

Universidad Autónoma de Barcelona
Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental

***Ingeniería genética y control fisiológico en
condiciones de limitación de oxígeno para la
mejora de la eficiencia del bioproceso de
producción de proteína recombinante en *Pichia
pastoris****

Pol Reguera Cañadilla

Máster en Ingeniería Biológica y Ambiental

24 de Enero de 2020

Tutores: Francisco Valero Barranco, José Luis Montesinos Seguí

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Microorganismo	6
2.2. Métodos de cultivo	6
Preparación del inóculo.....	6
Medios de cultivo	6
Operación en continuo.....	7
2.3. Métodos analíticos.....	9
Cuantificación de la biomasa	9
Cuantificación de la actividad lipolítica.....	9
Cuantificación de subproductos y fuente de carbono	10
Análisis de los gases de salida	10
2.4. Determinación de los parámetros de proceso y cumplimiento de los balances	11
2.5. Reconciliación de datos	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.2. Consumo de sustrato y oxígeno y producción de dióxido de carbono	17
3.3. Producción de subproductos	19
3.4. Evolución de rendimiento biomasa/sustrato, actividad lipolítica y coeficiente respiratorio.....	20
3.5. Tabla Resumen de los parámetros más destacados	22
3.6 Relación entre la q_P y la RQ	23
4. CONCLUSIONES	25
5. AGRADECIMIENTOS	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

La levadura *Pichia pastoris* es ampliamente utilizada hoy en día como plataforma de producción de proteínas recombinantes (PPR) gracias a sus numerosas ventajas. Por ello, son muchos los estudios realizados para buscar mejoras de estos procesos. Estas mejoras se pueden plantear principalmente de dos maneras; realizando estudios sobre cómo mejorar la cepa utilizando ingeniería genética o buscando nuevas estrategias operacionales para mejorar la eficiencia del bioproceso.

En estudios previos se ha visto que la aplicación de condiciones hipóxicas (limitación de oxígeno) en cultivos con glucosa como fuente de carbono se ha traducido en un aumento notable de la velocidad específica de producción de proteína (q_p), bajo la regulación del promotor GAP.

En el presente estudio se ha encontrado un máximo de productividad específica subministrando una mezcla de aire y nitrógeno con una composición de un 10% de oxígeno, alcanzando valores por encima de 5 veces mayor que en condiciones sin limitación de oxígeno.

También se ha relacionado los valores de q_p con el cociente respiratorio (RQ), encontrando así una manera de optimizar la productividad relacionándola con el estado fisiológico de los microorganismos y no con el sistema de operación.

Destacado:

- Estudio del efecto de la limitación de oxígeno sobre la q_p .
- Efecto del aumento de la dosis génica en la q_p .
- Estudio del cociente respiratorio como parámetro de control de la fermentación.

Keywords: *CRL1, cultivo continuo, hipoxia, Pichia pastoris, P_{GAP}, RQ.*

1. INTRODUCCIÓN

Los bioprocessos están sustituyendo cada vez más a los procesos químicos convencionales teniendo un mayor impacto en la percepción por parte de la sociedad de esta necesidad. Esto es debido, entre otras muchas cosas, a su menor impacto ambiental gracias a que la mayoría de los medios de cultivo se encuentran en medio acuoso, no se suelen necesitar altas temperaturas ni presiones para realizar las bioreacciones, se reducen los pasos intermedios de éstas, se puede evitar el uso de catalizadores tóxicos al ser sustituidos por microorganismos y otros puntos importantes [1].

La gran cantidad de productos “bio” de alto valor añadido asociados a bioprocessos ha derivado en que la industria biotecnológica se convierta en una industria multimillonaria [2], motivo por el cual, en las últimas décadas ha habido un gran interés en el estudio de los microorganismos, encargados de llevar a cabo los bioprocessos, gracias a todos los avances y al completo conocimiento del genoma de muchos de ellos [3]. Todo esto ha llevado a la posibilidad de seleccionar el mejor sistema de expresión en cuanto a parámetros de producción, rendimientos y costes en función del bioproducto [4].

En general se ha visto que las bacterias son excelentes sistemas de expresión con los cuales se pueden establecer procesos de bajo coste y alta producción. Aun así, su gran desventaja es la no capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales como por ejemplo la glicosilación de proteínas. Por ello, han ganado un papel fundamental las levaduras, que disponen simultáneamente de ventajas propias tanto de los microorganismos procariotas como de los eucariotas [5].

Las levaduras han sido, y son, una de las factorías celulares más utilizadas, y por ende una de las más estudiadas para llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes gracias a su eficacia y versatilidad [6]. Por lo general, tienen la capacidad de crecer hasta altas densidades celulares

en medios de cultivo definidos, hay mucha información tanto para su manipulación genética como para manipulaciones post-traduccionales y permiten alcanzar altos valores de productividad específica de proteínas recombinantes [7-8].

Entre las levaduras utilizadas como factorías celulares para la producción de proteínas recombinantes, una de las más destacadas es *Pichia pastoris*, una levadura metilotrófica, capaz de usar metanol como única fuente de carbono aunque también se suele usar otras fuentes de carbono como glucosa o glicerol. *P. pastoris* ha sido estudiada durante los últimos años hasta convertirse en un eficiente sistema de expresión de proteínas recombinantes [8-9].

También cabe remarcar que esta levadura puede llegar a densidades celulares superiores a 100 gramos de biomasa por litro de medio de cultivo, tiene la capacidad de secretar las proteínas de interés al medio extracelular [10], y presenta bajos niveles de secreción de las proteínas nativas (hecho que facilita mucho su posterior purificación en las etapas del *downstream*). Además, dispone de una gran variedad de promotores que se pueden utilizar, como por ejemplo, el promotor fuerte y regulable de la alcohol-oxidasa P_{AOX1} o el promotor constitutivo de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa P_{GAP} . [11]

El promotor P_{AOX1} fue de los primeros que se usó para la regulación de la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, y hoy en día sigue siendo de los más usados, ya que se usa el metanol, inductor de este promotor, tanto como fuente de carbono como inductor para la expresión. Sin embargo, el uso de metanol tiene ciertas desventajas frente al uso de otras fuentes como glucosa o glicerol, al ser una substancia inflamable y peligrosa requiriendo de unas condiciones de seguridad, manipulación y acondicionamiento de instalaciones nada despreciables. [6].

El promotor constitutivo P_{GAP} ha sido usado comúnmente para la expresión de proteínas heterólogas utilizando glucosa o glicerol como fuente de carbono [6]. Son varias las ventajas de este promotor frente al P_{AOX} [12-13].

A diferencia de los sistemas regulados por el P_{AOX1} , dónde la expresión de la proteína está condicionada por la disponibilidad del metanol como inductor del promotor, con la regulación del P_{GAP} , la expresión de la proteína ocurre simultáneamente con la crecimiento ya que el P_{GAP} se encuentra de manera natural dentro de la glicólisis [14].

A parte de la optimización de a cepa productora (selección del promotor, ingeniería genética, etc.), también se puede mejorar la eficiencia de un bioproceso optimizando las condiciones de operación [15].

Cuando se habla de producción en bioprocesos, el método de operación mayormente utilizado por su alta capacidad de producción y sus altas densidades celulares alcanzadas es el *Fed-Batch* (operación en discontinuo con alimentación) [16]. No obstante este modo de operación es el más complejo de operar, así que si el objetivo es la búsqueda de las mejoras operacionales identificando los rangos óptimos de operación de alguno de los parámetros para maximizar la producción, se puede simplificar notablemente si se realiza en continuo en un quimiostato. Para ello se debe de llegar a un estado estacionario manteniendo controladas ciertas variables y modificando el parámetro el cual se quiera optimizar.

Dentro de las posibles mejoras del proceso, se ha podido comprobar en estudios previos [3] que disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto en el sistema de un cultivo de *P. pastoris* creciendo con glucosa como fuente de carbono, se consigue en un aumento de la expresión de la proteína de interés a causa de la sobreexpresión de algunos genes presentes en la ruta de la glicólisis y afectados por la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto, desde cultivos con exceso de oxígeno hasta condiciones de hipoxia fuerte, en varias variables relacionadas con la producción y las diferentes productividades. También se estudiará la evolución de la producción de CO_2 y de consumo de oxígeno y su cociente respiratorio (RQ) para intentar encontrar la dependencia entre estos parámetros y la velocidad específica de

producción (q_p) tanto de la proteína como de posibles metabolismos producidos al variar las condiciones de oxigenación.

Como el valor de RQ no depende de la capacidad de transferencia de oxígeno del sistema ni de ninguna otra variable propia de los biorreactores, sino que depende del estado fisiológico de las células, puede ser un parámetro óptimo para implementar con éxito un cambio de escala.

En este trabajo se va a producir la lipasa procedente de la levadura *Candida Rugosa* (Crl1). Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster, aunque también pueden hacer la reacción inversa (formación de los enlaces éster) según el medio en el que se encuentren, ya que como en toda hidrólisis (la reacción de romper el enlace éster utilizando agua), si se hace en medio acuoso, se puede revertir la reacción. El punto fuerte se encuentra en el poder de obtención de compuestos ópticamente puros gracias a su capacidad enantioselectiva.

Por lo tanto, la lipasa Crl1 se va a expresar extracelularmente en *P. pastoris* bajo la regulación del promotor P_{GAP} , utilizando glucosa como fuente de carbono. Se trabajará con dos clones diferentes, la *Single Copy* (SC), la cual tiene una copia del gen de la CRL1, y la *Multi Copy* (MC) la cual contiene cinco copias del gen.

Todos los experimentos realizados corresponden a réplicas de un estudio previo [17], por lo cual en este trabajo también se llevará a cabo la comparación de los experimentos actuales con los hechos previamente, realizándose el correspondiente tratamiento estadístico de los datos resultantes y la reconciliación de éstos. De este modo, se podrá discernir qué aspectos o puntos pueden ser más susceptibles o sensibles de cambio dentro de la variabilidad del sistema.

A parte, se han recogido muestras para un futuro análisis transcriptómico de la expresión génica, que será de vital importancia para completar un estudio más amplio y así poder establecer o proponer las posibles causas a nivel de expresión de los cambios fisiológicos observados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo

La cepa que se utilizó fue la X-33 de *P. pastoris* utilizando el vector pGAP α A-CRL1 para la expresión del gen de la lipasa 1 de *Candida Rugosa* (CRL1) bajo la regulación del promotor constitutivo GAP.

Se utilizaron dos variaciones (clones) de esta cepa, la *single copy* (SC) que tenía una copia del gen responsable de la expresión de la proteína, y la *multi copy* (MC) que tenía cinco copias de este gen [18].

2.2. Métodos de cultivo

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 0,5L de volumen a partir de unos criostocks previamente preparados, los cuales se mezclaron con 75 mL de medio YPG (Yeast extract, Peptone, Glycerol y se utilizó zeocina como marcador de selección), durante aproximadamente 24 horas, 25°C y 130 rpm para llegar a la OD de entre 12-15 (la deseada para inocular el *batch*).

Medios de cultivo

El medio de cultivo del *batch* utiliza glicerol como fuente de carbono junto a una serie de sales y ácido cítrico. El uso de glicerol en el *batch* se debe a que estudios previos determinaron que es mejor fuente de carbono que la glucosa [12] en términos de rendimiento biomasa/substrato, sin formación de subproductos ni formación de agregados de biomasa en forma de gránulos.

El medio de cultivo contenía las siguientes cantidades por litro: 1.8 g de ácido cítrico, 39.9 g de glicerol, 12.60 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.90 g de KCl, 0.02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.60 ml de sales traza y 2 ml de biotina (0.2 g/L).

Para ello el medio de cultivo se esterilizó mediante autoclave junto al biorreactor antes de ser inoculado, y posteriormente se injectó por el septum, y utilizando como método de esterilización una microfiltración con filtros de 0.22 μm , las sales traza [19] y la biotina ya que éstas son termolábiles.

El medio para el cultivo continuo en quimiostato (fase continua) se esterilizó mediante un filtro hidrofílico de 0,2 μm *Sartopore2* de *Sartorius Stedim* (Gotinga, Alemania), excepto el antiespumante (Glanapon) que se esterilizó en autoclave junto con la botella dónde se filtraría el medio de cultivo, ya que éste era demasiado viscoso.

El medio de cultivo en continuo contenía las siguientes cantidades por litro: 0.918 g de ácido cítrico, 50.0 g de glucosa, 4.35 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.650 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.70 g de KCl, 0.01 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.62 ml de sales traza y 1 ml de biotina (0.2 g/L).

Tanto en la fase *batch* como en la fase continua el control del pH se realizó mediante la adición de hidróxido de amonio (15% v/v).

Operación en continuo

Las fermentaciones se realizaron en un reactor de 2L *Biostat B Braun Biotech* (Melsungen, Alemania), con un volumen operativo de 1 L.

Las condiciones de cultivo se controlaron y monitorizaron en los siguientes valores: Temperatura a 25 °C controlada a través de una camisa conectada a un criostato externo. La consigna del pH fue de 6.00, utilizando la sonda 405.DPAS.SC.K8S de *METTLER TOLEDO* (Columbus, Estados Unidos) y hidróxido de amonio (15% v/v). La velocidad de agitación se mantuvo en un valor fijo

de 700 rpm durante los experimentos en continuo. Éste valor se manipuló durante la fase de *batch* para controlar el valor de la pO_2 por encima del 30% de saturación con aire mediante una sonda polarimétrica de oxígeno disuelto *InPro 6820 de METTLER TOLEDO* para asegurar así que en ningún momento la levadura se quedase en condiciones de limitación por oxígeno.

El caudal de gases de entrada se mantuvo constante en un valor de 0.8 L/min. Las distintas concentraciones de oxígeno fijadas en el aire de entrada para cada uno de los estados estacionarios (21%, 14%, 12%, 11%, 10%, 9% y 8%), se lograron haciendo diferentes mezclas de aire y nitrógeno en la entrada. Estos gases se suministraron a través de unos caudalímetros básicos *El-Flow de Bronkhorst* (Ruurlo, Países Bajos).

El biorreactor operó a una sobrepresión constante de 0.2 bares, para intentar reducir así posibles contaminaciones.

La velocidad de dilución (D) se fijó en 0.10 h^{-1} , realizándose la adición de sustrato mediante una bomba peristáltica *ISM930C de ISMATEC* (Wertheim, Alemania).

Los gases de salida pasaron a través de un filtro hidrofóbico de $0.2 \mu\text{m}$ de *Millipore* (Burlington, Estados Unidos), y por una torre de secado para que se reduciera en lo posible la humedad que pudieran contener, de ahí finalmente fueron a los analizadores de gases de *Bluesens* (Herten, Alemania), donde se midieron las concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono y la humedad correspondiente.

Para cada una de las condiciones implementadas, con su respectiva concentración de oxígeno en los gases de entrada, se dejó llegar al estado estacionario. Para ello se sacó muestra al tercer, cuarto y quinto tiempo de residencia (τ) [16] y si los valores de concentración de biomasa y producto en el medio de cultivo coincidían, así como las concentraciones de oxígeno y CO₂ en los gases de salida, se consideraba que se había llegado al estado estacionario. Según la velocidad de dilución (D) implementada el valor de τ fue de 10 h.

2.3. Métodos analíticos

Cuantificación de la biomasa

Para la cuantificación de la biomasa, se determinó por cuadruplicado el peso seco (DCW) de la muestra recién sacada del fermentador. Para ello, se utilizaron filtros de fibra de vidrio de 0.22 μm de *Millipore* (Burlington, Estados Unidos), previamente secados y tarados. Para su uso, estos filtros se humedecieron con una solución de NaCl (0.9% v/v). En cada filtro se añadieron 2 ml de muestra. Posteriormente se introdujeron en la estufa a 105°C durante 24 horas y seguidamente en el desecador durante dos horas previamente a su pesada [16].

También, después de cada muestreo se estimó la concentración de biomasa a partir de la medida de densidad óptica mediante un espectrofotómetro *Lange DR3900* de *Hach* (Loveland, Estados Unidos), a una longitud de onda de 600 nm. Aunque es mucho más fiable y robusto el valor del peso seco, con la absorbancia se pudo estimar de una manera sencilla y rápida un valor aproximado de la biomasa para así poder tener una idea de la evolución de la fermentación.

Cuantificación de la actividad lipolítica

En cada muestreo se centrifugó parte de la muestra a 13400 rpm durante 90 segundos en una centrífuga *MiniSpin® de Eppendorf* (Hamburgo, Alemania) y se guardó el sobrenadante a -20 °C. La cuantificación de la proteína de interés (Crl1) se llevó a cabo determinando la actividad enzimática usando p-nitrofenil butirato (pNPB) como sustrato, ya que la lipasa de interés hidroliza este sustrato dando lugar a un producto cromóforo. De este modo, se determina la concentración de lipasa en función de la actividad lipolítica midiendo el aumento de absorbancia al poner en contacto la lipasa con el sustrato, a una longitud de onda de 358nm en un espectrofotómetro *Specord 200 Plus, Analytic Jena* (Jena, Alemania) [21].

Cuantificación de subproductos y fuente de carbono

En cada cultivo en quimiostato que se llevó a cabo se determinó la concentración de glucosa en la alimentación al inicio y final del mismo, para poder descartar posibles cambios en su concentración.

Es importante conocer también la concentración de subproductos (etanol, arabinol y ácido succínico) que se pueda generar durante la fermentación, ya que a partir de ciertas condiciones hipóxicas ya empieza a cambiar el metabolismo hacia un metabolismo respiro-fermentativo.

Para ello, se midió la concentración de todos estos componentes mediante HPLC con un cromatógrafo líquido *HP 1050* de *Dionex Corporation* (Sunnyvale, Estados Unidos) equipado con una columna *ICSep Eq. 1 7 ICE COREGEL 87H3* de *Transgenomic Inc.* (Omaha, Estados Unidos) y una fase móvil de ácido sulfúrico 8 mM disuelto en agua ultrafiltrada.

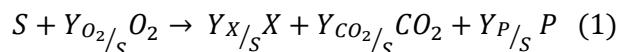
Análisis de los gases de salida

Es importante saber la composición del oxígeno y del dióxido de carbono en la salida para poder determinar los valores de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), de producción de dióxido de carbono (CER) y el coeficiente respiratorio (RQ). Estas composiciones de los gases y su humedad se cuantificaron a partir del analizador *BlueInOne*, el cual se calibró después de cada condición, haciendo pasar varias botellas de mezcla de gases con diferentes composiciones de oxígeno y dióxido de carbono conocidas para poder así, realizar una recta de calibrado.

2.4. Determinación de los parámetros de proceso y cumplimiento de los balances

En este apartado se presentan y definen las variables de proceso de mayor importancia y el cálculo utilizado para así ayudar a interpretar y obtener más información de los cultivos.

En este estudio se ha realizado el balance de carbono, el cual se puede observar en la ecuación 1 de una manera simplificada:



Donde S es la fuente de carbono, $Y_{i/S}$ es el rendimiento global del componente "i" respecto al sustrato (ambos en base a los moles de carbono) y P es el producto de interés (lipasa) o posibles subproductos.

En la realización de los balances de materia, a esta expresión se le puede simplificar el término $Y_{P/S} P$ ya que el carbono asociado a la producción de proteína en comparación al carbono asociado al CO₂ y a la biomasa es despreciable, aunque en las condiciones más hipóxicas los rendimientos de los metabolitos pueden llegar a tener una influencia alrededor de un 5% en el balance (en el caso del etanol), de manera que el balance en C-mol se puede expresar de la siguiente manera:

$$1 = Y_{CO_2/S} + Y_{X/S} + Y_{P/S} \quad (2)$$

Siendo P en este caso los subproductos, no la lipasa.

Dos de los principales parámetros en una fermentación son las concentraciones del O₂ y el CO₂ para poder determinar las velocidades de consumo y producción de éstos. De éste modo se puede definir *OUR (Oxygen Uptake Rate)* como la velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos.

Cuando nos encontramos en estado estacionario, si se considera que la variación de oxígeno disuelto en el tiempo es prácticamente cero, se puede calcular la OUR de la siguiente manera:

$$OUR = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{ent,O_2} - X_{sort,O_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O_2} - X_{ent,CO_2} - X_{ent,H_2O})}{(1 - X_{sort,O_2} - X_{sort,CO_2} - X_{sort,H_2O})} \right] \quad (3)$$

Dónde: k' : Factor de conversión (2.677 mol·min·l⁻¹·h⁻¹; P : 1.0 atm i T : 273 K) (en condiciones normales); V_R : Volumen del reactor (L); F_{ent} : Caudal aire de entrada (L·min⁻¹); X_{ent,CO_2} : Fracción molar de CO₂ del corriente del gas de entrada (aire ~ 0.0400 %); X_{sort,CO_2} : Fracción molar de CO₂ del corriente del gas de salida; X_{ent,O_2} : Fracción molar de O₂ del corriente del gas de entrada (aire ~ 20.97 %); X_{sort,O_2} : Fracción molar de O₂ del corriente de gas de salida.; X_{ent,H_2O} : Fracción molar H₂O del corriente de gas de entrada (~ 0 %); X_{sort,H_2O} : Fracción molar H₂O del corriente de gas de salida.

Para poder saber la OUR se necesita saber las composiciones (fracciones) del oxígeno en la entrada (valor fijado) y el de la salida (se obtiene del analizador de gases), al igual que se debe conocer el caudal de entrada y salida. Normalmente sólo se mide el caudal a la entrada, por lo que se debe encontrar alguna alternativa para poder calcular el caudal a la salida.

Para ello se utilizará el balance de inertes, considerando que éstos no intervienen en la biorreacción y por tanto su caudal de salida es igual al de entrada.

En la ecuación (3) aparece el término de humedad a la entrada (X_{ent,H_2O}). Se registró la humedad de los gases de servicio y al verse la baja influencia de este parámetro en la ecuación de la OUR se decidió no tenerlo en cuenta.

Respecto a la producción de dióxido de carbono se calcula la *CER* (*CO₂ Evolution Rate*) como la velocidad de producción de CO₂ a causa del crecimiento y del consumo de sustrato del microorganismo.

Este parámetro tiene el mismo procedimiento de cálculo que la OUR pero teniendo en cuenta que no es un consumo sino una producción (Ecuación 4).

$$CER = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{sort,CO_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O2} - X_{ent,CO2} - X_{ent,H2O})}{(1 - X_{sort,O2} - X_{sort,CO2} - X_{sort,H2O})} - X_{ent,CO2} \right] \quad (4)$$

Tanto la OUR como la CER son velocidades volumétricas totales (teniendo en cuenta toda la biomasa), estas variables se pasan a velocidades específicas (q) dividiéndose por el valor de la biomasa (X).

Considerando que el reactor es un tanque agitado ideal, se pueden calcular los siguientes parámetros, siguiendo el balance de masa para una operación en continuo en el estado estacionario, a partir de la siguiente expresión:

$$\begin{bmatrix} \mu \\ q_s \\ q_i \\ q_{O_2} \\ q_{CO_2} \end{bmatrix} XV = \begin{bmatrix} F_{sal} \\ -F S_0 + F_{sal} S \\ F_{sal} I \\ OUR V \\ CER V \end{bmatrix} \quad (5)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}); q_s , velocidad de consumo específico de sustrato ($(Cs\text{-mol}/h)/Cx\text{-mol}$); q_i , la velocidad específica de producción del componente “i”, siendo este el producto principal o cualquiera de los subproductos (g/gXh); q_{O_2} , velocidad específica de consumo de oxígeno ($(mol\ O_2/h)/Cx\text{-mol}$); q_{CO_2} , velocidad específica de producción de dióxido de carbono ($(mol\ CO_2/h)/Cx\text{-mol}$); F , caudal de entrada de sustrato (ml/min); F_{sal} , caudal de salida (ml/min); X , concentración de la biomasa (g/L); V , volumen del reactor (L); I , concentración del componente “i” (g/L) y S , la concentración de sustrato (g/L) a la salida (prácticamente 0 en todas las condiciones).

Todas estas variables se han transformado a $C\text{-mol}$, dividiendo las concentraciones másicas que aparecen en los balances entre su peso molecular (PM) en $C\text{-mol}$.

La concentración del producto de interés se ha dado en unidades de actividad (UA), no siendo necesario expresarlo en *C-mol* pues se considera negligible su aportación a los balances de materia.

También ha sido realizado el balance redox, el cual muestra como son distribuidos, en la reacción, los electrones disponibles entre el sustrato, productos, biomasa y oxígeno. Este número de electrones es calculado a partir de la valencia de varios elementos [16].

El grado de reductancia (γ) es definido como el número de electrones disponibles equivalentes en un componente por mol de carbono.

$$1 = \frac{4}{\gamma_s} \cdot Y_{O_2/S} + \frac{\gamma_X}{\gamma_s} \cdot Y_{X/S} + \frac{\gamma_P}{\gamma_s} \cdot Y_{P/S} \quad (6)$$

Por lo tanto, como se aprecia en la ecuación 6, se puede expresar este balance electrónico como una suma de fracciones, siendo estas fracciones los distintos destinos de los electrones del sustrato (oxígeno, biomasa y productos respectivamente).

2.5. Reconciliación de datos

Se ha aplicado una reconciliación de datos a partir de un tratamiento estadístico estándar utilizando como restricción los valores de los balances de carbono y redox. Esta reconciliación se ha estimado a partir de los errores de siete velocidades específicas; μ , q_{CO_2} , q_{O_2} , q_s y las producciones de los tres subproductos, cumpliéndose el nivel de confianza de 0,95. Este método fue descrito con detalle en estudios previos [22,23].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron una serie de experimentos réplica [17] para confirmar la robustez de los resultados, al igual que poder encontrar ciertas controversias o puntos más sensibles.

A continuación, en las diferentes figuras se presentan los resultados de los parámetros más importantes en las fermentaciones, priorizando la productividad específica de la lipasa 1 de *C. rugosa* (producto de interés). Estos valores son directamente las medias de las dos réplicas con su correspondiente barra de error (desviación), comparando por separado el clon SC y el clon MC, para poder ver a la vez la influencia de la dosis génica y la fracción de oxígeno en los gases de entrada.

El rango de las diferentes condiciones de oxígeno en el gas de entrada va desde la condición de “normoxia” (21%), hasta una condición de hipoxia fuerte (8%), analizándose un total de 7 condiciones entre estos valores.

Este rango se ha elegido basándose en estudios previos [24] en los cuales se comprobó que para condiciones de hipoxia por debajo del 8%, tanto la producción de la proteína de interés como la viabilidad celular descendían drásticamente. Para confirmar este hecho se probó y se confirmó que en condiciones tan fuertemente hipóxicas se llegaba al lavado del reactor ($D > \mu_{\max}$).

Es importante remarcar que con los datos finales se deben cumplir tanto el balance de carbono como el balance redox. Los balances se mantuvieron en la gran mayoría de casos por encima del 95% antes de realizar la reconciliación, ya indicada en el apartado de materiales y métodos.

Es importante destacar que las velocidades (productividades) representadas son específicas, ya que no en todas las condiciones se dispone del mismo valor de biomasa, la cual va disminuyendo conforme aumentan las condiciones de hipoxia.

3.1. Evolución de los principales parámetros de cultivo

En la figura 1 se puede comprobar cómo afecta la limitación de oxígeno a diferentes variables del cultivo, pudiéndose diferenciar tres zonas con diferente comportamiento [24].

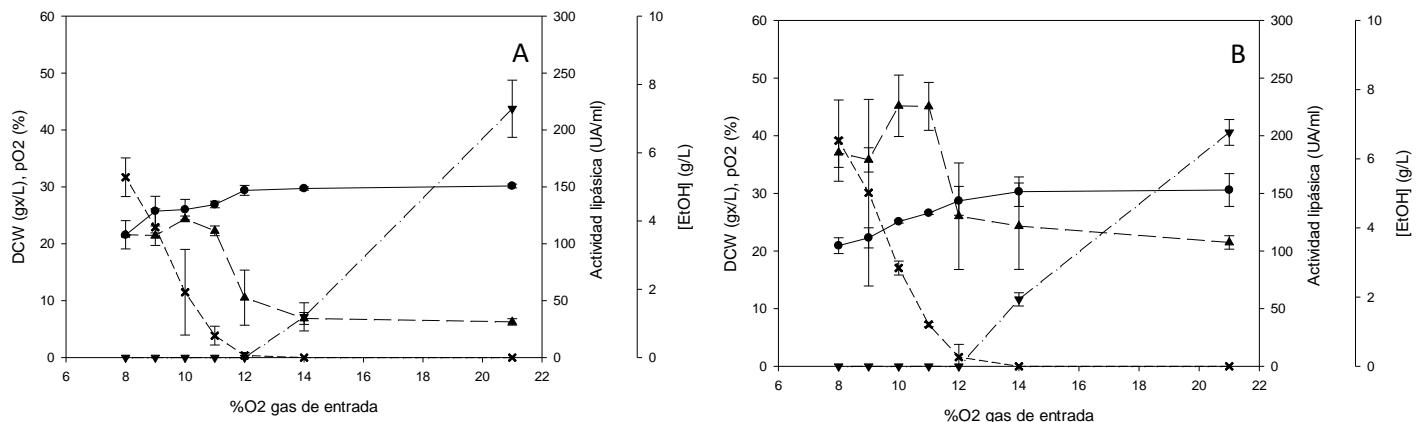


Figura 1. Evolución de la concentración de etanol (X), pO₂ (▼), biomasa (●) y de la actividad lipolítica (▲) en función de la fracción de oxígeno del gas de entrada. (A) Clon SC y (B) clon MC. Las barras de error indican la desviación entre las réplicas.

La primera (condiciones del 21 y 14%), es aquella zona donde el oxígeno no es un factor limitante (hecho demostrable con los valores positivos que tiene la pO₂), a la vez que se puede evidenciar por la no acumulación de glucosa en el cultivo y la no aparición de etanol (ambos analizados con el HPLC). Estos hechos confirman que el estado fisiológico de los microorganismos sigue siendo el mismo (metabolismo respiratorio), hecho que se traduce también en la no variación de la concentración de la biomasa (DCW) y en una actividad lipolítica prácticamente igual.

La segunda zona se comprende entre la condición del 14 y 12%, es una zona de transición entre el metabolismo respiratorio y el respiro-fermentativo, ya que empiezan a haber ciertos cambios en las distintas variables presentadas en la figura pero sin demasiada trascendencia. Aunque la pO₂ tenga un valor de ~ 0 no tiene porqué significar que haya limitación de oxígeno, ya que puede corresponder perfectamente a una situación en que todo el oxígeno que entra en el sistema es consumido por la actividad celular. Sin embargo, se aprecia como empieza a aparecer etanol y cómo la actividad lipolítica aumenta ligeramente, al igual que la concentración de la

biomasa empieza a descender. Por lo tanto se puede concluir que en esa zona es donde se empieza a observar una pequeña limitación de oxígeno.

La tercera zona se puede apreciar a partir de la condición del 11%, cuando de verdad se observa un gran cambio, aumentando considerablemente tanto la aparición de etanol como la actividad, llegándose a los máximos de actividad alrededor de la condición del 10% y llegando en la condición más hipoxica (8%) a concentraciones de etanol cercanas a 7 g/L. La concentración de la biomasa, en cambio, sigue disminuyendo aunque con una tendencia más lineal. Esta condición por lo tanto, se puede considerar como una condición fuertemente afectada por la limitación de oxígeno.

Entre los dos clones el único cambio considerable detectable es el aumento de la actividad enzimática, alcanzándose con la MC valores que prácticamente duplican los obtenidos con el SC.

3.2. Consumo de sustrato y oxígeno y producción de dióxido de carbono

En la figura 2 se pueden apreciar las velocidades específicas de consumo de sustrato y oxígeno como también la q_{CO_2} . Se puede ver claramente las zonas descritas anteriormente en la figura 1. En la primera zona donde la pO_2 es superior a cero se ve, al igual que se veía en la figura 1, como estas velocidades específicas se mantienen constantes, confirmando que no hay ningún cambio fisiológico celular importante.

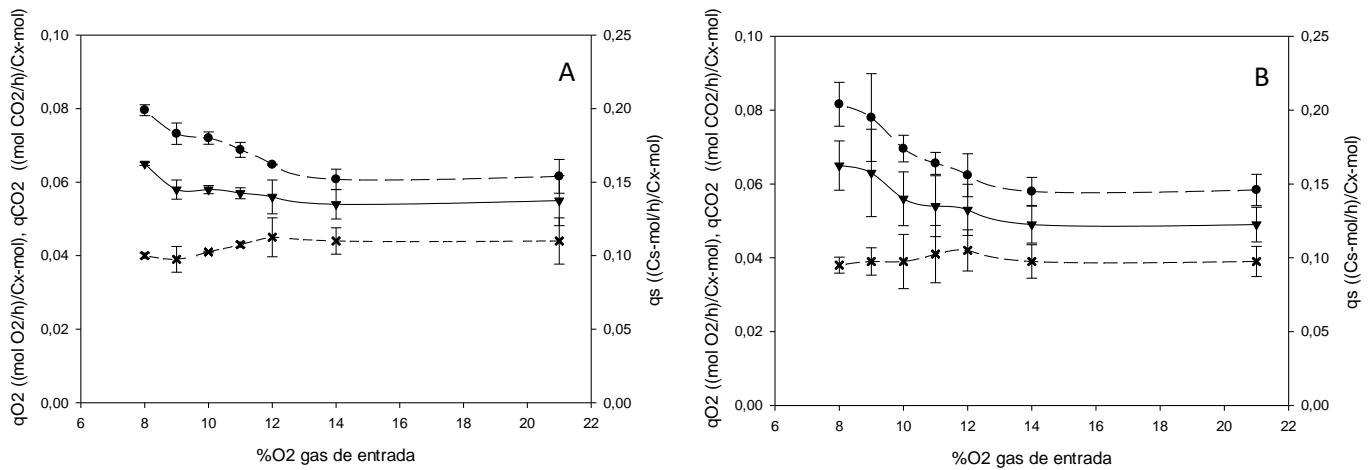


Figura 2. Evolución de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) (X); de la velocidad específica de producción de dióxido de carbono (q_{CO_2}) (▼) y de la velocidad específica de consumo de sustrato (glucosa) (q_s) (●), en función de la fracción de oxígeno del gas de entrada. (A) Clon SC y (B) clon MC. Las barras de error indican la desviación entre las réplicas.

En la figura 2 se pueden apreciar las velocidades específicas de consumo de sustrato y oxígeno como también la velocidad específica de producción de CO_2 . Se puede ver claramente las zonas descritas anteriormente en la figura 1. En la primera zona donde la pO_2 es diferente de cero se ve, al igual que se veía en la figura 1, como estas velocidades específicas se mantienen constantes, confirmando que no hay ningún cambio fisiológico celular presente.

Durante la zona de transición y las zonas más hipóxicas se ve una tendencia similar que es la siguiente:

- El valor de la q_{O_2} se mantiene aproximadamente estable, si bien es verdad que a medida que se van aplicando las condiciones hay cada vez menos oxígeno disponible, también hay cada vez menor cantidad de biomasa.
- La q_{CO_2} , cada vez va tomando un papel más importante en el metabolismo fermentativo, va aumentando ya que en esta vía se produce más rápido el CO_2 que por la vía respiratoria. Estas evoluciones de las velocidades específicas del O_2 y CO_2 han sido previamente descritas con mayor detalle [3].

- En cuanto a la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , ésta va aumentando durante las condiciones limitantes de oxígeno ya que como cada vez hay menos concentración de biomasa (visto en la figura 1) y la concentración de glucosa se mantiene constante, ésta debe aumentar. Respecto a las posibles diferencias entre los dos clones, no se ve ningún cambio significativo entre los dos clones SC y MC.

3.3. Producción de subproductos

En La figura 3 se muestran las velocidades específicas de aparición de los subproductos estudiados (etanol, arabitol y ácido succínico).

Se puede apreciar como éstos empiezan a aparecer en la condición del 12% tanto para el clon SC como para el MC. En las primeras condiciones en que estos subproductos aparecen, se ve una predominancia del etanol y el arabitol, siendo este último el que presenta una mayor velocidad específica de producción hasta la condición del 11% para el SC y hasta la del 12% para el MC.

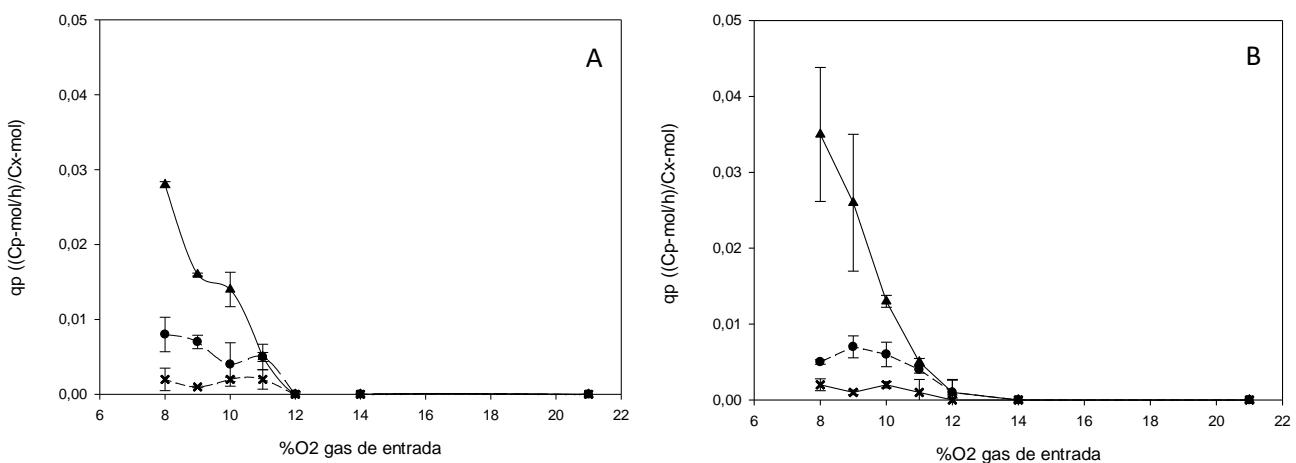


Figura 3. Evolución de la velocidad específica de aparición de subproductos “p”; q_{etanol} (\blacktriangle); q_{arabitol} (\bullet) y $q_{\text{succínico}}$ (\times), en función de la fracción de oxígeno del gas de entrada. (A) Clon SC y (B) clon MC. Las barras de error indican la desviación entre las réplicas.

Aun así no se ven diferencias significativas en las tendencias de aparición de estos subproductos entre las dos clones, más allá de los valores puntuales ya comentados.

El valor de velocidad específica de los metabolitos extracelulares como el caso del etanol, suele ser un buen indicador de la disponibilidad de oxígeno para las células, ya que presenta un comportamiento prácticamente lineal en función de las diferentes condiciones de hipoxia [24].

En cuanto al gran error que se aprecia en las dos condiciones más hipoxicas se puede relacionar con el hecho que en condiciones con tan bajo porcentaje de oxígeno en el gas de entrada, mínimas variaciones en el grado de hipoxia se traducen a grandes variaciones en la aparición de etanol y en la biomasa.

Para el cálculo de la velocidad de producción de etanol se tuvo en cuenta el fenómeno de desabsorción o *stripping*, teniendo en cuenta un factor de ~ 10% determinado con anterioridad para el sistema en estudio y las mismas condiciones de operación [24].

3.4. Evolución de rendimiento biomasa/sustrato, actividad lipolítica y coeficiente respiratorio

Otro parámetro clave como se ha comentado en ocasiones anteriores es el cociente respiratorio (RQ), el cociente entre la CER (*CO₂ Evolution Rate*) y la OUR (*Oxygen Uptake Rate*).

$$RQ = \frac{CER}{OUR}$$

Este coeficiente es un indicador del estado fisiológico (metabólico) de las células, y como ya se ha comentado, es un buen parámetro a monitorizar ya que este no depende de las capacidades de transferencia de oxígeno del equipo ni de ninguna variable referente al fermentador.

En la figura 4 se puede apreciar la velocidad específica de producción de la lipasa, junto al rendimiento biomasa-sustrato y el cociente respiratorio.

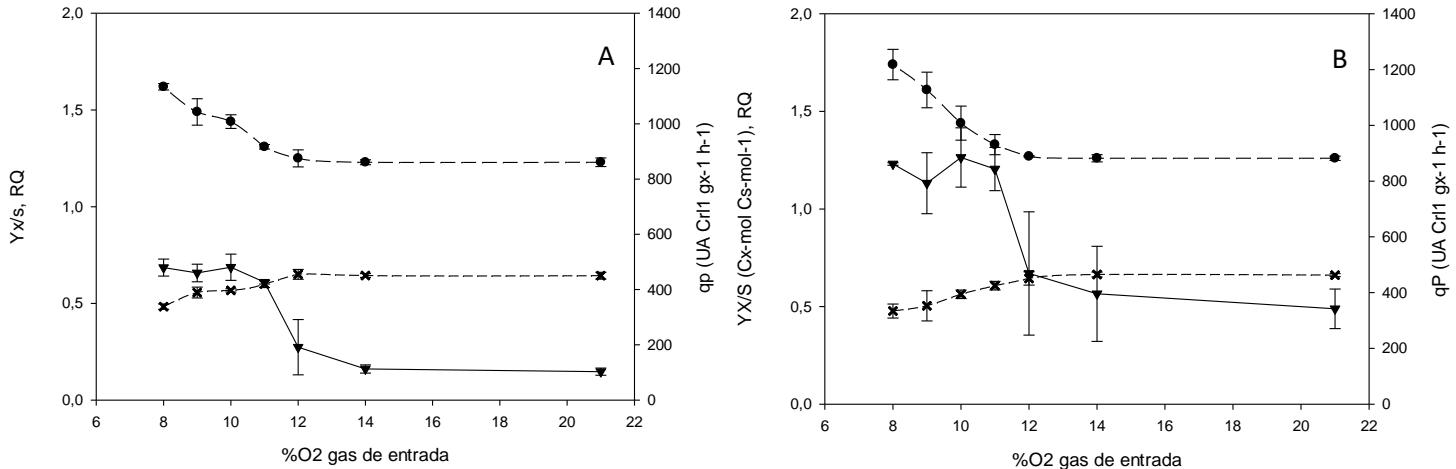


Figura 4. Evolución del cociente respiratorio (RQ) (●); de la velocidad específica de producción de proteína (qp) (▼) y del rendimiento biomasa/sustrato (Y_{X/S}) (X), en función de la fracción de oxígeno del gas de entrada. (A) Clon SC y (B) clon MC. Las barras de error indican la desviación entre las réplicas.

Al igual que en las demás figuras, se puede apreciar como durante las dos primeras condiciones apenas hay cambio en las variables representadas. Para la condición del 12% se empiezan a ver indicios de cambio. Este punto de cambio coincide con el cambio de metabolismo respiratorio a respiro-fermentativo.

Se debe tener en cuenta que, durante las condiciones en las que las variables no presentan cambios significativos, hay cambios en cuanto a la composición de gases y en la pO₂, tal y como se ha visto anteriormente. Cada vez que se aplica una mayor hipoxia la composición de oxígeno en el gas de salida es menor, al igual que la pO₂.

Tal y como se observa en la figura 1, a medida que se aporta menos concentración de oxígeno en la entrada hay menos biomasa, por lo que hay una disminución del rendimiento biomasa-sustrato. Esto hace también que aumente la velocidad de consumo de sustrato (visto anteriormente), ya que como no hay acumulación de sustrato y hay cada vez menos biomasa, ésta, debe consumirlo en más proporción.

En cuanto a la evolución de la RQ, como cabe esperar, va aumentando a medida que las condiciones de hipoxia son más severas, ya que la q_{O_2} se mantiene con una cierta estabilidad y la q_{CO_2} va en un claro aumento con cada condición más hipoxica, el RQ al ser el cociente de estos parámetros también irá en aumento.

En cuanto a la producción de la proteína de interés (q_p) se puede ver como a medida que se va aplicando una hipoxia más fuerte va aumentando notablemente hasta llegar a un máximo de actividad de la lipasa obtenida en la condición de 10% de oxígeno en el gas de entrada, alcanzándose valores aproximadamente 5 veces mayor que en condiciones de no limitación de oxígeno para el clon SC y unas 2.5 veces mayor para el clon MC. También se puede observar que, una vez llegado a éste máximo, la q_p se mantiene más o menos constante a medida que se disminuye más el aporte de oxígeno (condiciones del 9% y 8% de oxígeno a la entrada).

3.5. Tabla Resumen de los parámetros más destacados

A continuación se presentan las tablas 1 y 2 con los valores medios obtenidos por las dos réplicas de los parámetros de proceso más importantes en función de la concentración de oxígeno en el gas de entrada, tanto para el clon SC como para el clon MC:

Tabla 1. Valores medios de los parámetros clave de proceso de las dos replicas para el clon SC.

Condición (% O ₂ gas entrada)	q_s ((Cs-mol/h)/Cx-mol)	q_{O_2} ((mol O ₂ /h)/Cx-mol)	q_{CO_2} ((mol CO ₂ /h)/Cx-mol)	q_p (Crl1 UA/gXh)	$Y_{X/S}$ (Cx-mol/Cs-mol)	RQ
21	0.154	0.044	0.055	103	0.643	1.23
14	0.152	0.044	0.054	113	0.644	1.23
12	0.162	0.045	0.056	192	0.650	1.25
11	0.172	0.043	0.057	427	0.600	1.31
10	0.180	0.041	0.058	481	0.567	1.44
9	0.183	0.039	0.058	460	0.556	1.49
8	0.199	0.040	0.065	480	0.483	1.62

Tabla 2. Valores medios de los parámetros clave de proceso de las dos replicas para el clon MC.

Condición (% O ₂ gas entrada)	q _s ((Cs-mol/h)/Cx-mol)	q _{O₂} ((mol O ₂ /h)/Cx-mol)	q _{CO₂} ((mol CO ₂ /h)/Cx-mol)	q _P (CrI1 UA/gXh)	Y _{X/s} (Cx-mol/Cs-mol)	RQ
21	0.146	0.039	0.049	342	0.661	1.26
14	0.145	0.039	0.049	396	0.664	1.26
12	0.156	0.042	0.053	469	0.644	1.27
11	0.164	0.041	0.054	843	0.607	1.33
10	0.174	0.039	0.056	885	0.563	1.44
9	0.195	0.039	0.063	793	0.504	1.61
8	0.204	0.038	0.065	862	0.477	1.74

En estas tablas se puede ver, como se ha ido comentado a lo largo del análisis de los datos representados gráficamente, la semejanza entre todos los valores para el clon SC y el MC. El único cambio significativo es en la q_P, como era de esperar, al haber en el MC cinco copias del gen encargado de expresar la proteína de interés.

3.6 Relación entre la q_P y la RQ

Finalmente se presenta la figura 5, donde se observa la relación existente entre la velocidad específica de producción de la CrI1, y el RQ.

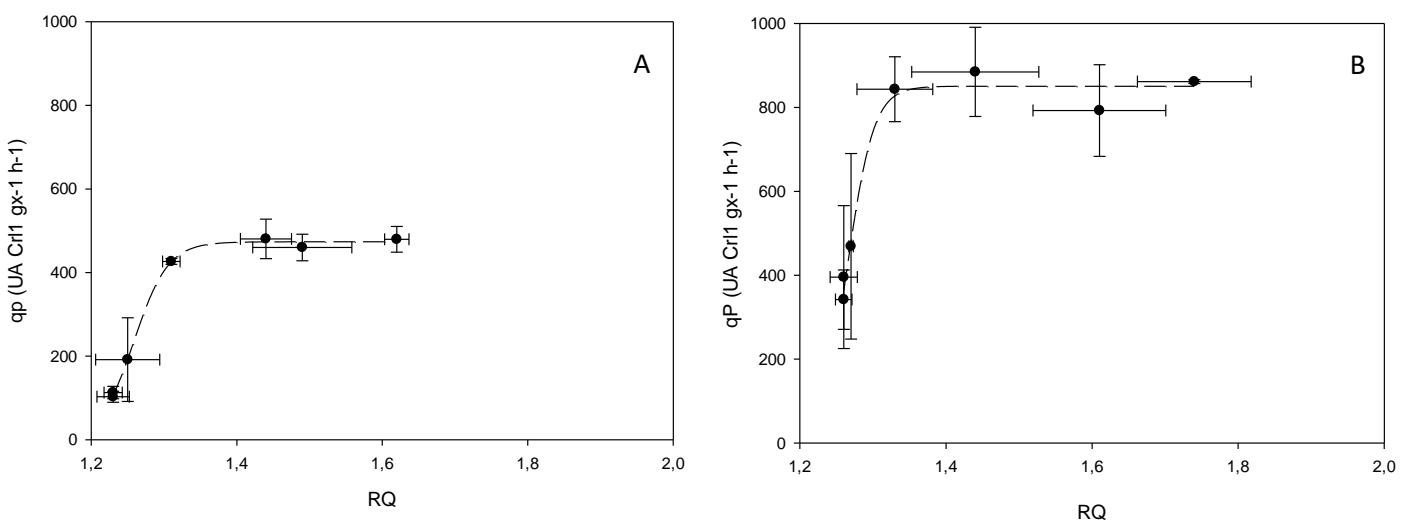


Figura 5. Relación entre la q_P y la RQ, (A) clon SC y (B) clon MC. Las barras de error indican la desviación entre las replicas.

El objetivo principal de este estudio era encontrar un parámetro que no dependiera del equipo (fermentador) utilizado sino que dependiera del estado fisiológico de las células, y con el que se pudiera establecer una relación con la productividad específica máxima. En la figura 5 se muestra claramente que, para mantener un valor máximo de q_p se dispone de un amplio rango de valores de RQ demostrándose que un control de este parámetro, en un valor alrededor de 1.5 aseguraría la máxima velocidad específica de producción, siendo ésta prácticamente constante en el rango de RQ entre 1.4 y 1.7.

4. CONCLUSIONES

A partir del análisis y discusión de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones.

Ha sido demostrada la influencia de la limitación de oxígeno (hipoxia) en la productividad específica de la lipasa Crl1, obteniéndose valores hasta 5 veces mayor que en condiciones de no limitación de oxígeno (normoxia).

También se ha podido comprobar que aumentando la dosis génica del clon se obtiene aproximadamente el doble de q_p que con solo una copia del gen que expresa la proteína de interés, aunque sin corresponderse con el número de copias del gen (5) lo que indica que el aumento de número de copias no implica un aumento proporcional de la velocidad específica de producción.

Por lo tanto, se puede confirmar que se ha mejorado la productividad del bioprocreso tanto modificando las condiciones de operación como aumentando el número de copias del gen del microorganismo. Actuando conjuntamente desde una aproximación tanto de ingeniería genética como de ingeniería de bioprocessos, se ha aumentado alrededor de un orden de magnitud la q_p , hecho realmente destacable.

Finalmente hay que destacar que se ha relacionado con éxito el valor del parámetro a optimizar, la q_p , con un parámetro que no está relacionado con el sistema de fermentación, como es el RQ, hecho que hace posible trasladar esta optimización a otros sistemas de fermentación utilizando este mismo clon de la cepa.

Además, se ha visto que es mucho más robusto, a *priori*, trabajar utilizando como variable controlada el RQ, ya que se tiene un amplio rango de trabajo con el que se podría obtener una q_p prácticamente igual y máxima ($RQ = 1,4 - 1,7$). En cambio, el porcentaje de oxígeno de entrada es un parámetro que no tiene porqué conservar la misma relación con la q_p al cambiar de equipo o al hacer un cambio de escala, ya que se trata de un parámetro que depende fuertemente del equipo empleado y no del estado fisiológico de las células.

5. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los magníficos tutores que he tenido para este trabajo final de máster, a José Luis que me ha visto formarme, y que me ha tenido que soportar, desde principios del grado en Experimentación 1, durante el grado, en el máster y ahora como tutor del TFM, gracias por todos estos años de paciencia y de apoyo, y a Paco, a quién no tenía el gusto de conocer en persona pero sí que era una cara conocida de todos estos años en la Escuela de Ingeniería, gracias por tu apoyo y por tus enseñanzas y a ambos por aceptarme en este grupo de investigación de Lipasas.

A todos los integrantes del grupo por las enseñanzas y por la amabilidad a la hora de resolver todas las dudas durante estos meses de experimentación.

Y sobre todo gracias a Arnau Gasset Franch, por el día a día, por estar horas y horas enseñándome y resolviendo todas las dudas, por la paciencia que ha tenido durante estos casi 5 meses, gracias a él se ha hecho un trabajo mucho más llevadero e interesante y este TFM en gran medida también es suyo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.L. Shuler, Bioprocess engineering: Basic concepts. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, cop. 2002 2nd ed.
- [2] J.L. Corchero, J.L Montesinos, Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnology advances* 31.2 (2013) 140-153
- [3] K. Baumann, M. Carnicer, M. Dragosits, A.B. Graf, J. Stadlmann, P. Jouhten, H. Maaheimo, B. Gasser, J. Albiol, D. Mattanovich, P. Ferrer, A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions, *BMC Syst. Biol.* 4 (2010) 141.
- [4] M. Huang, J. Bao, J. Nielsen, Biopharmaceutical protein production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and future prospects, *Pharm Bioprocess* 2 (2014) 167-82
- [5] T. W. Overton, Recombinant protein production in bacterial host, *Drug Discov* 19 (2014) 590-601
- [6] G. Potvin, A. Ahmad, Z. Zhang , Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochem. Eng. J.* 64 (2012) 91–105.
- [7] G.P.L. Cereghino, J.L. Cereghino, C. Ilgen and J.M. Cregg, Production of recombinant proteins in fermenter of the yeast *Pichiapastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 329–332.
- [8] S. Macauley-Patrick, M.L. Fazenda, B. McNeil, L.M. Harvey, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast*. 22 (2005) 249–270.
- [9] J.M. Cregg, J.L. Cereghino, J. Shi, D.R. Higgins, Recombinant protein expression in *Pichia Pastoris*, *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 23-52.
- [10] C.P. Kurtzman, Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1435–1438.

- [11] R. Daly R, M. Hearn. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.* 18 (2005) 119–38
- [12] 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.
- [13] H. Boer, T.T. Teeri, A. Koivula, Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia Pastoris* using two different promoters, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 486-494.
- [14] H.R. Waterham, M.E. Digan, P.J. Koutz, S. V Lair, J.M. Cregg, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter., *Gene.* 186 (1997) 37–44.
- [15] F. Valero, Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System, in: *Protein Eng. - Technol. Appl.*, InTech (2013) 3–32.
- [16] Bioprocess Engineering Principles, Pauline M. Doran.
- [17] TFM Carmen Hierro, Condiciones limitantes de oxígeno para mejorar la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* reguladas bajo el promotor GAP, (Julio 2019).
- [18] M.A. Nieto, J. Garrigós, M. Sánchez, F. Valero, X. Garcia, J.L. Montesinos, Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), *Microb Biotechnol.* (2019) 1751-7915.
- [19] M. Maurer, M. Kühlein, B. Gasser, D. Mattanovich, Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia Pastoris*, *Microbiol Cell* 5:37 (2006).
- [20] 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 FLD1 promoter. *Biotechnol Bioeng* 91 (2005) 760–767.

- [21] J. Garrigós, M.A. Nieto, A. Gasset, J. L. Montesinos, X. Garcia-Ortega, F. Valero, Specific growth rate governs AOX1 gene expression, affecting the production kinetics of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) PAOX1-driven recombinant producer strains with different target gene dosage, *Microb. Cell Fac.* (2019)
- [22] X. Ponte, J.L. Montesinos, 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) 1954–63.
- [23] R. T. J. M Van der Heijden, J.J Heijnen, C. Hellinga, B. Romein, K. C. A. Luyben, Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(1) (1994) 3-10.
- [24] X. Garcia-Ortega, F. Valero, J.L. Montesinos-Seguí, Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* through oxygen limitation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 2573–2582.