

Efecte de la velocitat específica de
creixement en la producció de Lip-1
de *Candida rugosa* en *Pichia pastoris* sota
l'efecte del promotor *AOX1*

Treball de fi de màster
Arnau Gasset Franch

ÍNDEX

1. ABSTRACT/RESUM.....	3
2. INTRODUCCIÓ.....	4
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1. Soca	7
3.2. Fermentació	7
3.2.1. Preparació de l'inòcul.....	7
3.2.2. Preparació del medi	7
3.2.3. Mode d'operació	8
3.2.4. Cultiu fed-batch.....	8
3.3. Mètodes analítics	9
3.3.1. Determinació del pes sec	9
3.3.2. Quantificació de la font de carboni i de sub-productes	10
3.3.3. Quantificació de l'activitat lipolítica.....	10
3.4. Càlcul dels paràmetres clau del procés.....	10
3.4.1. Càlcul discret de les velocitats específiques.....	10
3.4.2. Càlcul de les velocitats específiques mitjanes.....	11
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	13
5. CONCLUSIONS	20
6. TREBALL FUTUR.....	21
7. BIBLIOGRAFIA	22

-Aquest treball ha estat escrit seguint el format de la revista *Process Biochemistry*-

1. ABSTRACT/RESUM

En aquest estudi s'analitza l'efecte de la velocitat específica de creixement (μ) en un bioprocés en el qual el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* expressa la lipasa 1 de *Candida rugosa* (CRL1) sota la regulació del promotor P_{AOX1} . Concretament, s'ha estudiat l'efecte sobre altres paràmetres cinètics com ara la velocitat específica de consum de substrat (q_s) o la velocitat específica de síntesi de producte (q_p). Aquest estudi es duu a terme mitjançant tres fermentacions en *fed-batch* mantenint la μ aproximadament constant gràcies a una limitació de la font de carboni. En el treball s'ha observat una relació lineal entre la μ i la q_s , mentre que la q_p , per contra, presenta un màxim ($q_p = 588 \text{ U} \cdot \text{g DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a una μ mitjana al voltant de $0,053 \text{ h}^{-1}$. Com a hipòtesi, es creu que aquest fet pot estar relacionat amb l'estrès cel·lular, de manera que caldria un estudi més específic per poder corroborar aquesta suposició.

Paraules clau: CRL1, limitació de font de carboni, *Pichia pastoris*, promotor AOX1, velocitats específiques (μ , q_s , q_p)

2. INTRODUCCIÓ

En els últims 50 anys, el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) ha estat àmpliament estudiat per a diverses aplicacions. En l'inici, a la dècada dels 70, la companyia petrolera *Phillips* va desenvolupar la tecnologia per a produir aquest llevat com a suplement proteic alimentari, l'anomenada "Single Cell Protein". Aquesta resultava molt rendible per produir un aliment per al bestiar amb elevada aportació proteica a partir del metanol [1]. Posteriorment, obtingué el certificat GRAS (Generally Recognized As Safe), amb el qual s'inicià també el seu consum humà. No obstant això, durant aquesta mateixa dècada es produïren diverses crisis que van fer augmentar el preu del cru de petroli, i conseqüentment, van fer disminuir la rendibilitat d'aquest procés.

Posteriorment, cap als anys 80 i inicis dels 90 es va començar a estudiar aquest llevat com a plataforma d'expressió proteica recombinant [2], ja que presentava certes millores davant d'altres sistemes d'expressió coneguts, com *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Un exemple d'aquestes millores són els patrons de glicosilació més similars als humans, la capacitat de secretar les proteïnes sintetitzades al medi, etc. [3]. D'aquesta manera, es van aconseguir expressar nombrosos oligopèptids i proteïnes amb interès terapèutic [4–6]. Nogensmenys, gràcies al coneixement que s'ha generat sobre aquest llevat en els últims anys la síntesi recombinant s'ha estès en d'altres camps, des de la indústria alimentària fins a la bioremediació [3,7]. En aquest sentit, *P. pastoris* s'acosta cada cop més al concepte de sistema universal d'expressió de proteïnes recombinants, una plataforma cel·lular estable i coneguda en què només és necessari inserir un *cassette* d'expressió per tal que sintetitzi una proteïna determinada [8].

Més enllà de la fisiologia d'aquest llevat i dels avantatges que aquesta comporta, des del punt de vista transcripcional hi ha un altre punt a favor de la utilització de *P. pastoris*: el promotor de l'alcohol oxigenasa (P_{AOX1}). Com que el primer enzim en la ruta catabòlica del metanol, l'alcohol oxigenasa (AOX), té una baixa afinitat per al seu substrat la cèl·lula, per contrarestar-ho, el sintetitza en grans quantitats, que poden arribar a ser de més del 30% del total de proteïna cel·lular [9]. Aquesta proteïna està codificada per dos gens: AOX1, responsable del 90% de l'enzim a la cèl·lula, i AOX2, responsable de l'altre 10%, i és gràcies al promotor del gen AOX1, el P_{AOX1} , que la cèl·lula és capaç de sintetitzar tanta quantitat d'enzim, i només ho fa en presència d'aquest substrat [10].

Així doncs, aquest promotor és de gran interès en la síntesi recombinant, ja que per una banda està sotmès a una forta regulació i només s'activa en presència de metanol, i per altra banda permet sintetitzar una elevada quantitat de proteïna heteròloga.

És degut, doncs, a la presència d'aquests dos gens que existeixen tres fenotips diferents de *P. pastoris* pel que fa a la utilització del metanol: el fenotip Mut⁺, que correspon a aquelles soques que contenen íntegrament els dos gens i que poden metabolitzar el metanol de forma normal; i els fenotips Mut^S i Mut⁻, que resulten de la deleció del gen AOX1 o de la deleció d'ambdós gens AOX, respectivament. Per tant, impliquen una baixa capacitat de metabolitzar aquest hidrocarbur en el cas de Mut^S o nul·la en el cas de Mut⁻. D'entre les soques conegudes i disponibles amb el fenotip Mut⁺, les més utilitzades són la GS115 (*his4*), auxòtrofa per la histidina, i la X-33, que és la soca salvatge [10].

Tanmateix, l'ús d'aquest promotor també comporta certs inconvenients, ja que està condicionat a la utilització de metanol com a inductor, que és molt volàtil i de vegades resulta impossible de monitoritzar en sistemes poc controlats com matrassos Erlenmeyer o microplaques. A més, el catabolisme oxidatiu del metanol requereix molt d'oxigen i genera una gran quantitat de calor, i això esdevé un factor limitant quan es sobrepassa la capacitat del sistema per aportar oxigen o eliminar calor. Això comporta que no es pugui arribar a concentracions cel·lulars tant elevades com en d'altres sistemes [11,12]. Per altra banda, la utilització del metanol requereix certes mesures de seguretat, tant per a la utilització com per a l'emmagatzematge d'aquest, al tractar-se d'una substància inflamable i volàtil.

En aquest sentit, altres promotors han estat provats per a expressar proteïnes heteròlogues en aquest llevat, com per exemple el P_{GAP}, promotor constitutiu de l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (enzim clau de la glucòlisi) o el P_{FLD1}, promotor de l'enzim formaldehid deshidrogenasa 1, que pot ser activat a partir del metanol o de la metilamina. En ambdós casos s'han obtingut resultats molt variables pel que fa a la seva eficiència en funció de la proteïna expressada [11–13].

Paral·lelament, en els darrers anys s'han començat a estudiar les lipases degut a la seva gran versatilitat, ja que una de les seves característiques és la baixa especificitat envers el substrat i això fa que tinguin un gran ventall d'aplicacions, fins al punt d'esdevenir un dels grups de biocatalitzadors més importants en biotecnologia [14]. D'entre aquestes aplicacions, se'n poden destacar algunes com la síntesi de biofàrmacs enantiopurs, fertilitzants, additius alimentaris, biopolímers i fins i tot biocombustibles [14,15]. Concretament, la lipasa 1 del fong *Candida rugosa* (CRL1) destaca per ser una de les més versàtils i amb més aplicacions descrites [16],

especialment pel que fa a la producció de biodièsel [17]. És per això que actualment ja hi ha processos patentats que fan servir aquesta tecnologia [18].

En aquest treball s'estudia l'expressió del gen d'aquesta lipasa (CRL1) mitjançant la plataforma cel·lular *P. pastoris* i sota el control del promotor AOX1, amb l'objectiu principal de descobrir quin és l'efecte que té la velocitat específica de creixement (μ) sobre altres variables cinètiques, com ara la velocitat específica de consum de substrat (q_s), la velocitat específica de síntesi de producte (q_p), el rendiment biomassa-substrat ($Y'_{x/s}$), etc. També és important destacar que s'utilitza un medi de creixement amb un baix contingut en sals, que no ha estat provat anteriorment amb metanol com a font de carboni i inductor en el grup de recerca.

Aquests resultats també podran servir, en un futur, per veure l'efecte que té el nombre de còpies del gen i el promotor utilitzat en la síntesi d'una proteïna determinada, comparant-los amb els resultats d'altres estudis realitzats en *fed-batch* o en continu, i d'aquesta manera contribuir a ampliar el coneixement general que existeix sobre aquest sistema d'expressió.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Soca

La soca de *P. Pastoris* utilitzada en aquest estudi és la soca X-33 transformada amb el vector pPICZ α A (Invitrogen, Carlsbad, California, Estats Units) seguint el protocol descrit en la bibliografia [19]. Aquest vector conté un *cassette* d'expressió amb una còpia del gen CRL1 sintètic, amb l'ús de codó optimitzat (Genscript Biotech, Piscataway, New Jersey, Estats Units). A continuació presenta el factor α -mating de *Saccharomyces cerevisiae* per tal que la proteïna heteròloga sigui secretada al medi, així com regions d'homologia en ambdós costats per tal que es pugui donar una doble recombinació i pugui ser integrat en un punt desitjat del genoma. S'ha comprovat mitjançant *droplet digital PCR* que només existeix una còpia del *cassette* [20].

3.2. Fermentació

3.2.1. Preparació de l'inòcul

L'inòcul de cada fermentació s'ha fet créixer en 4 matrassos Erlenmeyer d'1 L amb deflectors durant unes 24 hores aproximadament, a 25°C i 160 rpm, que contenen 120 mL de medi YPG cadascun (2% peptona, 1% extracte de llevat, 2% glicerol, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de zeocina; pH 7). Aquests van ser inoculats amb *criostocks* conservats a -80°C (aproximadament 0,5 mL per matràs) de la soca prèviament esmentada. En arribar a una densitat òptica d'entre 12 i 20 unitats d'absorbància, aproximadament, una quantitat fixada d'aquest cultiu (calculada per obtenir una $\text{OD}\approx 1$ en el bioreactor) s'ha centrifugat durant 15 minuts a 8000 rpm i 20°C emprant la centrífuga Avanti J-20 XP (Beckman Coulter, Brea, Califòrnia, Estats Units) i re-suspès en aigua destil·lada, i tot seguit s'ha utilitzat per inocular el bioreactor.

3.2.2. Preparació del medi

El medi utilitzat per a la fermentació ha estat descrit en la bibliografia [21], utilitzant com a font de carboni glicerol per al *batch* i metanol per al *fed-batch*. El medi s'ha esterilitzat en autoclau, i la biotina i les sals traça s'han esterilitzat posteriorment mitjançant una microfiltració amb

filtres de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estats Units). Tot i haver-hi una font de nitrogen en el medi del *batch*, com a base per al control de pH s'ha utilitzat hidròxid amònic, el qual ha aportat, d'aquesta manera, una font de nitrogen durant el *fed-batch*.

3.2.3. Mode d'operació

L'estratègia operacional escollida ha estat la de *fed-batch*, que és la més òptima per a la producció de proteïnes recombinants. Per una banda, aquesta permet arribar a una concentració elevada de biomassa abans d'induir l'expressió (durant l'etapa inicial de *batch*), i per altra, també permet acumular el producte en el medi de cultiu, fet que abarateix la seva posterior purificació (en continu, en canvi, el producte es dilueix). A més a més, l'estratègia de *fed-batch*, en contrapartida al *batch* "simple", permet fixar una velocitat de creixement en funció del cabal d'entrada de la font de carboni i d'aquesta manera assolir un estat pseudo-estacionari, a banda d'evitar possibles inhibicions per substrat (fet que s'observa tant amb el glicerol com amb el metanol, les dues fonts de carboni utilitzades en aquest cas).

3.2.4. Cultiu *fed-batch*

Les tres fermentacions s'han realitzat en un bioreactor Biostat B de 5 L (Sartorius, Göttingen, Alemanya), amb un volum inicial de 2 L durant la fase *batch* i un volum d'entre 3,1 i 3,3 L al final de la fase *fed-batch*. Les condicions de cultiu s'han monitoritzat i controlat amb els següents valors de *set point*: temperatura 25°C; pH 6, controlat amb l'addició d'hidròxid amoni al 20% (v/v); pO₂ per sobre del 20% de saturació amb aire, amb una aeració constant de 1 vvm (2 L·min⁻¹) i una barreja d'aire i oxigen pur en diferents proporcions segons les necessitats del cultiu; velocitat d'agitació entre 700 i 1500, també en funció de la pO₂, mantenint aquesta per sobre del 20% de saturació amb aire. Els gasos de sortida s'han fet passar per un condensador refredat amb aigua a 4°C per tal de minimitzar les pèrdues per evaporació del medi de cultiu, i posteriorment per una torre d'assecatge i un analitzador de gasos BlueInOne Ferm (Bluesense, Herten, Alemanya).

En tots tres casos la fase *batch* ha tingut una duració d'unes 26 hores, moment en el qual ha augmentat la pO₂ ja que s'esgota la font de carboni. La fase de transició ha consistit en 2 addicions de metanol en el bioreactor, de 1 g·L⁻¹ i 2 g·L⁻¹ (concentració en el bioreactor), respectivament. Tot seguit s'ha connectat l'entrada d'aliment, amb un cabal exponencial fixat per una microbureta automatitzada Crison MicoBU-2031 (Alella, Barcelona, Spain).

L'estratègia de la fermentació durant la fase *fed-batch* ha estat la de fixar una velocitat específica de creixement (μ) mitjançant una limitació de font de carboni. Això permet assolir un estat pseudo-estacionari pel que fa a certes velocitats específiques del cultiu, com es comentarà més endavant a l'apartat de resultats, i d'aquesta manera estudiar quin és l'efecte de la μ en aquestes variables cinètiques. Aquesta limitació de font de carboni s'ha aconseguit mitjançant un perfil exponencial pre-programat del cabal d'alimentació (llaç obert). L'equació que fixa el cabal i que resulta d'aplicar els balanços de substrat es mostra a continuació:

$$F(t) = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0}{Y'_{x/s} \cdot S_e} \cdot e^{\mu \cdot (t-t_0)}$$

On F és el cabal (en $L \cdot h^{-1}$) calculat en cada minut del *fed-batch*, μ és la velocitat específica de creixement fixada en cada fermentació (0,03, 0,06 i 0,09 h^{-1} , respectivament), X_0 és la concentració cel·lular a l'inici del *fed-batch* (considerada de 20 $g \cdot L^{-1}$), V_0 és el volum inicial del *fed-batch* (considerat de 2 L), $Y'_{x/s}$ és el rendiment global biomassa/substrat del metanol (considerat de 0,4 g biomassa· g glicerol $^{-1}$), S_e és la concentració d'entrada del metanol (de 792 $g \cdot L^{-1}$) i t i t_0 són el temps de fermentació i el temps d'inici del *fed-batch*, respectivament.

A la pràctica no només hi ha una entrada d'aliment corresponent al metanol, sinó que per la impossibilitat de dissoldre les sals del medi de *fed-batch* en el metanol, s'ha hagut d'incorporar una entrada addicional amb una solució de les sals, les sals traça i la biotina. Aquesta entrada s'ha tingut en compte posteriorment en la simulació del càlcul del volum del cultiu, així com també la reducció del volum degut a l'extracció periòdica de mostres per al seu posterior anàlisi.

En tots 3 casos, la fermentació s'ha aturat quan la biomassa es trobava al voltant dels 70 $g \cdot L^{-1}$, ja que per a les velocitats específiques de creixement més elevades, a aquesta concentració de biomassa la calor generada en consumir el metanol és major que la calor que el sistema pot eliminar, de manera que la temperatura no es pot mantenir constant i augmenta, afectant negativament a l'enzim produït.

3.3. Mètodes analítics

3.3.1. Determinació del pes sec

El mètode utilitzat per a la determinació de la concentració de biomassa mitjançant el pes cel·lular sec (*DCW*) ha estat descrit prèviament [22]. Les mesures s'han realitzat per quadruplicat, amb un error estàndard relatiu menor al 5% en totes les mostres.

3.3.2. Quantificació de la font de carboni i de sub-productes

S'ha analitzat la concentració de glicerol, metanol i en alguns casos sub-productes com arabitol, sorbitol o etanol mitjançant una HPLC amb un cromatògraf líquid HP 1050 (Dionex Corporation, Sunnyvale, Califòrnia, Estats Units) amb una columna ICsep Eq. 1 7 ICE COREGEL 87H3 (Transgenomic Inc., Omaha, Nebraska, Estats Units) i una fase mòbil d'àcid sulfúric 8 mM. El volum d'injecció ha estat de 20 µL. L'error estàndard relatiu s'estima al voltant del 2% [10].

3.3.3. Quantificació de l'activitat lipolítica

Per tal de mesurar l'activitat lipolítica extracel·lular s'han centrifugat les mostres durant 90 segons a 13400 rpm amb una centrífuga MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg, Alemanya), i s'ha agafat el sobrenedant per a l'assaig enzimàtic. Aquest consisteix en la hidròlisi del p-nitrofenil butirat (PNB) a p-nitrofenol (PNP) i butirat, amb el que es mesura el canvi d'absorbància mitjançant un espectrofotòmetre Analytik Jena SPECORD® 200 PLUS (Analytik Jena, Jena, Alemanya). El substrat de la reacció consisteix en 400 µL de PNB dissolt en acetona, que es dissolen en 4,6 mL de tampó fosfat 50 mM (pH 7). 980 µL d'aquesta dissolució s'afegeixen en cubetes de 1,5 mL, juntament amb 20 µL de la mostra amb la dilució corresponent. El medi de reacció té un volum final de 1 mL, amb una concentració final de PNB de 1 mM. Es mesura el canvi d'absorbància durant 2 minuts, amb el que s'obté un pendent utilitzat per calcular l'activitat, expressada en U·mL⁻¹ (unitats d'activitat per mL). L'error estàndard relatiu ha estat menor al 8% en tots els casos.

3.4. Càlcul dels paràmetres clau del procés

3.4.1. Càlcul discret de les velocitats específiques

Per tal de calcular μ , q_s i q_p al llarg de la fermentació s'ha assignat una funció per a cada variable global d'estat (XV, SV i PV) mitjançant una aproximació per splines. Això s'ha fet aplicant la eina de "smoothing" de MATLAB R2015b Curvefit Toolbox (The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, Estats Units) a partir de les dades *off-line*, com ha estat descrit en altres casos [10]. També s'han obtingut, a partir d'aquesta aproximació, les derivades primeres d'aquestes variables globals d'estat respecte del temps, i aplicant els balanços (equacions 1-3) s'han pogut calcular la μ , q_s i q_p .

$$\mu_{(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \cdot \frac{d(XV)_t}{dt} \quad \text{eq.1}$$

$$q_{s(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \cdot \left(F_t \cdot S_e - \frac{d(SV)_t}{dt} \right) \quad \text{eq. 2}$$

$$q_{p(t)} = \frac{1}{(XV)_t} \cdot \frac{d(PV)_t}{dt} \quad \text{eq. 3}$$

3.4.2. Càlcul dels valors mitjans dels paràmetres clau del procés

Per tal d'evitar acumular errors en el càlcul de μ , q_s i q_p mitjanes degut a l'aproximació matemàtica anteriorment esmentada, s'han transformat els balanços de biomassa, substrat i producte en *fed-batch* per tal d'expressar-los en forma d'una funció lineal tal i com mostren les equacions 4, 5 i 6. D'aquesta manera, es poden calcular les velocitats específiques mitjanes ajustant les dades experimentals a les equacions de balanç a partir d'una regressió lineal.

$$\mu_{mitjana} \cdot \int_{t_0}^t (XV) dt = \int_{(XV)_0}^{(XV)} d(XV) \quad \text{eq. 4}$$

$$q_{s,mitjana} \cdot \int_{t_0}^t (XV) dt = S_e \cdot \int_{t_0}^t F dt - \int_{(SV)_0}^{(SV)} d(SV) \quad \text{eq. 5}$$

$$q_{p,mitjana} \cdot \int_{t_0}^t (XV) dt = \int_{(PV)_0}^{(PV)} d(PV) \quad \text{eq. 6}$$

Seguint aquesta metodologia s'evita utilitzar la μ estimada per a calcular la q_s o la q_p , és a dir, el càlcul de les tres velocitats específiques és independent. Això és un avantatge en processos en els quals la relació entre aquestes variables, és a dir, els rendiments biomassa/substrat o producte/biomassa, no es mantenen sempre constants. També s'ha utilitzat el mateix procediment per al càlcul dels rendiments $Y'_{X/S}$ i $Y'_{P/X}$, com mostren les equacions 7 i 8.

$$Y'_{X/S} \cdot \left[S_e \cdot \int_{t_0}^t F dt - \int_{(SV)_0}^{(SV)} d(SV) \right] = \int_{(XV)_0}^{(XV)} d(XV) \quad \text{eq. 7}$$

$$Y'_{P/X} \cdot \int_{(XV)_0}^{(XV)} d(XV) = \int_{(PV)_0}^{(PV)} d(PV) \quad \text{eq.8}$$

Per últim, per a calcular les velocitats específiques de consum d'oxigen (q_{O_2}) i producció de diòxid de carboni (q_{CO_2}) també s'ha fet a partir de regressions lineals, a partir de les equacions 9 i 10. Mitjançant l'anàlisi de les fraccions d'oxigen i diòxid de carboni en els gasos de sortida del bioreactor s'ha pogut calcular la velocitat de consum d'oxigen (OUR) i la velocitat d'emissió de diòxid de carboni (CER). Aquestes velocitats s'han integrat mitjançant el mètode dels trapezis per tal de calcular la q_{O_2} i la q_{CO_2} .

$$q_{O_2} \cdot \int_{t_0}^t (XV) dt = \int_{t_0}^t (OUR \cdot V) dt \quad \text{eq. 9}$$

$$q_{CO_2} \cdot \int_{t_0}^t (XV) dt = \int_{t_0}^t (CER \cdot V) dt \quad \text{eq. 10}$$

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

S'han realitzat diferents experiments de *fed-batch* per tal d'avaluar la relació entre diferents paràmetres cinètics de *P. pastoris* X-33 + pPICZαA::CRL1. Concretament, han estat tres fermentacions en les quals s'han mantingut constants totes les condicions d'operació excepte el cabal d'entrada del medi d'alimentació, fet que ha permès fixar, de manera aproximada, la velocitat específica de creixement mitjançant una limitació de la font de carboni. Gràcies a això s'ha assolit un estat pseudo-estacionari pel que fa a les variables cinètiques, com es comentarà més endavant. Les diferents μ fixades (μ nominals) han estat: 0,03, 0,06 i 0,09 h⁻¹.

A la Figura 1 es poden observar els perfils de concentració de biomassa (Figura 1A), substrat (Figura 1B) i producte, en forma d'activitat lipolítica (Figura 1C) obtinguts al llarg de la fermentació corresponent a la μ nominal de 0,03 h⁻¹. També es mostren les corresponents velocitats específiques de creixement, consum de substrat i síntesi de producte, respectivament, calculades en cada punt mitjançant l'aproximació per splines, com s'ha comentat anteriorment.

Com es pot comprovar a la Figura 1A, la biomassa segueix un creixement exponencial, tot i que el perfil de concentració de biomassa observat s'aproxima més a un creixement lineal. Això és pel fet que el volum no és constant; si el que es representa és la quantitat de biomassa total (en grams) sí que s'observa un perfil exponencial, com es pot observar a la Figura 3, on es mostren els perfils de concentració de biomassa (3A) i de biomassa total (3B) de les tres fermentacions. Es pot comprovar com la fase *batch* permet assolir una concentració de biomassa prou elevada. També s'observa com la μ , fixada a 0,03 h⁻¹ en aquest cas en concret, es manté relativament constant al voltant del valor fixat.

Per altra banda, en la Figura 1B s'observa que la concentració de substrat és igual a zero en totes les mostres analitzades, fet que confirma que no s'acumula metanol en el medi, i que per tant, el creixement està limitat per la font de carboni. A més, també es veu com la q_s es manté a un valor de 0,095 g S · g DCW⁻¹ · h⁻¹ durant tota la fermentació.

Finalment, a la Figura 1C es mostra que el perfil d'activitat lipolítica és similar al de la biomassa. Això indica que l'expressió de la CRL1 sota el promotor P_{AOX1} està fortament lligada al creixement, ja que l'alcohol oxidasa (AOX) és el primer enzim de la ruta catabòlica de respiració del metanol. En aquesta figura també es representa la q_p , que oscil·la més significativament que la μ o la q_s . En les altres dues fermentacions ($\mu=0,06$ h⁻¹ i $\mu=0,09$ h⁻¹) aquestes variables segueixen perfils molt similars (dades no mostrades).

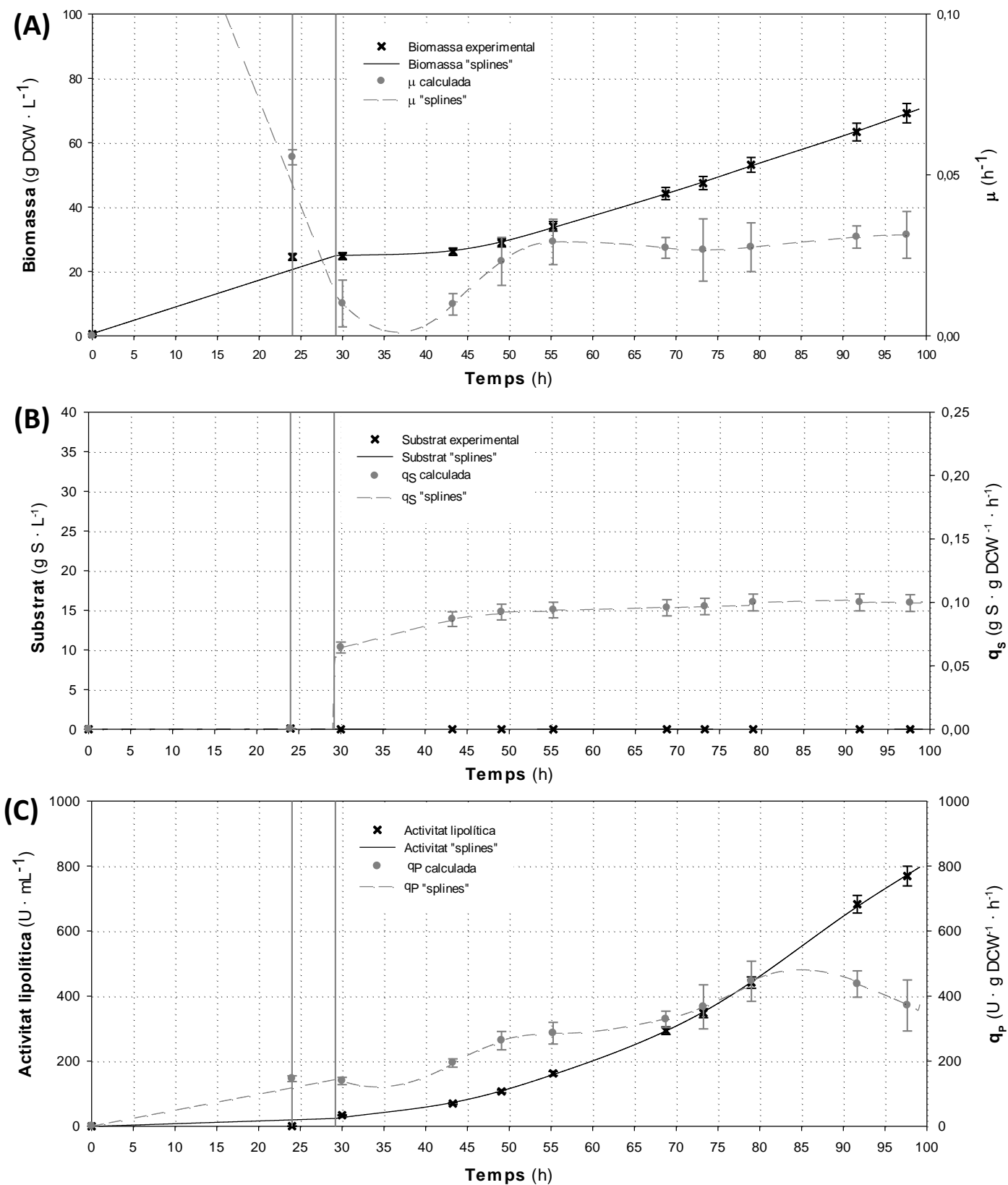


Figura 1: Evolució de les variables d'estat (concentració de biomassa **(A)**, substrat **(B)** i producte **(C)** i de les velocitats específiques de creixement **(A)**, de consum de substrat **(B)** i de síntesi de producte **(C)** al llarg de la fermentació amb $\mu=0,03\text{h}^{-1}$.

Com s'ha mencionat anteriorment, aquest sistema de creixement limitat per substrat té l'objectiu d'assolir un estat pseudo-estacionari. No totes les variables es mantenen constants, ja que tant la concentració de biomassa com de producte augmenten durant la fermentació, però sí que ho fan, en certa mesura, les variables cinètiques que caracteritzen el procés, com són μ , la q_s i la q_p . No obstant això, tot i que tota la biomassa actüi relativament igual durant tota la fermentació, l'estat fisiològic de cada cèl·lula és diferent, ja que no hi ha una renovació cel·lular com té lloc en els experiments en continu, i pot ser degut a això que els valors de q_s i q_p mitjanes difereixin dels obtinguts amb la mateixa soca en quimiostat a una mateixa velocitat específica de creixement (dades no publicades).

El fet que s'observi certa fluctuació en aquests paràmetres es deu a la robustesa del sistema; la oscil·lació que mostren la μ o la q_p es pot deure, per exemple, a l'acumulació de petits errors numèrics en el càlcul matemàtic durant l'aproximació per splines o també a errors en el càlcul de l'activitat. En canvi, un valor de q_s tant constant indica que el sistema d'addició de font de carboni i la mesura de la concentració de biomassa són molt precisos. Això és un indicatiu de que s'ha pogut mantenir un estat pseudo-estacionari de forma aproximada.

A l'hora de calcular les variables cinètiques mitjanes (μ , q_s , q_p , q_{O_2} , q_{CO_2} , $Y'_{X/S}$ i $Y'_{P/X}$) s'ha optat per realitzar el càlcul mitjançant una regressió lineal dels valors de les integrals acumulades obtingudes mitjançant els balanços, com s'ha comentat anteriorment a l'apartat de materials i mètodes. En tots els casos, el valor del coeficient R^2 d'aquestes regressions està per sobre de 0,97 excepte per al càlcul d'una de les q_p , en què és de 0,91. Els valors es troben tabulats a la Taula 1, i les regressions es mostren a la Figura 2.

Taula 1: Resum dels paràmetres cinètics i de procés obtinguts en aquest estudi. \pm indica la desviació estàndard.

μ nominal (h^{-1})	0,03	0,06	0,09
μ mitjana (h^{-1})	0,028 \pm 0,001	0,053 \pm 0,002	0,083 \pm 0,001
q_s mitjana ($g\ S \cdot g\ DCW^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,097 \pm 0,001	0,195 \pm 0,002	0,247 \pm 0,001
q_p mitjana ($U \cdot g\ DCW^{-1} \cdot h^{-1}$)	364 \pm 12	588 \pm 49	326 \pm 5
q_{O_2} mitjana ($mmol_{O_2} \cdot g\ DCW^{-1} \cdot h^{-1}$)	2,49 \pm 0,20	5,85 \pm 0,06	7,24 \pm 0,10
q_{CO_2} mitjana ($mmol_{CO_2} \cdot g\ DCW^{-1} \cdot h^{-1}$)	1,36 \pm 0,03	2,73 \pm 0,02	3,20 \pm 0,04
RQ mitjana ($mmol_{CO_2} \cdot mmol_{O_2}$)	0,54 \pm 0,10	0,47 \pm 0,02	0,44 \pm 0,03
$Y'_{X/S}$ ($g\ DCW \cdot g\ S^{-1}$)	0,286 \pm 0,002	0,270 \pm 0,008	0,338 \pm 0,005
$Y'_{P/X}$ ($U \cdot g\ DCW^{-1}$)	13155 \pm 343	11299 \pm 614	3911 \pm 99
Q_p ($U \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)	10,0 \pm 0,4	13,9 \pm 0,5	7,1 \pm 0,5
Activitat final ($U \cdot mL^{-1}$)	977 \pm 36	845 \pm 23	335 \pm 3

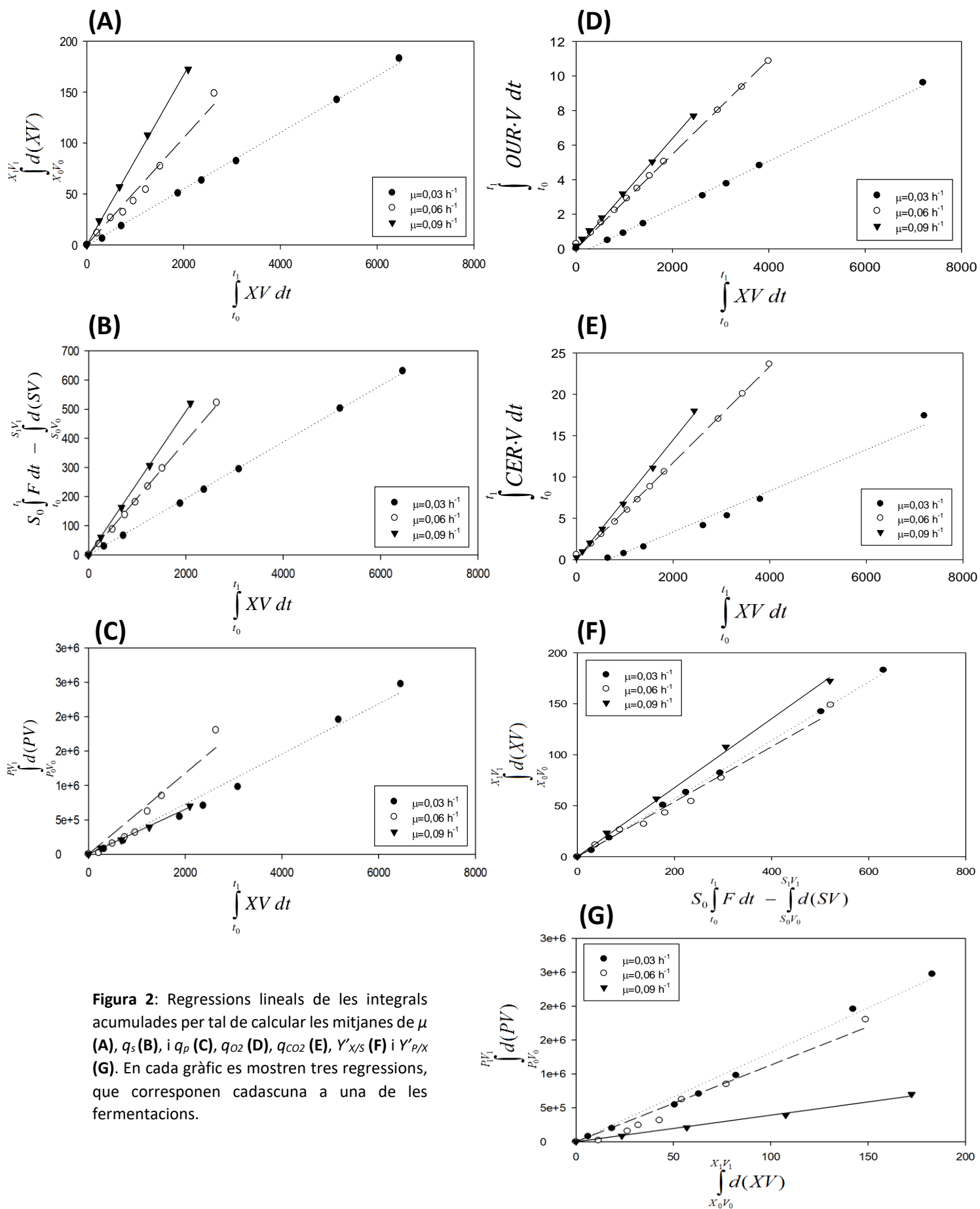


Figura 2: Regressions lineals de les integrals acumulades per tal de calcular les mitjanes de μ (A), q_s (B), i q_p (C), q_{O_2} (D), q_{CO_2} (E), $Y_{X/S}$ (F) i $Y_{P/X}$ (G). En cada gràfic es mostren tres regressions, que corresponen cadascuna a una de les fermentacions.

Aquest càlcul de variables mitjanes o globals és el que permet fer-ne una comparativa respecte la velocitat específica de creixement. No obstant això, per fer una bona comparació cal assegurar-se que la resta de variables (temperatura, agitació, concentració d'oxigen dissolt, concentració de biomassa final, etc.) s'han mantingut constants al llarg de les diferents fermentacions. Pel que fa a les variables fixades això és cert, com ja s'ha comentat a l'apartat de materials i mètodes. Pel que fa a la concentració de biomassa, en la Figura 3 es pot comprovar que en els tres experiments s'ha assolit una concentració final de biomassa al voltant dels 70 g·L⁻¹, tot i que el temps necessari per assolir-la ha estat diferent, en funció de la μ fixada. En aquesta figura també es mostra l'activitat lipolítica mesurada en les tres fermentacions, que es detecta a partir de l'inici del *fed-batch*, ja que és quan es comença a afegir metanol. A primera vista s'observa que l'augment d'activitat és més ràpid com més elevada és la μ , però també és cert que com més dura la fermentació, més activitat s'assoleix al final d'aquesta.

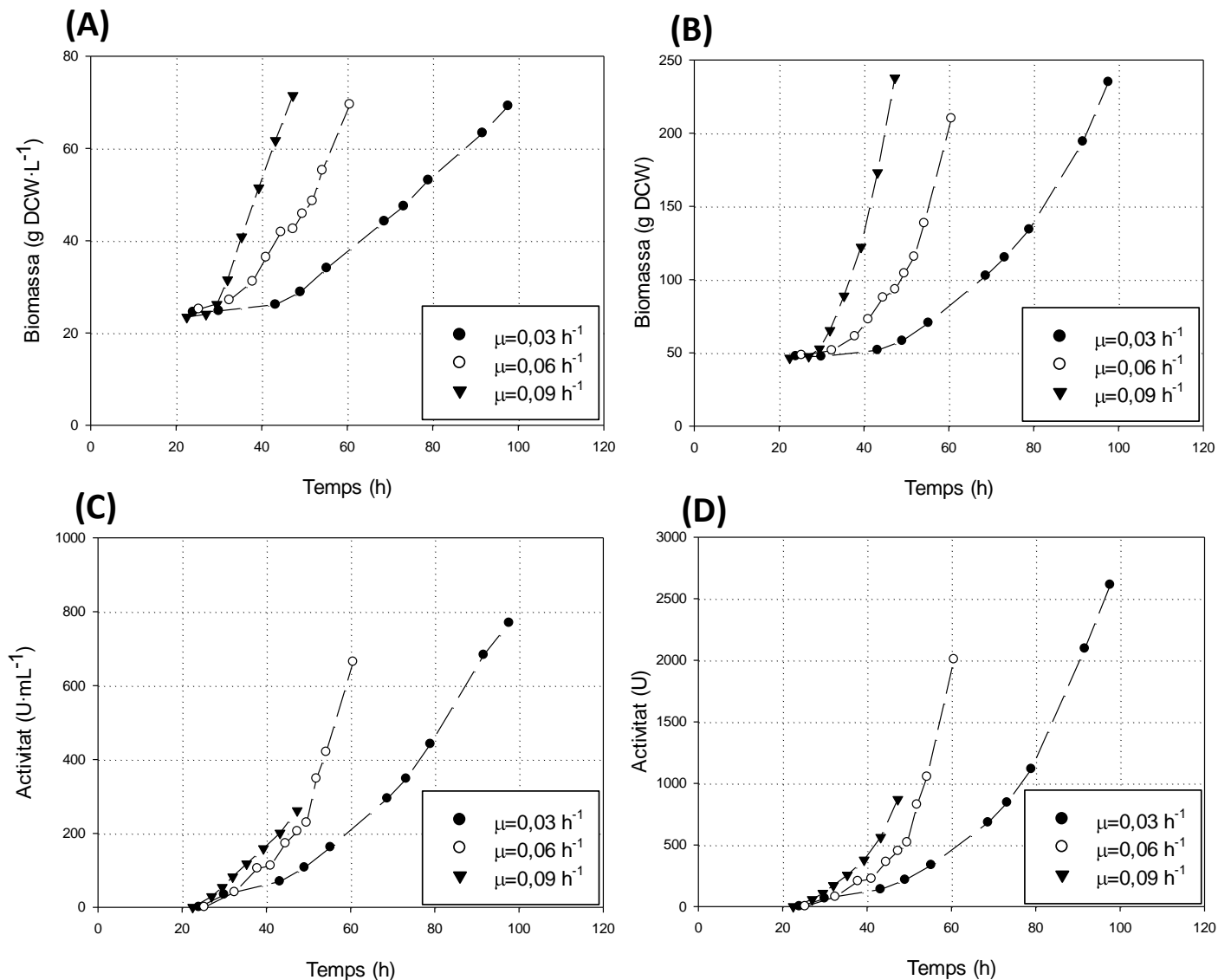


Figura 3: Perfils de concentració de biomassa (A), biomassa total (B), concentració de producte (C) i producte total (D) en forma d'activitat lipolítica al llarg del temps en les tres fermentacions.

Així doncs, per tal d'analitzar correctament quin és l'efecte de la μ en els altres paràmetres, així com per estudiar la dinàmica del sistema en conjunt, s'han representat en la Figura 4 les diferents q_s i q_p en funció de la μ , calculades com a variables globals mitjançant la regressió lineal.

Pel que fa a la q_s , a primera vista pot semblar que segueix una tendència de saturació respecte a la μ , tot i que bibliogràficament s'ha comprovat que en casos molt similars segueix un creixement proporcional conforme augmenta aquesta, és a dir, hi ha una correlació lineal entre la velocitat específica de creixement i la de consum de substrat [13,23,24]. Si s'aplica una regressió lineal entre els punts obtinguts, el valor del coeficient R^2 és de 0,943, i per tant resulta plausible pensar que es tracta d'un petit error numèric o un artefacte de l'aparell o del protocol de mesura. Aquests resultats també permeten calcular el rendiment substrat-biomassa intrínsec ($Y'_{s/x}=2,64 \text{ g S} \cdot \text{g DCW}^{-1}$), el pendent de la recta, i el coeficient de manteniment ($m_s=0,0352 \text{ g S} \cdot \text{g DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), que és el punt de tall de la recta amb l'eix d'ordenades.

Per altra banda, els resultats sí que mostren clarament que hi ha un màxim de la q_p en funció de la μ , que correspon a una μ al voltant de $0,053 \text{ h}^{-1}$. Això és consistent amb els resultats en continu (dades no publicades), on també es mostra un màxim de q_p amb una μ al voltant de $0,06 \text{ h}^{-1}$, encara que els valors de q_p no són els mateixos. L'existència d'un màxim pot ser deguda a que velocitats de creixement més elevades poden provocar que la maquinària de síntesi, plegament i secreció proteica es vegin saturades. És a dir, la velocitat de creixement cel·lular pot arribar a límits més elevats que no pas la velocitat de síntesi, plegament i secreció proteica, i per tant, a partir d'un valor determinat de μ la q_p comença a disminuir. És el que es coneix com estrès cel·lular, descrit en la bibliografia [25,26].

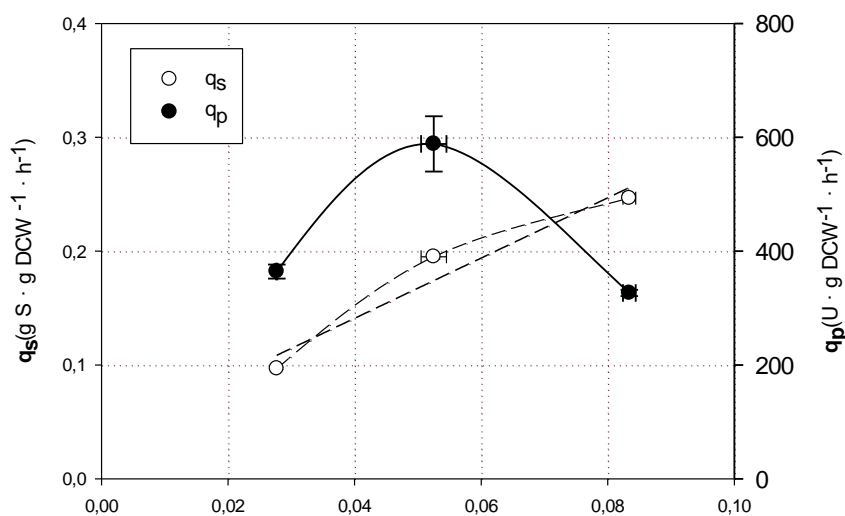


Figura 4: Efecte de la velocitat específica de creixement (μ) sobre la velocitat específica de consum de substrat (q_s) i de síntesi de producte (q_p).

Les velocitats específiques de consum d'oxigen i d'emissió de diòxid de carboni segueixen una tendència molt similar a la q_s , tal i com es pot observar a la Figura 5. Tot i que a primera vista sembli que hi ha una tendència de saturació de q_{O_2} i q_{CO_2} respecte a la μ , bibliogràficament s'ha comprovat que aquestes variables segueixen una relació lineal en sistemes molt similars, tot i que en aquest estudi el quocient respiratori (RQ) és lleugerament menor que en el cas descrit en la bibliografia, on presenta un valor constant de 0,6 mols $CO_2 \cdot mols O_2^{-1}$ [23].

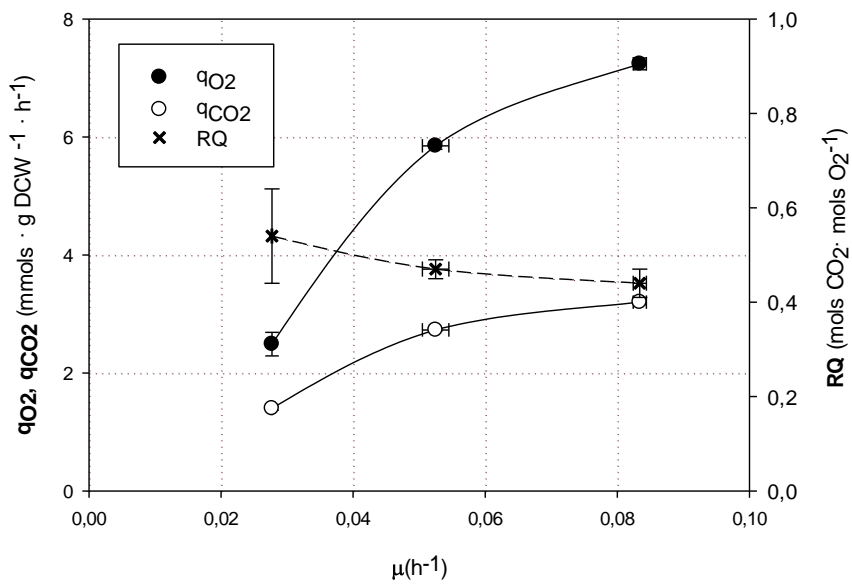


Figura 5: Efecte de la velocitat específica de creixement (μ) sobre la velocitat específica de consum d'oxigen (q_{O_2}) i de producció de diòxid de carboni (q_{CO_2}).

5. CONCLUSIONS

Es poden treure diferents conclusions d'aquest estudi. En primer lloc, el sistema implementat permet fixar una velocitat específica de creixement amb un error acceptable (un error relatiu menor al 12% entre la μ nominal i la μ mitjana assolida en aquests tres casos). Això és un indicador de la robustesa del sistema. D'igual manera, l'estat pseudo-estacionari assolit també presenta certes desviacions per les altres variables, però del tot acceptables, com s'ha pogut comprovar amb la oscil·lació de les variables q_s i q_p .

Per altra banda, també es pot afirmar que el medi utilitzat funciona bé amb metanol com a font de carboni i permet arribar a concentracions cel·lulars similars a les obtingudes amb altres medis de creixement utilitzats en sistemes semblants [27].

La conclusió més important d'aquest estudi, que tenia com a objectiu principal estudiar les relacions entre la μ , la q_s i la q_p , és que hi ha un màxim de q_p que correspon a una μ de $0,053 \text{ h}^{-1}$. Això indica la identificació d'un possible coll d'ampolla a velocitats altes del procés, probablement a les etapes de síntesi, plegament i/o secreció de la CRL1 (estrès cel·lular), ja que la síntesi d'aquesta proteïna està lligada al creixement però a partir de certa μ la q_p no augmenta proporcionalment, sinó que disminueix. Els resultats obtinguts també semblen indicar que la relació entre la q_s i la μ segueix una tendència lineal.

Des d'un punt de vista industrial, la productivitat volumètrica (Q_p) és un paràmetre clau per comparar la rendibilitat d'un procés, així com la concentració de producte, ja que aquesta última pot condicionar les posteriors etapes de purificació. Tenint en compte aquest criteri, la velocitat específica de creixement òptima estaria al voltant de les $0,053 \text{ h}^{-1}$, ja que en aquest cas la Q_p és força superior que en els altres casos (també ho és la q_p) i la concentració de producte no és gaire inferior que amb una $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$.

Finalment, també es pot afirmar que les tendències de q_s i q_p respecte μ són diferents que en d'altres sistemes similars estudiats, on s'expressava una altra lipasa (de *Rhizopus oryzae*, ROL) [23,24]. Per tant, vistes aquestes diferències cal pensar que és necessari un estudi acurat i específic de cada sistema (en funció de la soca cel·lular utilitzada, de la proteïna expressada, etc.) per tal d'optimitzar-ne els paràmetres operacionals.

6. TREBALL FUTUR

Tenint en compte els resultats obtinguts, es podria plantejar com a treball futur l'anàlisi de l'activitat intracel·lular. Això serviria per veure si s'acumula proteïna a l'interior de la cèl·lula, la qual cosa indicaria que el coll d'ampolla es troba en la secreció d'aquesta proteïna. O en cas de no haver-se acumulat, indicaria que o bé no s'ha sintetitzat i plegat de forma correcta o bé s'ha degradat, i per tant, el coll d'ampolla es trobaria en la síntesi, en el plegament o en la degradació proteica.

Segons quins fossin els resultats d'aquests anàlisis es podrien provar diferents opcions que s'ha demostrat que ajuden a millorar l'expressió recombinant. Per exemple, si el coll d'ampolla es trobés en la secreció, es podria provar de variar la seqüència d'aminoàcids del factor *α -mating* per tal d'augmentar l'eficiència de secreció [28]. Si per contra la limitació principal fos en la síntesi de la proteïna es podria utilitzar una soca multicòpia (amb varies còpies del gen) [10], o bé expressar factors de transcripció com Mit1, Mxr1 o Prm1, que s'ha demostrat que regulen positivament el promotor P_{AOX1} [29]. Per altra banda, si el coll d'ampolla es trobés en el plegament es podria provar d'expressar xaperones, que són proteïnes que ajuden al plegament d'altres proteïnes en el reticle endoplasmàtic, com per exemple Kar2p, Ssa1p o PDI (pròpies de *S. cerevisiae*) [30]. Per últim, si el problema fos degut a la degradació proteica es podria utilitzar una soca deficient en proteases, com la SMD1163 (*$\Delta his4 \Delta pep4 \Delta prb1$*) [31], o realitzar *knock-outs* d'aquestes proteases (*pep4* i *prb1*).

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Jara, J.J. Allais, J. Baratti, Isolation and characterization of a methanol utilizing yeast with high cell yield, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983) 19–23. doi:10.1007/BF00510566.
- [2] G.H. Wegner, Emerging applications of the methylotrophic yeasts, *FEMS Microbiol. Lett.* 87 (1990) 279–283. doi:10.1016/0378-1097(90)90467-5.
- [3] S.C. Spohner, H. Müller, H. Quitmann, P. Czermak, Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.* 202 (2015) 118–134. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.01.027.
- [4] G. Harrison, A. Phelps, C.E. Hubbard, High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, 28 (1988) 265–278. doi:10.1002/jobm.3620280410
- [5] J.M. Cregg, J.F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W.S. Craig, R.G. Buckholz, K.R. Madden, P. a Kellaris, G.R. Davis, B.L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velicëlebi, G.P. Thill, High–Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast, *Pichia Pastoris*, *Nat. Biotechnol.* 5 (1987) 479–485. doi:10.1038/nbt0587-479.
- [6] M.E. Digan, S. V. Lair, R.A. Brierley, R.S. Siegel, M.E. Williams, S.B. Ellis, P.A. Kellaris, S.A. Provow, W.S. Craig, G. Velicëlebi, M.M. Harpold, G.P. Thill, Continuous Production of a Novel Lysozyme via Secretion from the Yeast, *Pichia pastoris*, *Nat. Biotechnol.* 7 (1989) 160–164. doi:10.1038/nbt0289-160.
- [7] J. O’Callaghan, M. O’Brien, K. McClean, A. Dobson, Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 55–59. doi:10.1038/sj.jim.7000268.
- [8] H. Sørensen, Towards universal systems for recombinant gene expression, *Microb. Cell Fact.* 9 (2010) 27. doi:10.1186/1475-2859-9-27.
- [9] J.M. Cregg, K.R. Madden, K.J. Barringer, G.P. Thill, C.A. Stillman, Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*., *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1316–1323. doi:10.1128/MCB.9.3.1316.
- [10] O. Cos, A. Serrano, J.L. Montesinos, P. Ferrer, J.M. Cregg, F. Valero, Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures., *J. Biotechnol.* 116 (2005) 321–35. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.12.010.
- [11] O. Cos, D. Resina, P. Ferrer, J.L. Montesinos, F. Valero, Heterologous 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.* 26 (2005) 86–94.

doi:10.1016/j.bej.2005.04.005.

- [12] G. Potvin, A. Ahmad, Z. Zhang, Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review, *Biochem. Eng. J.* 64 (2010) 91–105. doi:10.1016/j.bej.2010.07.017.
- [13] X. Garcia-Ortega, P. Ferrer, J.L. Montesinos, F. Valero, Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter, *Biochem. Eng. J.* 79 (2013) 172–181. doi:10.1016/j.bej.2013.07.013.
- [14] K.-E. Jaeger, T. Eggert, Lipases for biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 390–397. doi:10.1016/S0958-1669(02)00341-5.
- [15] R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 627–662. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
- [16] S. Benjamin, A. Pandey, *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology, *Yeast.* 14 (1998) 1069–1087. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980915)14:12<1069::AID-YEA303>3.0.CO;2-K.
- [17] S. Hama, H. Noda, A. Kondo, How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks, *Curr. Opin. Biotechnol.* 50 (2018) 57–64. doi:10.1016/j.copbio.2017.11.001.
- [18] G.C. Lee, T.C. KUO, Methods for producing biodiesel by recombinant lipase. US Patent 20170137850 A1, 2017.
- [19] S. Minning, A. Serrano, P. Ferrer, C. Solá, R.D. Schmid, F. Valero, Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.* 86 (2001) 59–70. doi:10.1016/S0168-1656(00)00402-8.
- [20] E. Cámara, J. Albiol, P. Ferrer, Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains, *Biotechnol. Bioeng.* 113 (2016) 1542–1551. doi:10.1002/bit.25916.
- [21] M. Maurer, M. Kühleitner, B. Gasser, D. Mattanovich, Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Fact.* 5 (2006) 37. doi:10.1186/1475-2859-5-37.
- [22] D. Resina, O. Cos, P. Ferrer, F. Valero, Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD 1 Promoter, *Biotechnol. Bioeng.* 91 (2005) 760–767. doi:10.1002/bit.20545.
- [23] X. Ponte, J.L. Montesinos-Seguí, F. Valero, Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of PAOX1 is oxygen tension dependent, *Process Biochem.* 51 (2016) 1954–1963. doi:10.1016/j.procbio.2016.08.030.

- [24] J.M. Barrigón, F. Valero, J.L. Montesinos, A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter, *Biotechnol. Bioeng.* 112 (2015) 1132–1145. doi:10.1002/bit.25518.
- [25] S.S. Vembar, J.L. Brodsky, One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 944–957. doi:10.1038/nrm2546.
- [26] J. Hoseki, R. Ushioda, K. Nagata, Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation, *J. Biochem.* 147 (2010) 19–25. doi:10.1093/jb/mvp194.
- [27] J.M. Barrigón, J.L. Montesinos, F. Valero, Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?, *Biochem. Eng. J.* 75 (2013) 47–54. doi:10.1016/j.bej.2013.03.018.
- [28] G.P. Lin-Cereghino, C.M. Stark, D. Kim, J. Chang, N. Shaheen, H. Poerwanto, K. Agari, P. Moua, L.K. Low, N. Tran, A.D. Huang, M. Nattestad, K.T. Oshiro, J.W. Chang, A. Chavan, J.W. Tsai, J. Lin-Cereghino, The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Gene.* 519 (2013) 311–317. doi:10.1016/j.gene.2013.01.062.
- [29] X. Wang, Q. Wang, J. Wang, P. Bai, L. Shi, W. Shen, M. Zhou, X. Zhou, Y. Zhang, M. Cai, Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Promoter in *Pichia pastoris*, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 6245–6261. doi:10.1074/jbc.M115.692053.
- [30] W. Zhang, H. -l. Zhao, C. Xue, X. -h. Xiong, X. -q. Yao, X. -y. Li, H. -p. Chen, Z. -m. Liu, Enhanced Secretion of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris* Following Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Chaperone Proteins, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1090–1095. doi:10.1021/bp060019r.
- [31] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 5301–5317. doi:10.1007/s00253-014-5732-5.