, mitjançant l'addició exponencial del glicerol. Alhora el metanol és utilitzat com a substrat inductor, a una concentració fixada de 2 g l<sup>-1</sup> (valor optimitzat prèviament al capítol 5). Al realitzar els diferents cultius, no es registren acumulacions de glicerol, però quan la relació entre la  $\mu_{\text{Gli}}$  i la  $\mu_{\text{Met}}$  és superior a 6, s'obtenen valors significativament inferiors en tots els paràmetres vinculats a la producció de la proteïna recombinat d'interès. Aquest resultat es pot relacionar directament amb la disminució de la velocitat específica de consum de metanol registrada quan la  $\mu$  és de 0.05 i 0.1 h<sup>-1</sup>. La  $q_{\text{sMet}}$  és al voltant de 3 vegades superior quan la  $\mu$  es troba fixada en 0.02 h<sup>-1</sup>. Es registren valors d'activitat proteolítica, el que es relaciona amb la pèrdua d'activitat registrada durant les últimes hores d'inducció.

Conseqüentment es comparen els resultats obtinguts sota les mateixes condicions de treball utilitzant els diferents cosubstrats, el glicerol (estudiant en aquest capítol) i el sorbitol (estudiat en el capítol 5). Al comparar els cultius sota les mateixes condicions, s'observa que a l'utilitzar el glicerol com a cosubstrat s'obtenen valors similars d'activitat lipolítica màxima als obtinguts prèviament utilitzant el sorbitol, però les productivitats tant específiques com volumètriques com el  $Y_{\text{P/X}}$  són inferiors. És important remarcar que la utilització del glicerol sota les mateixes condicions de treball que el sorbitol, presenta dues desavantatges importants en el procés de producció:

s'observa una fase de latència d'unes 20 h abans d'obtenir les primeres unitats d'activitat, no registrada quan el cosubstrat era el sorbitol i es manifesta una pèrdua d'activitat durant les últimes hores d'inducció, no trobada a l'utilitzar el sorbitol.

## 6.2 INTRODUCCIÓ

L'ús del metanol com a única font de carboni presenta problemes operacionals importants al treballar amb el fenotip Mut<sup>+</sup> de *Pichia pastoris*. L'emmagatzematge del metanol en instal·lacions, requereix una gran inversió degut a les seves característiques explosives (Inan i Meagher, 2001). L'alt calor de combustió del metanol (-727 kJ mol C<sup>-1</sup>: Weast, 1980), precisa que el sistema disposi d'un sistema ràpid i eficaç de refredament, ja que un augment en la temperatura del procés pot afectar negativament en la productivitat i qualitat de la proteïna recombinant d'interès produïda (Jungo *et al.*,2007a). L'alt consum d'oxigen juntament amb l'elevada densitat cel·lular obtinguda en els cultius, provoca problemes relacionats amb la transferència d'oxigen, no podent mantenir el percentatge de pO<sub>2</sub> per sobre del 20%, a menys que el cabal d'aire a l'entrada sigui enriquit amb oxigen pur. El fet de disposar en la mateixa instal·lació la presència de combustible i comburent, no és el més recomanable, atesa a l'alta perillositat (Curvers *et al.*,2001).

Els problemes operacionals generats quan el fenotip Mut<sup>+</sup> és utilitzat poden ser reduïts en gran mesura mitjançant la utilització del fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*. Com s'ha comentat prèviament, presenta la deleció en el gen *AOXI*, el que implica una important reducció del consum del metanol. Alhora alguns autors (Cregg *et al.*,1987), defensen que el fenotip Mut<sup>s</sup>, en alguns casos presenta nivells d'expressió de proteïnes recombinats més elevats que els obtinguts utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup>. D'altra banda, el fenotip Mut<sup>s</sup> no és tan sensible com el Mut<sup>+</sup> a les altres concentracions de metanol transitòries, que fan que el procés biotecnològic sigui més senzill de controlar i a llarg termini, faran més assequible el procés del canvi d'escala (Chiruvolu *et al.*,1997). No obstant, l'ús del fenotip Mut<sup>s</sup>, representa llargues etapes d'inducció degut a les baixes velocitats de creixement presentades. La  $\mu$  mitjana registrada durant l'etapa d'inducció correspon a 0.004 h<sup>-1</sup>, quan la única font de carboni utilitzada és el metanol per a la producció de ROL (Cos *et al.*,2006).

Per ambdós fenotips, la utilització de substrats mixtes permet minimitzar els problemes presentats quan el metanol és utilitzat com a única font de carboni, fonamentalment en l'etapa d'inducció. Un dels cosubstrats més utilitzats als processos d'inducció per a la producció de proteïnes recombinats és el glicerol. L'entalpia de

combustió del glicerol correspon a  $-549.5 \text{ kJ mol C}^{-1}$ , reduint per tant el calor de combustió generat en el procés biològic en comparació amb treballar amb metanol com a única font de carboni (Von Stockar *et al.*,1993). A més a més, el consum d'oxigen també és reduït, ja que l'oxidació del glicerol requereix menys oxigen que l'oxidació del metanol, tot reduint el problemes operacionals presentats a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup> únicament amb metanol (Jungo *et al.*,2007b).

D'altra banda, tot i que el problemes relacionats amb la combustió i requeriments d'oxigen poden ser reduïts en gran mesura mitjançant l'ús del fenotip Mut<sup>s</sup>, l'ús dels substrats mixtes és especialment recomanat al treballar amb aquest fenotip, ja que aquesta estratègia, permetrà augmentar i millorar la velocitat específica de creixement, tot influenciat positivament sobre els nivells d'expressió de proteïnes recombinats, incrementant la productivitat del procés biològic.

Tanmateix, el glicerol s'ha descrit com a repressor de l'expressió del gen alcohol-oxidasa, i per tant pot afectar negativament sobre els nivells d'expressió de la proteïna recombinat d'interès (Tschopp *et al.*,1987). Per tant, el paràmetre clau alhora de dissenyar el procés de producció, mitjançant la utilització del glicerol, serà evitar la repressió d'aquest, per tal de maximitzar la productivitat del bioprocés. Tot i així, les primeres estratègies d'addició de substrats mixtes es van desenvolupar pel fenotip Mut<sup>+</sup> (Brierley *et al.*,1990; Loewen *et al.*,1997; Inan *et al.*,1999).

Altres autors optimitzen la producció d'avidina mitjançant la utilització de substrats mixtes amb el fenotip Mut<sup>+</sup> (Jungo *et al.*,2007a). La millor producció obtinguda per aquests autors, es trobada al realitzar una estratègia en semicontinu, on la velocitat específica de creixement és fixada a  $0.06 \text{ h}^{-1}$ , a partir d'una addició exponencial preprogramada, utilitzant glicerol i metanol com a fonts de carboni en l'etapa d'inducció, en una proporció de 65% metanol / 35% glicerol. Els autors, a l'utilitzar aquesta estratègia d'addició, no detecten acumulacions dels substrats en el medi de cultiu, i sota condicions de substrat limitant (es treballa per sota de les dues  $\mu_{\text{max}}$ ) les dues fonts de carboni són consumides simultàniament i completament. D'Anjou i Daugulis (2001), utilitzen una estratègia similar per a la producció d'una proteïna anticongelant (srAFP) utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup>, on el metanol es manté fixat entre 1 - 2 g l<sup>-1</sup>. Aquests autors van utilitzar dues velocitats específiques de creixement, 0.03 i 0.06

$h^{-1}$ , obtenint valors més alts de producció de la proteïna recombinant d'interès quan la velocitat específica de creixement era de  $0.03 h^{-1}$ . Si es comparen el treball de Jungo *et al.*, (2007a) i D'Anjou i Daugulis (2001), s'observa que a l'utilitzar el fenotip Mut<sup>+</sup>, la velocitat específica de creixement òptima trobada és superior que al treballar amb el fenotip Mut<sup>s</sup>.

Files *et al.*, (2001) estudien, utilitzant el mateix fenotip, l'efecte de diferents velocitats d'addició de glicerol, mantenint constant la velocitat d'addició de metanol a  $1.8 g_{Met} h^{-1} l^{-1}$  per a la producció de cistatina C humana. Aquests autors observen que la màxima producció de proteïna recombinant disminueix a l'augmentar la velocitat d'addició de glicerol, trobant l'equilibri quan la velocitat d'addició d'aquest correspon a  $2 g_{Gli} h^{-1} l^{-1}$ . Tot i que l'estratègia d'addició continua de substrats és molt senzilla d'aplicar en cultius en semicontinu, s'ha de tenir present que en aquest cas, les velocitats de consum de substrats variaran al llarg del temps, no permetent que les cèl·lules es mantinguin en un estat quasi estacionari. Choi *et al.*, (2006), estudien l'efecte de la combinació de diferents relacions metanol /glicerol a partir d'una addició continua mitjançant una estratègia en semicontinu per a la producció d'una  $\alpha$ -amilasa de ratolí amb el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Utilitzen diferents relacions trobant com a òptima la relació corresponent a 1:0.5 (metanol /glicerol), on s'afegeix amb un cabal de  $13.6 ml h^{-1}$  corresponent a  $3 g h^{-1}$ , la qual correspon a la proporció de metanol més elevada.

Ottone *et al.*, (2007), utilitzen també una estratègia de substrats mixtes per a la producció de l'antigen de superfície de l'hepatitis B fenotip Mut<sup>s</sup> i Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Pel fenotip Mut<sup>s</sup>, la relació que proporciona la producció òptima és la  $1 g_{Met}:1 g_{Gli}$  la que s'inicia amb un cabal de  $0.4 g h^{-1} l^{-1}$ , que anirà augmentant per a mantenir una concentració de metanol residual de  $1.25 g l^{-1}$ . D'altra banda, pel fenotip Mut<sup>+</sup>, únicament s'addiciona metanol al 100% per a mantenir una concentració residual al medi de cultiu al voltant del  $0.25 g l^{-1}$ . Les mesures de la concentració de metanol es realitzen en aquest cas off-line mitjançant la utilització d'un analitzador YSI 2007 (YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA). Conclouen que a nivells de producció ambdós fenotip presenten resultats similars, destacant però avantatges operacionals pel fenotip Mut<sup>s</sup>.

D'altra banda, Xie *et al.*,(2003), desenvolupen un control en línia del metanol i realitzen variacions del cabal d'addició de glicerol per a la producció d'angiostatina. La concentració de metanol es manté fixada a 5 g l<sup>-1</sup> mitjançant l'addició de metanol pur, i el glicerol s'afegeix al 50 % (w/w) variant el cabal, per tal de mantenir una addició exponencial. Els nivells màxims de producció els troben quan la relació de consum és de 1.5:1 (g glicerol g metanol<sup>-1</sup>), indicant en aquest cas que el metanol presenta una contribució tant per la generació de biomassa com en l'expressió d'angiostatina.

La producció de lipases de *Rhizopus oryzae* sota el promotor AOX ha estat àmpliament estudiada des del punt de vista d'optimització del procés biològic dels fenotips Mut<sup>+</sup> i Mut<sup>s</sup> en estratègies en semicontinu, utilitzant el metanol com a única font de carboni en l'etapa d'inducció (Cos *et al.*,2005; Cos *et al.*,2006) i utilitzant estratègies alternatives (Surribas *et al.*,2007).

Anteriors treballs realitzats per Ramon *et al.*, (2007) i els resultats presentats al capítol 5 d'aquesta tesi, han demostrat que el sorbitol és un excel·lent cosubstrat per a augmentar la producció de ROL, minimitzant els problemes operacionals. Tanmateix, la seva baixa velocitat específica de creixement màxima (0.02 h<sup>-1</sup>) en *P. pastoris*, provoca una baixa productivitat.

L'objectiu d'aquest treball és valorar la capacitat del glicerol actuant com a cosubstrat amb el metanol, analitzant la influència de la  $\mu$  del microorganisme, mantinguda mitjançant diferents perfils d'addició exponencial de glicerol, a una concentració de metanol fixada al valor òptim de 2 g l<sup>-1</sup> (concentració trobada als experiments realitzats capítol 5). A diferència del sorbitol, la  $\mu$  màxima registrada per aquest substrat (0.18 *versus* 0.02 h<sup>-1</sup>) permetrà, sempre que no es produeixi la repressió del promotor AOX, obtenir una major productivitat del bioproces. Aquests experiments es realitzen sota una tecnologia analítica de procés (PAT; Integració del mecanisme de disseny, anàlisi i control d'un procés biològic) per tal de millorar la reproductibilitat d'aquest.



## 6.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 6.3.1 Comparació dels cultius realitzats sota les mateixes condicions utilitzant el glicerol o sorbitol com a cosubstrat

Els resultats previs obtinguts en el *capítol 5* d'aquesta tesi, on el sorbitol es utilitzat com a cosubstrat, determinen que el paràmetre clau per a la producció de ROL és la consigna de metanol escollida. Tanmateix, el sorbitol facilita el creixement cel·lular, però l'efecte de dues velocitats específiques de creixement provades ( $0.01$  i  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ), no representen modificacions significatives en quant a la quantitat de producte d'interès obtingut.

La baixa  $\mu_{\max}$  ( $0.02 \text{ h}^{-1}$ ) registrada mitjançant l'ús del sorbitol en cultius en discontinu i semicontinu, d'alguna forma limita la productivitat del procés. Una alternativa pràctica per tal d'incrementar la productivitat del procés de producció de ROL, és la de substituir el sorbitol pel glicerol, ja que *P. pastoris* presenta un  $\mu_{\max}$  corresponent a  $0.18 \text{ h}^{-1}$  utilitzant glicerol (Resina *et al.*, 2005). No obstant això, a diferència del sorbitol, el glicerol està descrit com a repressor de l'expressió del promotor alcohol oxidasa, i conseqüentment la producció del producte recombinant d'interès. Tot i així, cal destacar que si el glicerol es troba sota condicions limitats pot no donar-se la repressió del PAOX.

Per tal de veure l'efecte del glicerol sobre la producció de ROL, es realitzen varis cultius utilitzant una estratègia en semicontinu mantenint la concentració de metanol fixada a  $2 \text{ g l}^{-1}$ , i utilitzant tres diferents velocitats específiques de creixement ( $0.02$ ,  $0.05$  i  $0.1 \text{ h}^{-1}$ ), les quals es mantindran en funció del glicerol afegit al cultiu. La velocitat específica de creixement més elevada que s'utilitza correspon a  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , valor allunyat de la  $\mu_{\max}$ , per tal d'evitar l'acumulació d'aquest substrat en el medi de cultiu, el que afavorirà la repressió del promotor AOX tal i com descriuen prèviament D'Anjou i Daugulis (2001).

La fase d'inducció s'inicia al finalitzar-se el glicerol, i en tots els cultius aquesta s'inicia mitjançant l'addició exponencial preprogramada del glicerol, per tal de mantenir

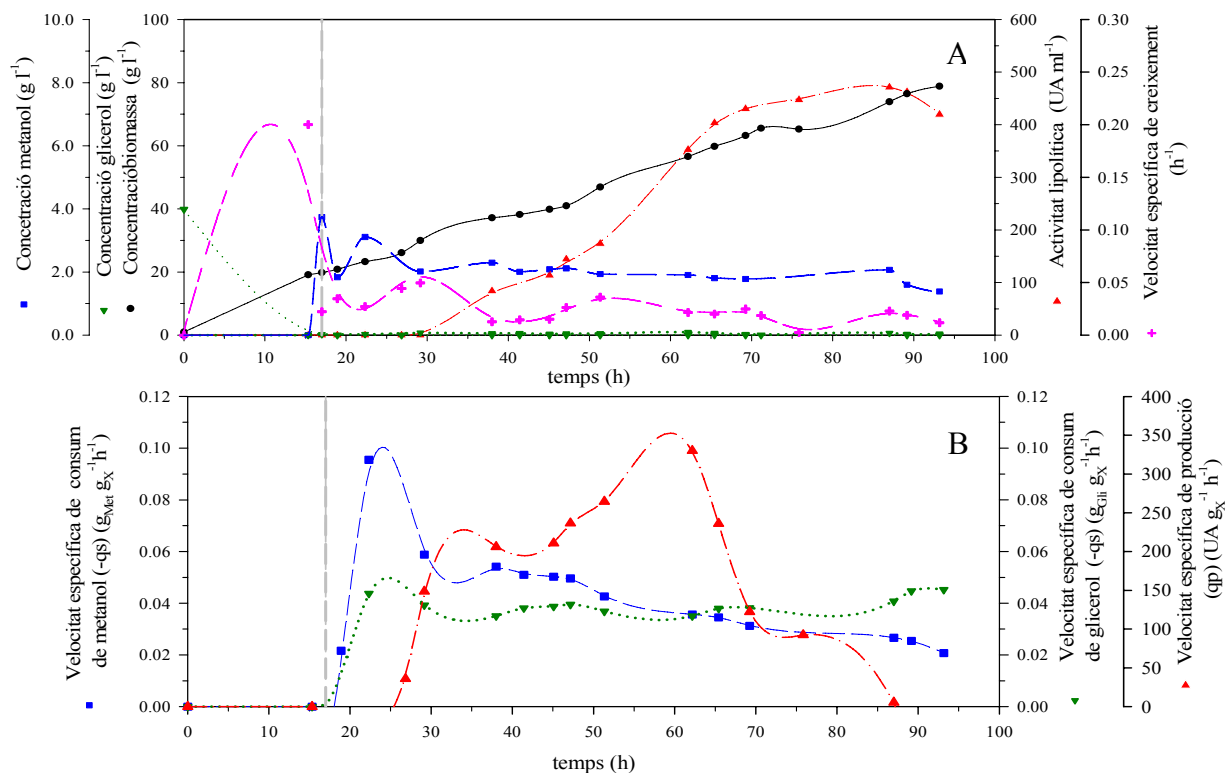
fixada la  $\mu$  escollida (control en llaç obert). Els valors que s'utilitzen per calcular el cabal inicial són els següents:  $V_0=3.3$  l;  $Y_{X/S}=0.5$  g<sub>X</sub> g<sub>Gli</sub><sup>-1</sup>;  $X_0=20$  g l<sup>-1</sup>;  $S_0=550$  g l<sup>-1</sup>.

De la mateixa forma, el metanol es manté a la consigna seleccionada (2 g l<sup>-1</sup>) mitjançant un algorisme de control predictiu combinat amb un controlador PI desenvolupat per Cos *et al.*, (2006). En totes les condicions dutes a terme, la consigna de metanol es va mantenir a aquest valor presentant desviacions inferiors al 5%, demostrant la robustesa del monitoratge i control del metanol al sistema *P. pastoris*.

S'inicia aquest estudi realitzant un cultiu en semicontinu, imitant les condicions més favorables per a la producció, determinades en el *capítol 5*, quan el sorbitol va ser utilitzat com a cosubstrat ( $\mu=0.02$  h<sup>-1</sup> i 2 g l<sup>-1</sup> metanol). La figura 6.1 mostra l'evolució dels diferents paràmetres de cultiu en funció del temps, sota les condicions anteriorment cometades. En aquest cultiu, la  $\mu$  es va mantenir al voltant de 0.02 h<sup>-1</sup>, exceptuant les primeres hores d'inducció on aquesta era superior, estabilitzant-se posteriorment, i presentant un valor mitjà de 0.023 h<sup>-1</sup>, durant la fase d'inducció. (figura 6.1 A). La biomassa augmenta durant tot el cultiu presentant un valor final de 78 g l<sup>-1</sup>.

A la mateixa figura el glicerol, es manté limitant durant tot el cultiu, no presentant acumulacions d'aquest en cap moment. La figura 6.1 B mostra com la  $q_{sGli}$  és manté estable al voltant de 0.037 g<sub>Gli</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> durant tot el cultiu. Referent al metanol, aquest es manté al voltant de la consigna seleccionada, exceptuant les primeres 10 h d'inducció, on el valors de la concentració es troben al voltant de 2.5 g l<sup>-1</sup>. La  $q_{sMet}$  augmenta durant les primeres 5 h d'inducció, presentant posteriorment una severa disminució, obtenint un valor mig de 0.042 g<sub>Met</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (taula 6.1).

L'activitat lipolítica augmenta progressivament durant tot el cultiu, exceptuant les últimes hores d'inducció, on presenta una aturada i una posterior disminució. Cal destacar que durant les primeres 15 h d'inducció, no es registren nivells d'activitat lipolítica significatius (figura 6.1 A). La  $q_p$  presenta dos màxims significatius, un a les 35 h i un altre a les 60 h de cultiu, presentant un descens important després del segon pic, tot arribant a valors de zero a les 90 h de cultiu (figura 6.1 B).



**Figura 6.1:** Evolució dels diferents paràmetres de cultiu realitzant una estratègia de semicontinu utilitzant glicerol com a cosubstrat on la  $\mu$  es manté a  $0.02 \text{ h}^{-1}$  i la consigna de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$ .

Un cop realitzat el cultiu, es pot realitzar la comparació entre l'addició dels diferents substrats per a la producció de ROL amb *P. pastoris*. Quan el glicerol és utilitzat sota les mateixes condicions que el sorbitol, l'activitat lipolítica màxima registrada durant el cultiu és similar, però d'altra banda, la  $q_p$  màxima registrada amb el sorbitol és 1.3 vegades superior, i la  $q_p$  mitjana registrada és 2.2 vegades superior (taula 6.1). Aquesta inferioritat registrada és deguda a la important disminució que presenta la  $q_p$  després de 50 h d'inducció (figura 6.1 B) acompanyat de la pèrdua d'unitats d'activitat lipolítica obtingudes. Aquesta disminució o pèrdua, podria ser conseqüència de l'acció de proteases present en el medi de cultiu. Si es recorden els resultats presentats en el capítol 5, referents a la utilització del sorbitol com a cosubstrat, la  $q_p$  obtinguda presenta un màxim a les 15 h d'inducció, posteriorment disminueix estabilitzant-se al voltant de  $220 \text{ UA g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ , no observant-se aturades en l'activitat lipolítica durant les darreres hores de la fase d'inducció, i tampoc registrant-se pèrdues d'aquest valor.

Quan el sorbitol va ser utilitzat, les primeres unitats d'activitat lipolítica es van manifestar a les poques hores d'inducció, no observant-se la fase la latència registrada

quan el glicerol és utilitzat com a cosubstrat (figura 6.1 A). Una possible explicació per a la fase de latència presentada en el cultiu utilitzant glicerol, podria ser la manca de fase de transició en aquesta estratègia emprada. És va decidir no realitzar fase de transició, entenent que existia la incorporació d'una nova font de carboni, el metanol, però el glicerol, la principal font de carboni, és mantenia. El fet de no existir una aclimatació al metanol, pot ser la causa del retard registrat en l'activitat lipolítica.

Continuant amb la comparació entre els dos cosubstrats, la taula 6.1 mostra com la  $q_{sMet}$  mitjana durant l'etapa d'inducció és molt similar per ambdós substrats utilitzats. És important destacar que ambdós cosubstrats registren valors similars de  $q_{sMet}$  però d'altra banda, els valors obtinguts de la  $q_p$  quan s'utilitza el glicerol és inferior. Al comparar les velocitats específiques de consum del cosubstrat, es pot veure que el consum específic de sorbitol és superior al consum específic de glicerol, degut a que el  $Y_{X/S}$  pel sorbitol és inferior.

**Taula 6.1:** Comparació de les velocitats específiques de producció i consum utilitzant diferents cosubstrats (sorbitol i glicerol) a la mateixa  $\mu$  ( $0.02h^{-1}$ ), mantenint la concentració de metanol a  $2 g l^{-1}$  per a la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* en una estratègia de semicontinu.

Cosubstrat	Sorbitol	Glicerol
Act. lipolítica màx. (UA ml <sup>-1</sup> )	487.5	471.2
$q_{p \max}$ (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	451.4	352.7
$q_{p \text{ mitja}}$ (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	326.1	148.8
$q_{sMet \text{ mitja}}$ (g <sub>Met</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.045	0.042
$q_{s \text{ co-sub mitja}}$ (g <sub>Co-sub</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.052	0.037
$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> g <sub>Co-sub</sub> <sup>-1</sup> )	0.3	0.5

Valors calculats en l'etapa d'inducció

Cal destacar que en el procés de producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup>, la velocitat específica de consum de metanol, és superior al treballar amb substrats mixtes, independentment del cosubstrat utilitzat, en comparació amb els cultius on el metanol s'utilitza com a única font de carboni. Cos *et al.*, (2006), troben que el valor de la  $q_{sMet}$  mitjana durant l'etapa d'inducció és de  $0.027 g_{MeOH} g_X^{-1} h^{-1}$ , quan el metanol és utilitzant com a única font de carboni, mantenint la consigna d'aquest al voltant de  $2 g l^{-1}$ , siguent 1.56 vegades inferior al trobat a l'utilitzar substrats mixtes (taula 6.1).

Fent referència al *capítol 5* d'aquesta tesi, la  $q_p$  obtinguda quan els sorbitol és utilitzat com a cosubstrat, presenta un màxim a les 15 h d'inducció. A continuació presenta una disminució, estabilitzant-se al voltant de  $220 \text{ UA g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Si aquesta actuació es compara amb el comportament observat a l'utilitzar el glicerol com a cosubstrat (figura 6.1), és pot veure com les primeres unitats d'activitat es registren un cop han transcorregut 10 h d'inducció. Aquesta diferència com s'ha comentat anteriorment, es relaciona amb que en els cultius amb glicerol, no es realitza una etapa a de transició.

A la taula 6.2, es poden comparar els paràmetres més representatius relacionats amb la producció del ROL utilitzant els diferents cosubstrats. Al comparar els valors de producció, és pot observar que s'obtenen valors similars en quant a la productivitat volumètrica ( $6346 \text{ versus } 5416 \text{ UA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). D'altra banda, cal destacar que la productivitat específica va ser 1.8 vegades superior, quan el sorbitol va ser utilitzat com a cosubstrat, demostrant per tant, que el sorbitol presenta una major eficiència que el glicerol des del punt de vista de productivitat cel·lular. A més a més, si es compara el valor de  $Y_{p/X}$  es pot observar que aquest és gairebé 2 vegades inferior a l'utilitzar el glicerol com a font de carboni.

**Taula 6.2:** Comparació dels paràmetres de producció més representatius utilitzant diferents cosubstrats (sorbitol i glicerol) en les mateixes condicions de treball ( $\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$ ;  $2 \text{ g l}^{-1}$  metanol) per la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* en una estratègia de semicontinu.

<b>Cosubstrat</b>	<b>Sorbitol</b>	<b>Glicerol</b>
$Y_{p/X} (\text{UA g}_X^{-1})$	10369.1	6373.4
Productivitat volumètrica ( $\text{UA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	6345.6	5416.2
Productivitat específica ( $\text{UA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	135.0	73.3

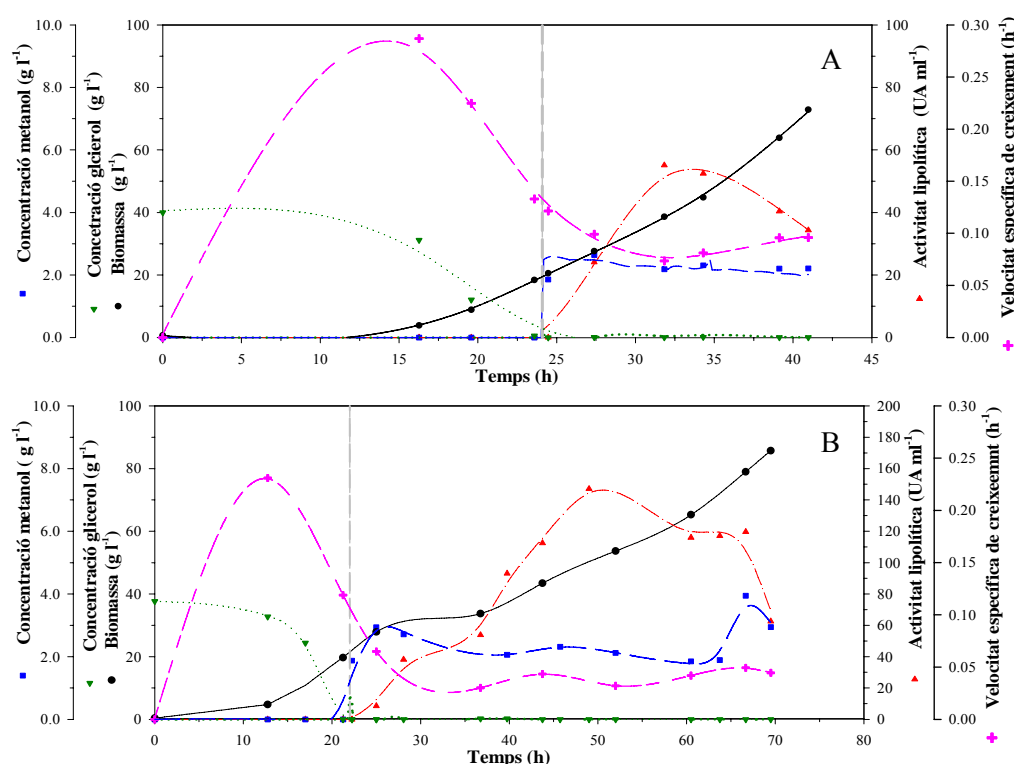
En resum, el cultiu realitzat amb glicerol com a cosubstrat utilitzant una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , presenta valors inferiors referents a la productivitat i al  $Y_{p/X}$ , tot i que les unitats d'activitat lipolítica màxima registrada són similars. Cal destacar també, la possible

presència de proteases al final de la fase d'inducció, provocant una disminució en l'activitat lipolítica i la fase de latència observada a l'iniciar la fase d'inducció.

Tanmateix, el glicerol presenta l'avantatge sobre el sorbitol, de permetre treballar a  $\mu$  més elevades, que permetrien obtenir el producte desitjat amb temps de cultius molt inferiors, permeten per tant, augmentar la productivitat del procés. Tot i que la realització d'aquest primer cultiu, sembla indicar que el sorbitol presenta avantatges sobre el glicerol, es realitzaran cultius amb glicerol augmentat la  $\mu$ , per tal de comprovar si es pot obtenir la mateixa quantitat de producte, requerint menys temps de cultiu, el que faria augmentar la productivitat del procés.

### 6.3.2 Cultius en semicontinu utilitzant el glicerol com a cosubstrat sota diferents velocitats específiques de creixement

Un cop va ser realitzat el primer cultiu amb glicerol, a les mateixes condicions a les que havia estat dut a terme el cultiu utilitzant el sorbitol, es van realitzar dues fermentacions, utilitzant valors  $\mu$  superior ( $0.1$  i  $0.05 \text{ h}^{-1}$ ), per tal de poder augmentar la productivitat del procés biològic, tot mantenint la mateixa concentració de metanol a l'interior del bioreactor (figura 6.2).



**Figura 6.2:** Evolució dels diferents paràmetres de cultiu realitzant una estratègia de semicontinu utilitzant glicerol com a cosubstrat on la  $\mu$  es manté a  $0.1 \text{ h}^{-1}$  (A) i  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (B) i consigna de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$  per a la soca Mut<sup>5</sup> de *Pichia pastoris*.

La figura 6.2 A i B, mostra com el glicerol es manté sota condicions limitants, ja que no es va detectar cap acumulació d'aquest en el cultiu (límit de detecció per l'HPLC utilitzat correspon a  $0.01 \text{ g l}^{-1}$ ). També cal destacar que ambos substrats van ser consumits alhora i completament, tal i com havia estat descrit prèviament per D'Anjou i Daugulis (2001) en cultius realitzats mitjançant una estratègia en discontinu.

A la figura 6.2 A, on la  $\mu$  es manté al voltant de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , el cultiu té una durada de 40.96 h presentant una fase d'inducció de 16.87 h. La biomassa augmenta progressivament fins arribar a un màxim de  $72 \text{ g l}^{-1}$ , al final del cultiu, i la  $\mu$  es manté al voltant de la consigna seleccionada durant la fase d'inducció. La concentració de glicerol roman al voltant de zero, i la concentració de metanol és manté a la consigna seleccionada. Pel que fa a l'activitat lipolítica, les primeres unitats apareixen a les poques hores d'inducció arribant a un màxim de  $55.2 \text{ UA ml}^{-1}$ , presentant una pèrdua d'aquesta al final del cultiu.

De la mateixa forma, a la figura 6.2 B, es pot observar el cultiu on la  $\mu$  es manté al voltant de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ . La biomassa augmenta progressivament fins a arribar a un màxim de  $85.7 \text{ g l}^{-1}$ , al final del cultiu, i la  $\mu$  es manté al voltant de la consigna seleccionada durant la fase inducció. La concentració de glicerol també roman al voltant de zero, i la concentració de metanol és manté a la consigna seleccionada. Pel que fa a l'activitat lipolítica, les primeres unitats apareixen a les poques hores d'inducció arribant a un màxim de  $147.0 \text{ UA ml}^{-1}$ , similar al que s'obté en el cultiu anterior, una pèrdua d'aquesta al final del cultiu.

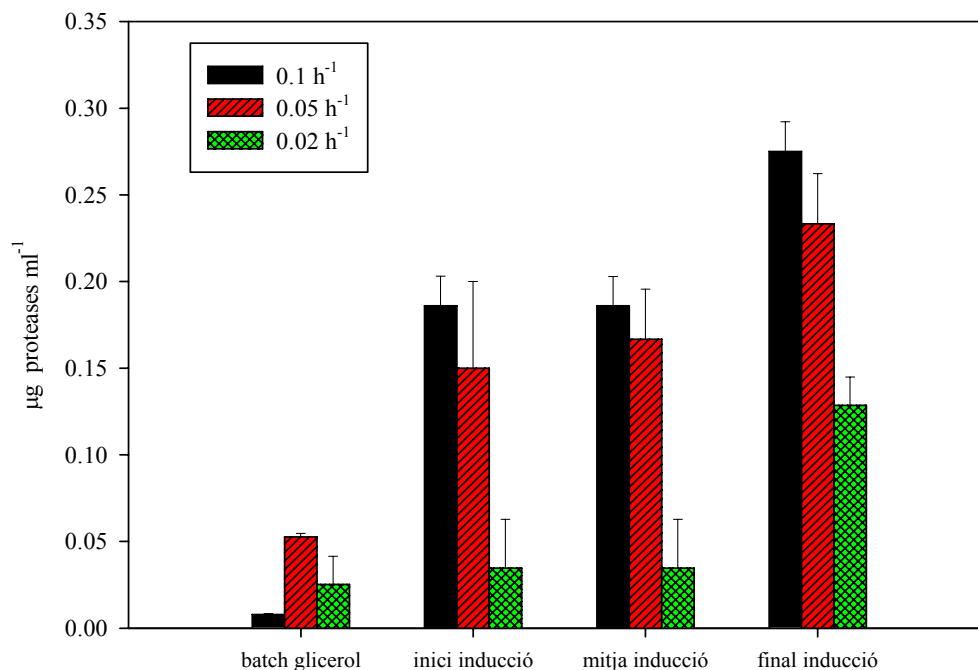
És important destacar, les diferències trobades al treballar a les diferents velocitats específiques de creixement. A diferència de quan la  $\mu$  era fixada a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , en les dues noves condicions provades, apareixen les primeres unitats d'activitat lipolítica a l'iniciar la fase d'inducció, no presentant una fase de latència. Tanmateix, tot i que les primeres unitats d'activitat apareixen a les poques hores d'inducció, l'activitat lipolítica màxima obtinguda, és 3.2 i 8.5 vegades inferior, quan la  $\mu$  és fixada a  $0.05$  i  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , respectivament, en comparació amb els resultats obtinguts a la  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Alhora, tal i com es pot observar a la figura 6.2, després d'haver assolit l'activitat lipolítica màxima, es manifesta una important disminució durant les últimes hores d'inducció, presentant-se de forma menys severa quan la  $\mu$  de treball era  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Aquesta disminució pot estar atribuïda a la presència de proteases en el medi de cultiu, provocant, la degradació del producte recombinant d'interès.

Varis autors descriuen problemes detectats amb la proteòlisis del producte recombinant d'interès en *P. pastoris* treballant en semicontinu a l'obtenir altes densitats cel·lulars (Clare *et al.*, 1991, 1998; Brierley *et al.*, 1994; Brierley, 1998). Davant la



problemàtica relacionada amb la degradació del producte d'interès recombinat, diferents autors descriuen possibles aplicacions per tal de reduir la degradació del producte; utilitzar soques deficientes en proteases (Gleeson *et al.*, 1998), realitzar modificacions en l'estructura de la proteïna (Gustavsson *et al.*, 2001), addicionar inhibidors de proteases (Holmquist *et al.*, 1997), variar el pH del medi de cultiu (Kang *et al.*, 2000) o bé afegir aminoàcids i peptona al medi de cultiu (Clare *et al.*, 1991). Alguns autors indiquen que l'activitat proteolítica augmenta quan el nivell d'amoni en el medi de cultiu és inferior a  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$ , suggerint per tant que l'activitat proteolítica pot estar induïda per que la deficiència d'amoni (Kobayash *et al.*, 2000).

En aquest treball, inicialment es realitza l'anàlisi de l'activitat proteolítica (Thermo Scientific, Rockford, USA), per tal de comprovar si la disminució de la ROL obtinguda al final del cultiu, pot estar relacionada amb la presència de proteases al medi de cultiu. La figura 6.3, mostra la concentració de proteases detectada en diferents moments del cultiu per les tres fermentacions realitzades. A la primera de les mostres (fase discontinua amb glicerol), tots els cultius presenten valors similars, mostrant les diferències més significatives a mesura que transcorren les hores de cultiu. Es pot observar que entre les mostres analitzades de l'inici i mitjana inducció, els cultius no presenten un augment significatiu. Tot i que, la mostra presa al final de l'etapa d'inducció, si presenta un augment significatiu, en comparació amb les mostres prèvies analitzades.



**Figura 6.3:** Resultats de l'anàlisi de l'activitat proteolítica realitzada en diferents punts del bioprocés. Discontínu amb glicerol, correspon a la mostra extreta a l'inici del de glicerol; inici inducció, correspon a la mostra extreta quan la biomassa obtinguda es trobava entre 27-29 g l<sup>-1</sup>; mitja inducció, correspon a la mostra extreta quan la biomassa obtinguda es trobava entre 28-56 g l<sup>-1</sup>; Final inducció, correspon a la mostra extreta quan la biomassa es trobava entre 65-78 g l<sup>-1</sup>.

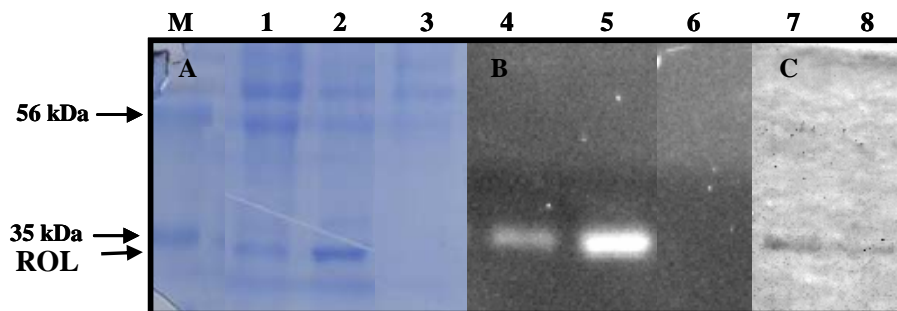
Cal destacar, que les concentracions màximes de proteases s'obtenen quan la  $\mu$  es troba fixada a 0.05 i 0.1 h<sup>-1</sup>. En aquestes condicions de treball, es registren les pèrdues d'activitat lipolítica més elevades, arribant a perdre al voltant 60% i 40% d'activitat lipolítica màxima obtinguda, respectivament. D'altra banda, quan la  $\mu$  era fixada a 0.02 h<sup>-1</sup>, la pèrdua d'activitat lipolítica correspon al 13%, i la concentració de proteases obtinguda és significativament inferior.

De forma similar, Zhou i Zhang, (2002), produeixen hirudina recombinat utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* utilitzant el metanol com a única font de carboni, i observen que al treballar a  $\mu$  igual o superior a 0.03 h<sup>-1</sup>, la  $q_p$  disminueix atribuint-se aquesta a la degradació per l'efecte de les proteases. Troben la producció òptima quan la  $\mu$  de treball es troba fixada a 0.02 h<sup>-1</sup> i la concentració de metanol és troba fixada a 0.5 g l<sup>-1</sup>. A velocitats inferiors (0.01 h<sup>-1</sup>) o bé superiors (0.047 h<sup>-1</sup>), es presenta un efecte de degradació del producte d'interès major. En molts casos la concentració de proteases augmenta, a mesura que augmenta la  $\mu$ . Alhora en el treball realitzat en aquesta tesi, es

registra un augment significatiu en les últimes hores de cultiu, el qual es pot relacionar amb la lisis cel·lular.

Cal destacar que quan s'utilitzava el sorbitol com a font de carboni (*Capítol 5*), la concentració de proteases obtinguda va ser significativament inferior. També si es recorden els perfils d'activitat mostrats en el *Capítol 5*, l'activitat dels cultius no disminueix al finalitzar l'etapa d'inducció.

Posteriorment, es realitzen diferents anàlisis per tal d'identificar la proteïna heteròloga d'interès. La figura 6.4 mostra els resultats obtinguts al realitzar un (A): SDS-PAGE; (B): Zimograma; (C): Western blot.



**Figura 6.4:** Diferents anàlisis de les mostres dels cultius realitzats en semicontinu per a la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, on el metanol es manté fixat a 2 g l<sup>-1</sup> i la velocitat específica de creixement es fixada a 0.02 i 0.1 h<sup>-1</sup>. (A): SDS-PAGE; (B): Zimograma; (C): Western blot. Carril 1, 4 i 8 :  $\mu$  de 0.1 h<sup>-1</sup>; Carril 2, 5 i 7:  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup>; Carril 3 i 6: la soca nativa a una  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup>.

A la figura 6.4 A, s'identifica la lipasa de ROL a un pes molecular al voltant de 34 kDa, trobant-se aquest valor una mica per sobre del pes molecular de la proteïna nativa (32 kDa). Aquesta diferència pot estar relacionada amb modificacions post-transduccionals de les proteïnes secretades (Salah *et al.*, 2009). Tot i així, cal destacar que la lipasa de *Rhizopus oryzae* produïda en *P. pastoris*, no és una proteïna hiperglicosil·lada, en comparació amb la proteïna nativa. Recentment Guillén *et al.*, (2011) han estudiat la proteïna nativa de *Rhizopus oryzae*, i n'hi identifiquen 3 bandes, trobant-se la predominant a un pes molecular lleugerament superior a 35 kDa. La superioritat trobada podria ser deguda a modificacions post-transduccionals. Cal

destacar, que el carril 2, presenta un intensitat superior en la banda detectada com a ROL, coincidint amb l'obtenció superior de producte recombinant sota aquestes condicions. Per tant, les bandes detectades en el SDS-PAGE confirmen els resultats obtinguts mitjançant el test hidrolític, on l'activitat màxima detectada correspon al cultiu realitzat a una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . El carril 3 correspon a la soca que no expressa ROL, i tal i com era d'esperar no es detecta cap banda en el pes molecular de la proteïna recombinat expressada.

A la figura 6.4 B mostra un zimograma, el que permetrà identificar les bandes que presentin activitat hidrolítica. Un cop més la intensitat del carril 5 ( $\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$ ) supera a la intensitat del carril 4 ( $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ), coincidint que la banda més activa registra valors d'activitat lipolítica 8 vegades superior. Tanmateix, és important destacar que en el carril 6 no es detecta cap banda amb activitat lipàsica o esteràsica del microorganisme hoste natiu, el que permet afirmar que el test d'activitat lipolítica no presentarà interferències degudes a proteïnes natives de *P. pastoris* amb activitat lipolítica.

Finalment, la figura 6.4 C mostra un Western blot, que permet detectar la proteïna heteròloga d'interès (ROL), mitjançant la utilització d'un anticòs específic identificatiu per aquesta proteïna. En ambdós carrils (7 i 8), es detecta la presència de la proteïna al voltant dels 34 kDa. Per tant, amb aquest resultat, es pot dir que la proteïna recombinant d'interès, queda identificada i presenta activitat lipàsica.

Tornant als paràmetres de producció (taula 6.3) es troben resumits els més representatius, referents a la producció de ROL, utilitzant les diferents condicions de cultiu. Al comparar els valors òptims obtinguts a una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , el  $Y_{P/X}$  és 4.4 vegades inferior quan la  $\mu$  és  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , i 2.2 vegades inferior quan la  $\mu$  és  $0.05 \text{ h}^{-1}$ . Alhora la productivitat volumètrica també és 1.8 i 3.1 vegades inferior quan la  $\mu$  és fixada a  $0.05$  i  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , respectivament.

Fent referència al  $Y_{X/S}$ , es realitza el càlcul comptant que tota la biomassa generada prové del glicerol, descomptant l'aportació per a biomassa del metanol. Experiments previs realitzats per Cos *et al.*, (2006) amb metanol com a única font de carboni, determinen que el fenotip Mut<sup>s</sup> produint ROL pràcticament no presenta creixement

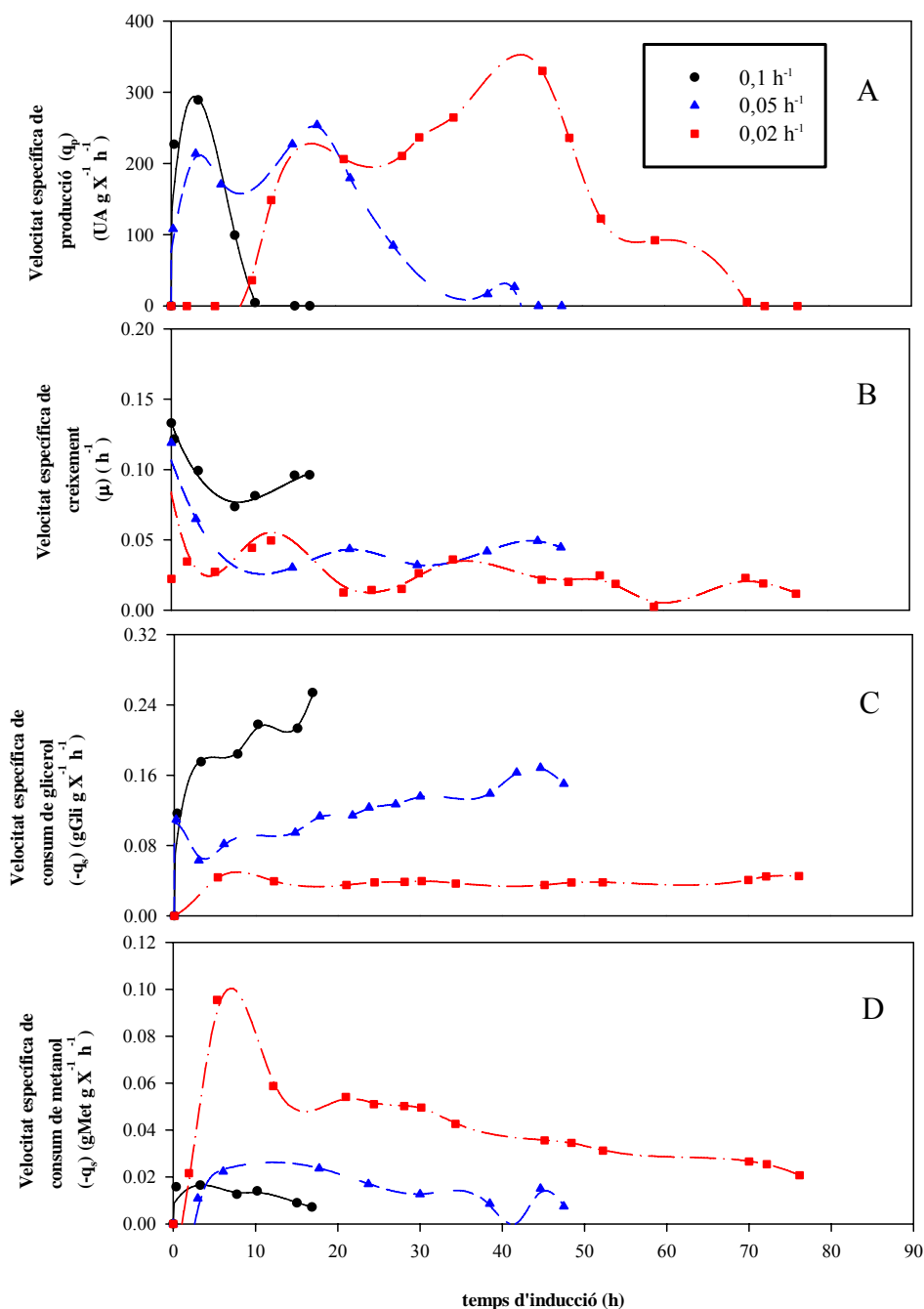
( $\mu_{\text{mitjana}} = 0.004 \text{ h}^{-1}$ ), utilitzant el substrat majoritàriament per a l'obtenció d'energia obtenint com a producte final  $\text{CO}_2$ .

**Taula 6.3:** Comparació dels diferents paràmetres de procés utilitzant diferents  $\mu$ , mantenint la concentració de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$ .

Consigna $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.1	0.05	0.02
Act. lipolítica màx. ( $\text{UA ml}^{-1}$ )	55.2	147.0	471.2
$\mu_{\text{mitja}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.099	0.042	0.023
$Y_{p/x} \text{ (UA g}_x^{-1}\text{)}$	1446.7	2922.5	6373.4
Productivitat volumètrica ( $\text{UA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	1733.8	3000.7	5416.2
Productivitat específica ( $\text{UA g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	45.5	59.6	73.3
$Y_{x/s} \text{ (g}_x \text{ g}_{\text{gly}}^{-1}\text{)}^*$	0.42	0.46	0.47

\*Calculat assumint que tota la biomassa generada prové del glicerol.

La figura 6.6 mostra l'evolució de les diferents velocitats específiques de producció, creixement i consum. Fent referència a la velocitat específica de consum de glicerol (figura 6.4 C), es pot observar que al mantenir la  $\mu$  a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , aquesta es manté constant durant tota l'etapa d'inducció al voltant de  $0.037 \text{ g}_{\text{Gli}} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ . D'altra banda, al augmentar la  $\mu$  de treball, aquest valor òbviament augmenta, però deixa de mantenir-se constant, presentant un lleuger augment a mesura que transcorren les hores d'inducció. Aquest efecte s'aprecia amb major facilitat al treballar a  $\mu$  de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , i probablement estigui relacionat amb la disminució de la  $q_{s\text{Met}}$  (figura 6.4 D), i la conseqüent caiguda en la velocitat específica de producció de ROL (figura 6.4 A). Les conseqüències de les baixes velocitats de producció de ROL quan la  $\mu$  augmenta, poden estar relacionades amb la disminució del consum mig de metanol, ja que aquest valor disminueix al voltant de 3.5 vegades quan la  $\mu$  de treball es troba per sobre de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Per tant, al treballar amb  $\mu$  superiors a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , es pot observar una clara la repressió del promotor AOX.



**Figura 6.6:** Evolució de les diferents velocitats específiques durant l'etapa d'inducció d'un procés en semicontinu utilitzant el glicerol com a font de carboni mantenint el metanol fixat a  $2 \text{ g l}^{-1}$ ; (A) velocitat específica de producció de ROL, (B) velocitat específica de creixement, (C) velocitat específica de consum de glicerol, (D) velocitat específica de consum de metanol.

Pel que fa al comportament de la  $\mu$  (figura 6.4 B), es pot observar que quan la  $\mu$  seleccionada és  $0.1$  i  $0.05 \text{ h}^{-1}$ , l'evolució d'aquesta es troba lleugerament per sota, presentant valors mitjans de  $0.099$  i  $0.042 \text{ h}^{-1}$ , i d'altra banda, quan la  $\mu$  seleccionada és  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , els valors es troben lleugerament per sobre, principalment durant les primeres

hores d'inducció, presentant un valor mig de  $0.023 \text{ h}^{-1}$  (taula 6.3). En els tres casos aquesta diferència, entre la  $\mu$  desitjada i la  $\mu$  obtinguda, està relacionada amb una sobre o subestimació del cabal inicial de glicerol en la fase d'inducció.

Alguns autors (D'Anjou i Daugulis, 2001) recomanen utilitzar  $\mu_{\max}/2$ , per tal de treballar suficientment allunyats de la  $\mu_{\max}$  per així tenir la certesa de que el glicerol no s'acumularà en el medi de cultiu, tot afectant negativament sobre l'activitat del promotor AOX. Però, tot i que en aquest treball la  $\mu$  fixada es troba lluny de la  $\mu_{\max}$  en glicerol ( $0.18 \text{ h}^{-1}$ ), en tots els cultius realitzats, s'observa una clara disminució tant de la  $q_p$  com de la  $q_{s\text{Met}}$ . La  $q_p$  tot i assolir valors màxims semblants en els diferents cultius, aquests no es mantenen al llarg del temps, disminuint fins a valors de zero, a les poques hores d'inducció. Cal destacar, que com més elevada és la  $\mu$  de treball, més acusada és la pèrdua.

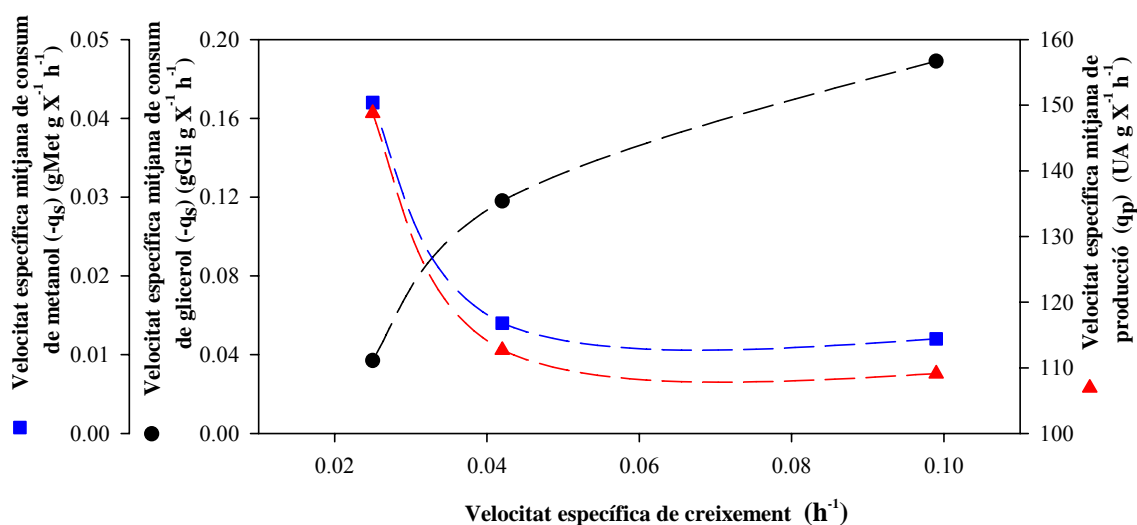
La taula 6.4 mostra el resum dels valors màxims i mitjans de les diferents velocitats específiques de producció, consum i creixement per a les diferents condicions de cultiu provades. La  $q_{s\text{Gli}}$  màxima i mitjana presenten un clar augment a l'augmentar la  $\mu$  de treball. De la mateixa forma, l'efecte contrari es manifesta al fer referència a la  $q_p$  i a la  $q_{s\text{Met}}$ , observant-se una disminució de 1.3 i 3.2 vegades respectivament, al treballar a  $\mu$  superiors a  $0.023 \text{ h}^{-1}$ . Per tant, es pot amb claredat que la  $q_p$  es troba fortament relacionada amb la  $q_{s\text{Met}}$ .

**Taula 6.4:** Comparació de les diferents velocitats de producció i consum de substrats durant l'etapa d'inducció d'un procés en semicontinu utilitzant diferents velocitats específiques de creixement on la consigna de metanol es manté  $2 \text{ g l}^{-1}$  en cultius amb *Pichia pastoris* produint ROL utilitzant glicerol com a cosubstrat en l'etapa d'inducció.

$\mu$ set-point ( $\text{h}^{-1}$ )	0.1	0.05	0.02
$q_{p \text{ max}}$ ( $\text{UA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	294.1	252.4	352.7
$q_{p \text{ mitja}}$ ( $\text{UA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	109.1	112.2	148.8
$q_{s\text{Met max}}$ ( $\text{g}_{\text{Met}} \text{g}_{\text{X}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.016	0.026	0.100
$q_{s\text{Met mitja}}$ ( $\text{g}_{\text{Met}} \text{g}_{\text{X}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.012	0.014	0.042
$q_{s\text{Gli max}}$ ( $\text{g}_{\text{Gli}} \text{g}_{\text{X}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.252	0.170	0.050
$q_{s\text{Gli mitja}}$ ( $\text{g}_{\text{Gli}} \text{g}_{\text{X}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.189	0.118	0.037

Valors calculats en l'etapa d'inducció

De la mateixa forma, a la figura 6.7, es pot veure la relació que existeix entre la producció i consum de substrats per a les diferents  $\mu$  utilitzades. Es presenta una tendència simètrica oposada entre la  $q_p$  i la  $q_{sGlic}$  mitjanes, obtenint majors produccions quan la  $q_{sGlic}$  és menor. També cal destacar el comportament de la  $q_{sMet}$ , ja que a mesura que augmenta la  $q_{sGlic}$ , la  $q_{sMet}$  disminueix repercutint sobre els valors de producció.



**Figura 6.7:** Variació de les velocitats específiques de consum de substrat i producció per les diferents velocitats específiques de creixement utilitzades per a la producció de ROL mitjançant la utilització de glicerol i metanol en la fase d'inducció.

Zhang *et al.*, (2003) observen un comportament similar al produir un fragment del serotip C de la neurotoxina botulínica amb el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* coalimentant glicerol i metanol durant la fase d'inducció. Aquests autors recomanen treballar a una relació de velocitats específiques de creixement de 4 o inferior ( $\mu_{Glic} / \mu_{Met} = 4$ ). En el treball que es realitza en aquest capítol, també es troba una relació òptima entre les dues velocitats específiques de creixement. Tenint present que la  $\mu_{mitjana}$  del fenotip Mut<sup>s</sup> produint ROL, utilitzant el metanol com a única font de carboni, correspon a  $0.004 h^{-1}$  en cultius en semicontinu (Cos *et al.*, 2006), quan es va utilitzar una relació corresponent a 6, no es va observar repressió del promotor AOX, obtenint les produccions més elevades. D'altra banda, quan la relació va ser superior a 6, es van registrar valors inferiors, tant d'activitat lipolítica com de producció, confirmant per tant, la repressió



del promotor AOX. Per tant, tot i no tractar-se del mateix fenotip, la relació establerta com a òptima per a la producció és similar en ambdós estudis realitzats.

També cal destacar els estudis de Jungo *et al.*, (2007a), que realitzen cultius en discontinu per a la producció d'avidina utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. La producció específica d'avidina es manté gairebé constant quan la fracció del metanol en l'aliment és manté entre  $0.6 - 1 C_{\text{mol}} C_{\text{mol}}^{-1}$ . Quan la fracció de metanol en l'aliment es troba per sota de  $0.6 C_{\text{mol}} C_{\text{mol}}^{-1}$ , observen una disminució en la velocitat específica de producció d'avidina, associada a la disminució de la  $q_{\text{sMet}}$ . Aquests mateixos investigadors, realitzen cultius en semicontinu, trobant els millors valors de producció quan la relació entre els substrats usats a l'entrada durant l'inducció és de  $1.93 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ . Si es comparen els resultats obtinguts amb aquests autors, es pot veure que en aquest estudi quan la  $\mu$  estava fixada a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , la relació dels dos substrats va anar variant des de l'inici al final de la fase d'inducció. Durant l'etapa d'inducció s'observa un màxim de  $2.02 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ , prenent un valor mig de  $1.19 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ . Aquesta relació disminueix prenent un valor mig de  $0.17 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$  quan la  $\mu$  és de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  i de  $0.08 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ , quan la  $\mu$  és de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Per tant, com a conclusió es pot veure que al disminuir la relació  $\text{g}_{\text{MeOH}} \text{ g}_{\text{Gli}}^{-1}$ , el qual indica un major consum de glicerol, s'obtenen valors més baixos de productivitat, lligats amb la disminució observada de la  $q_{\text{sMet}}$ .

D'Anjou i Daugulis (2001), també observen un comportament similar al produir una proteïna anticongelant (Sea raven AFP), utilitzant en aquest cas el fenotip Mut<sup>s</sup>. Els cultius són realitzats en semicontinu a dues velocitats específiques de creixement,  $0.03$  i  $0.07 \text{ h}^{-1}$ , i observen un augment en la producció durant la fase d'inducció al treballar a la  $\mu$  més baixa. Tanmateix observen una relació negativa entre la  $\mu$  i la  $q_{\text{sMet}}$ , és a dir, a mesura que augmentava la  $\mu$  de treball, disminuïa la velocitat específica de consum de metanol. L'estudi realitzat en aquest capítol mostra una tendència similar (figura 6.7), obtenint el valor màxim de  $q_{\text{sMet}}$  quan la  $\mu$  de treball és la més baixa.

Resumint els resultats obtinguts en aquest capítol, podem puntualitzar que independentment de qüestions econòmiques del producte utilitzat, la principal avantatge que presenta el glicerol front al sorbitol, és que el primer té la possibilitat d'assolir  $\mu$  més elevades ( $0.18 \text{ h}^{-1}$  versus  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ), permetent obtenir un augment de la productivitat del procés, no sent efectiva pel fenotip Mut<sup>s</sup>. Un altre relació observada

entre les  $\mu$  de treball, és que quan la relació entre la  $\mu_{\text{Gli}}$  i la  $\mu_{\text{Met}}$  i la és superior a 6, s'observa una disminució dels paràmetres relacionats amb la producció i amb el consum de metanol. Alhora cal destacar, que a l'utilitzar el glicerol, s'observa una disminució de l'activitat lipolítica durant les últimes hores de cultiu, associat a un augment de l'activitat proteolítica, no presentada quan el sorbitol és usat com a cosubstrat.

## 6.4 CONCLUSIONS

- El glicerol permet augmentar la velocitat específica de creixement en comparació amb la utilització del sorbitol, factor que inicialment afavorirà la productivitat del procés ( $0.18 \text{ h}^{-1}$  .vers.  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ).
- De la comparació realitzada entre els dos cosubstrats (glicerol i sorbitol), treballant sota les mateixes condicions de cultiu ( $\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$  i  $2 \text{ g l}^{-1}$ ), es conclou:
  - ❖ S'obtenen valors similars tant d'activitat lipolítica màxima com de productivitat volumètrica, però s'obtenen valors 1.8 i 2 vegades inferiors al comparar la productivitat específica i el  $Y_{P/X}$  amb glicerol, respectivament.
  - ❖ Les primers unitats d'activitat apareixen a les 10 h d'inducció, presentant un retràs en la  $q_p$ , efecte no observat a l'utilitzar el sorbitol.
  - ❖ S'observa la degradació del producte recombinant d'interès durant les últimes hores de cultiu associat a la presència de proteases, efecte no observat a l'utilitzar el sorbitol.
- Al treballar a diferents  $\mu$ , es pot observar que a l'utilitzar una relació de  $\mu_{\text{Gli}}/\mu_{\text{Met}}$  superior a 6, s'observa una clara repressió del promotor AOX, afectant directament sobre l'activitat lipolítica extracel·lular.
- La concentració de proteases augmenta a l'augmentar la  $\mu$  de treball, presentant els valors més elevats durant les últimes hores de cultiu, afectant directament sobre la degradació del producte recombinats d'interès obtingut.
- La  $q_{\text{SGli}}$  mitjana, presenta un relació contraposada amb la  $q_p$  mitjana observada, ja que a l'augmentar la primera, la segona presenta una clara disminució. D'altra banda, la  $q_p$  i la  $q_{\text{SMet}}$ , presenten la mateixa tendència, disminuint ambdós valors a l'augmentar la  $\mu$  de treball.

- Tot i que inicialment es va valorar el glicerol com a una bona alternativa a ser utilitzat com a cosubstrat per a la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, pensant que permetria augmentar la productivitat del procés biològic, finalment es descarta per presentar menys beneficis en comparació amb el sorbitol.

## 6.5 BIBLIOGRAFIA

Ben Salah R. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Thizoopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25:1375-1384.

Brierley AR, Davis RG, Holtz CG. Production of insuline-like growth factor-1 in methylothrophic yeast cells. United States Patent: 5324639, 0-100. 1994.

Brierley RA. Secretion of recombinant human insulinlike growth factor I (IGF-I). Methods Mol. Biol. 1998;103:149-177.

Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: Bovine lisozyme. Ann NY Acad Sci. 1990;589:350-362

Clare JJ, Scorer C, Buckholz R, Romanos M. Expression of EGF and HIV envelope glycoprotein. Methods Mol. Biol. 1998;103:209-225.

Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene. 1991;105:205-212.

Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. Enzyme Microb Technol. 1997;21:277-283.

Cregg, JM and Madden KR. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. In: Stewart GG, Russell I, Klein RD, Hiebsch RR, editors. Biological research on industrial yeast, vol.2 Boca Raton: CRC Press; 1987. p. 1-18

Choi DB, Park EY. Enhanced production of mouse  $\alpha$ -amilase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. Process Biochem. 2006;41:390-397.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. J Biotechnol 2005;116(4):321-335.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95(1):145-154.

Curvers,S., Brixius,P., Klauser,T., Thommes,J., Weuster-Botz,D., Takors,R. & Wandrey,C.. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnology Progress.* 2001;17:495-502.

D'Anjou MC, Daugulis AJ. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 2001;72(1):1-11.

Files D, Ogawa M, Scaman CH, Baldwin SA. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb Technol.* 2001;29:335-340.

Gleeson MAG, White CE, Meininger DP, Komives EA. Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol. Biol.* 1998;103: 81- 84.

Guillén M, Benaiges MD, Valero F. Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. *Biochem. Eng. J.* 2011; 54(2): 117-123.

Gustavsson M, Lehtio J, Denman S, Teeri TT, Hult K, Martinelle M. Stable linker peptides for a cellulosebinding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 2001;14:711- 715.

Holmquist M, Tessier DC, Cygler M. High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* 1997;11:35-40

Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* 2001;92(6):585-589.

Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson SB, Meagher MM. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant kookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol.* 1999;24:438-445.

Jungo C, Marison I, von Stockar U. 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.* 2007a;128:824-837.

Jungo C, Marison I, von Stockar U. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain in transient continuous cultures. *J Biotechnol.* 2007b; 30:236-246.

Kang HA, Choi ES, Hong WK, Kim JY, Ko SM, Sohn JH, Rhee SK. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000;53:575-582.

Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *P. pastoris* with minimal protease production and activation, *J. Biosci. Bioeng.* 2000;89:55-61.

Loewen MC, Liu X, Davies PL, Daugulis AJ. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot.* 1997; 48:480-486.

Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(9):3859-3876

Ottone S, Nguyen X, Bazin J, Berard C, Jimenez S, Letourneur O. Expression of hepatitis B surface antigen major subtypes in *Pichia pastoris* and purification for *in vitro* diagnosis. *Protein Expres Purif.* 2007;56:177-188.

Surribas A, Stanh R, Montesinos JL, Enfors S-O, Valero F, Jahic M. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *J Biotechnol.* 2007;130:291-299.

Ramon R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2007;130:39-46.

Resina D, Cos O, Ferrer P, Valero F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *Biotechnol Bioeng.* 2005;91:760–767.

Von Stockar U, Gustafsson L, Larsson C, Marison I, Tissot P, Gnaiger E. Thermodynamic considerations in constructing energy balances for cellular growth. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1183:221-240.

Weast RC. *Handbook of Chemistry and Physics.* 1980. CRC Press, Inc., Boca Raton (Florida)

Xie J, Zhang L, Ye Q, Zhou Q, Xin L, Su P, Gan R. Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. *Enzyme Microb Technol.* 2003;25:173-177.

Zhang W, Karen J, Potter JH, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003;30:210-215.

Zhou XS i Zhang YX. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. *Biotechnol. Lett.* 2002;24: 1449-1453



# Capítol 7:

## **Canvi d'escala per a la producció de lipasa de ROL en el sistema d'expressió de *Pichia pastoris* mitjançant l'ús de substrats mixtes.**

---

Realitzat en col·laboració amb:

Planta Pilot Fermentació  
Universitat autònoma de Barcelona





## 7 Canvi d'escala per a la producció de lipasa de ROL en el sistema d'expressió de *Pichia pastoris* mitjançant l'ús de substrats mixtes

### 7.1 RESUM

El següent pas realitzat en aquest treball és el canvi d'escala del procés de producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, mitjançant una estratègia de substrats mixtes utilitzant el sorbitol com a cosubstrat durant la fase d'inducció, estratègia optimitzada en el *Capítol 5* d'aquesta tesi.

Inicialment es realitza la comparació de la geometria dels reactors que s'utilitzaran, el reactor de 5 l (Biostat B) i el de 50 l (Biostat UD 50) de volum de treball. Es conclou que ambdós reactors presenten geometries similars, tot i que el reactor Biostat UD 50 presenta una relació T/D superior a la del reactor Biostat B, el que representarà que el primer serà més llarg i estret. Tanmateix, es valoren els valors de  $k_{La}$  presentats per cada un dels reactors, observant-se valors superiors en el reactor Biostat UD 50. Per tant, no es preveuran limitacions per transferència d'oxigen.

Es reproduïx el cultiu realitzat a escala de laboratori a escala de 50 l i es troba que la producció és entre 2 i 3 vegades inferiors, en comparació al prèviament obtingut a escala de 5 l. Cal destacar, que el paràmetre més important per explicar la davallada dels valors de producció recau en el consum de metanol. La  $q_{sMet}$  mitjana en el cultiu a 50 l es troba 2.2 vegades per sota dels valors registrats a escala laboratori. D'altra banda, el consum de sorbitol és manté sobre els mateixos valors.

Davant les resultats obtinguts s'avalua la dispersió del metanol a les diferents alçades del reactor Biostat UD 50. Altres autors presents a la bibliografia fan referència al possible gradient dels substrats en reactors de volums elevats. El metanol presenta característiques fisicoquímiques que poden contribuir negativament a la dispersió, juntament amb el sistema d'addició escollit, duent-se a terme des de la part superior del reactor. Després de realitzar l'avaluació de la dispersió dels substrats en el reactor, es troba que el metanol presenta un gradient màxim de 0.41 g l<sup>-1</sup>. Aquest gradient

augmenta a mesura que augmenta la concentració d'aquest en el reactor, i es troba que probablement la presència de biomassa contribuirà a l'augment de la dispersió. D'altra banda, la dispersió que presenta el sorbitol és gairebé imperceptible. Davant dels resultats obtinguts es repeteix el cultiu realitzat a la planta pilot sota les mateixes condicions de cultiu, aplicant una modificació al sistema d'addició de metanol. Aquest passarà d'addicionar-se per la part superior de reactor, a addicionar-se de forma submergida a mitja alçada del reactor mitjançant la utilització d'una cànula.

Al realitzar l'addició del metanol de forma submergida s'obtenen diferències importants en quant a la producció del procés. El  $Y_{p/X}$  correspon a  $7169.3 \text{ UA gX}^{-1}$ , augmentant 1.6 vegades el valor obtingut quan l'addició de metanol era realitzada per la part superior del reactor. Al comparar el valor de  $q_p$  mitjana, s'obtenen valors 2.1 superiors qual l'addició es realitzada de forma submergida. Tant la productivitat específica com la volumètrica presenten valors gairebé 2 vegades superiors sota la nova estratègia d'addició. Cal destacar, que la  $q_{sMet}$  mitjana augmenta 1.5 vegades al canviar el sistema d'addició de metanol. L'augment en el consum del metanol, es relaciona directament amb l'augment de la producció del procés.

Cal destacar que, tot i presentar millores significatives, els nivells de producció són inferiors als obtinguts prèviament a escala 5l. Per tant, tot i que la modificació realitzada presenta una important millora en el procés de producció, serà necessari un posterior estudi sobre els sistema d'addició de metanol, i veure com aquest afecta en funció dels punts d'addició, ja que tot sembla indicar que podria tractar-se d'un paràmetre clau alhora de reproduir els resultats obtinguts a l'escala de 5 l.

## 7.2 INTRODUCCIÓ

Un cop ha estat optimitzat el procés per a la producció de ROL amb *P. pastoris*, a escala laboratori (5 l), és decideix realitzar el canvi d'escala mantenint els nivells de producció, no variant la qualitat del producte i obtenint un bon rendiment.

Els canvis d'escala que habitualment es duen a terme en els processos biològics, són de 1 a 10, a diferència dels processos químics, en els que habitualment el canvi d'escala és de l'ordre de 50.000 o 80.000. En el treball que es presenta a continuació, el canvi d'escala dut a terme és d'un factor de 10, passant del reactor Biostat B Braun de 5 l de volum de treball, al reactors UD50 de capacitat 50 l de volum de treball.

Els problemes més destacats alhora de dur a terme el canvi d'escala d'un bioprocés recauen en l'augment de la mida del tanc, i els problemes associats al factor de mescla del reactor. Degut al convencional disseny dels reactors, la direcció dels dos factors principals és oposada, ja que el substrat normalment s'afegeix per la part superior del reactor i l'aireació per la part inferior a partir d'un difusor. Degut a l'augment de la llargada dels reactors, es poden presentar els següents problemes: haver de cobrir una àrea superior de substrat i la possible presència de zones anaeròbies en el reactor (Enfors *et al.*, 2001), un augment en el temps de mescla degut a la quantitat de líquid que s'ha de desplaçar, i finalment una major pressió hidràulica, la qual influirà sobre l'OUR (velocitat específica de consum d'oxigen) (Schmidt, 2005). També és important destacar que les cèl·lules que es troben a la part superior del tanc, estan exposades a un excés de substrat (addició de substrats a altes concentracions per la part superior del tanc), i alhora a possibles limitacions d'oxigen. D'altra banda a la part inferior del tanc les condicions poden ser a l'inrevés.

La majoria dels processos biològics són de característiques aeròbies i en la majoria s'utilitzen medis de cultiu amb elevades concentracions de salts, alhora la presència de les cèl·lules, en particular en cultius d'elevades densitats cel·lulars, fa que la viscositat del brou de cultiu augmenti tot provocant un comportament no-newtonia (Garcia-Ochoa, 2009). En aquests processos l'oxigen és un dels nutrients importats per garantir el creixement, el manteniment i la producció de metabòlits, els quals els poden veure afectats pels dèficits d'aquest (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000; Calik *et al.*, 2004; Liu *et al.*,

2006). Tanmateix altres estudis realitzats per Larsson *et al.*, (1996) i Bylund *et al.*, (1998), per tal de millorar la distribució dels substrats al llarg del reactor, proposen una addició, en aquest cas de glucosa, per la part superior i inferior del reactor, tant si l'estratègia d'operació es realitza mitjançant una addició continua o exponencial. Realitzen extraccions de mostres per tres punts diferenciats (la part superior, intermèdia i inferior del reactor), d'aquesta forma poden observar el gradient generat en el reactor de 12 m<sup>3</sup> de capacitat. A l'analitzar els resultats, troben que existeix un gradient en la concentració de glucosa al llarg de l'alçada del reactor. Les diferències més significatives, es troben entre la part superior i la inferior, trobant-se una diferència inferior entre la part intermèdia i la inferior. Anant un pas més endavant, seria positiu utilitzar una injecció en diferents alçades del substrat per així millorar la mescla d'aquest en el tanc.

L'objectiu del canvi d'escala és la determinació de les condicions operacionals que permetin assegurar que l'efecte de les diferents variables és el mateix independentment de la dimensió de cultiu. El resultat final depèn en gran mesura de la interrelació entre la cinètica o cinètiques químiques del procés biològic i la hidrodinàmica del bioreactor. El canvi d'escala es pot basar en la teoria de la semblança, que proposa que si dos sistemes estan descrits per les mateixes equacions diferencials amb les mateixes condicions de contorn el seu comportament ha de ser similar. Aquesta semblança s'expressa matemàticament com:

$$m' = k \cdot m \text{ (Eq. 7.1)}$$

on  $m'$  i  $m$  representen una variable a gran escala i a escala laboratori, respectivament. La semblança es pot dividir en diferents classes:

- Semblança geomètrica
- Semblança dinàmica
- Semblança tèrmica
- Semblança màssica
- Semblança bioquímica

On cada una de les semblances és un prerrequisit de la següent (Solà i Gòdia 1994).

Han aparegut diferents aproximacions per al canvi d'escala d'un procés biotecnològic basades en diferents mètodes:

- Mètode fonamental: es basa en la descripció quantitativa dels processos biològics i implica descriure les equacions del procés i solucionar-les.
- Mètode dimensional: es basa en la relació de diferents variables (mòduls adimensionals).
- Mètodes heurístics i els mètodes de prova i error: es basen en l'experiència.
- Mètodes d'anàlisi del règim de flux: es basen en la comparació de les velocitats que juguen un paper important en el procés.

Tradicionalment pel canvi d'escala es busca la semblança geomètrica i també es selecciona algun paràmetre amb influència sobre el cultiu i es cerca la forma de mantenir-lo constant. Entre aquests paràmetres cal destacar: la potència per unitat de volum ( $P/V$ ), el coeficient volumètric de transferència d'oxigen ( $k_L a$ ), l'esforç tallant màxim i el temps de mescla. Un dels paràmetres més utilitzats és la transferència d'oxigen, tenint present la baixa solubilitat d'aquest gas en el medi de cultiu i la seva importància en els cultius aeròbics on es poden arribar a assolir altes densitats cel·lulars.

La velocitat de transferència d'oxigen des de la fase gasosa (bombolles) al si de la fase líquida (medi líquid) s'expressa en l'equació 7.2, on el  $k_L a$  és el coeficient volumètric de transferència d'oxigen,  $C_L$  és la concentració d'oxigen dissolt en el si del líquid i la  $C_L^*$  és la concentració d'oxigen dissolt en equilibri amb la pressió parcial d'oxigen en la fase gasosa. Per tant, el  $k_L a$  i el grau de transferència d'oxigen dependran de les condicions d'operació, de la geometria del sistema, del tipus de gas i líquid que s'utilitzin en el procés. De fet per les mateixes condicions de treball, s'obtenen valors de  $k_L a$  diferents, associat a l'ús de reactors amb diferents dimensions (Nagata, 1975; Van't Riet, 1979; Perry i Green, 1997; Gaddis, 1999; Paul *et al.*, 2004). En general els paràmetres que fan disminuir el valor del  $k_L a$  són la viscositat i el volum del líquid, i d'altra banda els factors que poden augmentar el seu valor estan relacionats amb l'àrea

de transferència, l'agitació i la presència de dispositius que facin augmentar un, l'altre o ambdós paràmetres, com per exemple l'ús de deflectors.

$$\text{OTR} = k_L a \cdot (C_L^* - C_L) \quad (\text{Eq. 7.2})$$

Tenint present que en l'estat estacionari la velocitat de consum d'oxigen (OUR) és igual a la velocitat de transferència d'oxigen (OTR) (Dunn *et al.*, 2003) (equació 7.4), podem veure la importància que prenen els valors del  $k_L a$  i de la  $C_L^*$  en sistemes amb microorganismes aerobis (equació 7.3). Existeix la possibilitat de modificar el valor de  $C_L^*$ , mitjançant l'enriquiment amb oxigen pur o bé pressuritzant el procés. No obstant, l'estratègia realitzada més habitualment és la d'augmentar el valor del  $k_L a$  mitjançant modificacions operacionals o geomètriques del sistema. De fet, cal destacar que una petita modificació al sistema pot generar un cost econòmic baix tot obtenint un augment important en les prestacions del bioreactor. Tot i que es convenient arribar a una solució de compromís, ja que una agitació o aireació excessiva poden provocar una disminució en l'eficàcia del sistema i la mort cel·lular.

$$k_L a \cdot (C_L^* - C_L) = q_{O_2} \cdot X \quad (\text{Eq. 7.3})$$

$$\text{OTR} = \text{OUR} \quad (\text{Eq. 7.4})$$

En la bibliografia existeixen treballs en els que s'aconsegueix satisfactòriament el procés de canvi d'escala fins a 800 l per a la producció de lipasa de *Candida Rugosa* mitjançant la soca *P. pastoris* amb el promotor GAP, el qual utilitza com a substrat per a la producció el glicerol (Zhao *et al.*, 2008). Aquests autors dissenyen una estratègia pel cultiu a 800 l en el que conclouen, que mantenir una velocitat específica de creixement baixa durant el cultiu, la productivitat és superior, provocat per la disminució de la lisis cel·lular i una menor activitat proteolítica.

Cal destacar que els processos a escales de treball superiors descrits en la bibliografia, són més nombrosos utilitzant el promotor GAP que amb el promotor AOX, probablement perquè la utilització d'aquest últim implica l'ús del metanol. Tot i així



existeixen autors (Guo *et al.*, 2007), que utilitzen el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* per a la producció de fitases termostables recombinants a un volum de treball de 50 l. Utilitzen diferents estratègies durant l'etapa d'inducció, mitjançant l'addició de diferents cabals de metanol (1-5 ml min<sup>-1</sup>), trobant la major producció quan el cabal és de 3 ml min<sup>-1</sup>. Al utilitzar cabals superiors, es registren acumulacions de metanol màximes de 14 g l<sup>-1</sup>, i en els casos inferiors, no detecten metanol residual en el medi. Aquests autors, proposen que la utilització de substrats mixtes pels cabals inferiors de metanol emprats podrien afavorir la producció de les fitases recombinants.

Kong *et al.*, (2009), també obtenen resultats satisfactoris realitzant fermentacions a un volum de 80 l per la producció de oncoestatina M humana utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* a partir d'una estratègia en semicontinu. Durant la fase d'inducció, afegeixen metanol pur, iniciant amb un cabal de 144 ml h<sup>-1</sup>, arribant a un màxim de 440 ml h<sup>-1</sup>, al final del cultiu. Durant les últimes hores d'inducció detecten una disminució del producte recombinat d'interès, que és associada a l'augment de l'activitat proteolítica, generada probablement per la lisis cel·lular. Aquests, addicionen peptona al 0.5 % a l'aliment, per tal de reduir aquesta disminució.

Es troben treballs realitzats a volums de treball superiors (3000 l), per a la producció d'un antigen per l'hepatitis B utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* (Hardy *et al.*, 2000). Aquests utilitzen una estratègia en semicontinu, on al finalitzar l'etapa discontinua amb glicerol, addicionen el metanol augmentant el cabal de 2.9-10.9 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en funció dels temps.

Tanmateix cal destacar l'empresa Hopeland Chem-Tech Co. ([www.hopeland-cn.com](http://www.hopeland-cn.com)), produeix satisfactòriament fitases per us animal a escala industrial (30 m<sup>3</sup>), utilitzant la soca *P. pastoris*, aplicant una inducció al 0.5 % de metanol. Arriben a produir nivells de 5 g l<sup>-1</sup> de fitasa recombinat, sent la major quantitat d'aquesta produïda.

Com a antecedents d'aquest treball, es troba el treball realitzat per Surribas (2008). En aquest estudi es realitzen varis cultius en semicontinu utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* per a la producció de lipases de *Rhizopus oryzae*, a un volum de treball de 50 l mitjançant l'addició de metanol com a única font de carboni a la fase d'inducció. Sota

aquest fenotip es troben amb problemes relacionats amb limitacions d'oxigen, lligades a l'alt consum de metanol, requerint alts cabals d'oxigen per tal de no entrar en fases anaeròbies. Realitzen dos cultiu a la planta pilot, amb el primer es troben amb limitacions d'oxigen importants que promouen l'aparició d'un subproducte no identificat (no detectat en els cultius de referència (5 l)), el qual es relacionat amb la baixa producció del producte recombinant d'interès. A partir de l'enriquiment amb oxigen pur del cabal d'aireació i l'augment de l'agitació, milloren la productivitat obtinguda i disminueixen l'aparició del subproducte no identificat, però tot i així els resultats es troben per sota dels cultius duta a terme al volum de 5 l. Tot i augmentar l'agitació i enriquint el cabal d'aire amb oxigen pur, no aconsegueixen eliminar completament les deficiències d'oxigen.

Tal i com es pot observar a la taula 7.1, es registren pèrdues al voltant del 77 % pel que fa a la productivitat i l'activitat lipolítica màxima registrada al comparar els valors obtinguts a la planta pilot amb els cultius realitzats a 5 l. Alhora també es registren pèrdues al voltant del 62 % pel que fa a la  $qp_{m\grave{a}xima}$  obtinguda. Per tant Surribas (2008), davant dels resultats obtinguts, conclou que la transferència d'oxigen és un paràmetre clau per a poder reproduir amb èxit el valors dels cultius realitzats a escala laboratori i que amb els sistema experimental utilitzat no hi ha possibilitat de realitzar un canvi d'escala satisfactori. Aquests proposen realitzar modificacions al sistema d'aireació i d'agitació (disseny de noves turbines, afegir nous deflectors, etc) del bioreactor de 50 l, per tal d'augmentar la transferència d'oxigen, ja que és la principal limitació detectada en el procés.

**Taula 7.1:** Presentació dels principals paràmetres de cultiu per a fermentacions dutes a terme a la planta pilot, utilitzant una estratègia en semicontinu mitjançant l'addició de metanol com a única font de carboni a la fase d'inducció utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Experiments realitzats per Surribas (2008)

<b>Fenotip</b>	<b>Mut<sup>+</sup></b>	
<b>Font de carboni inducció</b>	<b>Metanol</b>	
<b>Volum de treball (l)</b>	<b>30</b>	<b>5</b>
<b>Consigna metanol (g l<sup>-1</sup>)</b>	2.5	2.5
<b>Màx. activitat lipolítica (UA ml<sup>-1</sup>)</b>	88	390
<b>Productivitat (UA l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	1329	5869
<b><math>qp_{m\grave{a}xima}</math> (UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	140	360

L'objectiu d'aquest treball es reproduir els valors obtinguts en quant a producció i qualitat del producte recombinant d'interès, obtingut a escala laboratori (5 l), utilitzant una estratègia en semicontinu mitjançant l'ús de substrats mixtes (sorbitol i metanol) per a la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* tot augmentant el volum de treball 10 vegades (50 l). En el treball que s'ha dut a terme en aquest capítol, no s'esperen trobar problemes relacionats amb limitacions d'oxigen, ja que el fenotip utilitzat en aquest cas, presenta una assimilació de metanol lenta (Mut<sup>s</sup>) requerint una baixa demanda d'oxigen, en comparació al treball realitzat per Surribas (2008), on va ser utilitzat el fenotip Mut<sup>+</sup>. Aquest treball va ser dut a terme a la Planta Pilot de Fermentacions de la UAB amb la col·laboració del Dr. Antoni Casablanques i l'Oscar Fernández.



## 7.3 MATERIALS I MÈTODES

### 7.3.1 Preparació del inòcul

L'inòcul per al bioreactor Biostat UD50 es realitzar en diferents passos, inicialment es du a terme un primer creixement en flascons agitats de 1 l de capacitat (partint d'estoc en criovials), utilitzant un volum de treball de 200 ml. Es manté en un orbital en les següents condicions: 30°C i 200 rpm, durant 42 h. S'obtenen valors d'absorbància entre 70-80 unitats. Posteriorment, es centrifuga el brou de cultiu durant 15 minuts (5000 g; (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa)) a 4°C, es recuperant les cèl·lules i es resuspenen en 80 ml de solució estèril isotònica al 0.9% i s'inocula el reactor Braun Biostat B (Sartorius, Alemanya) de 5 litres de volum útil, obtenint un valor inicial de densitat òptica al voltant de 4-6 unitats. El medi utilitzat correspon al medi utilitzat en el semicontinu descrit en l'apartat 3.2 *Medis de cultiu*.

Les condicions de cultiu utilitzades són les següents; control en cascada del pO<sub>2</sub> lligat a la velocitat d'agitació amb una agitació mínima de 300 rpm i una agitació màxima de 900 rpm, per tal de mantenir la senyal de pO<sub>2</sub> per sobre del 30%. L'aireació correspon a 1 vvm, la temperatura es manté a 30°C, i el pH a 5.5, mitjançant l'addició de NH<sub>4</sub>OH (30%). Un cop és consumit el glicerol present en el medi (disminució de l'agitació al mínim), el medi de cultiu es traspasa al reactor Biostat UD 50 (Sartorius, Alemanya) obtenint una absorbància inicial al voltant de 4-5 unitats. Mitjançant aquesta estratègia s'assegura que la primera fase de cultiu (creixement amb glicerol) tingui una durada d'unes 18-20h.

### 7.3.2 Condicions i estratègia del procés de cultiu

S'ha realitzat el cultiu mitjançant una estratègia en semicontinu utilitzant el fermentador B. Braun model UD50 (Sartorius, Alemanya) compostat per una cuba de 70 litres de capacitat màxima, disponible a la Planta Pilot de Fermentacions (PPF) del Departament d'Enginyeria Química. El sistema d'esterilització del reactor és *in-situ*, mitjançant l'ús de vapor. El medi de cultiu s'esterilitza amb el reactor, on les sals traça i la biotina, s'afegeixen posteriorment, filtrant-les amb un filtre estèril de 0.45 µm

(Millipore). El medi de cultiu correspon al medi utilitzat en semicontinu descrit a l'apartat 3.2 *Medis de cultiu*, i el volum inicial del cultiu és de 30 l. La temperatura es manté fixada a 30°C i el pH es mesura mitjançant una sonda introduïda al interior del reactor (CRISON Inpro, Alella, Espanya) i es mante a un valor de 5.5 mitjançant l'addició d'amoniac (30%) durant la fase de creixement en discontinu amb glicerol. Quan la senyal del pO<sub>2</sub> augmenta, indica l'acabament del glicerol, i per tant la finalització del discontinu en glicerol. Un cop finalitzada aquesta fase, la base es canvia per KOH 5M, per tal d'evitar interferències amb la sonda de metanol i s'inicia la fase de transició. En aquesta, s'afegeixen al cultiu una addició puntual de 5 g l<sup>-1</sup> de metanol i 10 g l<sup>-1</sup> de sorbitol. Un cop finalitzada la fase de transició (esgotament d'ambdós substrats) s'inicia la fase d'inducció. S'activa el control de metanol, per tal de mantenir la concentració de metanol a l'interior del reactor a 2 g l<sup>-1</sup>. Per realitzar el control de la concentració d'aquest al interior del reactor, es posarà en marxa l'estratègia de control descrita a l'apartat 3.6.2 *Control i anàlisis de la concentració de metanol en línia*. El metanol s'addiciona pur, juntament amb les sals traça (5 ml l<sup>-1</sup>) i la biotina (2 ml l<sup>-1</sup>). Per a la segona font de carboni utilitzada, es prepararà una dissolució de 300 g l<sup>-1</sup> de sorbitol i 107.14 g l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl estèrils, on s'hi afegeixen sals traça (5 ml l<sup>-1</sup>) i biotina (2 ml l<sup>-1</sup>). Aquest substrat s'introduirà al interior del reactor, mitjançant una addició exponencial preprogramada descrita a l'apartat 3.6.3 *Sistema d'addició de cosubstrats (Sorbitol i Glicerol)*.

Les addicions d'ambdós substrats es realitzen mitjançant dues microburetes automàtiques (Crison, Alella, Espanya) que s'esterilitzen químicament per realitzar les addicions. Quan s'inicia el semicontinu s'inicialitza el funcionament de les microburetes, i aquestes començaran a addicionar el volum desitjat per l'usuari o que decideixi l'algorisme de control. Les microburetes presenten unes xeringues de 5 ml pel metanol i de 10 ml pel sorbitol, volums que no s'assoliran durant el cultiu.

El percentatge d'oxigen dissolt en el medi es mesura mitjançant una sonda d'oxigen (Mettler Toledo, Küsnacht, Suïssa), on es mante per sobre del 30% mitjançant un control en cascada lligat a l'agitació, permetent una agitació mínima de 400 rpm, per tal de garantir la homogeneïtat del medi de cultiu. El cabal d'aire que s'utilitza és de 30 l min<sup>-1</sup> (1 vvm) durant la fase de creixement en glicerol i de 50 l min<sup>-1</sup> durant les

posteriors fases, tant la transició com la inducció. Les sondes tant de pH com d'oxigen són calibrades a l'inici del cultiu.

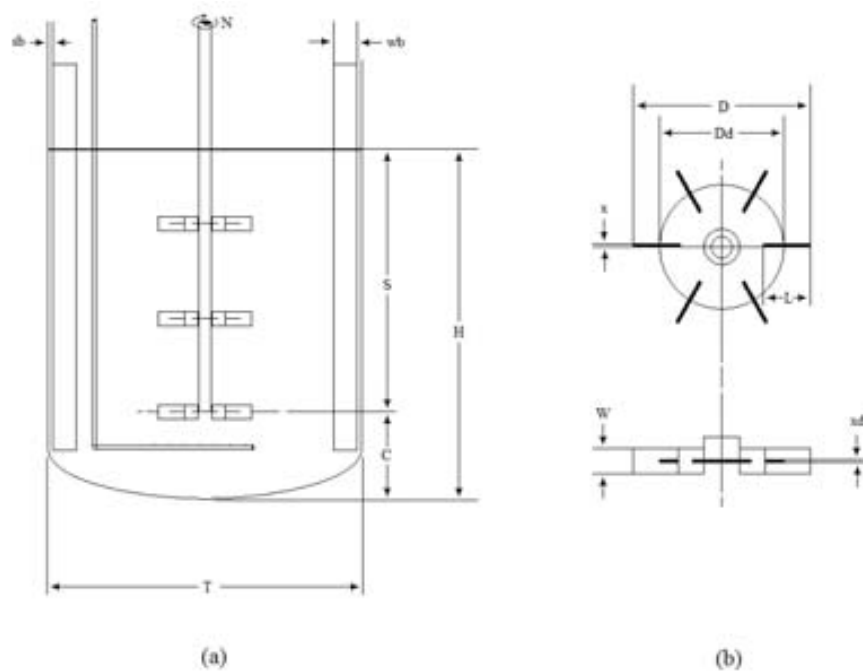




## 7.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 7.4.1 Comparació geomètrica dels reactors Biostat B i Biostat UD50

El factor d'escala entre el Biostat UD i el Biostat B és de 10, un valor habitual en els canvis d'escala en Biotecnologia. Són dos equips semblants, tot i que no es compleix estrictament entre ells la semblança geomètrica. Les taules 7.2 i 7.3 mostren les dimensions i relacions geomètriques entre ells. Pel que fa a l'agitació es van utilitzar tres turbines tipus Rushton en els dos reactors. La figura 7.1 mostra la geometria estàndard d'un reactor amb turbines tipus Rushton. La nomenclatura que presenta aquesta figura, permetrà reconèixer les distàncies presentades en la taula 7.1.



**Figura 7.1:** Geometria dels bioreactors. Els valors de les distàncies es poden consultar en la taula 7.2.

**Taula 7.2:** Dimensions i relacions geomètriques entre el Biostat B i el Biostat UD, expressades en cm. Dibuix representat a la figura 7.1)

Reactor	Biostat B	Biostat UD50
Diàmetre tanc (T)	16.0	31.5
Nombre deflectors (nb)	4	4
Amplada deflectors (wb)	1.2	2.3
Espai deflectors (sb)	0.5	0.8
Diàmetre impulsor (D)	6.3	12.5
Distància: fons - turbina (C)	4.0	15.0
Distància turbines submergides (S)	17.5	53.5
Alçada líquid (H)	21.5	68.5
Nombre de paletes (n)	6	6
Angle paletes ( $\alpha$ )	60	60
Amplada paletes (W)	1.3	2.5
Longitud paletes (L)	1.8	4.0
Gruix paletes (x)	0.15	0.3
Gruix disc (xd)	0.15	0.3
Diàmetre disc (Dd)	3.45	7.5
Geometria base	Bombejada	Bombejada

Al comparar els valors de la taula 7.3, es pot veure que la relació H/T és superior en el reactor Biostat UD50 que en el reactor Biostat B, ja que el primer presenta una geometria més cilíndrica que el segon. La relació entre el diàmetre del tanc i de les turbines (D/T), és molt semblant. Alhora la relació entre l'amplada i el diàmetre de les turbines (W/D), és igual pels dos bioreactors. Fent referència a la separació de les turbines, aquestes es recomana que estiguin separades a una distància de 1 o 2 vegades el diàmetre de l'impulsor. El bioreactor UD50 presenta una separació entre la primera i segona pala de 1.41 D, i entre la segona i tercera pala de 1.76 D. D'altra banda, el reactor Biostat B, presenta una disposició menys espaciada, presentant una separació de 0.8 D entre la primera i segona pala, i una separació de 0.3 D entre la segona i tercera pala.

**Taula 7.3:** Relacions geomètriques entre el Biostat B i el Biostat UD.

Reactor	Biostat B	Biostat UD50
D / T	0.39	0.40
W / D	0.21	0.21
H / T	1.34	2.17

Els dos reactors són reactors encamisats, per on hi circularà aigua per tal de mantenir a la temperatura en la consigna fixada. Ambdós reactors presenten 4 deflectors. Cal destacar que el reactor Biostat B, a més a més presenta 4 sondes (temperatura, pH, pO<sub>2</sub> i metanol) de longituds aproximades a 34 cm, les quals actuen com a deflectors afavorint al factor de mescla. D'altra banda, el reactor UD50, també presenta 4 sondes, però aquestes es troben situades a la part inferior d'aquest, no actuant com a bandes deflectors, ja que la superfície de contacte no és superior a 2 cm. Per tant, inicialment sembla que el reactor Biostat B presenta una millor distribució geomètrica per tal d'afavorir al factor de mescla.

#### 7.4.2 Avaluació del $k_{LA}$ del reactor Biostat UD50

L'estudi del  $k_{LA}$  del reactor utilitzat (UD50) va ser determinat per Ferrer (2007). La tècnica utilitzada per calcular aquest paràmetre va ser el mètode dinàmic "Gassing out", citat prèviament per varis autors (Van't Riet, 1979; Blanch i Clark, 1996; García-Ochoa i Gómez, 1998; Montes, 1999; Dalmau, 1999; Shuler i Kargi, 2002; Poughon *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2006). Aquest mètode consisteix en sotmetre al reactor a condicions operacionals constants, per després desplaçar l'oxigen dissolt mitjançant nitrogen en fase gas. Un cop s'obté el 0% d'oxigen dissolt (senyal de la sonda oxigen), s'atura la corrent de nitrogen i posteriorment l'agitació. Llavors, sense airejar, es reprèn l'agitació del sistema a la condició a les que es vulgui dur a terme l'experiment (entre 300-1000 rpm), i s'inicia l'aireació del sistema a un cabal establert (entre 0.25 - 1 vvm). De l'augment que presentarà la senyal de la sonda de pO<sub>2</sub> en funció del temps, es calcularà el valor del  $k_{LA}$ . Aquest procediment es realitza de la mateixa forma independentment del líquid utilitzat (aigua, medi de cultiu, etc), però queda limitat a fer-ho sense presència de biomassa.

La taula 7.4 mostra els valors obtinguts per Ferrer (2007) al realitzar el càlcul del  $k_{La}$  pels diferents reactors sota les mateixes condicions. Es pot veure que el reactor UD50 presenta valors de  $k_{La}$  superiors al reactor Biostat B en totes les condicions provades. Cal destacar que els valors de  $k_{La}$  disminuiran al treballar amb cultius amb presència cel·lular, ja que com alguns autors han comentat prèviament, la capacitat de transferència pot disminuir degut a la presència de surfactants o altres substàncies (Ju i Sundarajan, 1995; Galaction *et al.*, 2004; Fyferling *et al.*, 2008; García-Ochoa i Gómez, 2009). Altres autors, justifiquen aquesta disminució degut a l'augment de la viscositat del fluid a l'augmentar la concentració cel·lular en el medi de cultiu (Van't Riet, 1979; Fujasová *et al.*, 2007; Fyferling *et al.*, 2008; García-Ochoa i Gómez, 2009). En el cas que s'està estudiant, ambdós factors podrien afectar en la disminució del  $k_{La}$ , ja que el medi de cultiu presenta una alta concentració de sals i també pot presentar un augment de la viscositat, degut a les altes densitats cel·lulars a les que es treballa. Però tenint present que el valor de  $k_{La}$ , pel reactor de 50 l és superior als trobats en el reactor de 5 l, no es preveuen problemes relacionats amb la transferència d'oxigen pel fet de canviar de bioreactor.

**Taula 7.4:** Valors de  $k_{La}$  pels reactors Biostat B i el Biostat UD treballant amb medi *invitrogen* (descrit en el capítol 3: Material i mètodes). Resultats obtinguts per Ferrer (2007).

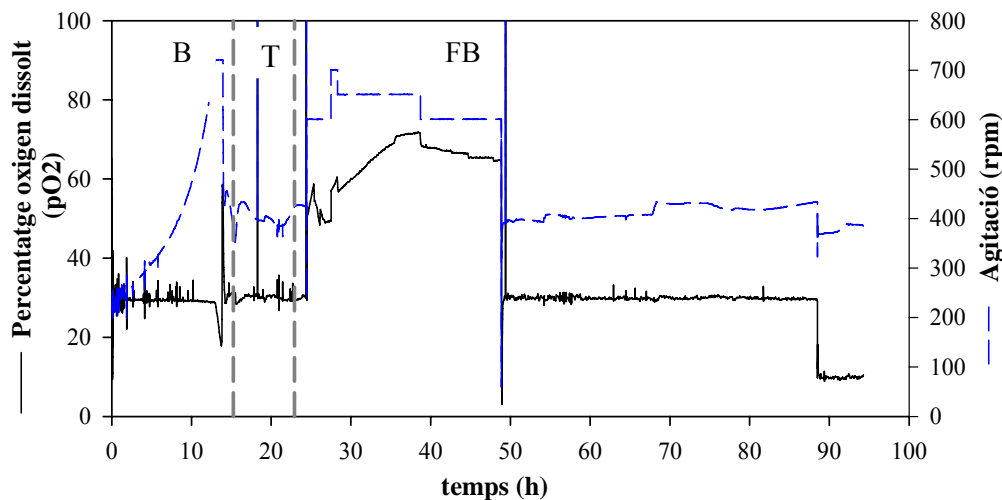
Reactor	Biostat B				Biostat UD 50			
vvm ( $l l^{-1} min^{-1}$ )	0.25		1		0.25		1	
Agitació (rpm)	300	700	300	700	300	700	300	700
$k_{La}$ ( $s^{-1}$ )	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.10</b>
Volum (l)	5				50			
Temperatura	30°C							
Fluid	Medi de cultiu							

### 7.4.3 Resultats del cultiu a escala pilot (50l)

Inicialment no existeixen diferències significatives en quant a semblança geomètrica i velocitat de transferència d'oxigen, llavors es decideix realitzar el canvi d'escala del cultiu optimitzat a escala de 5 l. Per tant, es realitza un cultiu a 50 l mirant de reproduir les condicions dels cultius realitzats a escala 5 l. Tal i com s'ha pogut veure en el *Capítol 5*, les condicions de cultiu en les que s'obtenia la màxima producció de ROL, era quan la concentració de metanol es mantenia fixada a  $2 \text{ g l}^{-1}$  (paràmetre clau), sent menys significatiu l'efecte de la velocitat específica de creixement. Per tant, es decideix realitzar el cultiu a la planta pilot, mantenint la concentració de metanol fixada a  $2 \text{ g l}^{-1}$  i una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Ambdós substrats són afegits per la part superior del reactor, mitjançant l'ús de dues microburetes.

La figura 7.2 mostra les tres fases del cultiu; B; discontinu de glicerol ( $40 \text{ g l}^{-1}$ ), T; la transició on s'introdueix un pols de metanol ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) i sorbitol ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ), i finalment FB; que correspon a l'etapa d'inducció, on el metanol es manté al voltant de la consigna seleccionada i el sorbitol s'afegeix de forma exponencial per aconseguir una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . A aquesta figura es pot veure l'evolució de les variables mesurades en línia mitjançant les sondes instal·lades en el reactor (pH, temperatura i  $p\text{O}_2$ ). Durant les primeres 22 h de cultiu, el percentatge d'oxigen dissolt es manté al voltant del 30% mitjançant un control en cascada lligat a l'agitació, les quals augmenten fins a gairebé 800 rpm per a mantenir la consigna de  $p\text{O}_2$  durant el discontinu de glicerol. A les 16 h de cultiu es pot veure una caiguda en l'agitació, factor que ens indica la finalització de la primera fase del cultiu (discontinuu de glicerol). Un cop finalitzat el glicerol, s'inicia la fase de transició, on s'afegien el metanol i el sorbitol mitjançant polsos de 5 i  $10 \text{ g l}^{-1}$ , respectivament. Durant aquesta fase l'agitació augmenta fins a un màxim de 400 rpm. Un cop s'inicia la inducció, s'atura el control de  $p\text{O}_2$ , i es manté una agitació fixada entre 600-700 rpm, independentment del valor de  $p\text{O}_2$  registrat, sempre que no disminueixi del 30%. A l'observar-se que el  $p\text{O}_2$  es troba molt per sobre del 30%, es decideix, a les 50 h de cultiu, iniciar el control en cascada de  $p\text{O}_2$  amb una agitació mínima de 320 rpm. Per tant, és important destacar que durant el cultiu, el  $p\text{O}_2$  no va trobar-se mai per sota del 20% (exceptuant pocs minuts al finalitzar el discontinuu de glicerol), no presentant-se problemes relacionats amb deficiències d'oxigen, no sent necessari enriquir el cabal d'aire a l'entrada amb oxigen pur ni augmentar el cabal

d'aireació a més de 1 vvm al final del cultiu. Per tant, el treballar amb el fenotip Mut<sup>s</sup>, no es presenten els problemes amb els que es trobava Surribas (2008) al treballar amb el fenotip Mut<sup>+</sup>. Altres variables controlades mitjançant les sondes instal·lades al reactor (pH i temperatura) es mantenen en les consignes seleccionades durant tot el cultiu.

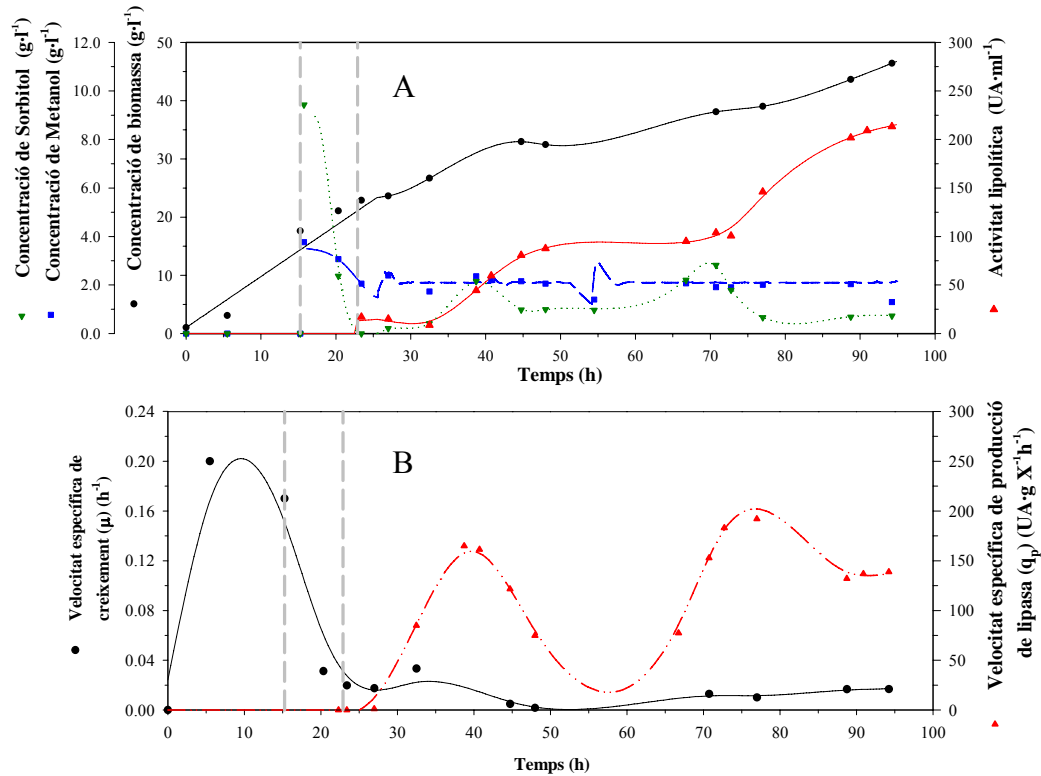


**Figura 7.2:** Evolució del percentatge d'oxigen dissolt i de l'agitació al llarg del cultiu. Les línies discontinues verticals indiquen el començament i final de l'etapa de transició.

La figura 7.3 mostra l'evolució de la biomassa al llarg del cultiu, la qual arriba a 20 g l<sup>-1</sup> durant les primeres 16 h de cultiu, corresponent a la fase discontinua amb glicerol. A l'analitzar la fase d'inducció, s'observa que el sorbitol presenta una lleugera acumulació fins a un màxim de 3 g l<sup>-1</sup> a les 39 i 72 h de cultiu, degut a que la  $\mu$  és troba per sota del valor fixat (0.02 h<sup>-1</sup>) (figura 7.3 B). Al ser detectada aquesta acumulació, el cabal d'addició de sorbitol es corregeix, disminuït aquest de 5492  $\mu\text{l min}^{-1}$  a 3000  $\mu\text{l min}^{-1}$  (figura 7.4 A). Tot i així, aquesta acumulació no representa cap problema pel creixement (toxicitat al voltant del 50 g l<sup>-1</sup>), ni tampoc cap efecte negatiu per a la producció, ja que no es tracta d'un substrat repressor del promotor AOX (Thorpe *et al.*, 1999). El nou cabal inicial va ser calculat prenent la concentració de biomassa i volum de cultiu en el reactor a les 72 h de cultiu. Les variables de  $\mu$ ,  $Y_{X/S}$  i  $S_0$  es mantenen constants, i s'utilitzen els mateixos valors per realitzar el nou càlcul.

Pel que fa al metanol, aquest es manté durant tot el cultiu al voltant de la consigna seleccionada, presentant una disminució d'aquesta a les 54h de cultiu, la qual es torna a recuperar a les poques hores. La disminució de la concentració de metanol va ser

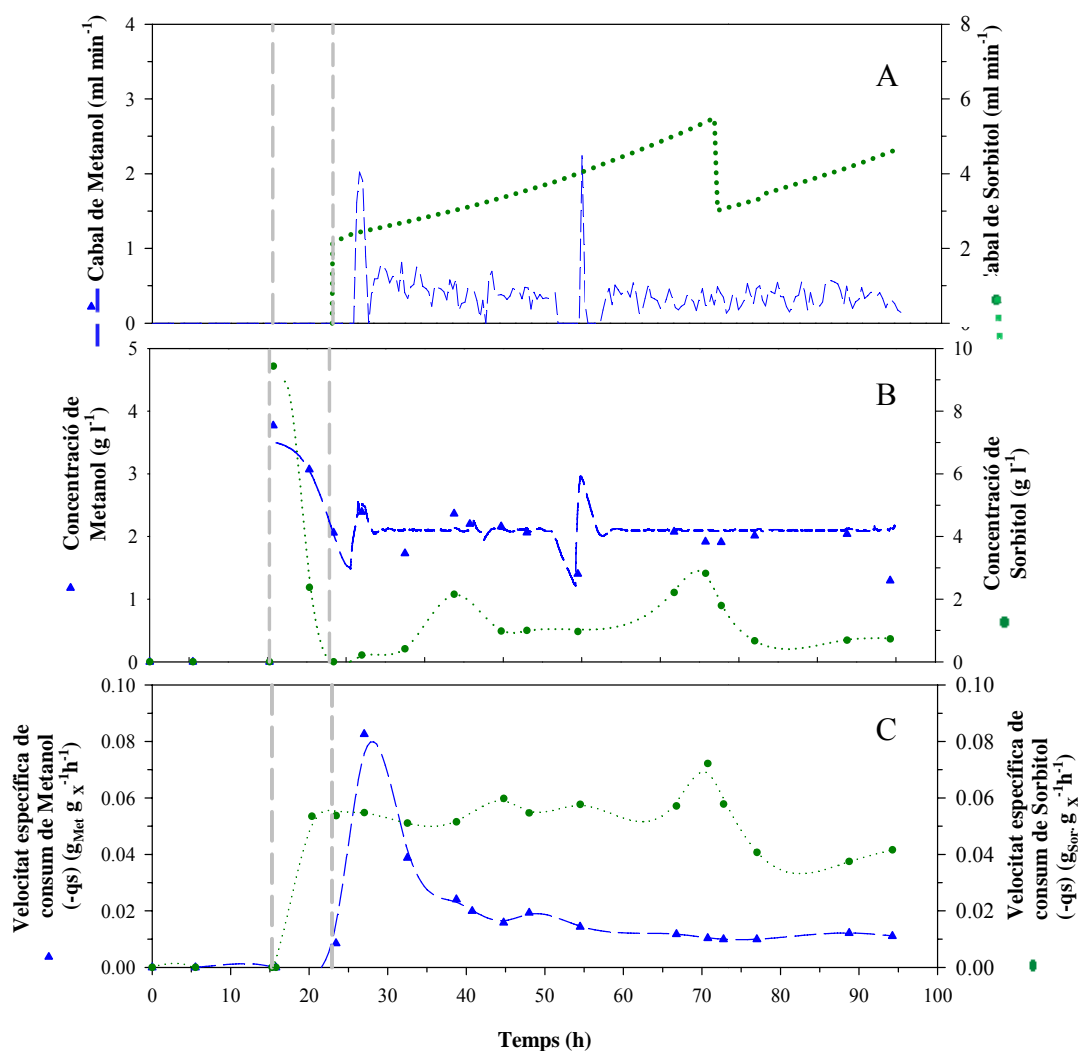
conseqüència d'un problema mecànic amb el sistema d'addició de metanol, on durant 2.8 h no es va addicionar metanol al reactor, afectant directament sobre la concentració d'aquest (figura 7.3 A).



**Figura 7.3:** Seguiment dels principals paràmetres de cultiu per a la producció de ROL mitjançant la soca Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* a una escala de 50 l. Les línies discontinues verticals indiquen el començament i final de l'etapa de transició.

Fent referència a la producció de ROL, es detecten les primeres unitats d'activitat al finalitzar la fase de transició, arribant a un màxim de 16 UA ml<sup>-1</sup> en aquest punt (figura 7.3 A). Poques hores després d'iniciar la fase d'inducció, s'observa un augment d'aquest valor, arribant a un màxim de 80 UA ml<sup>-1</sup>. Posteriorment, l'activitat s'atura durant 20 h, coincidint amb l'aturada de l'addició de metanol registrada degut a un problema mecànic, i alhora coincidint amb la disminució de l'agitació del cultiu passant de 600 rpm a 400 rpm (control en cansada amb una consigna de pO<sub>2</sub> al 30%), el va representar una disminució de l'oxigen dissolt en el medi del 62 % al 30 %, tot i que aquesta es registra unes hores després (aprox. 2 h). Tot i així, a les 70 h de cultiu, l'activitat lipolítica es recupera (figura 7.3 A), arribant a un màxim de 213.2 UA ml<sup>-1</sup> al final del cultiu. A la figura 7.3 B, es pot veure l'evolució de la q<sub>p</sub> al llarg del cultiu, presentant una important disminució entre les 45 i 65 h de cultiu, relacionada amb

l'aturada de l'activitat lipolítica. La  $q_p$  presenta el seu valor màxim a les 77 h de cultiu arribant a  $201 \text{ UA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La figura 7.4 C mostra l'evolució de la velocitat específica de consum de sorbitol i metanol. La  $q_{sMet}$ , presenta un important augment durant les primeres hores d'inducció, el qual disminuirà aproximadament a les 5 h, estabilitzant-se al voltant de  $0.017 \text{ g}_{Met} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$  presentant però, una lleugera tendència a disminuir. El valor mig de la  $q_{sMet}$  durant les últimes 45 h de cultiu és de  $0.014 \text{ g}_{Met} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A la mateixa figura, la  $q_{sSor}$  es manté constant al voltant de  $0.050 \text{ g}_{Sor} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$  durant les primeres 44 h d'inducció, presentant un lleuger augment a les 70 h de cultiu, arribant a un màxim de  $0.070 \text{ g}_{Sor} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Posteriorment, aquest valor presenta una disminució, conseqüència de la disminució del cabal de sorbitol afegit al reactor.

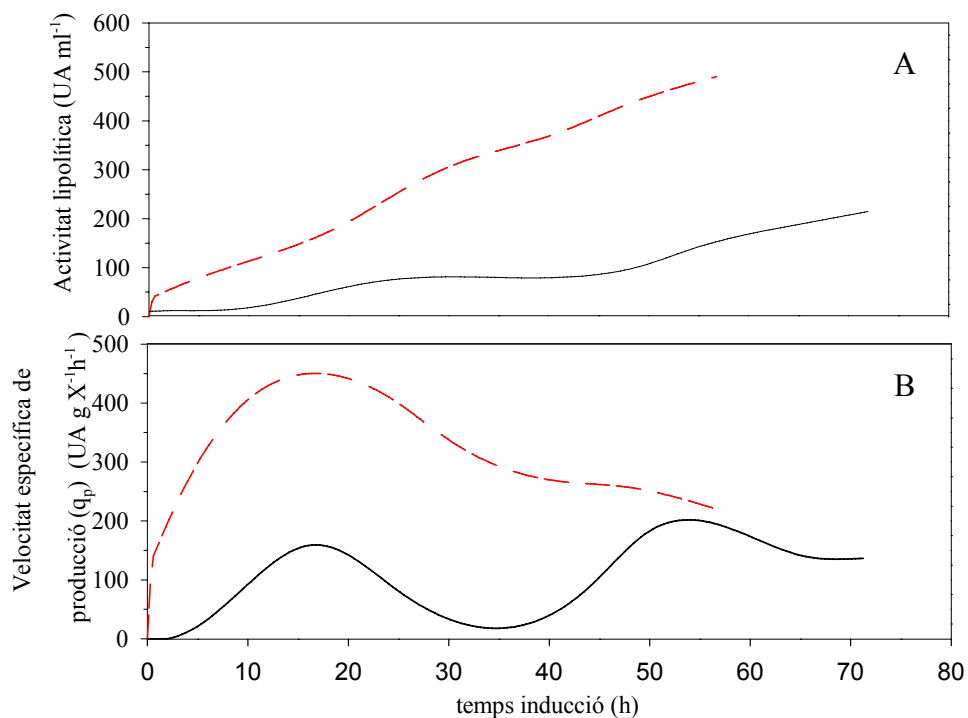


**Figura 7.4:** Evolució dels cabals d'addició, concentracions de metanol i sorbitol i les velocitats específiques de consum de metanol i sorbitol al llarg del cultiu. Les línies discontinues verticals indiquen el començament i final de l'etapa de transició.



#### 7.4.4 Comparació dels principals paràmetres entre el cultiu realitzat a la planta pilot i el realitzat a escala laboratori

Un cop obtinguts els resultats treballant a 50 l com a volum final, aquests són comparats amb els realitzats sota les mateixes condicions a escala laboratori (5 l) (resultats presentats en el *Capítol 5* d'aquesta tesi).



**Figura 7.5:** Comparació de l'evolució de l'activitat lipolítica (A) i la velocitat específica de producció (B) de ROL mitjançant la soca Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* pels diferents cultius emprant la mateixa estratègia de cultiu a escala laboratori (5 l) i a escala pilot (50 l). Els símbols corresponen a les següents condicions; (—):  $\mu$  de 0.02h<sup>-1</sup> i 2 g l<sup>-1</sup> de metanol (V=5 l); (—):  $\mu$  de 0.02h<sup>-1</sup> i 2 g l<sup>-1</sup> de metanol (V=50 l).

Alhora d'analitzar l'evolució de l'activitat lipolítica al llarg dels diferents cultius (figura 7.5A), s'observa una clara disminució d'aquest paràmetre, al realitzar el cultiu a 50 l. Aquest presenta una disminució de l'activitat lipolítica màxima obtinguda de 2.3 vegades (taula 7.5), en relació als resultats obtinguts a les mateixes condicions a escala laboratori. Cal destacar que a escala pilot, es registra una etapa de latència abans no s'obtenen les primeres unitats d'activitat lipolítica de gairebé 10 h, no registrada en els cultius de 5 l. Si es recorden els resultats obtinguts en el *Capítol 5*, es pot observar que

els valors obtinguts de producte recombinats a l'escala de 50 l són similars als obtinguts a l'escala laboratori quan la consigna de metanol era de 0.5 g l<sup>-1</sup>. Per tant, tot i que en el cultiu a 50 l la consigna de metanol és de 2 g l<sup>-1</sup>, els resultats obtinguts s'apropen als valors obtinguts quan la consigna de metanol era de 0.5 g l<sup>-1</sup> a escala de 5 l.

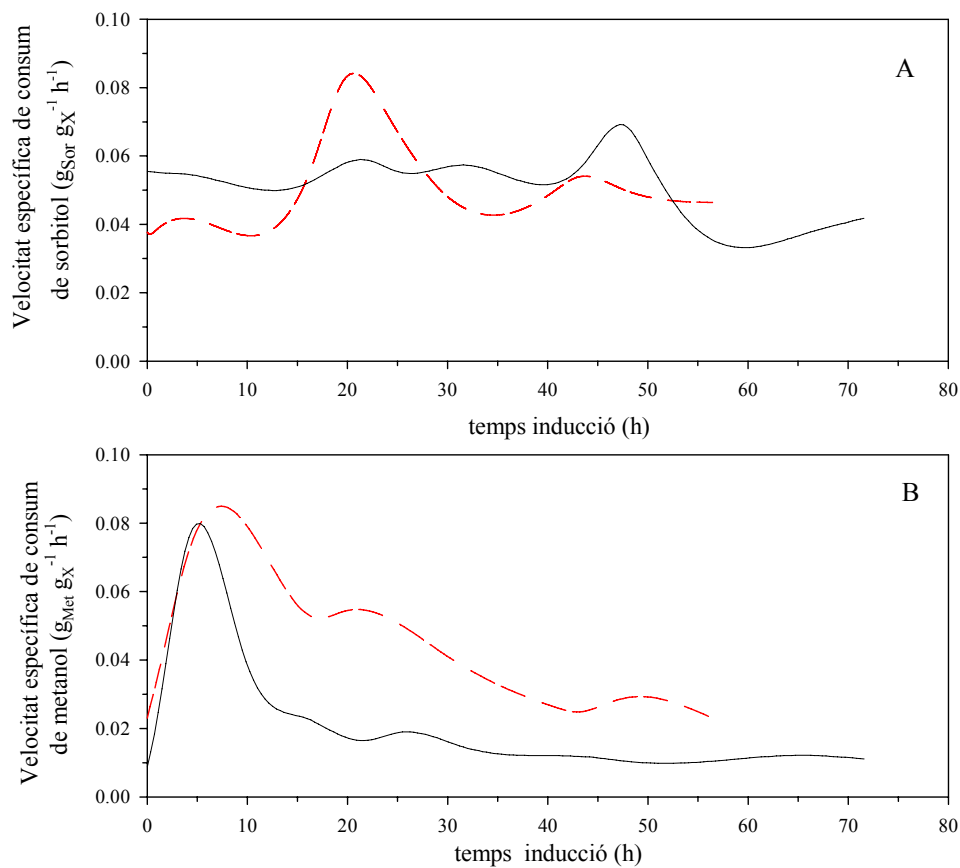
Fent referència a l'evolució de la  $q_p$  (figura 7.5 B), quan el volum de cultiu va ser de 5 l, la  $q_p$  mitjana va ser 3.1 vegades superior que al treballar a l'escala pilot (taula 7.5). Cal destacar, que el cultiu a escala pilot, va presentar una aturada significativa entre les 30 i 40 h d'inducció. Tot i així si, es comparen els valors màxims registrats de  $q_p$ , a l'escala de 5 l s'obté un valor 2.2 vegades superior. Durant ambdós fermentacions els valors de  $q_p$  s'igualen durant les últimes hores de cultiu. Cal destacar, que el cultiu a 5 l presenta una clara disminució d'aquest valors durant les últimes hores de cultiu.

A la taula 7.5, es poden comparar el principals paràmetres de producció. Fent referència a la productivitat volumètrica i l'específica, presenten valors al voltant de 2.8 vegades inferiors, al comparar els cultiu realitzats a les diferents escales. Finalment el  $Y_{X/P}$  és 2.3 vegades inferior.

**Taula 7.5:** Comparació dels paràmetres de producció de ROL sota el control del promotor AOX de *Pichia pastoris* en les dues escales de treball. BB5L2 indica: Braun Biostat a 5 l a  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup>. PPF2 indica: Planta Pilot Fermentació a de 0.02 h<sup>-1</sup>.

Nom	BB5L2	PPF2
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.02	0.02
Set-point metanol (g l <sup>-1</sup> )	2.0	2.0
Volum reactor (l)	5	50
Activitat lipolítica max. (UA ml <sup>-1</sup> )	487.5	213.2
$Y_{P/X}$ (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	10369.1	4611.7
Productivitat volumètrica (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	6345.6	2268.1
Productivitat específica (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	135.0	49.3
$q_{p_{max}}$ (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	451.4	201.0
$q_{p_{mig}}$ (UA g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	326.1	104.0
$q_{S_{Met\ mig}}$ (g <sub>M</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.045	0.020
$q_{S_{Sorb\ mig}}$ (g <sub>S</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.052	0.05

La  $q_{sMet}$  mitjana durant la fase d'inducció (figura 7.6 B) a l'escala pilot, és 2.3 vegades inferior al valor obtingut al cultiu a escala laboratori (taula 7.5). També es pot observar que en ambdós fermentacions, presenten un màxim durant les primeres hores de cultiu, el qual disminueix de forma més severa al cultiu de la planta pilot. Cal remarcar, que la  $q_{sMet}$  mitja al cultiu realitzat a la planta pilot, és també 1.5 vegades inferior al valor obtingut quan la consigna de metanol era de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  (escala 5 l). Tenint present la importància del consum del substrat inductor en referència a la producció de ROL, aquest fet explicaria la disminució dels valors relacionats amb la producció del producte d'interès. Cal destacar, que Surribas (2008) també trobava  $q_{sMet}$  inferiors al realitzar els cultius a l'escala pilot.



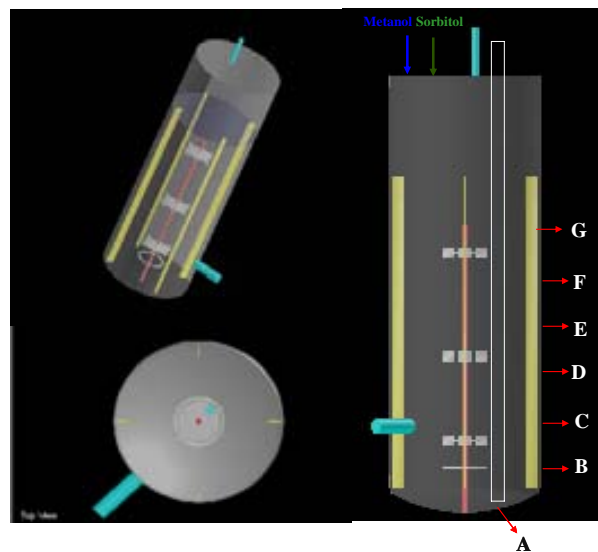
**Figura 7.6:** Evolució de les velocitats específiques de consum de sorbitol (A) i metanol (B) pels diferents cultius, emprant la mateixa estratègia de cultiu. Els símbols corresponen a les diferents condicions. (---):  $\mu$  de  $0.02h^{-1}$  i  $2 \text{ g l}^{-1}$  de metanol a 5 l (BB5L2); (—):  $\mu$  de  $0.02h^{-1}$  i  $2 \text{ g l}^{-1}$  de metanol a la planta pilot (PPF2).

Referent a la diferència del consum de metanol registrat en ambdós escales de treball, i el conseqüent efecte sobre la producció del producte recombinant d'interès, es planteja avaluar la dispersió dels substrats en l'interior del reactor UD50, per tal de trobar, si és que es dona, l'efecte del gradient en les concertacions dels substrats a l'interior del reactor. Larsson *et al.*, (1996), troben gradients de concentració de glucosa al llarg de les diferents alçades del reactor, i aquest varia en funció de la localització del cabal d'entrada, en reactors de 30 m<sup>3</sup>. Així com aquest autors troben que la glucosa presenta un gradient en el reactor, en aquest cas, es pensa que el sorbitol no presentarà dispersió, ja que el consum d'aquest substrat és molt similar en ambdós escales de treball. També cal destacar que la diferència de volums de treball entre Larsson *et al.*, (1996) i el treball que aquí és presenta és considerablement més petit. D'altra banda, com s'ha comentat anteriorment, el consum de metanol presenta diferències significatives, el que ens porta a pensar que la dispersió d'aquest substrat no sigui la mateixa que presenta el sorbitol, degut a les seves característiques fisicoquímiques (menys soluble en aigua, volàtil, etc) (Guo *et al.*, 2003).

Alhora, també va poder afectar l'agitació utilitzada (320 rpm), la qual potser no proporcionava el suficient grau de mescla per a homogeneïtzar el medi de cultiu perfectament. Per tant, es valora la realització d'un estudi de la distribució dels substrats a l'interior del reactor.

### 7.4.5 Distribució vertical del metanol en el reactor UD50

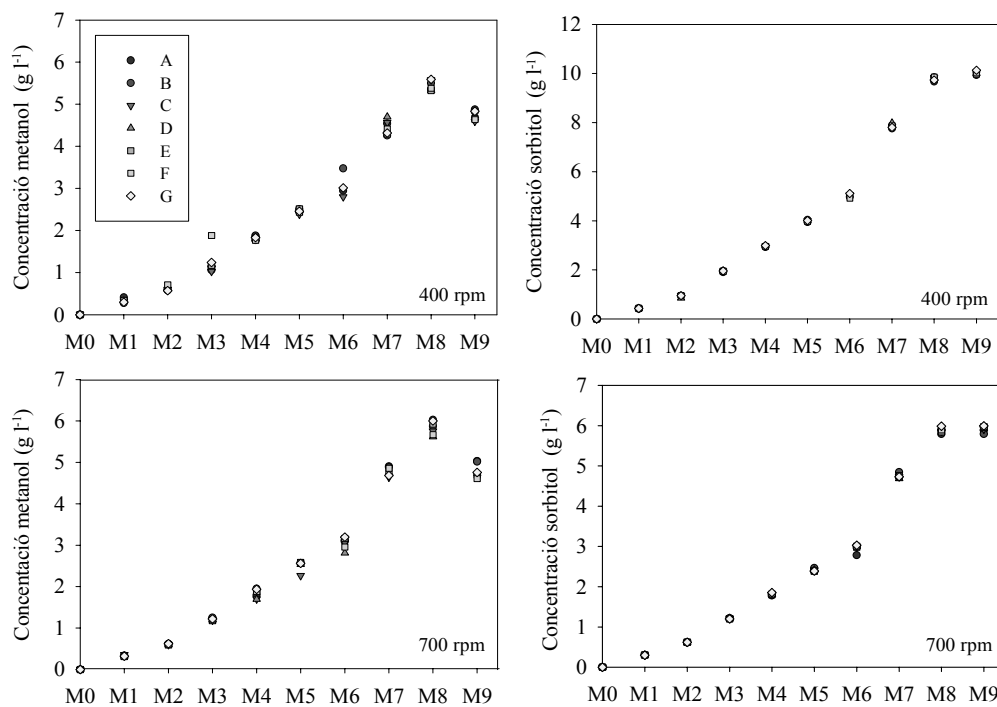
Per tal d'avaluar la dispersió dels substrats al llarg del reactor UD50, es realitza un experiment on s'addicionen els substrats per la part superior del bioreactor, i s'extreuen mostres a les diferents alçades (A, B, C, D, E, F i G) tal i com mostra la figura 7.8 mitjançant l'ús d'una cànula mòbil.



**Figura 7.8:** Punts de presa de mostra del reactor B.Braun UD-50 al llarg de les diferents alçades amb un volum de treball de 50 l. Programa utilitzat per generar la imatge: MixSim 2.0 (Fluent Inc., Lebanon, USA)

Es realitzarà per dos valors de volum inicial, 30 i 50 l, ja que durant el cultiu el volum inicial és de 30 l arribant a un màxim al voltant dels 58 l al final de l'inducció, depenent de les condicions de treball utilitzades. És convenient realitzar la prova als diferents volums, ja que quan el volum és de 30 l, es troben submergides dues de les tres turbines disponibles, i no serà fins als 42 l que la tercera turbina quedarà submergida. En ambdós casos, s'omple el reactor fins al volum escollit de líquid. Per la part superior del reactor es duren a terme les addicions de sorbitol i metanol a concentracions conegudes. La temperatura de treball és de 30°C, la velocitat d'agitació és de 400 i 700 rpm i l'aireació correspon a 1 vvm. Com a fluid de treball s'utilitza medi de cultiu (invitrogen), on el pH s'ajusta a 5.5 mitjançant l'addició de KOH (5M). Un cop són addicionats els dos substrats per la part superior del reactor, després de 4 minuts es realitza la presa de mostra a les diferents alçades.

Es realitzen addicions progressives d'ambdós substrats i la figura 7.9 mostra l'evolució d'aquests substrats al llarg de l'alçada del reactor. S'observen diferències entre la utilització dels substrats, presentant diferents gradients pel metanol (figura 7.9 A i C) i pel sorbitol (figura 7.9 B i D). El sorbitol presenta un gradient màxim aproximat de  $\pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$  i el metanol presenta un gradient màxim aproximat de  $\pm 0.3 \text{ g l}^{-1}$ . Cal destacar que en el cas del metanol el gradient augmenta a mesura que s'augmenta la concentració d'aquest.



**Figura 7.9:** Distribució de les concentracions de sorbitol i metanol a les diferents alçades del reactor UD50 variant la velocitat d'agitació utilitzant com a fluid el medi utilitzat en els cultius. A i B: experiment realitzat a 400 rpm. C i D: experiment realitzat a 700 rpm. El temps entre les diferents mostres és de 4 minuts, exceptuant la última mostra, la qual es presa després de 16 h. El volum utilitzat és de 50 l.

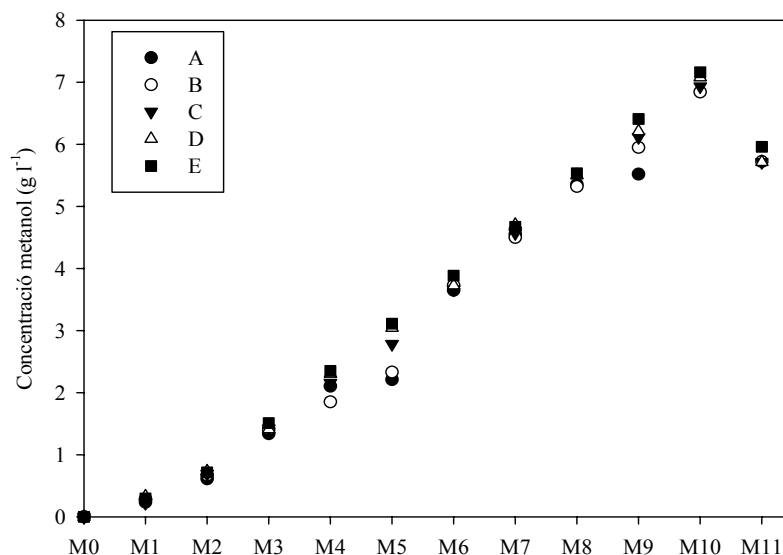
El temps transcorregut entre mostra és aproximadament de 4 minuts, però entre la mostra 8 i 9, no es va addicionar substrat i el temps va ser de 16 h. Així que, en les figures 7.9 A i C es pot observar que entre la mostra 8 i la mostra 9, existeix una disminució de la concentració de metanol, degut a l'efecte de la pèrdua d'aquest compost per arrossegament (*stripping*) a la sortida del reactor. Tot i que el sistema

presenta un condensador dimensionat, en el que hi circula aigua de xarxa (depenent època de l'any entre 10-24°C), la volatilitat d'aquest compost requerirà la utilització d'un fluid refrigerant, i així minimitzar la pèrdua del metanol per la línia de sortida del fermentador. En el cas del sorbitol, no s'observa un augment del gradient a mesura que augmenten la concentració, i tampoc s'observa una pèrdua d'aquest compost després de 16 h.

Fent referència a la velocitat d'agitació, en quan al sorbitol, no existeixen diferències significatives entre les dues velocitats utilitzades presentant un gradient màxim de  $\pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$ , independentment de l'agitació. D'altra banda, amb el metanol, el gradient màxim és de  $\pm 0.3 \text{ g l}^{-1}$  quan l'agitació és de 400 rpm i correspon a  $\pm 0.16 \text{ g l}^{-1}$  quan l'agitació és de 700 rpm. Per tant, es prendrà com a velocitat mínima d'agitació 500 rpm, per tal de no forçar el motor del rotor i garantir una bona mescla.

Aquesta mateixa prova es realitza a un volum de 30 l, el qual correspondrà al volum inicial de les fermentacions dutes a terme. Aquesta prova es realitza amb medi Invitrogen ajustat a pH 5.5, i únicament es realitza amb el metanol, ja que prèviament es determina que el sorbitol no presenta problemes de gradient en el reactor.

La figura 7.10 mostra que al treballar a 30 l el valor màxim de gradient registrat augmenta a  $\pm 0.41 \text{ g l}^{-1}$ . Per tant, al treballar amb dos impulsors, el factor de mescla disminueix front a treballar amb tres, tot i que el volum disposat és menor. La tendència és similar a la trobada anteriorment, ja que a l'augmentar la concentració de metanol, augmenta el gradient d'aquest, a les diferents alçades. Es presenta novament entre les dues últimes mostres (no hi ha addició de substrat i el temps transcorregut és de 16h), la 10 i 11, el problema de la *stripping* del metanol, disminuint la concentració d'aquest en  $1.23 \text{ g l}^{-1}$ .



**Figura 7.10:** Distribució de la concentració de metanol en les diferents alçades del reactor UD50 utilitzant medi de cultiu a un volum de treball 30 l. Experiment realitzat a 500 rpm. El temps entre les diferents mostres és de 4 minuts, exceptuant la última mostra, la qual es presa després de 16 h.

Davant dels resultats trobats després d'analitzar les concentracions dels substrats al llarg del reactor, s'observa que el gradient màxim obtingut correspon a  $\pm 0.41 \text{ g l}^{-1}$  referent al metanol. Tot i així, cal destacar que els experiments es porten a terme amb medi de cultiu, sense presència de biomassa. La presència d'aquesta pot afectar de forma significativa la dispersió dels elements. Altres autors com Douaire *et al.*, (2009), destaquen que a l'afegir els substrats per la part superior del reactor i l'aire per la part inferior, s'està contribuint a obtenir una barreja imperfecta, provocant concentracions baixes d'oxigen i altes de substrat a la part superior dels reactors, i tenint altes concentracions d'oxigen i baixes concentracions de substrat a la part inferior del reactor. Així, tal i com comenten Larsson *et al.*, (1996), és important el punt d'addició dels substrats, ja que aquest pot afectar negativament o positivament a la posterior mescla.

Al experiment previ realitzat, l'addició dels substrats es realitza pel capçal del reactor, el que sembla no presentar problemes pel sorbitol, però pot representar-ne algun pel metanol (detecció de consum irregular). Així que es decideix realitzar un nou cultiu, addicionant el metanol de forma submergida, en l'espai intermedi entre la primera i la segona pala, on la mescla serà favorable, tal i com recomanen Larsson *et al.*, (1996).

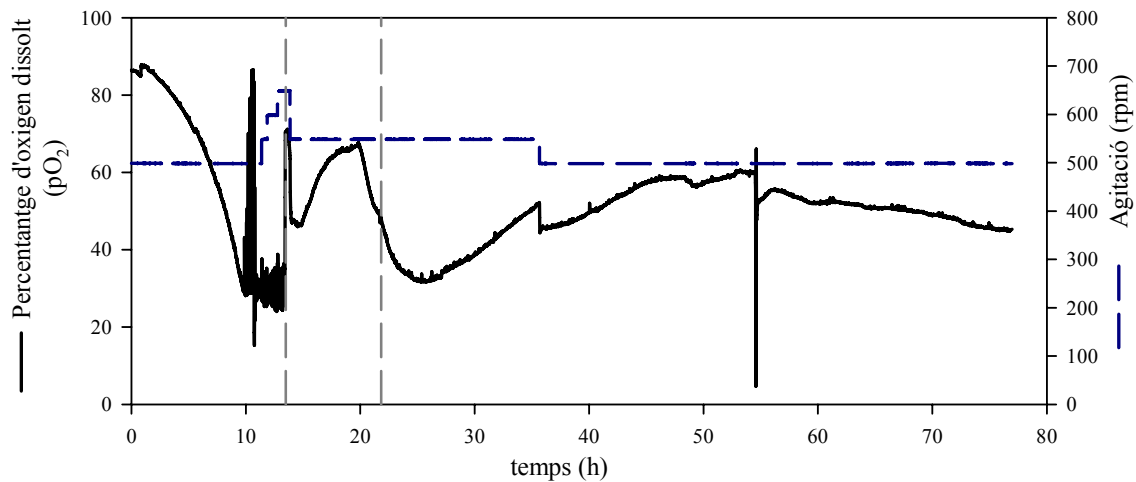


Per tant, all proper cultiu (PPF1), el metanol s'addiciona mitjançant una cànula submergida, i l'agitació es manté a un mínim de 500 rpm, per comprovar si aquestes variables presenten alguna afectació sobre el consum de metanol.

#### **7.4.6 Resultats del cultiu a escala pilot addicionant el metanol mitjançant una cànula a la meitat del reactor.**

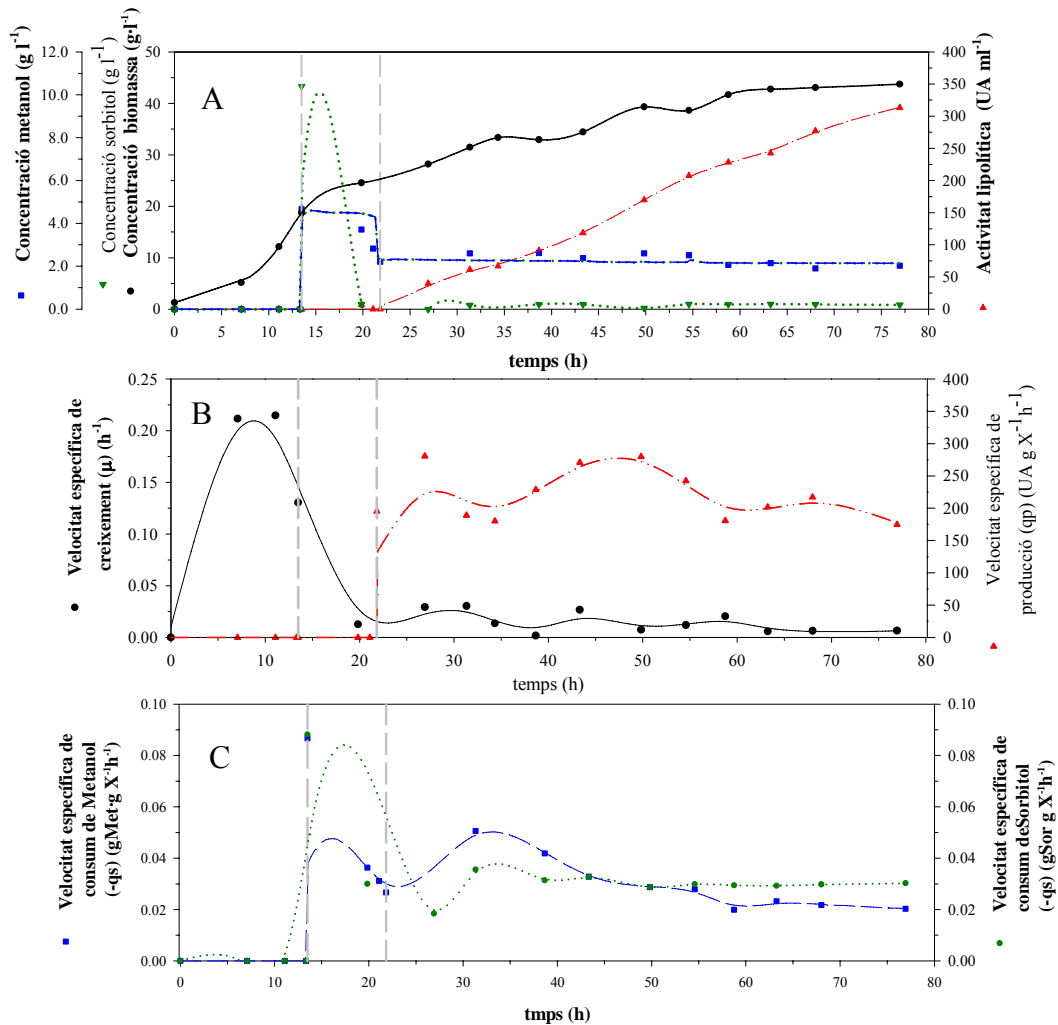
Es realitza un cultiu on el metanol serà addicionat entre la primera i la segona pala mitjançant l'ús d'una cànula. Prèviament es realitzen proves amb la microbureta (Crison, Alella, Espanya.), per tal de que aquesta pugui vèncer la pressió del volum del líquid. Un cop comprovat que la microbureta pot afegir el volum desitjat es realitza el cultiu, mantenint la mateixa estratègia que en el cultiu anterior, exceptuant la metodologia d'addició del metanol. També es decideix disminuir la  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , ja que com s'ha pogut veure al *Capítol 5*, la influència de la  $\mu$  no produeix grans diferències en quan al producte recombinat d'interès produït. D'altra banda, la disminució de la  $\mu$  permetrà dur a terme un cultiu més econòmic, i evitarà la possible acumulació d'aquest al medi de cultiu.

El cultiu no presenta problemes operacionals, tal i com es pot observar a la figura 7.11. El  $pO_2$  es manté durant tot el cultiu sobre el 30%, sense requeriments d'enriquir el cabal d'entrada amb oxigen pur, únicament augmentant la velocitat d'agitació, en el cas de registrar-se una disminució d'aquest. Durant la fase discontinua de glicerol, es manté una agitació fixa corresponent a 500 rpm, exceptuant les últimes 3 h, on es va iniciar un control en cascada amb l'agitació, mantenint la consigna de  $pO_2$  al 30 %. Al finalitzar el discontinu de glicerol, es torna a fixar l'agitació en 550 rpm, i s'acaba disminuint a 500 rpm al veure que el  $pO_2$  es manté per sobre del 30 % sense dificultats. La resta de variables controlades en línia és mantenien a les consignes seleccionades.



**Figura 7.11:** Evolució del percentatge d'oxigen dissolt i de l'agitació al llarg del cultiu. Les línies discontinues verticals indiquen el començament i final de l'etapa de transició.

La figura 7.12 mostra el comportament dels principals paràmetres durant el cultiu. La concentració de biomassa final registrada correspon a  $43.71 \text{ g l}^{-1}$ . Durant les últimes 20 h d'inducció, es registra una disminució de la  $\mu$ , la qual pren un valor mitjà de  $0.013 \text{ h}^{-1}$  durant tota la fase d'inducció. Tot i registrar-se aquesta disminució, el sorbitol es manté limitant durant tot el cultiu, no presentant acumulacions superiors a  $0.23 \text{ g l}^{-1}$ . La concentració de metanol es manté a  $2 \text{ g l}^{-1}$  durant tot el cultiu, mitjançant el control aplicat prèviament comentant (Cos *et al.*, 2006). L'activitat lipolítica presenta un augment progressiu durant tot el cultiu. La  $q_p$  es manté gairebé tot el cultiu al voltant de  $218.4 \text{ UA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , presentant una lleugera disminució durant els últimes hores de cultiu (figura 7.12 B). Referent al consum de substrats (figura 7.12 C), la  $q_{s\text{Sor}}$  es manté constant durant tota la fase d'inducció i la  $q_{s\text{Met}}$  presenta un màxim a les 30 h de cultiu, per posteriorment registrar una lleugera disminució, estabilitzant el seu valor a  $0.02 \text{ g}_{\text{Met}} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$  durant les últimes hores del cultiu.



**Figura 7. 12:** Seguiment dels principals paràmetres de cultiu per a la producció de ROL mitjançant la soca Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* a una escala de 50 l afegint el metanol a partir d'una cànula submergida; (A): Evolució de la biomassa (●), concentració de metanol (■), sorbitol (▼), i activitat lipolítica (▲). (B): Evolució de la velocitat específica de creixement (●) i producció de ROL (▲) al llarg del cultiu. (C): Evolució de la velocitat específica de consum de metanol (■) i velocitat específica de consum de sorbitol (●) al llarg del cultiu. Les línies discontinues verticals indiquen el començament i final de l'etapa de transició.

És important comparar els resultats obtinguts amb els resultats del cultiu realitzat a escala laboratori. La taula 7.6 mostra que els valors obtinguts en PPF1 són inferiors als obtinguts en BB5L1. La productivitat volumètrica i específica són 1.6 vegades inferiors i  $Y_{P/X}$  i l'activitat lipolítica màxima obtinguda són 1.9 vegades inferiors.

**Taula 7.6:** Comparació dels paràmetres de producció de ROL sota el control del promotor *AOX* de *Pichia pastoris* mitjançant substrats mixtes utilitzant diferents estratègies d'addició de metanol. BB5L1 indica: Braun Biostat 5 L a  $\mu$  0.01 h<sup>-1</sup> i PPF1 indica: Planta Pilot Fermentació a  $\mu$  0.01 h<sup>-1</sup> (addició metanol submergida).

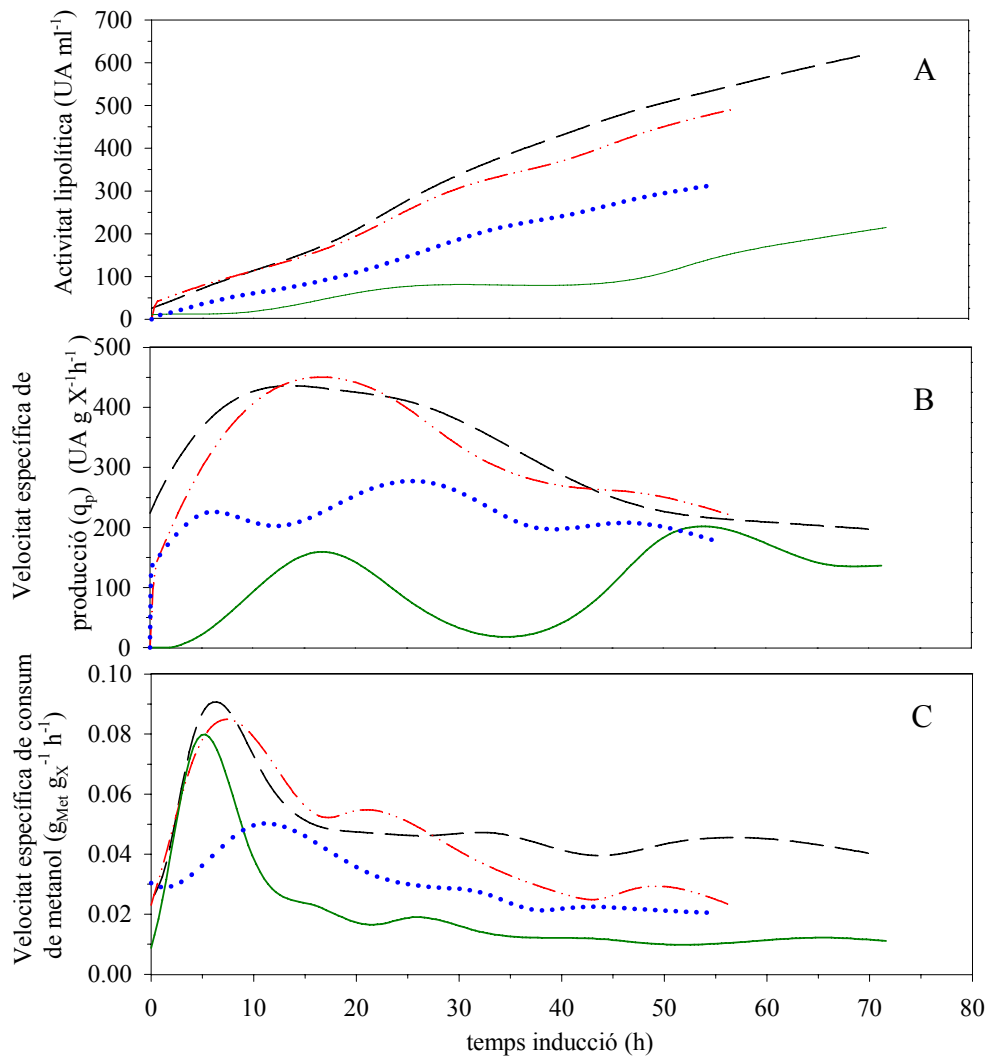
<b>Nom cultiu</b>	<b>BB5L1</b>	<b>PPF1</b>
<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>Set-point metanol (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>2.0</b>	<b>2.0</b>
<b>Addició metanol</b>	<b>capçal</b>	<b>submergit</b>
Volum reactor (l)	5	50
Activitat lipolítica màx. (UA ml <sup>-1</sup> )	621.2	313.3
$Y_{p/x}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	13688.8	7167.8
Productivitat volumètrica (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	6623.6	4071.5
Productivitat específica (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	146.0	93.2
$q_{p_{max}}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	433.0	277.2
$q_{p_{mitjà}}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	306.3	218.4
$q_{S_{Met\ mitjà}}$ (g <sub>M</sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.049	0.031
$q_{S_{Sorb\ mitjà}}$ (g <sub>S</sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.025	0.030

Al comparar el consum de sorbitol, es pot observar que presenten valors de consum similars. D'altra banda, a l'observar el metanol, es troben diferències significatives. La  $q_{S_{Met}}$  mitjana és 1.6 vegades inferior al cultiu PPF1. Aquesta disminució explicaria la disminució dels paràmetres de producció.

#### **7.4.7 Comparació dels resultats obtinguts entre els cultius realitzats a la PPF i a escala laboratori (BB5L)**

Posteriorment es compararan els cultius realitzats a la planta pilot (PPF) amb els cultius realitzats a escala laboratori (BB5L). Al comparar els dos cultius realitzats a la planta pilot, s'observa que l'activitat lipolítica en PPF1 presenta valors superiors durant tot el cultiu, obtenint un valor d'activitat lipolítica màxima 1.5 vegades superior a la registrada en PPF2 (figura 7.13 A). Tanmateix, la  $q_p$  presenta una tendència superior en PPF1 durant tota la fase d'inducció, no manifestant la disminució observada en PPF2

entre les 30 i 40 h d'inducció (figura 7.13 B). El cultiu PPF1 presenta un valor mig de  $q_p$  2.1 vegades superior a l'obtingut al cultiu PPF2 (taula 7.7). La figura 7.13 C mostra que la  $q_{sMet}$  en PPF1, exceptuant les primeres hores d'inducció, és superior a PPF2, presentant un valor de  $q_{sMet}$  mig 1.6 vegades superior (0.031 *versus* 0.020  $g_{Met} g_X^{-1} h^{-1}$ ).



**Figura 7.13:** Evolució dels diferents paràmetres durant els cultius realitzats a la planta pilot i escala laboratori per a la producció de ROL mitjançant la soca Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* mitjançant l'addició del metanol pel capçal del reactor (-) (PPF2); mitjançant l'addició del metanol a partir d'una cànula submergida (.....) (PPF1); BB5L1 (- -) i BB5L2 (-.-.).

(A): Activitat lipolítica, (B): Velocitat específica de producció de ROL; (C): Velocitat específica de consum de metanol.; durant l'etapa d'inducció.

La taula 7.7 mostra els valors dels paràmetres de producció més representatius per les fermentacions realitzades a escala laboratori i escala pilot. La productivitat

específica de PPF1 és 1.9 vegades superior a la obtinguda en PPF2, i  $Y_{p/x}$  també és 1.55 vegades superior en PPF1. Aquests dos paràmetres són els més representatius a comparar, ja que es té present la biomassa obtinguda durant el cultiu, tenint present que creixien a diferents velocitats específiques de creixement.

D'altra banda, si es comparen els cultius realitzats a diferents escales, però a les mateixes condicions, es pot veure que entre els cultius BB5L2 i PPF2, es registren pèrdues al voltant 2.8 vegades de productivitat volumètrica i específica. Alhora, al comparar els cultius BB5L1 i PPF1, els valors es troben al voltant de 1.6 vegades inferiors de productivitat específica i volumètrica. Pel que fa al  $Y_{p/x}$ , en PPF2 es registren valors 2.3 vegades inferiors, i en PPF1 es registre valors 1.9 vegades inferiors.

Tot i que les pèrdues registrades en l'activitat lipolítica màxima obtinguda són similars (al voltant de 2 vegades) al comparar la  $q_p$  mitja, es pot veure que entre els cultius BB5L2 i PPF2, els valors són 3.2 vegades inferiors, i per contra al comparar els cultius BB5L1 i PPF1, els valors són 1.4 vegades inferiors.

**Taula 7.7:** Comparació dels paràmetres de producció de ROL sota el control del promotor AOX de *Pichia pastoris* mitjançant substrats mixtes utilitzant diferents estratègies d'addició de metanol.

Nom cultiu	BB5L2	PPF2	BB5L1	PPF1
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.02	0.02	0.01	0.01
Set-point metanol (g l <sup>-1</sup> )	2.0	2.0	2.0	2.0
Addició metanol	capçal	capçal	capçal	submergit
Volum reactor (l)	5	50	5	50
Activitat lipolítica màx. (UA ml <sup>-1</sup> )	487.5	213.2	621.2	313.3
$q_{p\text{màxima}}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	451.4	201.0	433.0	277.2
$q_{p\text{mitja}}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	326.1	104.0	306.3	218.4
$Y_{p/x}$ (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	10369.1	4611.7	13688.8	7167.8
Productivitat volumètrica (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	6345.6	2268.1	6623.6	4071.5
Productivitat específica (UA g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	135.0	49.3	146.0	93.2

Tot i que es parla de pèrdues, al comparar els resultats obtinguts amb els de Surribas (2008), on va ser utilitzat el fenotip Mut<sup>+</sup> mitjançant l'addició de metanol com a única font de carboni, es pot observar que el procediment de canvi d'escala realitzat en aquest treball és més eficient, reduint considerablement les pèrdues obtingudes del producte recombinant d'interès. Surribas (2008) presenta una disminució del 77% de l'activitat lipolítica registrada en ambdós escales, i en aquest treball la disminució obtinguda correspon al 50% (taula 7.8). Alhora la disminució obtinguda per Surribas (2008) de la productivitat correspon al 77% i en aquest treball correspon al 38%, i finalment Surribas (2008) registra una disminució del 61% en la  $qp_{\max}$  i en aquest treball la disminució obtinguda correspon al 36%.

**Taula 7.8:** Comparació de les pèrdues obtingudes entre els cultius a escala laboratori i els cultius a escala pilot per les fermentacions realitzades, utilitzant el fenotip Mut<sup>+</sup> (Surribas, 2008) i Mut<sup>s</sup> per a la producció de ROL (BB5L1 i PPF1).

Fenotip	Mut <sup>+</sup>	Mut <sup>s</sup>
Font de carboni inducció	Metanol	Sorbitol i metanol
Consigna metanol (g l <sup>-1</sup> )	2.5	2.0
Factor canvi d'escala	10	
Màx. activitat lip. (UA ml <sup>-1</sup> )	Pèrdua del 77 %	Pèrdua del 50 %
Productivitat (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Pèrdua del 38 %
$qp_{\max}$ (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Pèrdua del 61 %	Pèrdua del 36 %

Per tant, cal destacar que tot i que encara es parli de pèrdues sobre producte d'interès recombinat, al canviar el sistema d'addició de metanol, es redueixen considerablement les pèrdues, sobretot pels valors de productivitat volumètrica i específica. Per tant, es té una primera evidència de que el sistema d'addició de metanol és un paràmetre important a tenir en compte, ja que afecta directament sobre la producció del procés.

Serà convenient realitzar posteriors estudis sobre de com pot afectar l'addició del metanol al llarg de les diferents alçades del reactor, així com crear una addició multi-alçada, que cobreixi gran part de la llargada del bioreactor o bé per la part inferior, per tal de garantir una mescla completa en el reactor. Ja que, tot i haver millorat els valors

obtinguts entre les diferents fermentacions (PPF1 i PPF2), cal seguir investigant per arribar a obtenir els valors obtinguts a les fermentacions de referència (BB5L).



## 7.5 CONCLUSIONS

En aquest capítol es realitza el procediment de canvi d'escala per la producció de ROL mitjançant l'ús del fenotip Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris*, i s'extreuen les següents conclusions:

- El sistema d'addició del metanol representa a un paràmetre clau per la producció de ROL, ja que l'addició del metanol de forma submergida permet augmentar un 48% els valors de productivitat específica obtinguts quan el metanol és afegit pel capçal del reactor.
- Si es realitza la comparació dels diferents fenotips (Mut<sup>+</sup> i Mut<sup>s</sup>), es troben resultats més satisfactoris en el procés de canvi d'escala per al fenotip Mut<sup>s</sup>. Aquest presenta valors de productivitat 3 vegades superiors així com menys problemes operacionals.
- Es requereix d'un posterior estudi, per avaluar com afecta el sistema d'addició del metanol, realitzant addicions a diferents alçades o bé per la part inferior del reactor, per tal d'estudiar la dispersió d'aquest substrat en el reactor, i veure quin efecte presenta sobre la producció. La realització d'una petita modificació mecànica, ha representant un augment del 48% en els valors de productivitat específica.



## 7.6 BIBLIOGRAFIA

Blanch H. i Clark D. Biochemical Engineering, Marcel Dekkar, New York. 1996. Capítol 5: 343-444.

Bylund F, Collet E, Enfors SO, Larsson G.. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases byproduct formation. Bioprocess Biosystems Eng. 1998;18(3):171–180.

Dalmau E. Memoria de tesi doctoral. Regulació fisiològica i criteris de canvi d'escala de la producció de lipases amb *Candida rugosa*. 1999. Universitat Autònoma de Barcelona

Douaire M, Morchain J, Liné A. Mini Review: relationship between hydrodynamic conditions and substrate influx toward cells.13th European Conference on Mixing, 2009.

Dunn IJ, Heinzle E, Ingham J, Prenosil JE. Biological reaction engineering. Second edition WILEY-VCH Verlag GmbH y Co.KGaA, Weinheim. 2003

Dux MP, Barent R, Sinha J, Gouthro M, Swanson T, Barthuli A, Inan M, Ross JT, Smith LA, Smith TJ, Webb R, Loveless B, Henderson I. Meagher MM. Purification and scale-up of a recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype E in *Pichia pastoris* GS115. Protein Expression and Purification. 2006;45:359-367.

Calik P, Yilgör P, Ayhan P, Demir AS. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. Chem Eng Sci. 2004;59:5075–5083.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. Biotechnol. Bioeng.2006;95:145-154.

Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger B, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HJ, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius A. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. J Biotechnol.2001;85:175–185.

Ferrer JF. Máster en biotecnología. Estudio de la transferencia de oxígeno en bioreactores utilizados para la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*. 2007. Universitat Autònoma de Barcelona.

Fujasova M, Linek V, Maucha T. Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phase on "local"  $K_L$  values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chem. Eng. Sci.* 2007;62:1650-1669.

Fyferling M, Uribelarrea J, Goma G, Molina-Jouve C. Oxygen transfer in intensive microbial culture. *Bioprocess Biosyst. Eng.* Oxygen transfer in intensive microbial culture. *Bioprocess Biosyst.* 2008;31: 595-604

Gaddis ES. Mass transfer in gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Process.* 1999;38:503-510.

Galaction AI, Cascaval D, Oniscu C, Turnea M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochem Eng J.* 2004;20:85-94

Garcia-Ochoa F. i Gomez E. Mass transfer coefficient in stirred tank reactor for xanthan gum solutions. *Biochem. Eng. J.* 1998;1:1-10.

Garcia F i Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv.* 2009, 27(2):153-176.

Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb Technol.* 2000;27:680-690.

Guo JH, Luo Y, Augustsson A, Kashtanov S, Rubensson JE, Shuh DK, Ågren H, Nordgren J. Molecular Structure of Alcohol-Water Mixtures. *Physical review letters.* 2003;91(15):1-4.

Guo MJ, Zhuang YP, Chu J, Zhang SL, Xiong AS, Peng RH, Yao QH. Production and purification of a novel thermoestable phytase by *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 2007; 42:1660-1665.

Hardy E, Martínez E, Diago D, Díaz R, González D, Herrera L. Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2000;77:157-167.

Johnson SK, Zhang W, Smith LA, Hywood-Potter KJ., Todd Swanson S, Schlegel VL, Meagher MM. Scale-up of the fermentation and purification of the recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* 2003;32:1-9.

Ju LK, Sundararajan A. The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors. *Bioprocess Eng.* 1995; 13:271-278.

Kong N, Mu X, Han H, Yan W. Pilot-scale fermentation, purification, and characterization of recombinant human Oncostatin M in *Pichia pastoris*. Protein expression and purification. 2009;63(2):134-139.

Larsson G, Törnkvist M, Wernersson ES, Trägård C, Noorman H, Enfors SO. Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. Bioprocess Eng 1996;14:281–289

Liu YS, Wu JY, Ho Kp. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. Biochem Eng J. 2006;27:331–335.

Montes F, Catalán J, Galán M. Prediction of  $K_{La}$  in yeast broths. Process Biochem. 1999;34:549-555.

Nagata S. Mixing: Principles and Applications. Kodansha Ltd. Japan (1975).

Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM. Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, John Wiley & Sons, New Jersey (USA). 2004.

Pérez J, Montesinos J, Gòdia F. Gas-liquid mass transfer in an up-flow cocurrent packed-bed biofilm reactor. Biochem. Eng. J. 2006;31:188-196.

Perry RH, Green DW (1997) Chapter 14: Gas absorption and gas-liquid system design. In: Perry's Chemical Engineer's Handbook, 7<sup>th</sup> edn. New York: McGraw Hill.

Poughon L, Duchez D, Cornet J, Dussap C.  $kLa$  determination: comparative study for a gas mass balance method. Bioproc. Biosyst. Eng. 2003;25:341-348.

Schmidt FR.. Optimization and scale-up of industrial fermentation processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005;68:425-435.

Shuler M, i Kargi F. Bioprocess engineering: basic concepts. Second Edition, Prentice Hall, United States of America. 2002. Part 3: chapters: 9-16.

Solà C. i Gòdia F. Scale-up. In: Bioreactor System Design. Ed. By Asenjo JA & Merchuk JC. pp. 511-552. Marcel Dekker, Inc. New York (USA). 1994.

Surribas, A. Memòria de tesi doctoral. Millores en el sistema de producció d'una lipasa de *Rhizopus oryzae* en *Pichia pastoris* mitjançant tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu alternatives. 2008. Universitat Autònoma de Barcelona.

Thorpe, E. D., d'Anjou, M. C. i Daugulis, A. J. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. 1999;21:669-672.

Van't Riet K. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 1979;3:357- 364.

Zhao W, Wang J, Deng R. Wang X . Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008;35:189-195.

# Capítol 8:

## **Efecte de la coexpressió del gen HAC 1 de *Pichia pastoris* sobre la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup>**

---

Aquest capítol es troba en preparació per publicar-se:

Hörmann A, **Arнау C**, Adelantado N, Rodriguez S, Ferrer P, Valero F. Effect of the coexpression of the *HAC 1* gene for the ROL production by fenotype Mut<sup>s</sup> of *Pichia pastoris* using mixed substrates. J. Biotechnol.





## 8 Efecte de la coexpressió del gen *HAC1* de *Pichia pastoris* sobre la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup>

### 8.1 RESUM

En aquest treball es compara l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* per a la producció de ROL en *P. pastoris* utilitzant una estratègia de substrats mixtes. Els cultius es duen a terme a les condicions prèviament optimitzades al capítol 5 d'aquest document (metanol fixat a  $2 \text{ g l}^{-1}$  i  $\mu$  a  $0.01 \text{ h}^{-1}$ ).

Inicialment s'estudia l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* de forma induïble en comparació amb els cultius realitzats sota les mateixes condicions sense coexpressar-se el gen. S'observa que l'activitat lipolítica màxima registrada i el  $Y_{P/X}$  augmenten 1.4 vegades, i alhora la productivitat tant volumètrica com específica milloren 1.5 vegades. En aquest cas, és important destacar que la  $q_{s\text{Met}}$  mitjana obtinguda és 1.2 vegades inferior, a la registrada quan el gen *HAC1* no era coexpressat. Per tant, l'augment de la  $q_{s\text{Met}}$  no es tradueix a un augment en la productivitat del procés, sent un altre avantatge important a valorar, degut a la problemàtica d'emmagatzemar grans quantitats de metanol als laboratoris de treball. D'altra banda, la  $q_{s\text{Sor}}$  es manté pràcticament igual durant tota la fase d'inducció en ambdós cultius realitzats.

Posteriorment, s'estudia l'efecte de la coexpressió induïble del gen *HAC1* utilitzant el metanol com a única font de carboni durant la fase d'inducció, comparant els resultats obtinguts prèviament per Cos *et al.*, (2006). La realització del cultiu demostra que la coexpressió del gen *HAC1* no presenta avantatges, presentant valors inferiors en tots els paràmetres relacionats amb la producció. L'activitat lipolítica màxima obtinguda és 2.1 vegades inferior, i el  $Y_{P/X}$  i la productivitat volumètrica són 1.3 vegades inferiors. Cal destacar però que la  $q_p$  màxima obtinguda és 1.2 vegades superior al realitzar-se la coexpressió del gen *HAC1*, però aquesta disminueix ràpidament a les poques hores d'inducció obtenint una  $q_p$  mitjana 2 vegades inferior. Per tant, la realització del cultiu permet concloure, que a diferència dels resultats obtinguts utilitzant una estratègia amb substrats mixtes, la coexpressió del gen *HAC1* utilitzant el metanol com a única font de carboni a la fase d'inducció no presenta millores sobre la producció.

Finalment s'estudia l'efecte de la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* utilitzant una estratègia de substrats mixtes, avaluant així les possibles diferències manifestades segons el sistema d'expressió utilitzat. La realització d'aquest cultiu mostra que l'expressió constitutiva del gen *HAC1* no presenta millores sobre el procés de producció. S'obté un augment de la  $q_{sMet}$  durant les primeres hores d'inducció, en comparació amb la resta de cultiu realitzats, no representant un augment en la producció del procés. D'altra banda, cal destacar que a conseqüència de problemes operacionals és complicat extreure conclusions definitives, sent necessària la realització d'experiments per estudiar l'efecte de la coexpressió constitutiva del gen *HAC1*.

## 8.2 INTRODUCCIÓ

Actualment, un gran nombre de proteïnes són produïdes de manera recombinant utilitzant *P. pastoris* com a organisme d'expressió. La producció de proteïnes recombinants és una tecnologia crítica en la biotecnologia i en la investigació biomèdica. La sobre-expressió d'aquestes proteïnes pot afectar la maquinaria cel·lular, saturant-la i provocant un incorrecte plegament d'aquestes, conclouent en una pèrdua o aturada en la seva expressió. Per aquest motiu és necessari estudiar, comparar i millorar les diferents estratègies de producció amb aquest organisme (Zhang *et al.*, 2005). Aquesta optimització pot portar-se a terme des de dues perspectives diferents, la genètica i l'operacional.

Referent als factors genètics i fisiològics, n'hi ha molts que poden afectar la productivitat del sistema recombinant (Hohenblum *et al.*, 2004). Alguns possibles factors limitants observats inclouen la selecció de l'ús de codó, el nombre de còpies del gen integrades, els promotors i pèptid senyal utilitzats, el processament i plegament al reticle endoplasmàtic (ER) i Golgi, la secreció (en el cas que la proteïna sigui expressada extracel·lularment) i la possible proteòlisi de la proteïna un cop secretada.

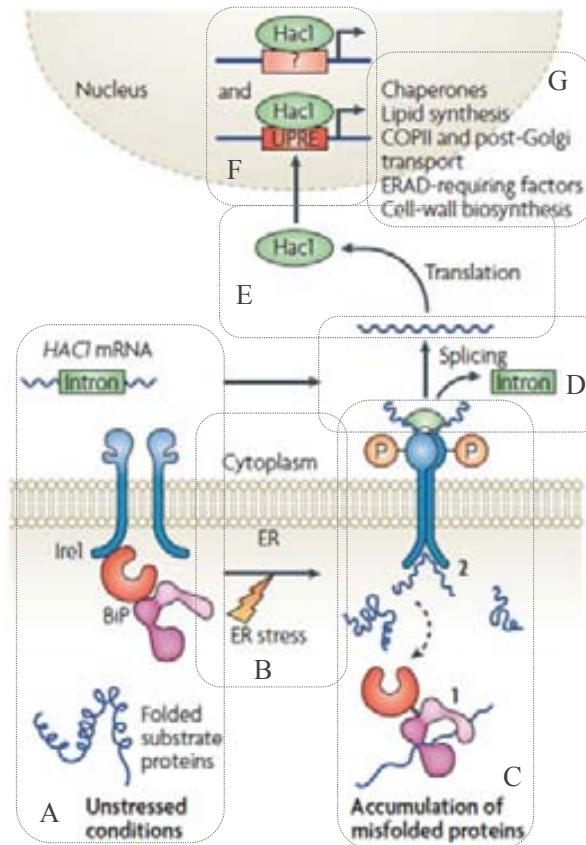
Per tal de minimitzar els factors limitants anteriors, s'han dut a terme tant estratègies de tipus genètic com operacional. En el cas concret de la proteòlisi, es coneix que les proteïnes recombinants secretades poden ser degradades en el medi de cultiu per proteases extracel·lulars o proteases intracel·lulars de cèl·lules lisades, provocant una reducció del rendiment de producte quan aquest és degradat; pèrdua d'activitat biològica quan és trencat, o bé contaminació del producte amb intermedis de degradació durant el procés de purificació (Cereghino i Cregg, 2000).

Una de les estratègies genètiques per a reduir-la, és la utilització de soques deficientes en proteases vacuolars o bé, mitjançant una estratègia operacional, addicionar suplementes rics en aminoàcids (Clare *et al.*, 1991) o l'aplicació d'estratègies de cultiu alternatives com disminució de la temperatura en la fase d'inducció (Jahic *et al.*, 2003) o l'ús de pH no òptim per a l'acció de les proteases. L'addició de complements rics en

aminoàcids o peptones pot resultar molt car o dificultar l'eficàcia del procés de recuperació i purificació del producte d'interès.

La viabilitat del cultiu, és un altre paràmetre important ja que si es presenten alts valors de mortalitat cel·lular poden presentar-se disminucions de la productivitat i problemes de lisi cel·lular. Aquest fenomen de lisi pot portar a la contaminació del producte extracel·lular d'interès per proteïnes intracel·lulars alliberades al medi de cultiu, i així la conseqüent davallada de l'eficiència de la purificació del producte. Així doncs, la viabilitat cel·lular i la proteòlisi del producte d'interès són dos efectes que es troben relacionats. La viabilitat del cultiu s'ha relacionat amb les situacions d'estrès a què poden estar sotmeses les cèl·lules. Mattanovich *et al.*, (2004) van dur a terme processos de producció utilitzant llevats i van dividir les situacions d'estrès provocat per la sobre-expressió de proteïna recombinant en dues categories: estrès metabòlic, que es dona quan la maquinària cel·lular es veu saturada degut a la sobreexpressió del producte d'interès i el qual desencadena la resposta de proteïna mal plegada o UPR (*Unfolding Protein Response*); i l'estrès ambiental, imposat per les condicions o l'estratègia del cultiu, com són la temperatura, el pH, l'estrès osmòtic i l'estrès oxidatiu. Aquestes situacions d'estrès poden comportar una reducció de la productivitat del cultiu i viabilitat cel·lular. Per aquest motiu és clau avaluar l'evolució de la viabilitat cel·lular durant el procés, especialment si es produeixen canvis causats per l'estratègia de cultiu.

Un cop sintetitzades les proteïnes, aquestes són enviades al reticle endoplasmàtic, on es realitza el seu plegament i posteriors modificacions post-traduccionals, com la glicosil·lació o la formació de ponts disulfur que permetran que la proteïna sigui funcional. Les proteïnes només abandonaran el reticle un cop la conformació sigui correcta, sent el pas de sortida de les proteïnes del reticle endoplasmàtic una de les limitacions que es presenten en la majoria de casos.



**Figura 8.1:** Esquema explicatiu de la resposta a situacions d'estres cel·lular. A: Condicions no estressants; B: situació d'estrés; C: la BiP identifica i s'uneix a les proteïnes mal plegades. Es dona la oligorització i autofosforilització; D: tallament del fragment de l'gen *HAC1* del mRNA; E: formació del *HAC1* funcional; F: Unió del *HAC1*a les zones UPR funcionals; G: Síntesis de xaperones, lípids específics, etc. com a resposta a la UPR.  
Font: Vembar i Brodsky (2008).

La presència de proteïna mal plegada en el reticle desencadena la resposta de proteïna mal plegada (UPR) i posterior degradació d'aquestes (ERAD: Endoplasmatic Reticulum-Associated Degradation) (figura 8.1 B). S'ha observat que la sobre-expressió de proteïna recombinant pot induir aquest tipus de resposta (Ron i Walter, 2007).

Quan la cèl·lula produeix elevades quantitats de proteïna, la maquinaria es satura, provocant la acumulació de proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic (figura 8.1 C). La seva presència és detectada per la proteïna transmembrana Ire1p, que fosforila el seu domini RNasa i el fa capaç de processar l'mRNA del gen *HAC1*, el qual generarà *HAC1*p funcional (figura 8.1 D i E). Aquesta entrarà al nucli, on induirà

l'expressió dels gens implicats en la UPR, que inclouen xaperones, síntesi de lípids, biosíntesi de paret cel·lular entre altres (figura 8.1 F i G) (McCracken i Brodsky, 2000)

La degradació de proteïnes mal plegades es dona quan aquestes es mantenen en la forma mal plegada prolongadament. La UPR desencadena la ERAD a través del marcatge de la proteïna amb residus d'ubiquitina un cop aquestes han estat transportades al citosol. La ubiquitinació permet al proteosoma reconèixer aquestes proteïnes i degradar-les.

Fent referència a treballs previs realitzats per Resina *et al.*, (2005), per a la producció de ROL en *P. pastoris*, utilitzen un sistema que no requereix la utilització del metanol per a la producció del producte d'interès. Aquests utilitzen el promotor del gen formaldehid deshidrogenasa (*FLD1*), pFLD1 que utilitza com a font de carboni el sorbitol, i com a font de nitrogen i agent inductor per la producció, la metilamina. Aquests autors realitzen diferents cultius emprant una estratègia en semicontinu utilitzant diferents velocitats específiques de creixement. Observen que la productivitat varia en funció de la  $\mu$  (major producció a  $\mu$  0.02 h<sup>-1</sup>), i en tots els casos observen l'acumulació de producte actiu a l'interior de la cèl·lula. Tot i que no detecten valors significants de degradació proteolítica, sí que detecten una important disminució en la secreció a l'espai extracel·lular del producte, al llarg del cultiu. Davant d'aquests resultats queda evident, que el sistema de síntesi i secreció del producte d'interès, pot ser una factor limitant en el procés de producció.

Continuant en aquest context de treball, Hohenblum *et al.*, (2004), observen que la sobre-expressió d'algunes proteïnes heteròlogues en *P. pastoris* provoquen l'acumulació de proteïnes no plegades en el reticle endoplasmàtic, causant l'activació de la UPR. Gasser *et al.*, (2006), avancen que la sobre-expressió constitutiva del factor de transcripció de la UPR, HAC1p de *S. cerevisiae* en *P. pastoris* proporciona un augment al voltant de 1.3 vegades, dels nivells de secreció de fragments d'anticossos recombinants. Tot i que, aquests autors, junt amb Mattanovich *et al.*, (2004), declaren que amb la sobre-expressió constitutiva del HAC1 i/o de proteïnes encarregades d'ajudar al plegament de les proteïnes (com la disulfat isomerasa (Pdi1) o xaperones BiP (binding protein) en llevats), l'efecte de l'expressió no pot ser predita, ja que depèn en gran part de les característiques de la proteïna sobreexpressada. D'altra banda cal

destacar, que seran necessaris majors estudis en aquest context, ja que existeixen pocs treballs que combinin diferents estratègies genètiques que minimitzin l'efecte de la UPR en la producció de proteïnes, amb utilització de diferents organismes hostes en condicions de producció.

Tot i així, existeixen treballs previs realitzats per Cos *et al.*, (2005), indicant que les soques de *P. pastoris* que contenen múltiples còpies del gen ROL expressat sota el promotor AOX1, presenten un creixement cel·lular deficient, probablement degut a l'estrès causat per la sobre-expressió de la ROL. Alhora estudis posteriors realitzats per Resina *et al.*, (2007), indiquen que la sobreexpressió de ROL en *P. pastoris* activa la UPR.

Posteriorment Resina *et al.*, (2009), davant les limitacions trobades en la producció de ROL en aquest context, realitzen la construcció d'una nova soca de *P. pastoris* expressant ROL extracel·lular sota el promotor FLD1, la qual inclourà la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* de *S. cerevisiae*. Els primers experiments que es realitzen en flascons agitats, mostren que la soca ROL-HAC1 millora al voltant de 1.2 vegades els nivells mitjans de l'expressió de ROL, en comparació amb la soca sense la inclusió del gen *HAC1*. En cultius realitzats en semicontinu mitjançant la utilització de sorbitol i metilamina, com a font de carboni i nitrogen, respectivament, a una  $\mu$  mitjana al voltant de  $0.005 \text{ h}^{-1}$ , la soca ROL-HAC1 obté valors gairebé dues vegades superiors tant en l'activitat lipolítica màxima obtinguda com en la productivitat. I alhora, obtenen valors gairebé 3 vegades superiors del  $Y_{P/X}$ , de la productivitat específica i de la velocitat específica de producció, al comparar amb el valors obtinguts amb la soca sense la coexpressió el gen *HAC1*. Per tant, sembla que la coexpressió del gen *HAC1* de *S. cerevisiae*, presenta grans avantatges en la producció de proteïnes recombinats amb *P. pastoris*.

Tot i així, Guerfal *et al.*, (2010), destaquen que no s'havia realitzat cap estudi referent a la utilització del *HAC1* de *P. pastoris*. Per tant aquests autors realitzen un disseny d'una nova soca incloent la sobre-expressió constitutiva i induïda del gen *HAC1* de *P. pastoris* per a la producció de diferents proteïnes en la soca GS115.

Aquests autors, conclouen que la sobre-expressió del gen *HAC1* de *P. pastoris* pot representar una eina útil per augmentar la productivitat d'un procés, però serà necessària l'avaluació específica de cada cas, ja que troben resultats divergents en funció de la proteïna que estiguin produint. Alhora conclouen que a l'utilitzar el gen *HAC1* de forma constitutiva, en la majoria dels casos estudiats, no es presenten millores significatives en comparació als sistemes d'expressió sense la utilització del gen *HAC1*. Tanmateix, l'expressió induïble del gen *HAC1* presenta diferències significatives en comparació amb els nivells de proteïna recombinant expressada sola. Aquestes diferències seran positives o negatives en funció de la proteïna expressada. S'han observat millores significatives al produir thrombomodulina humana, però d'altra banda s'obtenen pèrdues en la productivitat al produir eritropoietina humana (rHuEpo), interferons- $\gamma$  de ratolí i interferons- $\beta$  humans.

Davant la possibilitat de que la coexpressió del gen *HAC1* permeti augmentar la productivitat del procés, es decideix dur a terme el procés de producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* aplicant la modificació genètica corresponent. L'investigadora Astrid Hörmann del grup de recerca, realitza la construcció genètica incloent el gen *HAC1* processat en el vector d'expressió de *P. pastoris*, que permet l'expressió del HAC1p funcional. S'obtenen dos construccions, una on l'expressió del gen *HAC1* serà de forma constitutiva (*HAC1*<sub>CONST</sub>-Mut<sup>s</sup>) i una on l'expressió serà induïble per metanol (*HAC1*<sub>IND</sub>-Mut<sup>s</sup>), seleccionant els clons més productius.

En aquest treball, es plategen diferents fermentacions per tal de comparar l'efecte la coexpressió de HAC1 sobre la producció de ROL. Es realitzen cultius en semicontinu utilitzant una estratègia de substrats mixtes (sorbitol i el metanol) durant la fase d'inducció on la  $\mu$  es mantindrà al voltant de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  i la concentració de metanol es mantindrà fixada en  $2 \text{ g l}^{-1}$ . Es realitzarà un primer cultiu utilitzant la construcció genètica on l'expressió de HAC1 serà de forma induïble per metanol i posteriorment, sota les mateixes condicions es realitzarà un altre cultiu, utilitzant la soca on l'expressió de HAC1 serà constitutiva sota el promotor GAP. Aquests resultats seran comparats amb els resultats obtinguts al capítol 5 d'aquesta tesi, on s'optimitza el procés de producció de ROL amb la utilització del fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* mitjançant la utilització de substrats mixtes (sorbitol-metanol). Tot i que al capítol 6 d'aquesta tesi, es realitzen cultius utilitzant el glicerol com a substrat mixte durant la fase d'inducció, es



decideix realitzar l'estratègia mitjançant la utilització del sorbitol, ja que els resultats obtinguts són més favorables.

Posteriorment, es realitza una estratègia en semicontinu, en el que s'utilitza com a font de carboni únicament metanol durant la fase d'inducció amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* coexpressant el gen *HAC1*, per tal de comparar els resultats amb els obtinguts prèviament per Cos *et al.*, (2006). Aquests autors realitzen cultius en semicontinu, utilitzant el metanol com a única font de carboni per a la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*.



### 8.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

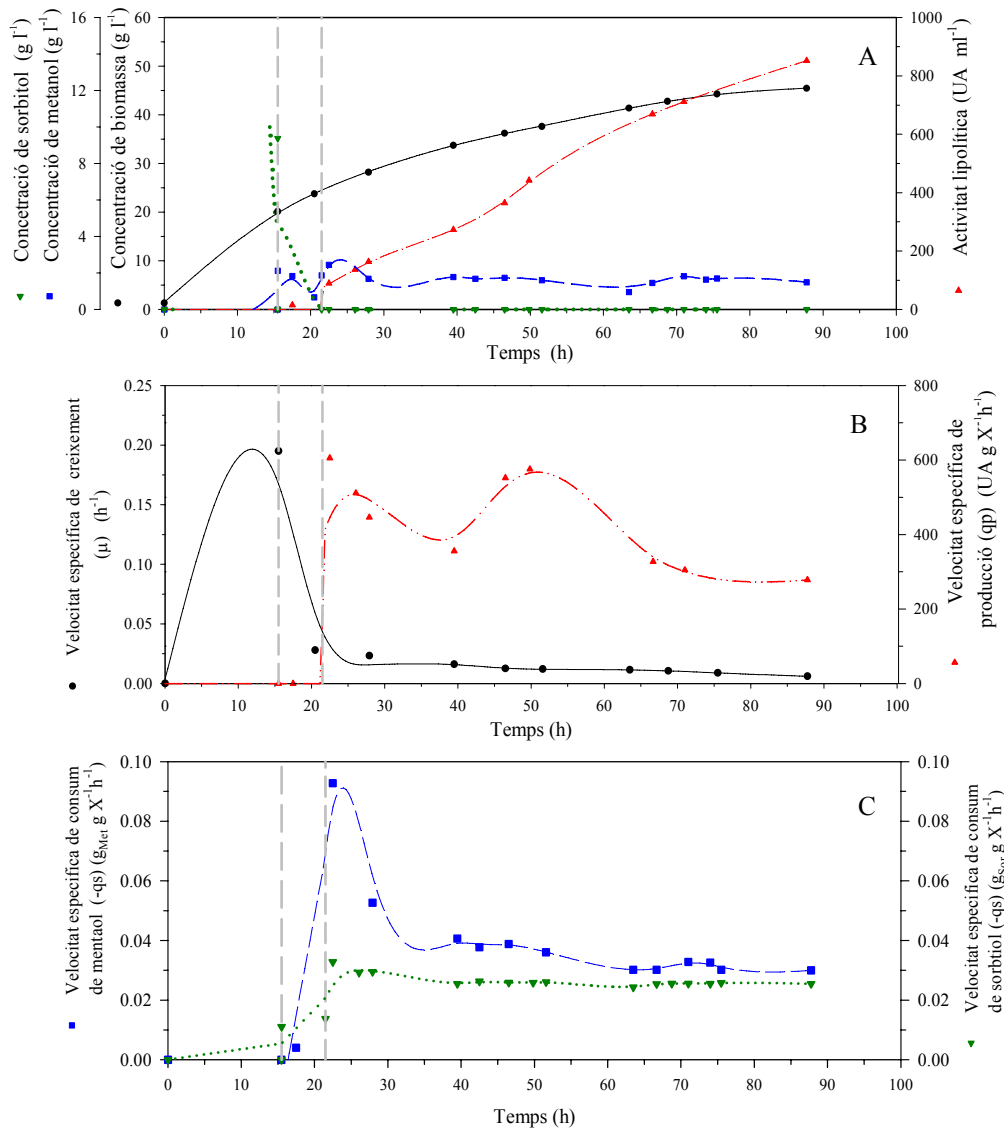
#### 8.3.1 Efecte de la coexpressió del gen *HAC1* induïble per a la producció de ROL utilitzant una estratègia de substrats mixtes: comparació de soques amb coexpressió i sense.

És important recordar, tal com s'ha vist prèviament en aquest document (*Capítol 5*), i com havia demostrat Ramon *et al.*, (2007), la utilització de substrats mixtes millora de forma important la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, en comparació amb la utilització del metanol com a única font de carboni sota condicions similars de cultiu (Cos *et al.*, 2006).

Alhora, cal recordar que del *Capítol 5* d'aquesta tesi se'n extreu una conclusió important referida a la concentració del metanol en el medi de cultiu, determinant-la com a paràmetre clau per a la producció de ROL. D'aquest capítol, se'n obtenen les condicions òptimes per a la producció de ROL, sent aquestes les de mantenir la concentració de metanol fixada a 2 g l<sup>-1</sup> i la  $\mu$  fixada a 0.01 h<sup>-1</sup>. Llavors, per tal d'estudiar l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* sobre la producció de ROL, es realitzen sota les mateixes condicions de cultiu.

A la figura 8.1, es pot veure l'evolució dels diferents paràmetres de cultiu en les condicions anteriorment explicades mitjançant la utilització de la soca que inclou el gen *HAC1* coexpressat de forma induïble. A la figura 8.1 A es pot veure que la biomassa augmenta progressivament fins arribar a un màxim de 45.4 g l<sup>-1</sup>. L'activitat lipolítica màxima obtinguda correspon a 852 UA ml<sup>-1</sup>, registrada al final del cultiu. Referent a la concentració de metanol, aquesta es manté a 2 g l<sup>-1</sup> durant tota la fase d'inducció, sense presentar desviacions importants. Cal remarcar que en aquest cultiu conseqüència d'una sobreestimació la concentració de metanol, aquesta va ser de 2.44 g l<sup>-1</sup> a l'iniciar la fase de la transició. Aquest valor no es va corregir, sinó que es va esperar que es consumís.

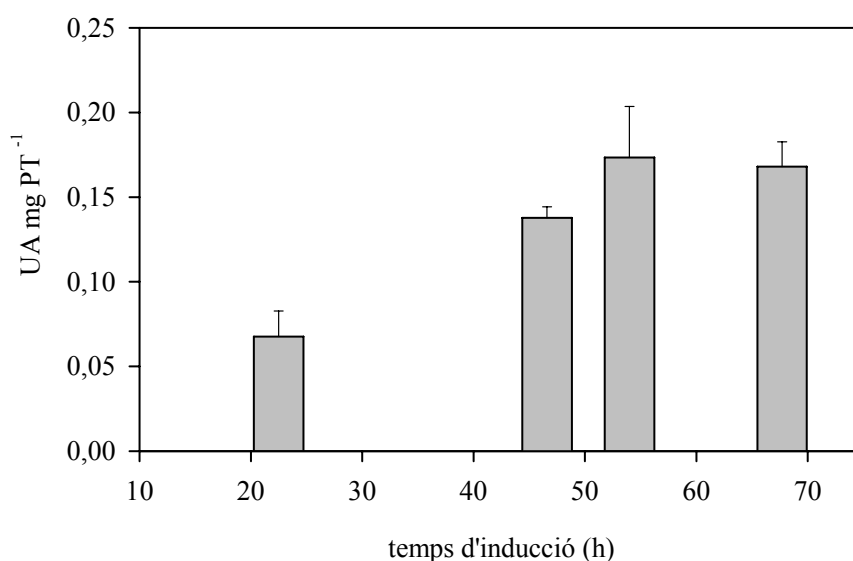
Pel que fa al sorbitol, aquest es va mantenir al voltant de zero durant tot el cultiu.



**Figura 8.1:** Evolució dels diferents paràmetres de procés, on es manté la concentració de metanol a 2 g l<sup>-1</sup> i la  $\mu$  en 0.01 h<sup>-1</sup>. (A) Evolució de la biomassa, concentracions de substrats i activitat lipolítica; (B) velocitat específica de creixement i velocitat específica de producció; (C) velocitat específica de consum de metanol i sorbitol.

La figura 8.1 B mostra l'evolució de la  $\mu$ , la qual es manté al voltant de la consigna seleccionada, presentant un valor mig de 0.013 h<sup>-1</sup>. Alhora es pot observar l'evolució de la  $q_p$ , la qual presenta dos màxims durant les primeres 30 h d'inducció, posteriorment una disminució, prenent un valor mig de 407.3 UA g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La disminució observada durant les últimes hores de cultiu d'aquest valor, es pot relacionar amb l'acumulació de lipases intracel·lular, ja que prèviament Resina *et al.*, (2005), obtenen un comportament similar durant les últimes hores de cultiu al produir ROL sota el promotor FLD de *P. pastoris*, i atribueixen aquesta disminució a l'acumulació de proteïna intracel·lular, el

que farà activar la UPR. Davant aquesta possibilitat es realitza l'anàlisi d'activitat lipolítica intracel·lular i de proteïna total de mostres durant la fase d'inducció. La figura 8.2 mostra l'evolució de les  $UA_{intra} \text{ mg}_{PT}^{-1}$  al llarg del cultiu, presentant un augment considerable entre les 22 i les 46 hores d'inducció. Els valors es mantenen gairebé constants a partir de les 46 h d'inducció fins al final del cultiu, no presentant un augment significatiu durant les últimes hores de cultiu.

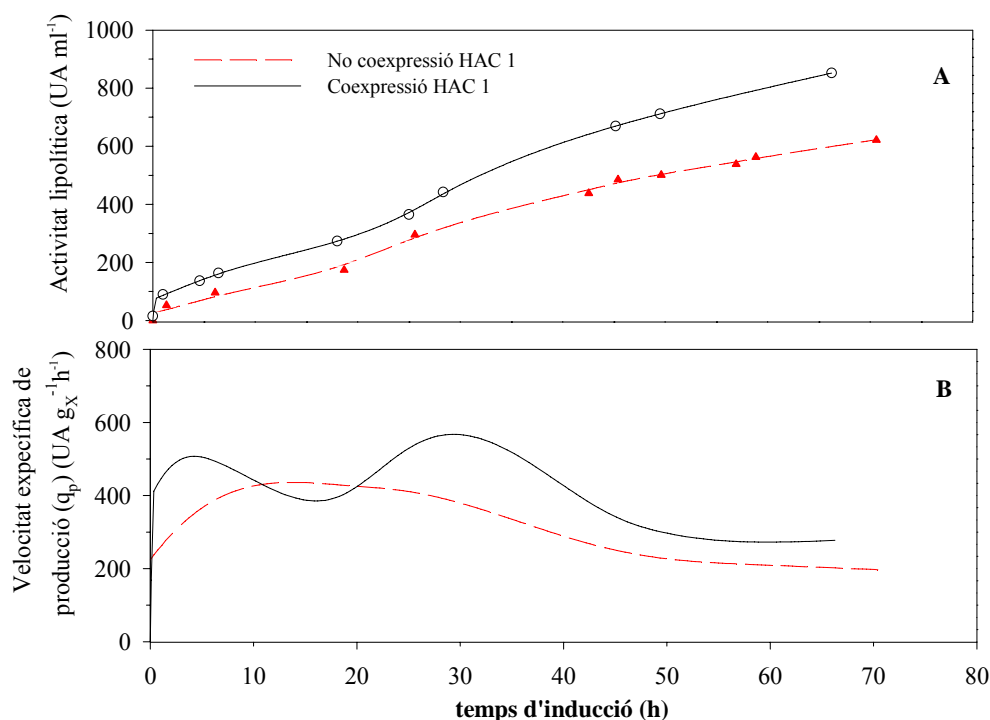


**Figura 8.2:** Evolució de les  $UA_{intra} \text{ mg}_{PT}^{-1}$  del cultiu dut a terme utilitzant una estratègia de substrats mixtes (sorbitol i metanol) amb la soca que coexpressió el gen *HAC1*.

Cal destacar també que els valors de  $UA_{intra} \mu\text{g}_{PT}^{-1}$  trobats, es troben considerablement per sota dels trobats per Resina *et al.*, (2005). Aquests autors troben valors al voltant de  $800 UA_{intra} \text{ mg}_{PT}^{-1}$ , i en aquest cultiu el valor màxim obtingut correspon a  $0.17 UA_{intra} \text{ mg}_{PT}^{-1}$ . Per tant, es descarta l'acumulació de la proteïna intracel·lular com a causa de la disminució detectada en la  $q_p$ .

Retornant als paràmetres de procés, la figura 8.1 C mostra l'evolució de la  $q_s$  d'ambdós substrats. La  $q_{sMet}$ , presenta un màxim a l'iniciar la fase d'inducció, disminuint i estabilitzant-se als voltant de  $0.03 \text{ g}_{Met} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La  $q_{sSorb}$  es manté estable durant tot el cultiu presentant un valor mig de  $0.026 \text{ g}_{Sorb} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

La figura 8.3, mostra l'evolució de diferents paràmetres de cultiu en les dues fermentacions dutes a terme a les mateixes condicions, coexpressant i no coexpressant el gen *HAC1*.



**Figura 8.3:** Evolució de l'activitat lipolítica (A) i de la velocitat específica de producció de ROL (B) durant l'etapa d'inducció d'un procés semicontinu utilitzant el sorbitol com a font de carboni mantenint el metanol fixat a 2 g l<sup>-1</sup>.

La figura 8.3 A mostra els nivells d'activitat lipolítica de la fermentació realitzada amb coexpressió induïda del gen *HAC1*, presentant valors superiors des de l'inici de la fase d'inducció, i mantenint-se durant tot el cultiu. Cal destacar que al realitzar la coexpressió induïda del gen *HAC1*, l'activitat lipolítica màxima registrada és 1.4 vegades superior. Alhora si es compara l'activitat obtinguda per unitat de biomassa, es pot veure que al coexpressar el gen *HAC1* s'obtenen 18600 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> i sense la coexpressió aquest valor correspon a 13689 UA g<sub>x</sub><sup>-1</sup> (taula 8.1). Per tant es pot veure que el cultiu que coexpressa el gen *HAC1* presenta un  $Y_{P/X}$  1.4 vegades superior al que no coexpressa, observant-se una major producció per unitat de biomassa.

Alhora, fent referència a la  $q_p$  (figura 8.3 B), aquesta també presenta un tendència superior durant la fase d'inducció, exceptuant la disminució registrada entre les 10 i 20

h d'inducció. És important destacar la millora significativa que representa la coexpressió del gen *HAC1* a la  $q_p$  durant la primera hora d'inducció, ja que es registren valors gairebé dues vegades superiors (400 *versus* 220 UA  $g_X^{-1} h^{-1}$ ). Aquest augment, com es veurà posteriorment, presentarà una certa relació amb la  $q_{sMet}$ . Tal i com es pot observar a la taula 8.1, el valor mitjà de la  $q_p$  és 1.3 vegades superior al realitzar-se la coexpressió. Continuant la comparació dels diferents paràmetres de producció, a la mateixa taula, es pot observar que al realitzar la coexpressió del gen *HAC1*, tant la productivitat volumètrica com específica són 1.5 vegades superiors.

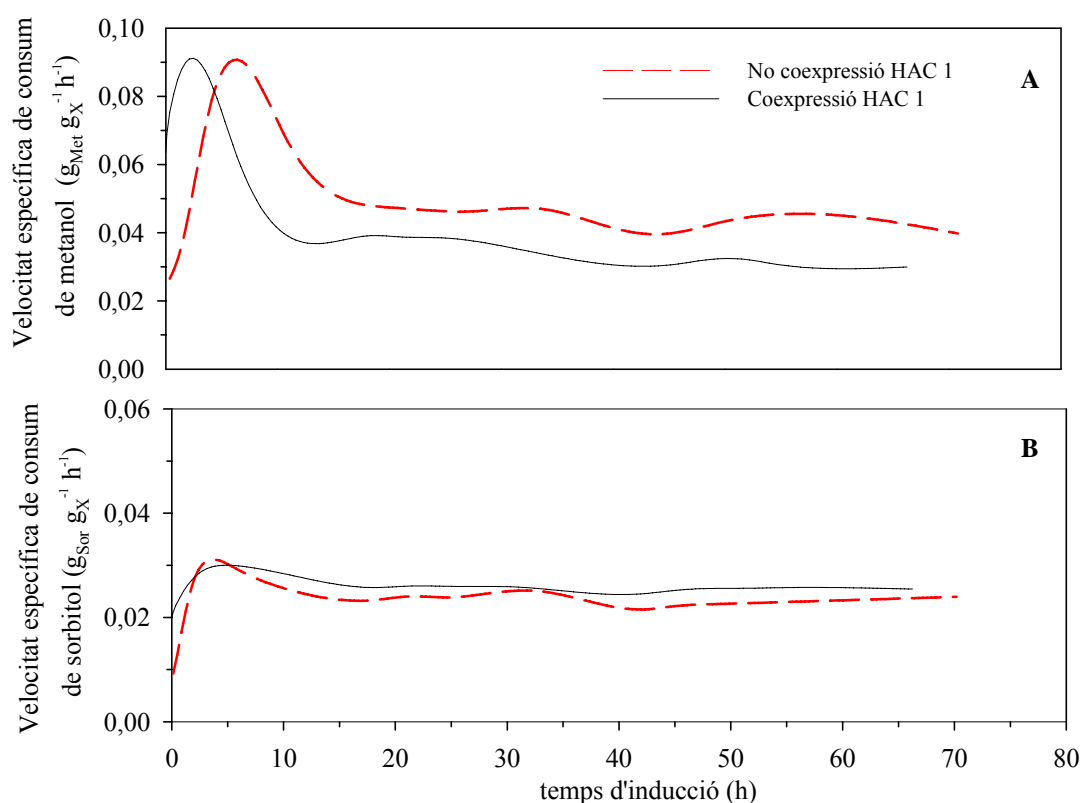
**Taula 8.1:** Comparació dels paràmetres de producció més representatius utilitzant diferents soques en les mateixes condicions de treball ( $\mu = 0.01 h^{-1}$ ; 2 g  $l^{-1}$  metanol) per la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* en una estratègia de semicontinu.

Coexpressió <i>HAC1</i>	no	si
Biomassa final (g $l^{-1}$ )	45.3	45.4
$\mu_{mig}$ ( $h^{-1}$ )	0.013	0.013
Act. lipolítica max. (UA $ml^{-1}$ )	621.2	851.9
$q_{p\ max}$ (UA $l^{-1} h^{-1}$ )	433.0	507.5
$q_{p\ mig}$ (UA $l^{-1} h^{-1}$ )	306.3	407.3
$Y_{p/x}$ (UA $g_X^{-1}$ )	13688.8	18600.5
Productivitat vol. (UA $l^{-1} h^{-1}$ )	6623.6	9708.3
Productivitat específica (UA $g_X^{-1} h^{-1}$ )	146.0	212.0

Tal i com havien descrit prèviament Guerfal *et al.*, (2010), és necessari l'estudi individualitzat per cada proteïna, ja que tal i com aquests comproven, depenent de la proteïna l'efecte de la coexpressió induïda és favorable i en altres casos, obtenen valors inferiors als obtinguts amb les soques que no coexpressen el gen *HAC1*. Per tant, es pot observar que la coexpressió induïda del gen *HAC 1* per a la producció de ROL amb *P. pastoris*, presenta un clar efecte positiu sobre la producció del procés.

Referent a les velocitats específiques de consum de substrat la figura 8.4 mostra l'evolució dels perfils de  $q_s$  per cada un dels substrats. Fent referència al metanol (figura 8.4A), la  $q_{sMet}$  presenta una tendència similar per ambdós fermentacions realitzades,

presentant un màxim durant les primeres hores d'inducció, disminuint i estabilitzant-se al voltant del 50% del valor màxim obtingut. Però cal destacar, que tot i presentar perfils similars, la soca que coexpressa el gen HAC1, presenta una anticipació en la velocitat de consum, registrant el màxim de la  $q_{sMet}$  5 h abans. Tot i així després d'aquest màxim, disminueix i els valors registrats es trobant, durant la resta de la fase d'inducció, per sota dels valors registrats en la soca no transformada (1.3 vegades inferior).



**Figura 8.4:** Evolució de la velocitat específica de consum de metanol (A) i de la velocitat específica de consum de sorbitol (B) durant l'etapa d'inducció d'un procés en semicontinu utilitzant el sorbitol com a font de carboni mantenint el metanol fixat a 2 g l<sup>-1</sup>.

Aquest comportament presenta una important diferència en relació amb els resultats que s'havien trobat fins al moment. Tal i com s'ha vist en el *Capítol 5* d'aquesta tesi, la concentració de metanol i el consum d'aquest, representen el paràmetre clau alhora d'augmentar la productivitat del procés, sent superior quan la  $q_{sMet}$  és major. Tanmateix, la soca que coexpressa el gen HAC1, tot i presentar una  $q_{sMet}$  mitjana 1.3 vegades inferior, els paràmetres referents a la producció són superiors. La coexpressió del gen



*HAC1* de forma induïble afavoreix el procés de producció, i sembla que aquest excés fa que l'activació de la UPR, per la presència de proteïnes mal plegades, es doni de forma menys importat, probablement afavorint el plegament de les proteïnes degut a l'augment d'elements plegadors (xaperones, lípids específics, etc), augmentat així la secreció del producte a l'exterior de la cèl·lula. Tot i així, serà necessària la realització de posteriors anàlisi a nivell intracel·lular per tal de verificar la informació.

D'altra banda la  $q_{sSor}$  (figura 8.4 B) per ambdós soques presenta una tendència molt similar, presentant un valor mig al voltant de  $0.026 \text{ g}_{Sor} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$  quan es coexpressa el gen *HAC 1*, i de  $0.025 \text{ g}_{Sor} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ , quan no es coexpressa. Per tant, tot i que la  $q_{sSor}$  és lleugerament superior quan es coexpressa el gen *HAC 1*, es pensa que no presentarà cap efecte sobre aquest paràmetre. D'altra banda, Resina *et al.*, (2009), observen un augment significatiu de la  $q_{sSor}$  a l'utilitzar la soca que coexpressava de forma constitutiva el gen *HAC 1* de *S. cerevisiae*. Tot i així, la diferència de fer-se la coexpressió de forma constitutiva o induïble, pot ser la causa de la diferència entre els consums de sorbitol.

Davant les millores presentades al coexpressar el gen *HAC1* de forma induïble per a la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, es decideix realitzar un cultiu, utilitzant una estratègia en semicontinu, mitjançant la utilització del metanol com a única font de carboni. Aquest experiment permetrà comprovar si la modificació genètica, permet millorar el procés de producció dut a terme per Cos *et al.*, (2006), ja que segons Guerfal *et al.*, (2010), cada cas ha de ser estudiat individualment, ja que la variació del sistema d'expressió pot representar diferències significatives.

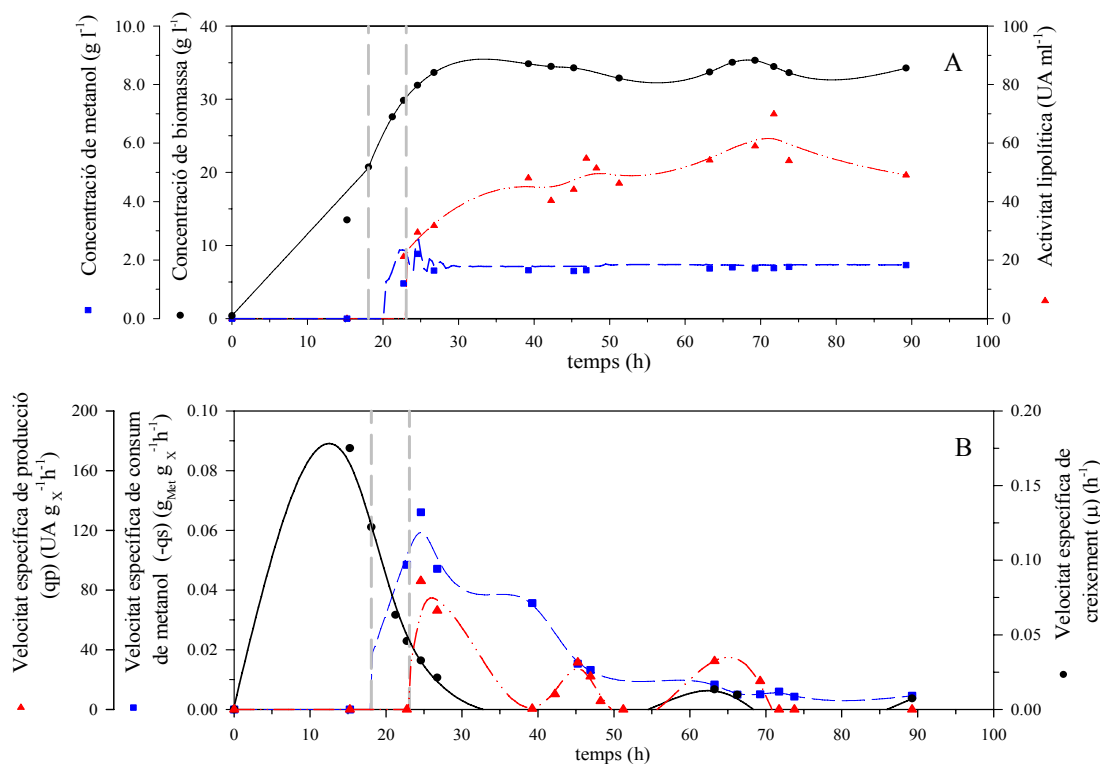
### 8.3.2 Efecte de la coexpressió del gen *HAC 1* induïble utilitzant el metanol com a única font de carboni per a la producció de ROL: comparació de soques amb coexpressió i sense.

Cos *et al.*, (2006), van realitzar diferents cultius en semicontinu, utilitzant el metanol com a única font de carboni, on la consigna d'aquest es mantenia fixada en; 0.5, 1 i 1.75 g l<sup>-1</sup>, per a la producció de ROL amb *P. pastoris*. Aquests investigadors, van trobar que en els experiments realitzats a les consignes de 0.5 i 1 g l<sup>-1</sup>, la  $q_p$  presentava un màxim, tot presentant una severa disminució, poques hores després. Aquesta disminució, tot i que puntualitzaven la realització de posteriors estudis fisiològics, era associada amb l'acumulació de ROL intracel·lular, el que induiria la UPR. D'altra banda, quan la consigna és mantenia en 1.75 g l<sup>-1</sup>, els valors d'activitat lipolítica eren remarcablement inferiors en comparació a la resta de condicions, però la  $q_p$  es mantenia pràcticament constant durant tot el procés.

Davant els resultats obtinguts per Cos *et al.*, (2006), es decideix realitzar un cultiu en semicontinu mantenint la concentració de metanol fixada a 2 g l<sup>-1</sup>, per veure si l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* de forma induïble afecta sobre la productivitat del procés utilitzant el metanol com a única font de carboni, i així comparar els resultats amb l'efecte de la utilització de substrats mixtes.

Els resultats obtinguts al realitzar el cultiu en semicontinu, es troben representants a la figura 8.5. Tal i com es pot observar, l'augment de biomassa durant la fase d'inducció és gairebé inexistent, passant de 29.9 a 34.2 g l<sup>-1</sup>, al finalitzar el cultiu, presentant un valor mig de  $\mu$  corresponent a 0.004 h<sup>-1</sup> (figura 8.5 B).

L'activitat lipolítica (figura 8.5 A) presenta un augment durant les primeres hores de cultiu, continuant aquest de forma lleugera partir de les 40 h de cultiu. Tanmateix la  $q_p$  (figura 8.5 B), presenta un primer màxim durant les primeres hores d'inducció, seguint d'una important davallada, arribant a valors de zero. Posteriorment es registren dos pics, els quals decreixen fins arribar a zero a les poques hores, sent probablement producte de l'error associat al mètode de mesura de l'activitat lipolítica (aprox. 10 %).



**Figura 8.5:** Evolució dels diferents paràmetres de procés, utilitzant el metanol com a única font de carboni mantenint la concentració de metanol en 2 g l<sup>-1</sup>. (A) Evolució de la biomassa, concentracions de metanol i activitat lipolítica; (B) evolució de la velocitat específica de creixement, de la velocitat específica de producció i de la velocitat específica de consum de metanol.

La concentració de metanol (figura 8.5 A), es manté constant durant tot el cultiu al voltant de la consigna seleccionada. Durant la fase de transició (5h) es combinen les addicions de glicerol 50% (v/v) i metanol pur, (veure estratègia de transició a l'apartat 3.7.3. *Cultiu en fermentador de 5 litres*) fins a eliminar l'addició del primer i iniciar el control del metanol. Pel que fa a la  $q_{sMet}$  (figura 8.5 B), aquesta presenta un màxim a l'inici de la fase d'inducció, presentant una posterior disminució gairebé fins a valors al voltant de zero, presentant una comportament similar a l'observat a la  $q_p$ .

Si es comparen els resultats, amb els resultats previs obtinguts per Cos *et al.*, (2006), es pot veure que la coexpressió del gen *HAC1* no presenta cap millora sobre la producció del procés. La taula 8.2 mostra com l'activitat màxima registrada disminueix 2 vegades a l'utilitzar la soca modificada genèticament. Alhora la resta de paràmetres relacionats, així com la productivitat volumètrica i el  $Y_{P/X}$  disminueixen 1.5 i 1.3

vegades, respectivament. D'altra banda, la productivitat específica obtinguda en ambdós processos és similar.

**Taula 8.2:** Comparació dels paràmetres de producció més representatius utilitzant diferents soques en condicions de treball similars (1.75 i 2 g l<sup>-1</sup> metanol) per la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* en una estratègia de semicontinu.

<b>Coexpressió gen HAC1</b>	<b>no*</b>	<b>si</b>
<b>Consigna metanol (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.75*</b>	<b>2.0</b>
Act. lipolítica max. (UA ml <sup>-1</sup> )	150.0	69.9
Y <sub>p/x</sub> (UA gX <sup>-1</sup> )	3017.0	2029.7
Productivitat vol. (UA l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1228.0	974.1
Productivitat específica (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	25.0	28.3

\* Cos *et al.*, (2006)

La taula 8.3 mostra com la q<sub>p</sub> mitjana durant la fase d'inducció és superior, quan la soca no modificada és utilitzada, però alhora la q<sub>p</sub> màxima registrada és superior a l'utilitzar la soca modificada genèticament. D'aquesta forma, es pot veure que a l'utilitzar la soca modificada, es presenta un primer màxim durant les primeres hores d'inducció el qual disminuirà de forma severa. A diferència del cultiu realitzat per Cos *et al.*, (2006) on el valor de q<sub>p</sub> és estable durant tot el cultiu, en aquest nou cultiu s'observa a l'inici de la fase d'inducció un màxim superior, però no serà molt significatiu, degut a que el valor de q<sub>p</sub> mitjana és 2 vegades inferior. Per tant, el comportament d'aquest cultiu és similar a l'observat per Cos *et al.*, (2006), a la resta de condicions testades (0.5 i 1 g l<sup>-1</sup> de metanol).

Alhora és important destacar que similar al que passava a l'utilitzar una estratègia de substrats mixtes el valor de la μ mitjana és comú per ambdós cultius (taula 8.3). Per tant, la coexpressió del gen *HAC1* no presenta cap efecte destacable sobre la velocitat del creixement del microorganisme, probablement degut al baix valor d'aquesta.

Es pot observar que el valor mitjà de la q<sub>sMet</sub> (taula 8.3), és superior en el cultiu realitzat per Cos *et al.*, (2006). Però de forma similar al que succeïa amb el perfil de la q<sub>p</sub>, el valor màxim de la q<sub>sMet</sub> és superior a l'utilitzar la soca modificada. Per tant,

sembla que la coexpressió del gen *HAC1* presenta un efecte positiu a l'inici de la fase d'inducció, no mantenint-se al llarg del cultiu.

**Taula 8.3:** Comparació dels paràmetres de producció més representatius utilitzant diferents soques en condicions de treball similars (1.75 i 2 g l<sup>-1</sup> metanol) per la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* en una estratègia en semicontinu.

<b>Coexpressió <i>HAC1</i></b>	<b>no<sup>*</sup></b>	<b>si</b>
<b>Consigna metanol (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.75<sup>*</sup></b>	<b>2.0</b>
qp <sub>max</sub> (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	60.0	74.6
qp <sub>mig</sub> (UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	34.0	16.7
q <sup>S</sup> <sub>Met max</sub> (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.042	0.060
q <sup>S</sup> <sub>Met mig</sub> (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.027	0.018
μ <sub>mig</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.004	0.004

Cal remarcar, que tot i que tots els factors indiquessin que en aquestes condicions també es generaria una millora en el procés de producció, ja que a l'utilitzar substrats mixtes les millores són significatives, la transferència no és directament proporcional, indicant la forta influència de l'estratègia de cultiu. És important destacar, l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* a l'inici de la fase d'inducció, no fent-se perdurar durant tot el cultiu. Per tant, es podria concloure que la coexpressió del gen *HAC1* per a la producció de ROL utilitzant metanol com a única font de carboni no presenta millores sobre el procés de producció. Per tant, la utilització del metanol, com a única font de carboni, sembla que no té la capacitat d'aportar tota l'energia necessària que requereix el funcionament metabòlic en *P. pastoris*, i el fet de coexpressar el gen *HAC1* probablement agreujaria el problema. Per tant, mitjançant la combinació ambdós estratègies, tant operacional com genètica, garanteix la optimització de la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*.

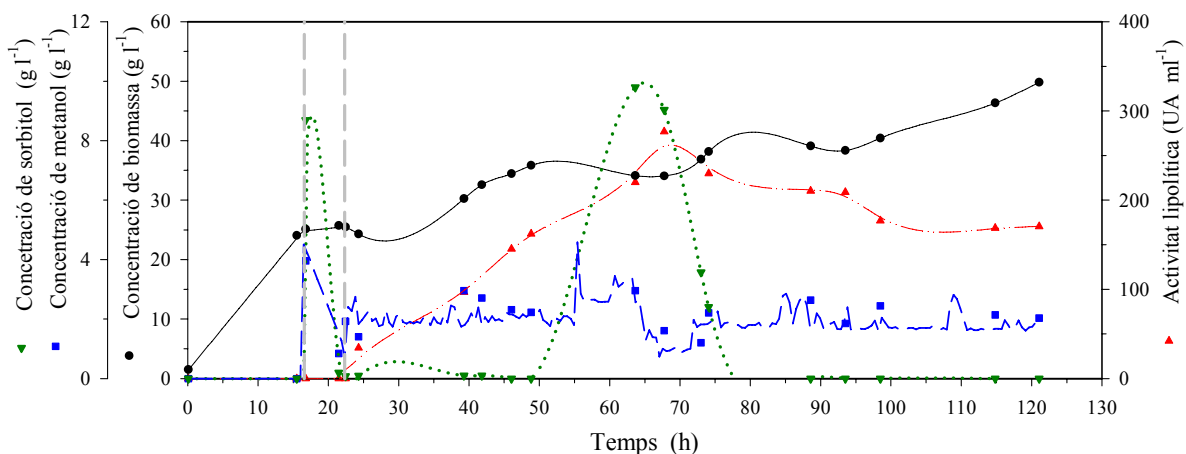
### 8.3.3 Efecte de la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* sota el promotor GAP utilitzant una estratègia de substrats mixtes

Guerfal *et al.*, (2010), estudien dues formes possibles d'expressar el gen *HAC1*, de forma induïble, com s'ha vist en l'apartat anterior, i de forma constitutiva. Aquests autors, realitzen una primera aproximació utilitzant flascons agitats, i conclouen, com s'ha comentat anteriorment, que al realitzar la coexpressió de forma induïble, l'èxit del procés dependrà de cada sistema d'expressió. Però d'altra banda, al realitzar experiments mitjançant la coexpressió constitutiva, observen petits increments o gairebé nuls, en tots els casos que estudien (4 proteïnes).

Alhora, Resina *et al.*, (2009) extreuen resultats satisfactoris a l'expressar de forma constitutiva el gen *HAC1* de *S. cerevisiae* per a la producció de ROL en *P. pastoris*. Davant la possibilitat d'estudiar com afectaria la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* homòleg en *P. pastoris* sobre la producció de ROL amb el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris*, la Dra. Rodriguez de la Universitat de Vigo durant una estada post-doctoral al departament d'Enginyeria Química de la UAB sota la direcció del grup de recerca dirigit pel Dr. Valero, realitza la construcció de la soca que presentarà la coexpressió del gen *HAC1*, però en aquest cas, la regulació de l'expressió d'aquest vindrà donada pel promotor GAP (coexpressió constitutiva). L'estratègia de cultiu seleccionada és en semicontinu mitjançant la utilització de substrats mixtes, on la concentració de metanol es mantindrà fixada en 2 g l<sup>-1</sup>, i la  $\mu$  a 0.01 h<sup>-1</sup>, durant la fase d'inducció. Es decideix realitzar-ho sota aquestes condicions, per tal de poder comparar l'efecte de la coexpressió del gen de forma induïble i constitutiva, sota les mateixes condicions de cultiu.

La figura 8.6 mostra l'evolució dels diferents paràmetres de cultiu. La concentració de sorbitol, es manté propera a zero durant les primeres 50 h de cultiu. A les 50 h, el sorbitol s'acumula fins a una concentració màxima de 9.8 g l<sup>-1</sup>. Aquesta acumulació és deguda a un problema operacional relacionat amb el sistema d'aireació del reactor, provocant l'aturada de l'aireació durant 15 h. Al trobar-se limitats per l'oxigen, el creixement disminueix, creixent a una  $\mu$  inferior a la fixada, el que provoca l'acumulació d'aquest substrat. Per disminuir la concentració de sorbitol en el medi,

s'atura l'addició exponencial durant 9 h. Mitjançant l'anàlisi de les mostres *off-line*, es coneix la concentració de sorbitol, el que permet tornar a reiniciar l'addició exponencial quan la concentració d'aquest es trobi proper a zero. A les 75 h de cultiu, es reinicia el cabal d'addició exponencial.



**Figura 8.6:** Evolució de la biomassa, concentracions de substrats i activitat lipolítica, on es manté la concentració de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$  i la  $\mu$  en  $0.01 \text{ h}^{-1}$ .

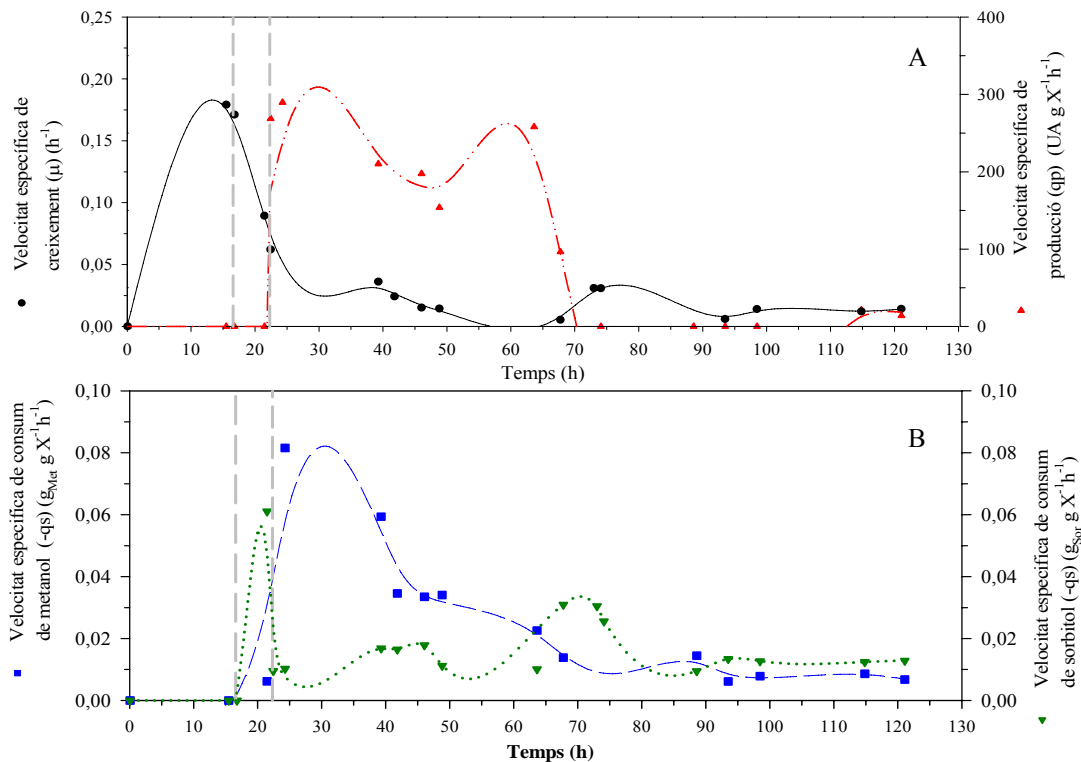
La biomassa durant la fase d'inducció, augmenta segons la  $\mu$  fixada, exceptuant el període compres entre les 50 i 75 h, on l'augment de la biomassa és gairebé nul. La biomassa no augmenta, degut al mateix problema operacional descrit anteriorment. Tot i així, al reprendre l'aireació la biomassa necessita un temps aproximat de 3 h per tornar a registrar un augment.

La concentració de metanol, es manté al voltant de  $2 \text{ g l}^{-1}$ , durant tota la fase d'inducció, excepte entre els 50 i 75 h d'inducció, on es registra una acumulació màxima de  $4 \text{ g l}^{-1}$ , degut a un problema amb el controlador. A partir de les 75 h de cultiu, la concentració de metanol es manté al voltant de la consigna.

Finalment, l'activitat lipolítica presenta un augment important fins arribar a les 68 h de cultiu. Tot i que, entre les 50 i 68 h de cultiu el creixement del microorganisme és gairebé inexistent, l'augment de l'activitat lipolítica no sembla veure's afectada de forma immediata per la limitació d'aire registrada. Que l'activitat lipolítica no es vegi afectada de forma immediata, pot ser degut a la possible acumulació d'aquesta a l'interior de la cèl·lula, i que per tant s'estigui produint la secreció del producte a l'espai extracel·lular, i la producció estigui aturada prèviament. No obstant, cal destacar que a

l'iniciar l'aireació, l'activitat lipolítica registrada disminueix, no recuperant-se durant la resta de cultiu.

La figura 8.7 mostra les diferents velocitats específiques de producció, consum i creixement. La  $q_p$  presenta un important augment durant les primeres hores de cultiu. Es registren dos màxims, a les 23 i 65 h de cultiu, presentant una lleugera disminució entre ambdós valors. A les 65 h de cultiu, la  $q_p$  disminueix de forma severa, registrant valors de zero. Cal destacar, que tot i disminuir de forma severa, i mantenint-se a zero entre les 70 i 121 h de cultiu, la  $\mu$  es manté durant tot aquest període al voltant de la consigna seleccionada. Per tant, la producció s'atura completament, però el creixement del microorganisme es manté.



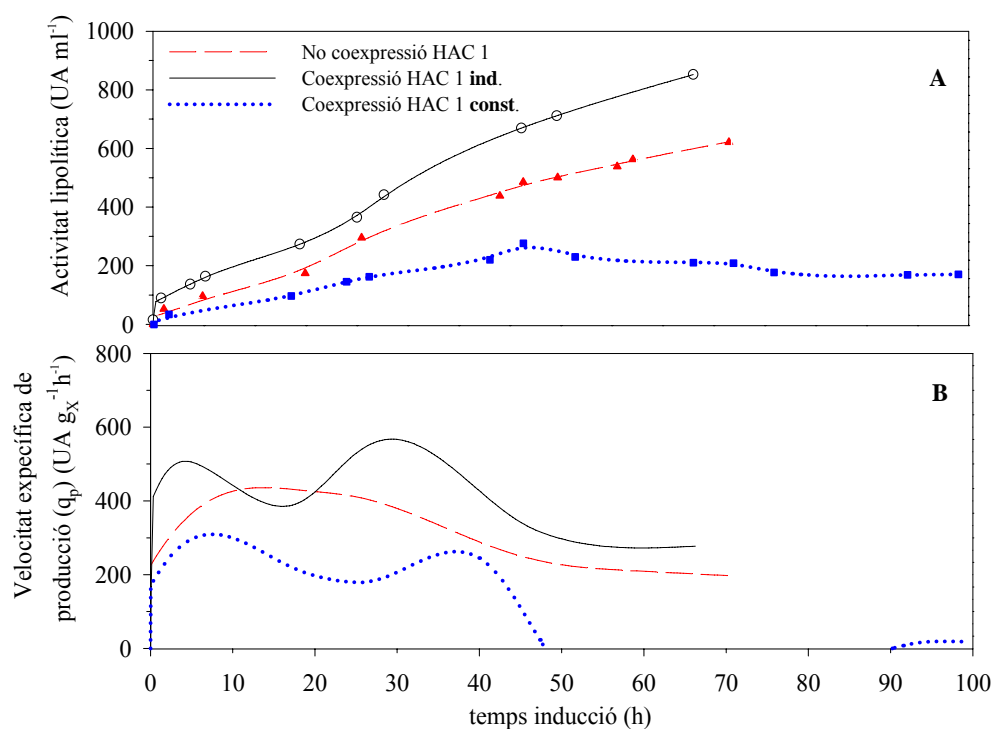
**Figura 8.7:** Evolució dels diferents paràmetres de procés, on es manté la concentració de metanol a  $2 \text{ g l}^{-1}$  i la  $\mu$  en  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . (A) velocitat específica de creixement i velocitat específica de producció; (B) velocitat específica de consum de metanol i sorbitol.

Fent referència a l'evolució del consum de substrats, es pot veure com la  $q_{sSor}$  (figura 8.7 B) presenta un important augment entre les 64 i 75 h de cultiu, coincidint amb el període on el sorbitol és acumulat. Al reiniciar-se l'addició exponencial, aquest valor es



manté estable fins al final del cultiu. A la mateixa figura, la  $q_{sMet}$  presenta un màxim a l'inici de la fase d'inducció, disminuint de forma progressiva fins a establir-se al voltant de  $0.01 \text{ g}_{Met} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Un cop s'han realitzat els cultius sota les mateixes condicions de treball utilitzant les diferents construccions genètiques, se'n pot realitzar una comparació. Per tal de que aquesta sigui representativa, es prendran les primeres 30 h d'inducció de cada un dels cultius (cap dels cultius presenta problemes operacionals en aquest període). La figura 8.8 mostra l'evolució de l'activitat lipolítica i la  $q_p$  per cada un dels cultius realitzats. Si es pren com a referència la soca que no coexpressa el gen *HAC1*, la qual es podria prendre com a soca control, s'observa que en funció del sistema d'expressió del gen *HAC1*, l'efecte sobre la producció és contraposada, afectant positivament al coexpressar-se induïblement i negativament al fer-se de forma constitutiva. Al comparar-se les dues soques que coexpressen el gen *HAC1*, es pot observar que a les 30 h d'inducció l'activitat lipolítica obtinguda és 3 vegades superior quan la coexpressió es realitza de forma induïble.



**Figura 8.8:** Evolució de l'activitat lipolítica (A) i de la velocitat específica de producció de ROL (B) durant l'etapa d'inducció d'un procés en semicontinu utilitzant el sorbitol com a font de carboni mantenint el metanol fixat a  $2 \text{ g l}^{-1}$  amb les diferents soques utilitzades.

De la mateixa forma que s'ha vist anteriorment amb l'activitat lipolítica, al comparar les diferents  $q_p$  registrades (figura 8.8 B), s'observa un comportament similar, trobant-se els valors més elevats al coexpressar de forma induïble el gen *HAC1*. Si es realitza la comparació de les dues soques que coexpressen el gen *HAC1*, s'observa que a les 30 h d'inducció la  $q_p$  és al voltant de 2.8 vegades superior al coexpressar-se induïblement.

La taula 8.4 mostra els valors obtinguts referents a la productivitat del procés per cada una de les soques utilitzades fins a les 30 h d'inducció. Al fer referència als diferents paràmetres de producció, es pot observar que al coexpressar-se constitutivament el gen *HAC1*, la productivitat tant específica com volumètrica disminueixen entre 2 i 3 vegades i alhora el  $Y_{P/X}$  disminueix 2 vegades, tant al comparar-ho amb el cultiu que coexpressa el gen *HAC1* de forma constitutiva, com amb la soca control.

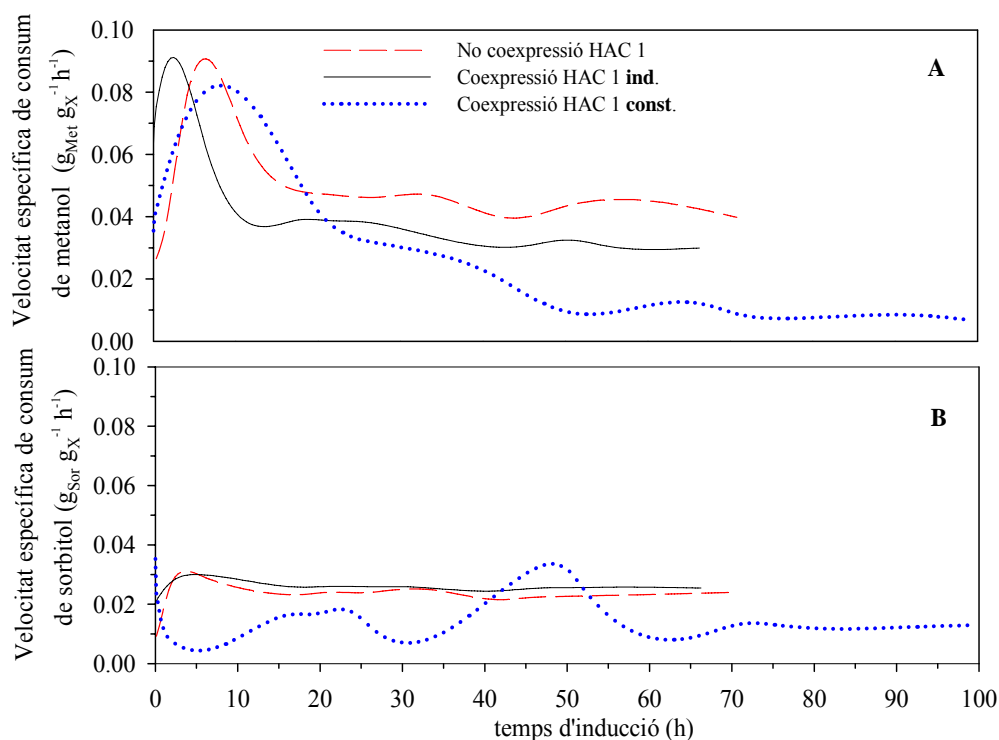
És important remarcar que durant les primeres 30 h d'inducció, les diferències entre el cultiu que coexpressa induïblement el gen *HAC1* i la soca control, no presenten diferències significatives (taula 8.4), observant-se valors més elevats tant de  $Y_{P/X}$  com de productivitat específica a l'utilitzar la soca control. Aquest fet indica, que la soca que no coexpressa el gen *HAC1* durant les primeres hores és més productiva per unitat de biomassa, no podent mantenir aquest nivell, probablement degut a l'acumulació de ROL a l'espai intracel·lular, fent-se notable els avantatges que presenta la coexpressió del gen *HAC1*, implicant un augment en la UPR de forma induïda.

**Taula 8.4:** Comparació dels paràmetres de producció més representatius utilitzant diferents soques en condicions de treball similars ( $0.01\text{h}^{-1}$  i  $2\text{ g l}^{-1}$  metanol) per la producció de ROL utilitzant el fenotip Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* en una estratègia de semicontinu durant les primeres 30 h d'inducció.

<b>Coexpressió gen <i>HAC1</i></b>	<b>No</b>	<b>Induïble</b>	<b>Constitutiu</b>
Act. lipolítica max. ( $\text{UA ml}^{-1}$ )	450	510	200
$Y_{P/X}$ ( $\text{UA g}_X^{-1}$ )	18443	17586	8000
Productivitat vol. ( $\text{UA l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	4464	5090	1755
Productivitat específica ( $\text{UA g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ )	615	586	267

Finalment, es realitza la comparació de les diferents velocitats específiques de consum de substrats per a les 3 soques utilitzades. La figura 8.9 A mostra els diferents perfils de la  $q_{sMet}$ , presentant similituds entre la soca no coexpressora i la que coexpressa el gen *HAC1* de forma constitutiva durant les primeres 20 h de cultiu. És important destacar, que el cultiu que coexpressa el gen *HAC1* de forma constitutiva en moments presenta valors superiors de  $q_{sMet}$  que la resta de cultius. D'altra banda l'activitat lipolítica registrada al coexpressar-se de forma constitutiva és 3 vegades inferior, per tant en aquest cas un augment en la  $q_{sMet}$  no es veu traduïda a un augment en la producció de ROL.

La figura 8.9 B mostra l'evolució de la  $q_{sSor}$ , presentant valors inferiors al coexpressar el gen *HAC1* de forma constitutiva. Tot i així, cal destacar que degut a les acumulacions i irregularitats d'aquest substrat durant el cultiu, és complicat extreure conclusions d'aquest comportament.



**Figura 8.9:** Comparació de l'evolució de la velocitat específica de consum de metanol (A) i de la velocitat específica de consum de sorbitol (B) durant l'etapa d'inducció d'un procés en semicontinu utilitzant el sorbitol com a font de carboni mantenint el metanol fixat a  $2 \text{ g l}^{-1}$  amb les diferents soques utilitzades.

Com a conclusió es pot observar que al comparar la producció en funció de la construcció genètica utilitzada, la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* no presenta cap avantatge en el procés de producció de ROL amb *P. pastoris*, tanmateix la coexpressió induïble presenta avantatges importants. Tot i així, cal destacar que l'aturada de l'aireació en el procés quan la coexpressió del gen *HAC1* era constitutiva provoca importants conseqüències en la producció de ROL en *P. pastoris* durant el procés. Així que tot i extreure unes conclusions prèvies es suggereix l'estudi de l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* de forma constitutiva en profunditat. La companya de grup de recerca Nuria Adelantado continuarà amb aquesta línia de treball, el que permetrà estudiar de forma clara l'efecte que presenta la coexpressió constitutiva del gen *HAC1*.

## 8.4 CONCLUSIONS

- El procés de producció de ROL amb *P. pastoris*, mitjançant la coexpressió induïble del gen *HAC1*, presenta millores significatives de tots els paràmetres relacionats amb la producció. Presentant millores de 1.4 vegades tant en l'activitat lipolítica màxima registrada com en el  $Y_{P/X}$ , i millores de 1.5 vegades en la productivitat tant volumètrica com específica.
- La  $q_{sMet}$  mitjana al coexpressar el gen *HAC1* de forma induïble és 1.3 vegades inferior a la soca que no coexpressa el gen *HAC1*. Aquest comportament demostra per primera vegada en aquest treball, que l'augment de la  $q_{sMet}$  no és veu traduïda a una superior productivitat. D'altra banda, la  $q_{sSor}$  és similar per ambdós cultius.
- Durant les 30 primeres hores d'inducció la productivitat específica i el  $Y_{P/X}$  són superiors a l'utilitzar la soca no coexpressora del gen *HAC1*, indicant una major productivitat per unitat de biomassa durant les primeres hores, no mantenint-se al llarg del cultiu, fent-se notable l'efecte de l'acció del gen *HAC1* coexpressat.
- Quan el metanol és utilitzat com a única font de carboni, la soca que presenta la coexpressió induïble del gen *HAC1* no presenta millores en referència als resultats trobats per Cos *et al.*, (2006). La utilització única del metanol, sembla que no té la capacitat d'aportar tota l'energia necessària que requereix el funcionament metabòlic en *P. pastoris*, i el fet de coexpressar el gen *HAC1*, sembla que agreujaria el problema.
- El procés de producció de ROL amb *P. pastoris*, mitjançant la coexpressió constitutiva del gen *HAC1*, no presenta millores en els paràmetres relacionats amb la producció.

- L'augment registrat de la  $q_{sMet}$  durant les primeres hores d'inducció al coexpressar de forma constitutiva el gen *HAC1* no representa un augment en la producció del procés.
- Tal i com prèviament altres autors havien apuntat, la coexpressió del gen *HAC1* ha de ser estudiat de forma individualitzada, ja que en funció del sistema d'expressió utilitzat la seva coexpressió serà afavoridora o no en el procés de producció.
- Serà necessària la realització de posteriors estudis per extreure conclusions sobre l'efecte de la coexpressió del gen *HAC1* sobre la producció de ROL amb *P. pastoris*.

## 8.5 **BIBLIOGRAFIA**

Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *BioTechnology*. 1991;9:455–460.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol*. 2005;116:321–35.

Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnol. Bioeng*. 2006;95:145–54.

Cereghino L, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev*. 2000;24:45-66.

Gasser B, Maurer M, Gach J, Kunert R, Mattanovich D. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol Bioeng*. 2006;94:353-361.

Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP, Ameloot P, Craenenbroeck KV, Derycke R, Callewaert N. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb. Cell Factories*. 2010;9:49-61.

Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2004;85:367–375.

Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, Martinelle M, Enfors SO. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch process. *J Biotechnol*. 2003;102:45–53.

Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H, Sauer M. Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol*. 2004;113:121-135.

McCracken A, Brodsky J. Minireview: A molecular portrait of the response to unfolded proteins. *Genome Biology*. 2000;1(2):1013.1-1013.3.

Ramon R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*. 2007;130:39–46.

Resina D, Cos O, Ferrer P, Valero F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source regulated FLD1 promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;91:760–767.

Resina D, Bollók M, Khatri KN, Valero F, Neubauer P, Ferrer P. Transcriptional response of *Pichia pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microb. Cell Factor.* 2007;6:21-32.

Resina D, Maurer M, Cos O, Arnau C, Carnicer M, Marx H, Gasser B, Valero F, Mattanovich D, Ferrer F. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *New Biotechnol.* 2009; 25(6):396–403.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:519–529.

Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9:944-958.

Zhang WH, Sinha J, Smith LA, Inan M, Meagher MM. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fedbatch fermentation. *Biotechnol. Prog.* 2005;21:386–393.



# Capítol 9:

## CONCLUSIONS GENERAL I PROPOSTES DE FUTUR



## 9 Conclusions generals i propostes de futur

- El sistema de 48 milibioreactors no es presenta com a candidat per a optimitzar el procés de producció de *P. pastoris* utilitzant els promotors induïbles AOX i FLD. Tanmateix, aquest sistema permetria optimitzar la producció de ROL utilitzant el promotor constitutiu GAP, un cop les limitacions genètiques que presenta aquesta construcció siguin resoltes.
- La utilització de substrats mixtes millora de forma important la producció del procés en comparació a la utilització del metanol com a única font de carboni. El sorbitol es presenta com un excel·lent candidat, presentat avantatges sobre la utilització del glicerol com a cosubstrat.
- La concentració de metanol residual en el medi de cultiu representa un paràmetre clau, siguent la concentració òptima de 2 g l<sup>-1</sup>. Tanmateix les diferents  $\mu$  utilitzades no presenten diferències significatives referent a la producció a l'utilitzar el sorbitol com a cosubstrat. D'altra banda, a l'utilitzar el glicerol com a cosubstrat si la relació de  $\mu_{Gli}/\mu_{Met}$  és superior a 6, s'observa una clara repressió del promotor AOX, afectant directament sobre l'activitat lipolítica extracel·lular registrada.
- La incorporació de la tècnica SIA, permetrà determinar del sorbitol en línia possibilitant la implementació un sistema de control en llaç tancat.
- Al realitzar el canvi d'escala el sistema d'addició del metanol representa un factor clau, presentant un augment del 48% en la productivitat específica quan el metanol és afegit mitjançant una cànula de forma submergida. Serà necessari un posterior estudi del sistema d'addició del metanol al reactor per aconseguir productivitats similars a les obtingudes a escala laboratori.
- La coexpressió dels gen *HAC1* al realitzar-se de forma induïble mitjançant la utilització de substrats mixtes presenta millores al voltant de 1.4 vegades de tots

els paràmetres relacionats amb la producció en comparació a la no coexpressió del gen. D'altra banda, la coexpressió constitutiva del gen *HAC1* no presenta avantatges en el procés de producció. Tanmateix si a la fase d'inducció s'utilitza el metanol com a única font de carboni es registren valors inferiors de producció en comparació als obtinguts prèviament.

Capítol 10:

# ABREVIATURES



## 10 Abreviatures

Abreviatures	Definició	Unitats
PPF1	Planta Pilot Fermentació a $\mu$ 0.01 h <sup>-1</sup> .	
PPF2	Planta Pilot Fermentació a $\mu$ 0.02 h <sup>-1</sup> .	
BB5L1	Braun Biostat a 5L a $\mu$ 0.01 h <sup>-1</sup> .	
BB5L2	Braun Biostat a 5L a $\mu$ 0.02 h <sup>-1</sup> .	
F	Cabal alimentació	l h <sup>-1</sup>
$\mu_{\max}$	Identificador de valor màxim	
M	Concentració de metanol	g l <sup>-1</sup>
PT	Proteïna total	mg PT
X	Concentració de biomassa	g l <sup>-1</sup>
S	Concentració de substrat	g l <sup>-1</sup>
P	Concentració de producte	UA ml <sup>-1</sup>
$q_p$	Velocitat específica de producció	UA g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$q_s$	Velocitat específica de consum de substrat	g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
S	Concentració de substrat	g l <sup>-1</sup>
$S_0$	Concentració de substrat a l'aliment	g l <sup>-1</sup>
t	Temps	h
$t_0$	Temps inicial	h
u	Cabal addició de substrat	l h <sup>-1</sup>
UA	Unitats d'activitat	UA
$V_R$	Volum reactor	l
V	Volum de cultiu	l
$V_b$	Volum total de cèl·lules	l
X	Concentració de biomassa	g l <sup>-1</sup>
$Y_{P/X}$	Rendiment producte - biomassa	UA g <sup>-1</sup>
$Y_{X/S}$	Rendiment biomassa - substrat	g g <sup>-1</sup>
$\mu$	Velocitat específica de creixement	h <sup>-1</sup>
$K_p$	Guany del controlador proporcional.	$\mu$ l l g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
$\tau_I$	Paràmetre de l'efecte integral.	minuts
$\varepsilon$	Diferència entre la consigna i la concentració de metanol en el medi de cultiu.	





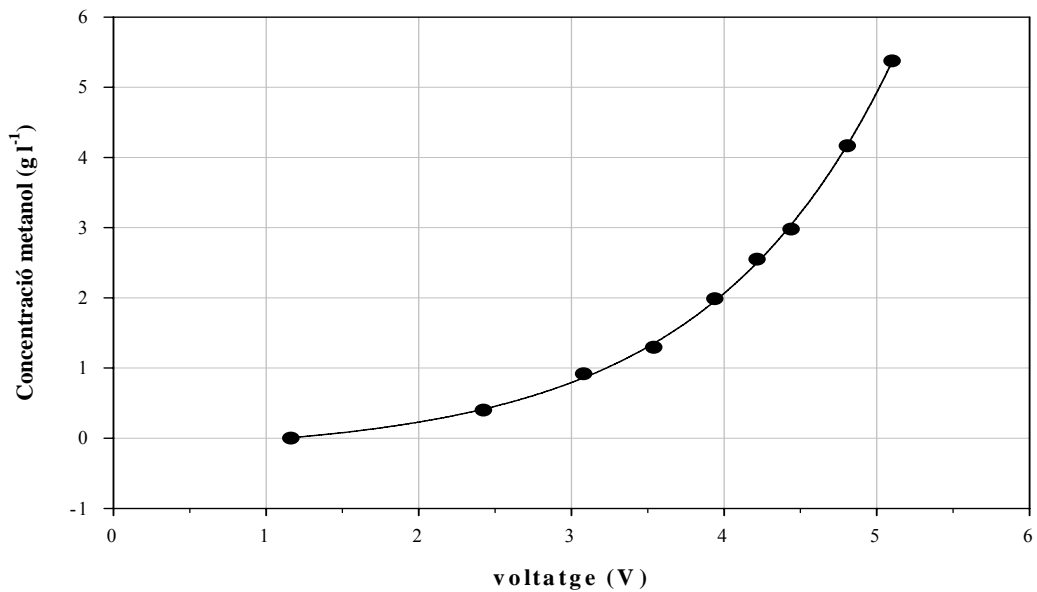
# Capítol 11:

## ANNEXES



## 11 Annexes

### 11.1 Annex 1: Calibrat sonda metanol



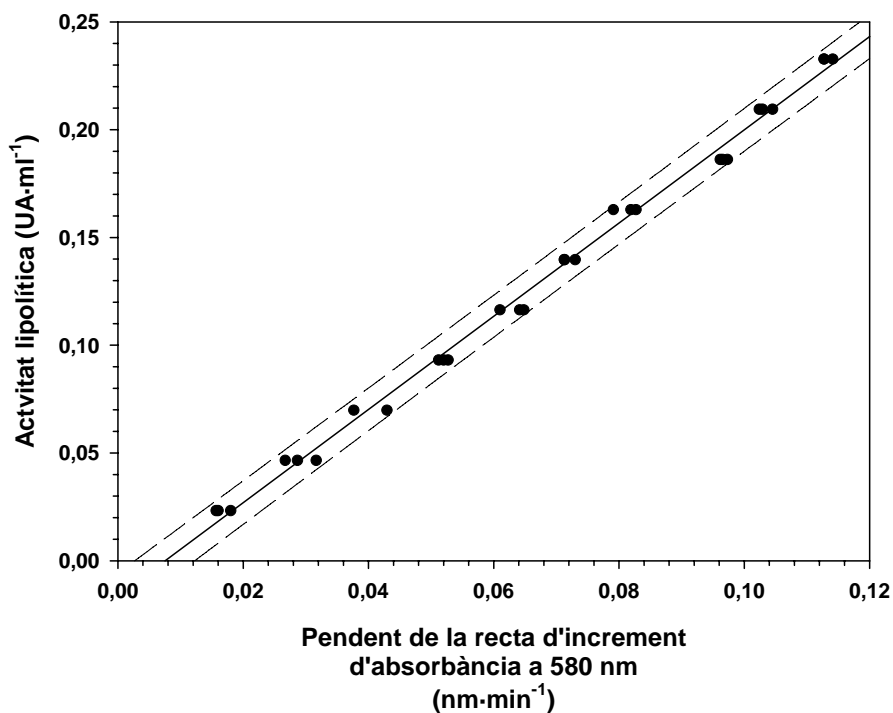
**Figura 11.1:** Recta de calibratge de l'activitat lipolítica.

$$M = y_0 + a \cdot \exp(b \cdot V) \quad \text{eq 11.1}$$

$y_0$	-0.219
$a$	0.088
$b$	0.812
$r^2$	0.9997

Resultats obtinguts després de realitzar la calibració de la sonda Raven Biotech. El calibrat es va realitzar en les condicions d'operació sense biomassa. Els punts trobats experimentalment s'han ajustat a l'equació 11.1.

## 11.2 Annex 2: Calibrat de l'activitat lipolítica



**Figura 11.2:** Recta de calibratge de l'activitat lipolítica.

### Activitat lipolítica:

$$\text{UA ml}^{-1} = 2.16 (\pm 0.03) \cdot \text{pendent} (\text{min}^{-1}) - 0.016 (\pm 0.002) \quad \text{eq. 11.2}$$

$r^2$ : 0.995.

Rang de mesura: Pendent entre 0.016 i 0.113 (min<sup>-1</sup>).

Interval de confiança: 95 %

## **NOTES**

