
This is the **published version** of the master thesis:

Terroba Benítez, Pablo [et al.]. *Caracterización de la producción del nanobody Nb.b201 por la levadura Komagataella phaffii*. (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Enginyeria Biològica i Ambiental)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336393>

under the terms of the  license.



Universitat Autònoma
de Barcelona

Caracterización de la producción del *nanobody* Nb.b201 por la levadura *Komagataella phaffii*

Pablo Terroba Benéitez

MÀSTER EN ENGINYERIA BIOLÒGICA I AMBIENTAL

Xavier García, Arnau Gasset, Albert Canet

11/02/2026

1. Contenido	
2. Background.....	5
2.1. Quimiostato	5
2.2. Fed-Batch	5
2.3. <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>)	5
2.4. Promotor GAP.....	6
2.5. Metabolismo de la glucosa y glicerol en normoxia e hipoxia para <i>K. phaffii</i>	7
2.6. Nb.b201.....	8
3. Resultados y discusión.....	9
3.1. Glucosa Vs Glicerol en condiciones de Normoxia.	9
3.1.1. Rendimientos $Y_{x/s}$	9
3.1.2. Producción de Nb.b201.....	12
3.2. Glucosa Normoxia Vs Glucosa Hipoxia.	13
3.2.1. Efecto de la hipoxia en el coeficiente respiratorio.	13
3.2.2. Producción de Nb.b201 bajo condiciones de hipoxia y comparativa con la producción en condiciones de normoxia.	14
3.3. Efecto del pH sobre la producción en Hipoxia de Nb.b201.	15
3.4. Fed-Batch para producir Nb.b201 con la condición Glucosa + Hipoxia + pH = 5 ...	16
4. Conclusiones	18
5. Métodos.....	19
5.1. <i>K. phaffii</i> X-33 pGAPZaA Nb.b 201.....	19
5.2. Cultivos.....	19
5.2.1. Pre-inóculo.....	19
5.2.2. Batch.....	19
5.2.3. Quimiostato.....	20
5.2.4. Fed-Batch	20
5.3. Métodos analíticos	21
5.3.1. DCW.....	21
5.3.2. OD	21
5.3.3. HPLC	21
5.3.4. Microscopia óptica	21
5.3.5. SDS-PAGE	22
5.3.6. Bradford	22
5.4. Factores de ajuste, balances de materia y tratamientos de datos.....	22
6. Documentos adicionales.....	24
7. Abreviaciones	25

8.	Agradecimientos	25
9.	Bibliografía	26

Caracterización de la producción del *nanobody* Nb.b201 por la levadura *Komagataella phaffii*

Pablo Terroba, Gina Liarte, Xavier García, Arnau Gasset, Albert Canet, Francisco Valero.

Abstract

Contexto:

La caracterización precisa de factorías celulares como *Komagataella phaffii* requiere de entornos fisicoquímicamente estables, los cuales se logran de manera óptima mediante el cultivo en continuo en quimiostato. En este contexto, el uso del promotor constitutivo P_{GAP} surge como una alternativa eficiente al sistema inducible por metanol P_{AOX1} , ya que simplifica la logística operacional y evita la toxicidad relacionada con el uso de metanol, siendo especialmente adecuado para la producción de *nanobodies* como el Nb.b201.

El presente trabajo busca encontrar mediante cultivos en continuo la fuente de carbono, el pH y la condición de oxígeno que maximicen la producción del *nanobody* Nb.b201. Con las mejores condiciones encontradas se podrá diseñar un cultivo *Fed-Batch* con una perspectiva más enfocada a la producción.

Resultados:

En este estudio se ha caracterizado la producción de Nb.b201 en condiciones de normoxia e hipoxia así como el efecto del pH. Se encuentra que condiciones de hipoxia multiplican hasta 2,4 veces la producción del Nb.b201 y se determinan los pH 5 y 6 como óptimos. También se consigue obtener una producción de hasta 60 mg/L en un cultivo en *Fed-Batch*.

Conclusiones:

El presente trabajo es un ejemplo de cómo la integración de diferentes intensificaciones operacionales permite obtener mejoras significantes en el proceso de producción del *nanobody* Nb.b201. Se concluye que la combinación de glucosa como fuente de carbono con una moderada hipoxia y con pH entre 6 y 5 es la mejor condición para aumentar la producción de Nb.b201 en *K. phaffii*.

Palabras Clave: *K. phaffii*, promotor GAP (P_{GAP}), hipoxia, Caracterización metabólica, *nanobody*, flujo glucolítico.

2. Background

2.1. Quimiostato

Para caracterizar una cepa con precisión, es fundamental mantener las células bajo condiciones fisicoquímicas y estados metabólicos constante. La obtención de estos entornos en estado estacionario se logra habitualmente mediante el empleo de cultivos en continuo [1]. Estos sistemas operan con un flujo de entrada de medio fresco y una salida de medio agotado que, al mantenerse equilibrados, mantienen volumen constante. Dentro de esta modalidad, el quimiostato destaca por operar bajo la limitación controlada de un nutriente, generalmente la fuente de carbono, lo que permite una regulación precisa de la velocidad de crecimiento [2]. Este modo de operación supera las limitaciones del cultivo discontinuo (*batch*), donde las fluctuaciones cinéticas y químicas son inherentes al proceso. En consecuencia, el quimiostato garantiza un entorno homogéneo y reproducible que minimiza el ruido metabólico asociado a las transiciones del ciclo celular.

2.2. Fed-Batch

Si bien el cultivo en continuo en quimiostato presenta un estado estacionario ideal para la caracterización de cepas, el modo de operación en Fed-batch ofrece ventajas significativas para la producción de proteínas recombinantes, como los nanobodies (VHH) [3]. Los cultivos operados en Fed-batch cuentan con una entrada de medio fresco durante todo el tiempo de operación, pero carecen de un flujo de salida; de esta manera, el volumen del biorreactor aumenta con el tiempo y se alcanzan densidades celulares muy elevadas.

A diferencia del cultivo en continuo —el cual está sujeto a una presión selectiva prolongada que puede favorecer la aparición de variantes genéticas que pierden el casete de expresión—, el Fed-batch limita el número de generaciones celulares, preservando así la estabilidad genotípica [4]. Asimismo, este modo de operación permite obtener concentraciones de producto notablemente superiores al final del proceso, mientras que en el cultivo en continuo el producto se diluye de forma constante [5]. Alcanzar estas concentraciones elevadas en Fed-batch representa una ventaja estratégica, ya que simplifica las etapas posteriores de purificación y concentración en el downstream.

2.3. *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

En la actualidad, se emplean diversos microorganismos como factorías celulares para la expresión de proteínas heterólogas con fines industriales. Entre los hospedadores más destacados se encuentran diversas bacterias, células de mamífero y levaduras, siendo estas últimas de gran relevancia para la producción de proteínas recombinantes de valor comercial.

Las líneas celulares de mamífero, como las células CHO (Chinese Hamster Ovary), son el estándar en la industria biofarmacéutica. No obstante, presentan limitaciones críticas: los medios de cultivo son costosos, poseen tasas de crecimiento lentas y, en términos de productividad volumétrica, suelen ser menos eficientes que los sistemas fúngicos [6].

Si bien las bacterias y levaduras representan alternativas más económicas, las levaduras ofrecen ventajas competitivas frente a los sistemas procariotas, como la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales (PTMs) complejas, el plegamiento correcto de proteínas mediante chaperonas y la secreción directa al medio, lo que simplifica el downstream. Además, permiten la integración estable del ADN en el genoma, asegurando líneas celulares robustas [7].

Históricamente, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la levadura más utilizada; sin embargo, su tendencia a la hiperglicosilación (adición de cadenas extensas de manosa) suele comprometer la funcionalidad y la inmunogenicidad de las proteínas. Por el contrario, la levadura *K. phaffii* (anteriormente *P. pastoris*) no presenta este problema de forma tan acentuada. *K. phaffii* destaca por sus altos niveles de expresión, su capacidad para procesar proteínas complejas, una mínima secreción de proteínas endógenas y el uso de medios de cultivo económicos, consolidándose como la opción predilecta para la producción de nanobodies [8].

A diferencia de *S. cerevisiae*, *K. phaffii* es una levadura mayoritariamente Crabtree-negativa, lo que implica un metabolismo predominantemente respiratorio. En presencia de oxígeno, *K. phaffii* oxida la glucosa completamente hasta CO₂ y agua, evitando la formación de subproductos fermentativos como el etanol, incluso ante concentraciones elevadas de sustrato. Esto permite alcanzar densidades celulares muy altas [9].

Finalmente, *K. phaffii* posee los genes AOX1 y AOX2, que codifican la enzima alcohol oxidasa, permitiéndole metabolizar el metanol como única fuente de carbono. El promotor P_{AOX1} es uno de los sistemas de expresión más potentes y estrictamente regulados que existen, facilitando una separación clara entre la fase de crecimiento de la biomasa y la fase de inducción de la proteína [10].

2.4. Promotor GAP

El uso de metanol en procesos industriales conlleva riesgos significativos de seguridad y logística, debido a su toxicidad e inflamabilidad, lo que exige instalaciones antideflagrantes a gran escala [3]. El promotor P_{GAP} elimina estas limitaciones al no requerir metanol para la inducción de la proteína de interés. Asimismo, su naturaleza constitutiva simplifica el protocolo de alimentación al suprimir la transición crítica de fuente de carbono (de glicerol a metanol) necesaria en sistemas inducibles [11]. Otra ventaja sustancial es la ausencia de formaldehído, un subproducto del metabolismo del metanol que puede comprometer la integridad de ciertos productos, como los nanobodies [12].

El promotor P_{GAP} regula la expresión del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enzima clave en la glucólisis que cataliza la conversión del

D-gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bisfosfoglicerato. Aunque este sistema se ha utilizado con éxito para una amplia variedad de proteínas, su eficacia es notable en la expresión de proteínas con una complejidad estructural similar a la propia GAPDH (~35,4 kDa) [13].

La fuerza transcripcional de P_{GAP} depende estrictamente de la fuente de carbono empleada. Su actividad máxima se alcanza en presencia de glucosa; bajo condiciones de cultivo en glicerol, la expresión se reduce aproximadamente a dos tercios de dicho nivel, mientras que en metanol la actividad es mínima [11]. A nivel molecular, su actividad constitutiva está modulada por un equilibrio entre factores de transcripción. Los activadores Gsm1p y Hot1p se unen directamente al promotor potenciando su actividad, mientras que las proteínas Loc1p y Msn2p actúan como represores. En situaciones de estrés, Msn2p se transloca del citoplasma al núcleo para ejercer su función reguladora [14].

Finalmente, una ventaja cinética del promotor P_{GAP} es que la expresión proteica se distribuye de forma continua durante toda la fase de crecimiento. Al ser una producción más lenta y sostenida —en comparación con la inducción masiva y repentina del sistema P_{AOX1} —, se favorece el plegamiento correcto en el retículo endoplasmático, minimizando el estrés celular y evitando la formación de cuerpos de inclusión [15].

2.5. Metabolismo de la glucosa y glicerol en normoxia e hipoxia para *K. phaffii*

El metabolismo central de *K. phaffii* exhibe una estrecha dependencia de la tasa de transferencia de oxígeno (OTR), especialmente durante el crecimiento sobre glucosa o glicerol. En condiciones de normoxia, la levadura prioriza la vía respiratoria, donde ambos sustratos se oxidan completamente hasta CO_2 y agua a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena transportadora de electrones, maximizando así la producción de biomasa y ATP [16]. Bajo este escenario, el flujo glucolítico hacia el piruvato es elevado, lo que sustenta la actividad alta y constante del promotor P_{GAP} [11].

Específicamente, para el catabolismo del glicerol, *K. phaffii* emplea predominantemente la ruta fosforilativa. Este proceso se inicia con la fosforilación del glicerol a L-glicerol-3-fosfato (G3P) mediante la enzima glicerol quinasa (GUT1), con consumo de ATP. Posteriormente, en la fase oxidativa, el G3P es convertido en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por la enzima GUT2 (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD), integrada en la membrana mitocondrial interna. La DHAP resultante se incorpora a la glucólisis, generando en el proceso neto 2 ATP, 1 NADH y 1 $FADH_2$. En condiciones óptimas de aireación, este flujo metabólico permite que los equivalentes reductores alimenten eficientemente la respiración celular, alcanzando un balance energético de 17,5 moléculas de ATP por cada molécula de glicerol [17].

Una vía alternativa es la ruta de la dihidroxiacetona (DHA) que, aunque es común en bacterias, su relevancia en levaduras es limitada. En esta ruta, el glicerol se oxida a DHA mediante el glicerol deshidrogenasa (GDH) dependiente de NAD^+ , para luego ser fosforilada a DHAP por la DHA quinasa (codificada por DAK1 y DAK2). Aunque

teóricamente esta vía reporta un rendimiento superior (18,5 ATP/glicerol), su actividad es marginal en comparación con la ruta fosforilativa [17].

Al transicionar hacia la hipoxia, *K. phaffii* experimenta un efecto Crabtree atenuado o una redirección hacia vías fermentativas, debido a que la escasez de receptor final de electrones impide la reoxidación eficiente del NADH. En el metabolismo de la glucosa, se incrementa la tasa de captación del sustrato (q_s) para compensar el bajo rendimiento energético de la fermentación, derivando en la acumulación de etanol, además de un aumento en el flujo de la vía de las pentosas fosfato para mitigar el estrés oxidativo [18]. En este contexto, se da una sobreexpresión de las enzimas de la vía glucolítica, lo que resulta en un aumento de la fuerza del promotor P_{GAP} . La fuerza del promotor P_{GAP} también se ve afectada por el regulador negativo Msn2p [14].

Cabe destacar que el catabolismo del glicerol se ve desbordado si la hipoxia es severa, ya que la enzima GUT2 depende directamente de la cadena respiratoria para transferir electrones. En consecuencia, la hipoxia reduce drásticamente la tasa de crecimiento sobre glicerol y favorece la acumulación de precursores glucolíticos. Finalmente, esta alteración metabólica impacta la producción de proteínas recombinantes al desencadenar una respuesta transcripcional compleja que afecta el plegamiento en el retículo endoplasmático. Si bien la hipoxia severa limita el crecimiento, niveles moderados de limitación de oxígeno pueden, paradójicamente, favorecer la secreción de ciertas proteínas heterólogas al modular la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) [16].

2.6. Nb.b201

Los *nanobodies* son anticuerpos de dominio único que han revolucionado la biotecnología debido a su reducido tamaño (~15 kDa), elevada estabilidad y notable homología con las regiones variables de las IgG humanas [19]. En el ámbito terapéutico, su capacidad para reconocer epítomos inaccesibles para los anticuerpos convencionales ha permitido el desarrollo de potentes agentes antivirales y antitumorales, destacando el Caplacizumab como el primer *nanobody* aprobado por la FDA [20]. Asimismo, destaca su aplicación como herramientas de diagnóstico molecular, permitiendo obtener imágenes de alta resolución y contraste superior en técnicas como PET y SPECT [21].

Estructuralmente, los *nanobodies* derivan de los anticuerpos de cadena pesada (hcAbs) presentes en camélidos, los cuales carecen de cadenas ligeras y del dominio constante CH1. La unidad funcional de unión al antígeno es un único dominio variable denominado VHH. A pesar de su sencillez estructural, mantienen un repertorio de unión extenso gracias a que el bucle CDR3 suele ser más largo que en las IgG convencionales, lo que les permite alcanzar cavidades enzimáticas o receptores crípticos. Además, presentan sustituciones de aminoácidos clave en la región que originalmente interactuaría con la cadena ligera (región *hallmark*), donde residuos hidrofóbicos son reemplazados por hidrofílicos, confiriéndoles una alta solubilidad y resistencia a la agregación [22].

El *nanobody* Nb.b201 fue identificado originalmente por McMahon et al. (2018) mediante el cribado de librerías sintéticas y seleccionado por su unión específica a la

albúmina sérica humana (HSA). Aunque presenta una afinidad modesta, su alta especificidad evita la reactividad cruzada con la albúmina de ratón (MSA). Estudios de cristalografía de rayos X han revelado que el Nb.b201 experimenta cambios conformacionales significativos tras la unión al antígeno, reorientando principalmente su bucle CDR3 para interactuar con una superficie convexa de la HSA.

En el presente Trabajo de Fin de Máster, se explorarán y optimizarán las variables de operación en cultivo continuo para maximizar la productividad de este *nanobody*. Se prueban glucosa y glicerol como fuentes de carbono, se compara entre normoxia e hipoxia y se valoran 4 pH distintos (pH 6, pH 5, pH 4 y pH 3). Para finalizar se hace un Fed-Batch con las mejores condiciones que nos permitirá ver la diferencia entre 2 modos de producción distintos.

3. Resultados y discusión

3.1. Glucosa Vs Glicerol en condiciones de Normoxia.

3.1.1. Rendimientos $Y_{x/s}$

En el primer cultivo en continuo, se comparó la producción del *nanobody* Nb.b201 empleando glucosa y glicerol como fuentes de carbono. El uso de un quimiostato a una tasa de dilución fija ($D = 0,10 \text{ h}^{-1}$) permite realizar una comparación termodinámica y estequiométrica rigurosa entre ambos sustratos. En la Figura 1.A se confirma que el sistema alcanzó el estado estacionario bajo un cociente respiratorio (RQ) propio de condiciones de Normoxia ($RQ = 1 - 1,15$) [16].

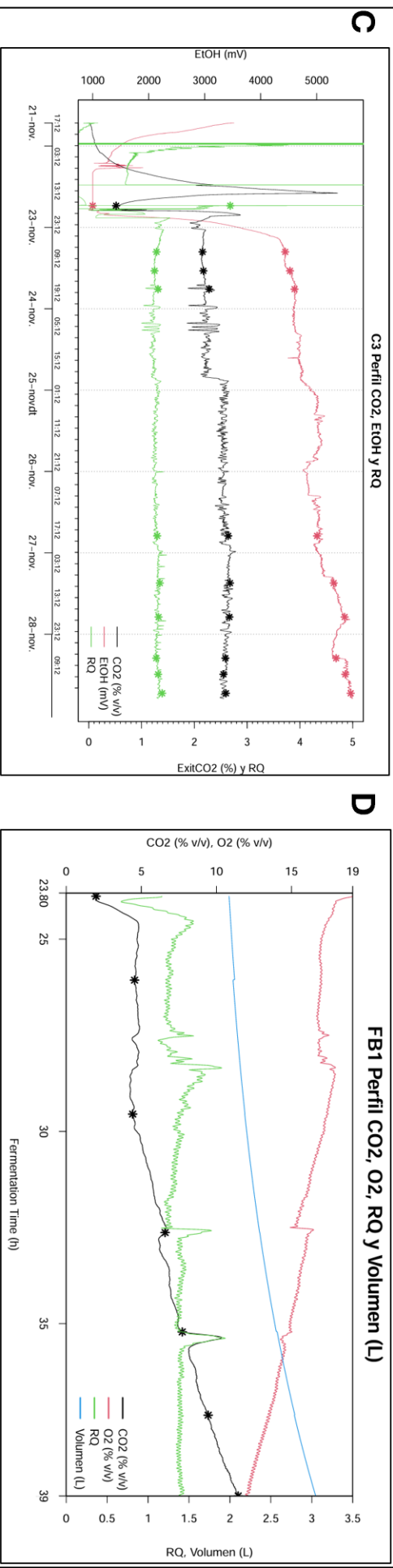
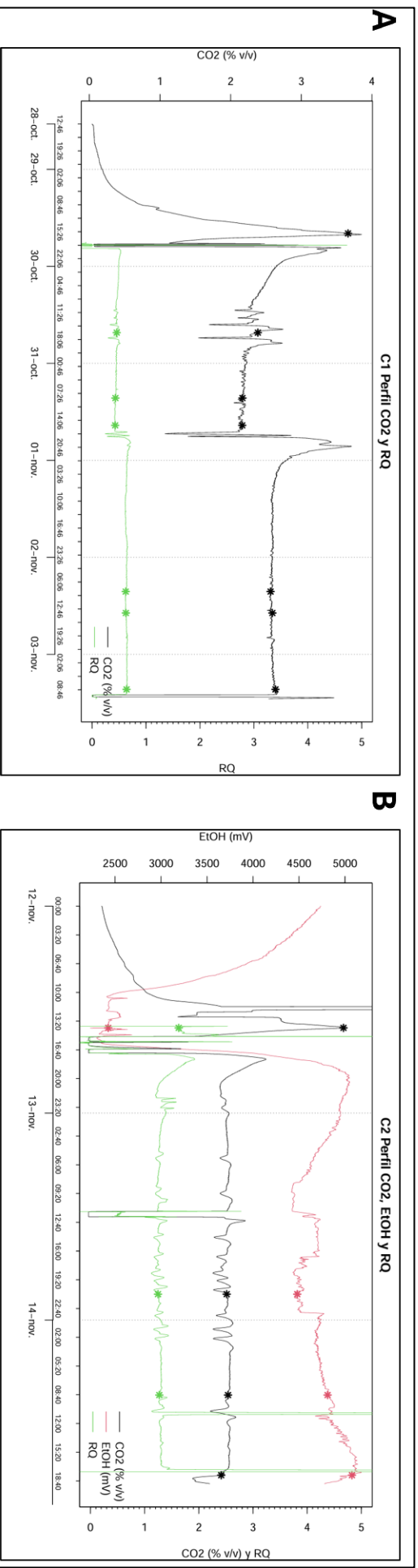


Figura 1. Perfil de los cultivos C1, C2, C3 y FB1. (A) Perfil del primer continuo 'C1' (Normoxia; Glucosa Vs Glicerol). (B) Perfil del segundo continuo 'C2' (Hipoxia + Glucosa; pH = 5). (C) Perfil del tercer continuo 'C3' (Hipoxia + Glucosa; pH = 4 y pH = 3). (D) Perfil del primer Fed Batch (Glucosa + Hipoxia + pH = 5).

Los resultados de la Tabla I muestran que el rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$) fue similar para ambos sustratos: 0,60 gX/gS para glucosa y 0,59 gX/gS para glicerol. Teóricamente, al ser el glicerol un sustrato más reducido que la glucosa, su metabolismo puramente respiratorio debería generar un mayor rendimiento de ATP y, por ende, un $Y_{X/S}$ superior. La literatura sitúa típicamente el $Y_{X/S}$ del glicerol en el rango de 0,6-0,7 gX/gS, frente a los 0,45-0,55 gX/gS de la glucosa [24].

	Normoxia		Hipoxia			
	Glucosa	Glicerol	pH = 6	pH = 5	pH = 4	pH = 3
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0,60	0,59	0,50	0,43	0,45	0,37
Biomasa (g/L)	29	30	23	21	22	23
Nb.b201 (mg/L)	5,8	4,8	10	14	3,3	4,5
SD Biomasa	0,96	0,45	1,3	1,5	1,3	0,82
SD Nb	0,050	0,010	2,1	1,0	0,60	2,1

Tabla I. Rendimientos y concentraciones de la biomasa y de Nb.b201. Rendimientos, concentración de biomasa y Nb.b201 según las condiciones probadas en los 3 cultivos en continuo (C1, C2 y C3).

Según estudios previos [25], se ha determinado un $Y_{X/S}^{máx}$ cercano a 0,60 gX/gS. No obstante, este valor es un valor teórico, alcanzándose únicamente cuando la tasa específica de crecimiento (μ) tiende a infinito y el término de mantenimiento celular (m_s) se vuelve despreciable. Bajo esta premisa, el rendimiento obtenido en este trabajo para la glucosa ($Y_{X/S} = 0,60$ gX/gS) resulta inusualmente elevado para una $\mu = 0,1$ h⁻¹, lo que sugiere la presencia de un error experimental.

Dado que el $Y_{X/S}$ se calcula como el cociente entre la concentración de biomasa y la de sustrato consumido, se procedió a verificar ambos parámetros para identificar el origen de la desviación. En primer lugar, se verificó la concentración del feeding mediante análisis por HPLC, confirmando que se mantenía en el valor objetivo de 50 g/L. Al ser el HPLC una técnica de alta fiabilidad que descarta anomalías en el suministro de sustrato, la investigación se centró en la determinación del peso seco celular (DCW), donde posiblemente una sobreestimación de la biomasa explicaría este valor situado en el límite superior bibliográfico.

Respecto a la determinación del DCW, se evaluaron tres hipótesis principales para identificar el origen de la desviación: el error humano, la interferencia por sales del medio o un secado insuficiente de las muestras.

En primer lugar, se consideró la posibilidad de un error de operario durante la manipulación o el pesaje; sin embargo, esta hipótesis se descartó tras realizar mediciones comparativas entre distintas personas, cuyos resultados no mostraron diferencias significativas.

Seguidamente, se analizó la posible interferencia salina, bajo la sospecha de que el espesor de la biomasa retenida en el filtro (el *cake*) pudiese estar actuando como una barrera física, impidiendo que las sales del medio eluyesen correctamente con la solución estándar de NaCl y aumentando así, de forma artificial, el peso final. Para verificar esto, se compararon los pesos secos del primer cultivo en continuo (C1), realizados mediante el protocolo estándar, con nuevas muestras sometidas a lavados con una disolución de ácido cítrico al 1%, siguiendo el protocolo publicado [26]. Dicho tratamiento asegura la eliminación de precipitados minerales y sales persistentes, pero los resultados se mantuvieron invariables, descartando esta fuente de error.

Finalmente, se planteó que un tiempo de residencia insuficiente en la estufa podría haber impedido la evaporación total del agua residual en los filtros; no obstante, ningún filtro pasó menos de 20h en la estufa.

Una explicación alternativa, reportada por [25], sugiere que *K. phaffii* posee la capacidad de desviar el flujo de carbono hacia la síntesis de polímeros de almacenamiento intracelular, como el glucógeno o la trehalosa, en respuesta a desequilibrios nutricionales (especialmente ante la limitación de nitrógeno). Según los autores, el contenido intracelular puede alcanzar valores de 0,12 g/g de DCW para la trehalosa y 0,07 g/g de DCW para el glucógeno. Esta acumulación incrementaría el valor del DCW de forma independiente al número de células, lo que resultaría en un aumento aparente del rendimiento biomasa-sustrato debido al peso de estas reservas y no a un incremento real del número de células. No obstante, esta reprogramación metabólica se observa típicamente a tasas específicas de crecimiento (μ) extremadamente bajas, lo que hace improbable que sea la causa principal del elevado rendimiento obtenido a $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$.

En cuanto a la ruta de degradación del glicerol, podemos decir que es una ruta energéticamente muy eficiente y que obtener un $Y_{x/s}$ de 0,59 es esperable y coherente.

3.1.2. Producción de Nb.b201

El promotor P_{GAP} se define como un promotor constitutivo cuya actividad está intrínsecamente ligada al flujo glucolítico. Tradicionalmente, se espera que la expresión de proteínas recombinantes bajo la regulación de P_{GAP} sea superior en presencia de glucosa en comparación con el glicerol, debido a que la glucosa se integra directamente en la glucólisis y demanda una elevada actividad de la enzima GAPDH [11].

No obstante, los resultados presentados en la Figura II A revelan que las velocidades específicas de producción q_p ($\text{mgp/g}_x \cdot \text{h}$) son equiparables para ambas fuentes de carbono. Estas observaciones concuerdan con estudios publicados [14], donde se demuestra que la regulación de P_{GAP} en *K. phaffii* es un proceso multifactorial. Además de depender del flujo glucolítico a través del factor de transcripción Hot1p, la actividad del promotor es potenciada por Gsm1p cuando se utiliza glicerol. En estas condiciones, la célula debe activar la ruta de la gluconeogénesis para la síntesis de precursores esenciales, lo que induce la unión de Gsm1p al promotor P_{GAP} y compensa la menor tasa glucolítica, equiparando así los niveles de expresión proteica.

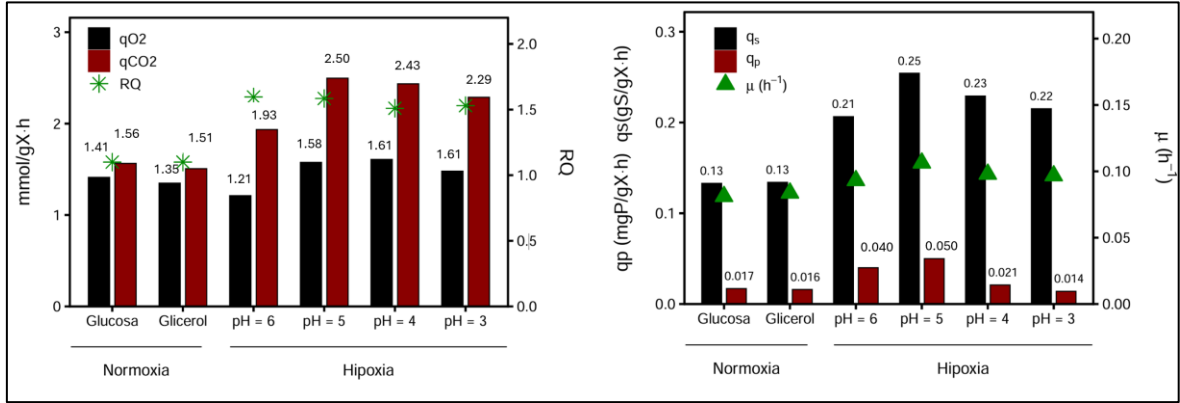


Figura II. Velocidades específicas. Velocidades específicas de consumo y producción (q_s , q_p , q_{O_2} y q_{CO_2}), μ y RQ para las condiciones probadas en este estudio.

3.2. Glucosa Normoxia Vs Glucosa Hipoxia.

3.2.1. Efecto de la hipoxia en el coeficiente respiratorio.

Bajo condiciones de hipoxia, la disponibilidad de oxígeno se vuelve limitante, induciendo en la célula la activación de rutas fermentativas. Este cambio metabólico genera la producción de etanol como subproducto principal, aunque también pueden detectarse otros metabolitos secundarios como arabitól y succinato.

Un parámetro crítico para caracterizar este estado es el Cociente Respiratorio (RQ), definido como la relación molar entre la velocidad específica de producción de CO₂ (q_{CO_2}) y la de consumo de oxígeno (q_{O_2}):

$$RQ = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}}$$

En condiciones hipóxicas, la producción de etanol actúa como una fuente adicional de CO₂. Esto es debido a que la descarboxilación del piruvato, añade un flujo extra de CO₂, es decir, se produce CO₂ sin consumir O₂, lo que aumenta el nominador sin afectar el denominador.

lo que eleva el valor del RQ. De acuerdo con el estudio publicado por Baumann en 2010 [16], el régimen de hipoxia se sitúa típicamente en un rango de RQ mayor a 1,2. Los resultados presentados en las Figuras I y II confirman que el sistema operó dentro de estos márgenes, lo cual, sumado a la detección de etanol, ratifica la limitación de oxígeno en el cultivo.

En cuanto a los parámetros cinéticos, el q_{O_2} se calcula como el cociente entre la tasa de consumo de oxígeno (OUR) y la concentración de biomasa (X). Aunque se esperaba una

disminución del q_{O_2} en hipoxia debido a la caída del OUR, nuestros resultados muestran valores similares para ambas condiciones. Esta observación se atribuye a que las concentraciones de biomasa en normoxia (con glucosa) fueron superiores a lo esperado, lo que reduce el valor calculado de q_{O_2} y enmascara la caída esperada en hipoxia.

Por el contrario, la q_{CO_2} mostró el incremento previsto al transicionar de normoxia a hipoxia. Este aumento responde a una menor eficiencia energética de la célula, que compensa la baja producción de ATP mediante un incremento del flujo glucolítico y la activación de la vía fermentativa, la cual libera CO_2 adicional. Finalmente, los rendimientos biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$) obtenidos guardan consistencia con los valores experimentales esperados.

3.2.2. Producción de Nb.b201 bajo condiciones de hipoxia y comparativa con la producción en condiciones de normoxia.

En la Tabla I se presentan las concentraciones de Nb.b201 obtenidas, destacando un incremento significativo al transicionar de normoxia (5,8 g/L) a hipoxia (14 g/L). Esta tendencia se refleja igualmente en las velocidades específicas de producción (q_P) mostradas en la Figura II, las cuales aumentaron de 0,017 a 0,05 $mg_P/g_X \cdot h^{-1}$. En términos comparativos, el cultivo en hipoxia supuso un incremento de 2,4 veces en la concentración total de la proteína y de 2,9 veces en la q_P respecto a las condiciones de normoxia.

Este fenómeno se explica por la respuesta metabólica de la levadura ante la limitación de oxígeno. Al activar vías fermentativas, menos eficientes energéticamente, la célula se ve obligada a incrementar el flujo glucolítico para satisfacer su demanda de ATP, lo que se traduce en un aumento de la q_S en hipoxia.

Dado que el promotor P_{GAP} está acoplado a este flujo, su actividad se intensifica, potenciando la expresión del *nanobody* [16]. Este mecanismo se ve respaldado por estudios que reportan una regulación al alza de genes glucolíticos clave, como *TDH3* y *PGK1*, estableciendo una correlación directa entre el metabolismo fermentativo y la productividad recombinante [27]. De hecho, el incremento de producción observado en este trabajo es consistente con el rango de 1,5 a 3 veces reportado en la literatura para condiciones similares.

Finalmente, se evaluó el posible efecto inhibitorio de los subproductos generados durante la fermentación. En condiciones de hipoxia con glucosa, la concentración de etanol osciló entre 5,5 y 6,5 g/L, valor que se mantiene por debajo del umbral de toxicidad crítica estipulado en 10 g/L. Asimismo, las concentraciones de arabitol (4,5 g/L) y ácido succínico (0,5 g/L) (se detallan las velocidades específicas de los subproductos en la Figura III) permanecieron inferiores a sus respectivos límites de inhibición (7 g/L y 1 g/L), garantizando que la biomasa no se vio comprometida por estrés metabólico derivado de subproductos[27].

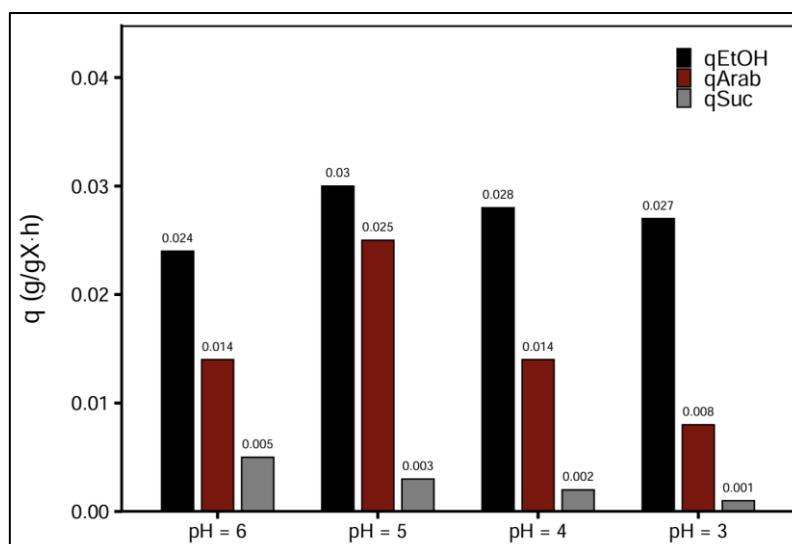


Figura III. Velocidades específicas de los subproductos. Velocidades específicas de formación de los subproductos para las condiciones en hipoxia (q_{EtOH} , q_{Arab} , q_{Suc}).

3.3. Efecto del pH sobre la producción en Hipoxia de Nb.b201.

Los resultados experimentales muestran una interacción crítica entre la limitación de oxígeno y el estrés por pH. Se confirma que la hipoxia induce un estado respiro-fermentativo caracterizado por la secreción de etanol, arabitól y succinato. En la Figura II se observa un incremento en la productividad específica del *nanobody* en el rango de pH moderado (5 – 6). No obstante, cuando pasamos a pH a 3 se genera una caída drástica en el rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S} = 0,37$), valor que se sitúa en el límite inferior de los rangos reportados para hipoxia y notoriamente por debajo de los rendimientos obtenidos en los otros tres niveles de pH ensayados, los cuales se mantuvieron en el límite superior.

Asimismo, se registró un descenso marcado en la concentración de Nb.b201 a pH 4 y pH 3 (3,3 y 4,5 mg/L, respectivamente) en comparación con los valores a pH más moderados. Cabe destacar que, si bien el dato a pH 3 se considera fiable, el valor de 3,3 mg/L obtenido a pH 4 presenta una desviación estándar de 1,1, lo que sugiere que la concentración real podría ser superior a la observada.

El efecto del succinato es determinante en este comportamiento. A pH 6, el succinato se encuentra mayoritariamente desprotonado y no interactúa con la membrana celular. Sin embargo, al descender por debajo de su pK_a (4,2), el succinato se protona, adquiriendo una forma que le permite difundir a través de la membrana plasmática hacia el citosol. Dado que el pH del interior de la levadura se mantiene en niveles neutros (6,5 – 7; [28]), el ácido se desprotona internamente, acidificando el medio intracelular. Para mitigar este efecto, la célula debe invertir una cantidad considerable de ATP en el bombeo activo de protones hacia el exterior [29]. Este gasto energético adicional desvía el flujo de carbono y energía desde la biosíntesis de proteínas hacia el mantenimiento de la homeostasis del pH, explicando así la disminución en la producción de Nb.b201.

Sintetizando, una hipoxia moderada a pH de 5 – 6 funciona como estrategia de intensificación de procesos para P_{GAP} , aumentando el flujo glucolítico, produciendo hasta 14 mg/L de Nb.b201. La combinación de hipoxia con pH por debajo de 4, eleva la energía de mantenimiento (ms) para mantener la homeostasis del pH y perjudica tanto al crecimiento de la biomasa como a la producción de Nb.b201.

Por lo tanto, se determina que las condiciones óptimas para producir Nb.b201 son Glucosa + Hipoxia + pH 5. Para aumentar la producción del Nb.b201 se decide hacer un Fed-Batch con estas condiciones.

3.4. Fed-Batch para producir Nb.b201 con la condición Glucosa + Hipoxia + pH = 5

La mayor diferencia entre un cultivo en continuo y un cultivo en Fed-Batch es la concentración de biomasa que se consigue en cada cultivo. También, es importante destacar que, a diferencia de los cultivos en continuo, cuando operamos en Fed-Batch, tenemos acumulación de producto. En el cultivo en continuo estamos introduciendo un medio con glucosa al 50 g/L que entra y sale al mismo caudal. De esta manera, se consigue un estado estacionario (Figura I, A, B y C) donde la biomasa llega idealmente a 25 g/L y se mantiene de forma constante. En cambio, en el Fed-Batch no hay flujo de salida y toda la biomasa generada se queda en el reactor. Esto permite alcanzar densidades celulares extremadamente altas mediante una alimentación exponencial controlada. Por lo tanto, el cultivo en quimiostato es la herramienta ideal para la caracterización fisiológica mientras que el Fed-Batch es el modo de operación para la producción industrial.

En la Figura I-D, se observa el perfil de CO_2 del cultivo en Fed-Batch. La medida del CO_2 nos permite observar cómo será el crecimiento de la biomasa en el cultivo. Observamos que el perfil de gases se asocia a una exponencial y es el esperado en un cultivo en Fed-Batch. En esta imagen también se puede observar que la RQ se mantiene dentro de los márgenes de la hipoxia, confirmando que, a pesar de que el volumen cambia, hemos trabajado bajo la misma limitación de oxígeno durante todo el cultivo.

En la Figura IV se observa el perfil de biomasa (obtenido mediante DCW) y el producto en cada muestra. Las muestras fueron tomadas en las concentraciones de biomasa que se relatan en el apartado de materiales y métodos. Teóricamente tanto la biomasa como la concentración del producto debería ser exponencial. La biomasa cumple con dicha condición, pero la concentración del producto se estabiliza a 60 mg/L. Este estacionamiento de la producción de Nb.b201 se debe a limitaciones en el gel SDS-PAGE (Anexo II) que sirvió para identificar el *nanobody*, por lo que se sospecha que la producción real no es igual a la observada a partir de la 4ª muestra, sino que debería ser superior.

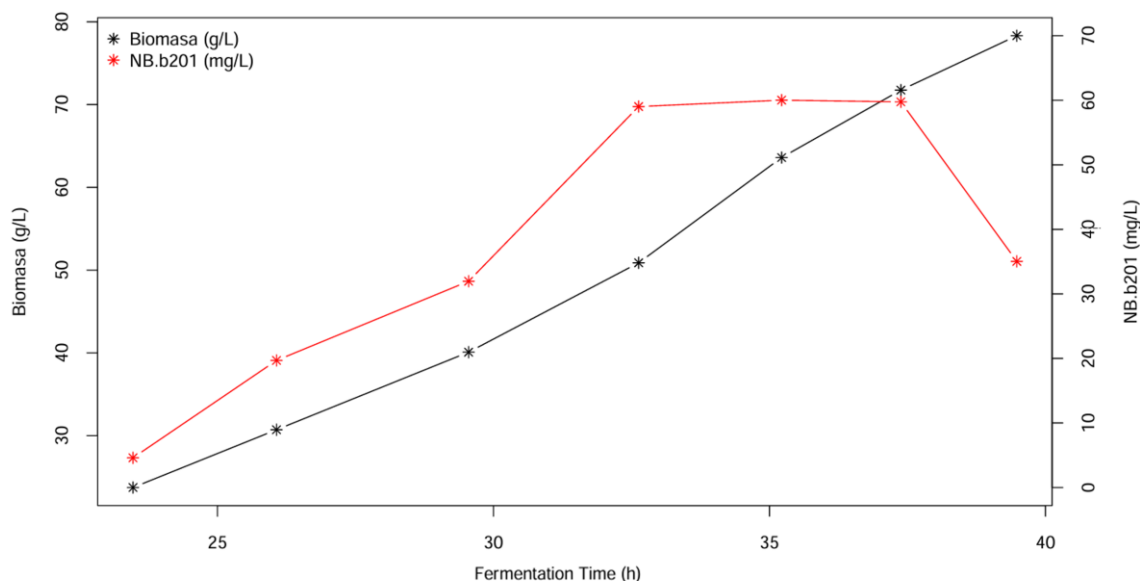


Figura IV. Perfil del cultivo en Fed Batch (FB1). Perfil de la concentración de biomasa y producción del Nb.b201 en el cultivo FB1 (Glucosa + Hipoxia + pH = 5).

En la Tabla II se muestra la comparativa entre el cultivo en Fed Batch y continuo para la condición de Glucosa + Hipoxia + pH = 5.

En primer lugar, se observa que la velocidad específica de consumo de sustrato q_s fue superior en el cultivo Fed-Batch ($0,37 \text{ gs/g}_x \cdot \text{h}$) en comparación con el cultivo en continuo ($0,25 \text{ gs/g}_x \cdot \text{h}$). Según [5], en cultivos limitados por carbono, el valor de q_s está directamente correlacionado con la tasa específica de crecimiento (μ). Esto sugiere que las células en el proceso Fed-Batch mantuvieron, en promedio, un estado metabólico más activo y una tasa de crecimiento superior a la fijada por la tasa de dilución en el quimiostato. Dado que la producción de proteínas recombinantes bajo promotores constitutivos (como el promotor GAP asociado al consumo de glucosa) suele estar principalmente asociada al crecimiento, esta diferencia en la actividad metabólica basal es un primer indicador de por qué el rendimiento productivo fue superior en la estrategia Fed-Batch.

Finalmente, la concentración final de Nb.b201 fue significativamente mayor en Fed-Batch (60 mg/L) frente al continuo (14 mg/L). Si bien parte de esta diferencia es inherente al modo de operación (acumulación de producto en el reactor frente a lavado constante por la dilución), la magnitud de la diferencia (más de 4 veces superior) es consecuencia directa de la mayor productividad específica (q_p) lograda. Estos resultados concuerdan con conclusiones publicadas [5], indicando que, para ciertos productos y promotores, las estrategias que permiten modular la tasa de crecimiento (como los perfiles exponenciales en Fed-Batch) suelen resultar en concentraciones finales superiores a las obtenidas en estados estacionarios subóptimos.

En conclusión, para la producción de Nb.b201 bajo las condiciones de estrés estudiadas, la estrategia Fed-Batch es superior debido a su capacidad para mantener una q_p elevada.

	Glucosa + Hipoxia + pH = 5	
	Fed-Batch	Continuo
qs (gS/gX·h)	0,37	0,25
qp (mgP/gX·h)	0,60	0,040
Nb.b201 (mg/L)	60	14

Tabla II. Comparativa Fed-Batch Vs Continuo. qS, qP y concentración de Nb.b201 de la condición Glucosa + Hipoxia + pH = 5 en los modos de operación Fed-Batch y continuo.

4. Conclusiones

Este estudio ofrece una caracterización fisiológica de *K. phaffii* como factoría celular para la producción del *nannobody* Nb.b201 bajo la regulación del promotor constitutivo P_{GAP}. Los resultados demuestran que la disponibilidad de oxígeno y el pH son parámetros claves para la intensificación del bioproceso.

La implementación de la hipoxia, monitoreada mediante una RQ de 1,4 - 1,5, supuso el cambio del metabolismo respiratorio al fermentativo e incrementó la producción del Nb.b201 en 2,4 veces y la qp en 2,9. Esta mejora es consistente con el aumento del flujo glucolítico necesario para satisfacer la demanda de ATP bajo limitación de oxígeno, que directamente aumenta la fuerza transcripcional de P_{GAP}.

También se identifica una relación entre la disponibilidad de oxígeno y el pH. Mientras que pH moderados (6 – 5) mantienen una productividad alta, pH por debajo de 4 bajan los rendimientos Y_{X/S} (pH 3) y la producción de *nannobody* en las condiciones probadas. Estos resultados se asocian a uno de los subproductos: el succinato. A bajos pH, el succinato difunde al citosol y causa una acidificación intracelular. Esta acidificación fuerza a la célula a bombear protones hacia el exterior y baja el flujo de energía destinado a la síntesis de proteínas recombinantes.

El cambio de trabajar en quimiostato a trabajar en Fed-Batch resultó en una concentración final de Nb.b201 de 60 mg/L. La acumulación de los subproductos se mantuvo por debajo de los niveles de toxicidad.

En resumen, la combinación de glucosa con hipoxia y pH controlado a 5, representó la condición óptima para maximizar la producción de Nb.b201 en *K.phaffii*.

5. Métodos

5.1. *K. phaffii* X-33 pGAPZaA Nb.b 201

En este estudio se ha empleado la cepa X-33 de *K. phaffii*. Esta cepa conserva los genes de la alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2), lo que le confiere un fenotipo Mut⁺ capaz de metabolizar el metanol. Su naturaleza protótrofa le permite crecer en medios mínimos sin necesidad de suplementos adicionales, optimizando así los costes en procesos industriales a gran escala. La cepa recombinante porta el gen del *nanobody* Nb.b 201 bajo el control transcripcional del promotor constitutivo P_{GAP}.

5.2. Cultivos

5.2.1. Pre-inóculo

Los cultivos en matraz agitado (shake flask) se inician a partir de viales de reserva (cryostocks) con una OD₆₀₀ de 60 para la preparación del pre-inóculo de la fermentación. Se utilizan matraces Erlenmeyer de 500 mL equipados con deflectores (baffles), en los cuales se cultiva el microorganismo en un volumen de 50 a 25 °C y 180 rpm. El tiempo de incubación y el volumen añadido se ajustan mediante las ecuaciones $C1 \times V1 = C2 \times V2$ y $Cf = Ci \times e^{\mu \times t}$ para alcanzar una OD₆₀₀ situada entre 10 y 14; en este punto, *K. phaffii* se encuentra en fase de crecimiento exponencial, lo que permite minimizar la fase de latencia en el biorreactor y asegurar una planificación experimental más precisa.

Para el pre-inóculo se utiliza medio YPG previamente esterilizado. Dicho medio se compone de 1% (w/w) de extracto de levadura, 2% (w/w) de peptona y 2% de glicerol. Para que sea un medio estéril, se autoclava a 120°C durante 30 minutos.

5.2.2. Batch

Antes de empezar el cultivo en Quimiostato y en Fed-Batch, se pasa por una fase Batch donde el cultivo generará biomasa. Esta fase se hace idealmente a 25°C y pH = 5. Se determina que la fase Batch ha terminado cuando se observa que el cultivo deja de generar CO₂ y se observa una subida de O₂.

El medio de la fase Batch se compone de 50 g/L de glicerol, 2,3 g/L de ácido cítrico 15,75 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0,63 g/L MgSO₄·7 H₂O, 0,9 g/L KCl, 0,02 g/L CaCl₂·2 H₂O, 5,75 mL/L de sales traza, 2,5 mL/L de biotina y 0,05 mL/L de anti espumante Glanapon 200kz.

El medio se prepara sin las sales traza y la biotina y se autoclava dentro del biorreactor. Después del autoclave y antes de inocular el cultivo, se completa el medio con las sales traza y la biotina. Para añadir las sales traza y la biotina se filtran mediante filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm.

5.2.3. Quimiostato

El cultivo en continuo se llevó a cabo en un Biostat B (Sartorius) de 3 L de capacidad total, con un volumen de trabajo inicial de 1 L. Para asegurar un estado estacionario con volumen constante, se ajustó la cánula de salida a la altura correspondiente.

El medio de cultivo para los cultivos en quimiostato se compone de 50 g/L de la fuente de carbono (glucosa o glicerol), 0,9 g/L de ácido cítrico monohidratado, 0,65 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,7 g/L de KCl, 0,01 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/L de sales traza, 1 mL/L de Biotina a 0,2g/L y 0,2 mL/L de antiespumante Glanapon 200kz.

Para la elaboración de la solución de sales traza, se mezclan los siguientes componentes: 5 mL/L de H_2SO_4 (97%), 65 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 g/L ZnCl_2 , 6 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 3,36 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,82 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,08 g/L de NaI y 0,02 g/L de H_3BO_3 . El volumen se completa con agua destilada hasta enrasar. Por otro lado, la biotina se prepara a una concentración de 0,2 g/L a partir de una disolución pura en polvo.

Las condiciones de operación para el primer cultivo fueron: agitación a 700 rpm, pH 5,0, temperatura de 25 °C y una sobrepresión de 0,2 bar. El flujo de gases se fijó en 0,6 L/min de aire y 0,2 L/min de O_2 .

En el segundo cultivo, se mantuvieron las constantes anteriores modificando únicamente la composición de los gases para inducir condiciones de limitación de oxígeno. En este caso, se omitió el suministro de O_2 puro. Para la condición con glucosa (hipoxia), se empleó un flujo de 0,32 L/min de aire y 0,48 L/min de N_2 . Para la condición con glicerol, el flujo se ajustó a 0,7 L/min de aire y 0,1 L/min de N_2 .

Finalmente, en el tercer cultivo, se replicaron las condiciones de hipoxia del segundo experimento (0,32 L/min de aire y 0,48 L/min de N_2) evaluando el efecto del pH en tres fases secuenciales: pH 6,0, pH 4,0 y pH 3,0.

5.2.4. Fed-Batch

Para el cultivo en Fed-Batch se utiliza glicerol a 40 g/L para la fase batch (utilizando el mismo medio que se ha detallado en el apartado 4.2.2.) y glucosa a 400 g/L para la fase de feeding. También se mantiene una RQ entre 1,3 y 1,5 (según se explica en [30]) para trabajar en condiciones de hipoxia y se fija el pH de trabajo a 5.

Las muestras se toman a 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 g/L de biomasa y se procesan de la misma manera que las muestras de los continuos para hacer los análisis pertinentes.

5.3. Métodos analíticos

Cada biorreactor cuenta con sonda de pH, pO₂ y temperatura que sirven para controlar las condiciones del cultivo. También, mediante el analizador de gases (BlueInOne Ferm) se analizan los parámetros respiratorios del cultivo (CO₂ y O₂). Con estos datos pueden calcular y ver de forma instantánea la RQ (*Respiratory quotient*).

5.3.1. DCW

Para determinar la biomasa del cultivo se cogieron muestras de 2 mL del cultivo y se filtraron a través de filtros de microfibra de vidrio con un tamaño de poro de 0,7 µm previamente pesados y secados a 105°C. Se filtra con ayuda de un matraz Kitasato y antes de quitar el filtro, se lava con 2 volúmenes (2 mL) de una disolución del 0,9% de NaCl. Seguidamente se dejan secar en la estufa a 105°C hasta alcanzar un peso constante.

5.3.2. OD

También se tomaron muestras del cultivo y se observaron mediante el espectrofotómetro DR3900 a OD₆₀₀ para seguir de forma instantánea la dinámica de la biomasa.

5.3.3. HPLC

En el HPLC se analizan muestras de los medios para conocer la concentración exacta de la fuente de carbono del medio de cultivo y muestras sacadas del cultivo para descartar la presencia de productos no deseados, a la vez que poder cuantificar los potenciales sub-productos fermentativos.

Las muestras de los medios se filtran con un filtro de 0,2 µm. Las muestras sacadas del cultivo se centrifugan a máxima potencia durante 90 segundos y se filtra el sobrenadante con los mismos filtros utilizados para el medio de cultivo.

5.3.4. Microscopia óptica

Cuando se coge muestra del cultivo, se reserva 1ml del volumen y se diluye 10 veces para observarlo mediante un microscopio Zeiss Axioskop y descartar contaminaciones y la formación de pseudo hifas.

5.3.5. SDS-PAGE

Para identificar y cuantificar el Nb.b.201 se utilizan los geles de poliacrilamida “Mini-PROTEAN TGX Gels”.

Primero de todo, se prepara una mezcla de Leammli y B- mercaptoetanol. Por cada muestra que se quiera cargar en el gel, se añaden 7 µl de Leammli y 0'6 µl de B-mercaptoetanol

Una vez tenemos el mix, se mezclan 7'6 µl junto con 22'4 µl de muestra. Posteriormente se calienta durante 5 minutos a 95°C. Para finalizar, se carga en el gel y se deja correr a 120 V.

Cuando el gel ya ha corrido, se tiñe durante 15 minutos con solución de tinción (50% metanol, 0'1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% ácido acético y 40% agua destilada) y luego se hacen 2 ciclos de 30 minutos para desteñir con la solución de destinción (10% ácido acético, 50% metanol y 40% agua destilada).

Para ver el resultado del gel se hace una fotografía y se procesa la imagen mediante el programa Image Lab para poder cuantificar las bandas.

5.3.6. Bradford

Para cuantificar la proteína total se apuesta por la técnica Bradford. Se inicia mezclando 35 µl de muestra con 220 µl de reactivo Bradford en una placa de 96 pocillos. En la placa se pondrán todas las muestras y una recta patrón que, en nuestro caso, iba desde una concentración de 0,0025 mg/ml hasta 1 mg/ml.

Una vez llena la placa de 96 pocillos, se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasados los 10 minutos se hace una lectura a 595 nm.

5.4. Factores de ajuste, balances de materia y tratamientos de datos

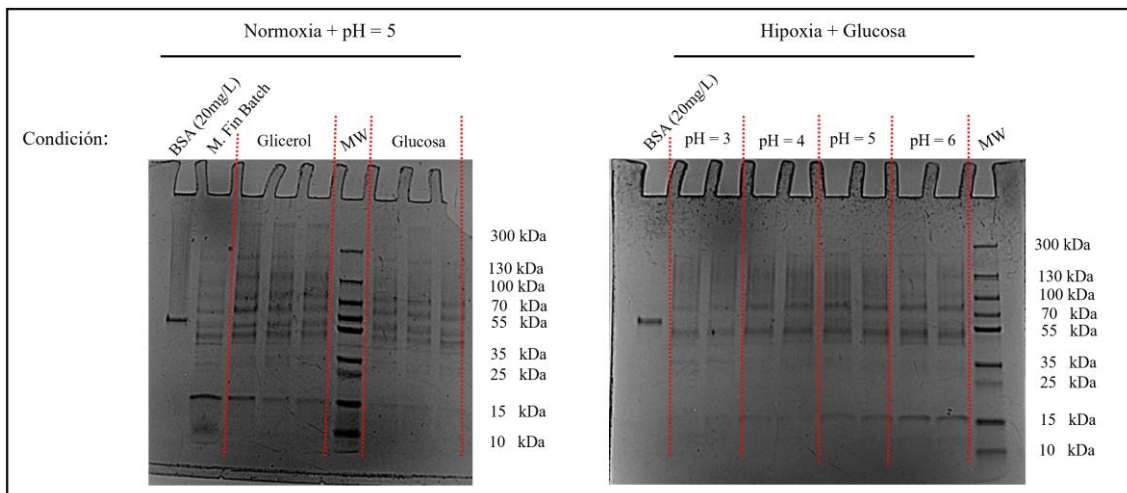
En las condiciones de Glucosa + Hipoxia para los pH 5 y 4, los balances de materia no cuadran. En estas condiciones se obtienen pesos secos (DCW) más altos que los reportados bibliográficamente, por lo que se sospecha que el valor de la biomasa observada es mayor al valor de la biomasa real y, por lo tanto, tener balances de materia por encima de 1.

Para corregir este error, se multiplica el valor de la biomasa obtenida mediante el DCW por el factor correspondiente para que el balance de materia cuadre. Los factores de corrección son 0,63 para la condición de hipoxia a pH = 5 y 0,78 para la condición a pH = 4.

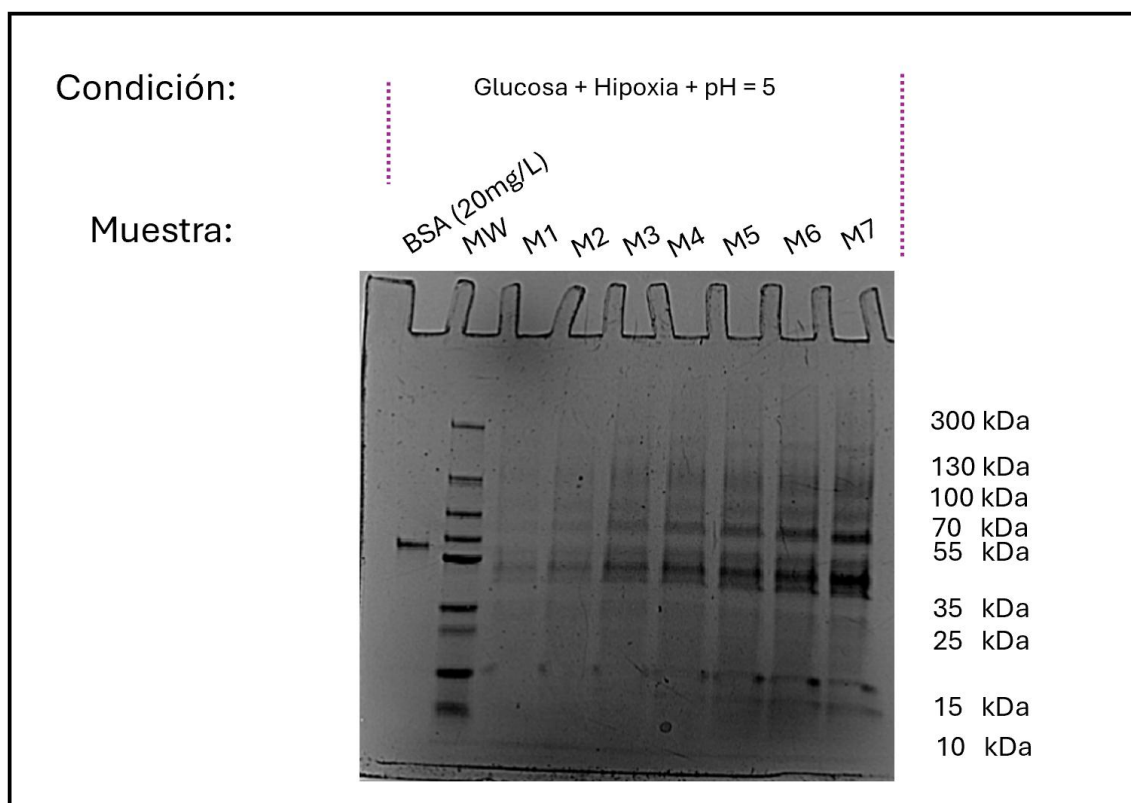
Tras este procedimiento, los balances presentaron un error máximo del 15%, procediéndose posteriormente a una reconciliación de datos. Este método ajusta los valores de las velocidades específicas y el cociente respiratorio (RQ) para garantizar el cumplimiento estricto de los balances. Cabe destacar que los resultados presentados en la Figura 1 corresponden a valores medidos directamente por el analizador de gases, sin haber sido sometidos a ningún reajuste previo.

Los balances de materia permitieron calcular los $Y_{X/S}$, q_s , q_p , q_{O_2} , q_{CO_2} , q_{EtOH} , q_{Arab} , q_{Suc} , μ y RQ.

6. Documentos adicionales



Anexo I. Geles SDS-PAGE de los cultivos en continuo. Geles SDS-PAGE para las condiciones estudiadas en continuo (C1, C2 y C3).



Anexo II. Gel SDS-PAGE del cultivo en Fed-Batch (FB1). Muestras ordenadas cronológicamente del cultivo en Fed-Batch cargadas en gel SDS-PAGE.

7. Abreviaciones

ADN/DNA (Ácido Desoxirribonucleico); AOX (Alcohol Oxidasa); ATP (Adenosín Trifosfato); D (Tasa de Dilución); DHA (Dihidroxiacetona); DHAP (Dihidroxiacetona Fosfato); GAP/GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); GUT1/GUT2 (Enzimas del metabolismo del glicerol); HSA (Albúmina Sérica Humana); IgG (Inmunoglobulina G); MSA (Albúmina Sérica de Ratón); NADPH (Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosfato); Nb (*Nanobody*); OTR (Tasa de Transferencia de Oxígeno); P_{AOX1} (Promotor del gen de la alcohol oxidasa 1); P_{GAP} (Promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); PET (Tomografía por Emisión de Positrones); PTM (Modificaciones Postraduccionales); SPECT (Tomografía Computarizada de Emisión Monofotónica); TCA (Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos); UPR (Respuesta a Proteínas Mal Plegadas); VHH (Dominio Variable de Cadena Pesada de Camélidos).

8. Agradecimientos

Quiero agradecer a mis tutores y al resto del equipo del laboratorio por su entrega y su trato. Ha sido un placer haber trabajado con vosotros.

Quiero agradecer a Gina Liarte, que me ha acompañado todos los días con su trabajo, tiempo y dedicación.

También quiero agradecer a mi familia, en especial, a mi hermana Ana.

9. Bibliografía

1. Herbert D, Elsworth R, Telling RC. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study.
2. Ziv N, Brandt NJ, Gresham D. The use of chemostats in microbial systems biology. Journal of Visualized Experiments. Journal of Visualized Experiments; 2013; <https://doi.org/10.3791/50168>
3. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. Oxford University Press (OUP); 2000;24:45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
4. Friehs K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. 2003; <https://doi.org/10.1007/b12440CHAPTER>
5. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. Biotechnol. Adv. Elsevier Inc.; 2014. p. 1177–93. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
6. Gasser B, Mattanovich D. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: On the road to large scale? Biotechnol. Lett. 2007. p. 201–12. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9237-x>
7. Karbalaee M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. J. Cell. Physiol. Wiley-Liss Inc.; 2020. p. 5867–81. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
8. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer Verlag; 2014. p. 5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
9. Van Urk H, Voll WSL, Scheffers WA, Van Dijken JP. Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 1990.
10. Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 1989.
11. Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair S V, Cregg JM, Bernardi A. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene. 1997.
12. Juturu V, Wu JC. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. ChemBioChem. Wiley-VCH Verlag; 2018. p. 7–21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>
13. Várnai A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G, Eijssink VGH. Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. Microb Cell Fact. BioMed Central Ltd.; 2014;13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-57>

14. Lin X, Ding W, Zheng S, Wu L, Chen X, Xie C, et al. Novel transcriptional regulation of the GAP promoter in *Pichia pastoris* towards high expression of heterologous proteins. *Microb Cell Fact.* BioMed Central Ltd; 2024;23. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02435-9>
15. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microb. Cell Fact.* 2008. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-11>
16. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, et al. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol.* 2010;4. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-141>
17. Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ. Microbiol.* Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 878–93. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
18. Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P, et al. Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microb Cell Fact.* 2009;8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-65>
19. C. Hammers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, R. Hammers. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. 1997;
20. Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval. *Drugs.* Springer International Publishing; 2018;78:1639–42. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0989-0>
21. Yang EY, Shah K. Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front. Oncol.* Frontiers Media S.A.; 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01182>
22. Shen Z, Xiang Y, Vegara S, Chen A, Xiao Z, Santiago U, et al. A robust and versatile nanobody platform for drug delivery [Internet]. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.19.257725>
23. McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* Nature Publishing Group; 2018;25:289–96. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0028-6>
24. Zhao S, Wang Y, Li Q, Xie J, Xu X, Zhang W, et al. Rewiring central metabolism in *Komagataella phaffii* for efficient mannose synthesis. *Microb Cell Fact.* BioMed Central Ltd; 2026;25. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02886-8>
25. Rebnegger C, Vos T, Graf AB, Valli M, Pronk JT, Daran-Lapujade P, et al. *Pichia Pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. *Appl Environ Microbiol.* American Society for Microbiology; 2016;82:4570–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.00638-16>

26. Barrero JJ, Pagazartaundua A, Glick BS, Valero F, Ferrer P. Bioreactor-scale cell performance and protein production can be substantially increased by using a secretion signal that drives co-translational translocation in *Pichia pastoris*. *N Biotechnol.* Elsevier B.V.; 2021;60:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.09.001>
27. Gasset A, Garcia-Ortega X, Garrigós-Martínez J, Valero F, Montesinos-Seguí JL. Innovative Bioprocess Strategies Combining Physiological Control and Strain Engineering of *Pichia pastoris* to Improve Recombinant Protein Production. *Front Bioeng Biotechnol.* Frontiers Media S.A.; 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.818434>
28. Orij R, Brul S, Smits GJ. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2011. p. 933–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.011>
29. Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M. Weak acid adaptation : the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives [Internet]. 2015. www.sgmjournals.org
30. Gasset A, Van Wijngaarden J, Mirabent F, Sales-Vallverdú A, Garcia-Ortega X, Montesinos-Seguí JL, et al. Continuous Process Verification 4.0 application in upstream: adaptiveness implementation managed by AI in the hypoxic bioprocess of the *Pichia pastoris* cell factory. *Front Bioeng Biotechnol.* Frontiers Media SA; 2024;12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1439638>