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

Pérez Escudero, Pablo; García Ortega, Javier (tut.); Gasset Franch, Arnau (tut.).
*Optimización de medios de cultivo para bioprocesos en continuo de larga duración
con Pichia pastoris.* (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Enginyeria
Biològica i Ambiental)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336448>

under the terms of the  license.



**Optimización de medios de cultivo para
bioprocesos en continuo de larga
duración con *Pichia pastoris***

AUTOR DEL TFM

Pablo Pérez Escudero

MÁSTER EN INGENIERÍA BIOLÓGICA Y AMBIENTAL

TUTORES DEL TFM

Xavier García Ortega

Arnau Gasset Franch

FECHA

11/02/2025

1. Introducción	4
1.1. <i>Pichia pastoris</i> como factoría celular	4
1.2. Sistema de expresión libre de metanol.....	5
1.3. Dominio variable de anticuerpos de cadena pesada (VHH)	6
1.4. Evolución y aplicación de los medios de cultivo en <i>Pichia pastoris</i>	12
2. Resultados y discusión	13
2.1. Análisis inicial y evaluación de diferentes medios de cultivo.....	13
2.2. Análisis de la solubilidad del VHH a distintos pH.....	15
2.3. Optimización específica de BSM y RDM centrada en la producción de VHH	16
2.3.1. Optimización de las condiciones fisicoquímicas del medio BSM.	16
2.3.2. Optimización de las condiciones fisicoquímicas del medio RDM	17
2.3.2.1. Análisis del efecto de sales traza, pH y concentración iónica sobre la producción de VHH en <i>Pichia pastoris</i> utilizando urea como fuente de nitrógeno....	18
2.3.2.2. Análisis del efecto de sales traza, pH y concentración iónica sobre la producción de VHH en <i>Pichia pastoris</i> utilizando NH ₄ ⁺ como fuente de nitrógeno..	20
2.4. Análisis comparativo de las condiciones más favorables	21
2.5. Análisis comparativos de los costes de los medios de cultivo de partida respecto a los optimizados	24
3. Conclusiones	25
4. Materiales y métodos	27
4.1. Cepas y clones	27
4.2. Operación del biorreactor.....	27
4.2.1. Preparación del inóculo	27
4.2.1.1. Banco de células de trabajo.....	27
4.2.1.2. Preparación del pre-inóculo.	27
4.3. Cultivo en quimiostato	27
4.3.1. Preparación del biorreactor y la fase <i>batch</i>	28
4.3.2. Operación del quimiostato	30
4.4. Métodos analíticos	30
4.4.1. Cuantificación de la biomasa mediante la densidad óptica (OD ₆₀₀)	30
4.4.2. Cuantificación de la biomasa mediante el peso seco celular	31
4.4.3. Análisis de gases de entrada y salida	31
4.4.4. Cuantificación de fuentes de carbono y subproductos	31
4.4.5. Cuantificación de la concentración de VHH.....	32
4.4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	32
4.4.5.2. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA).....	32
4.4.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS- PAGE)	33
4.5. Secuencia experimental.....	33
5. Referencias.....	36

Resumen

Introducción

Komagataella phaffii se posiciona como uno de los sistemas microbianos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes debido a su capacidad para crecer a alta densidad celular, realizar modificaciones postraduccionales y secretar proteínas al medio. La mayoría de los procesos descritos en esta levadura se han llevado a cabo en modo *batch* o *fed-batch*, a pesar del interés actual por los procesos en continuo. Este requiere de cepas estables genéticamente que eviten la pérdida de productividad a lo largo del tiempo y el desarrollo de medios de cultivo que dé lugar a altas productividades manteniendo condiciones estables, pues los medios ampliamente utilizados en *P. pastoris*, como el BSM, generalmente presentan una elevada fuerza iónica que puede comprometer tanto la fisiología celular como la solubilidad de proteínas recombinantes sensibles. En este contexto, resulta necesario adaptar y optimizar medios definidos existentes para su aplicación en cultivos continuos de larga duración, en este caso orientados a la producción de anticuerpos tipo VHH bajo un sistema de expresión libre de metanol regulado por el promotor constitutivo P_{GAP} .

Resultados

Diferentes alternativas de composiciones descritas en la literatura fueron comparadas en cultivos en continuo. Los medios FM22, MBSM y BFM21 fueron descartados debido a su elevada variabilidad analítica y valores de productividad específica por debajo del resto en el caso de los dos últimos. La optimización del medio BSM mostró que la reducción de la concentración total de sales y el uso de la solución de sales traza PTM 2 incrementaron la tasa específica de producción de VHH hasta 2,50 veces respecto a la formulación original. Sin embargo, presentó problemas de precipitación. En el caso del RDM, la modificación de la fuente de nitrógeno y de la composición iónica permitió reducir la precipitación. Además, el uso de NH_4OH como fuente de nitrógeno, junto con la disminución de fosfato, calcio y magnesio, dio lugar a las condiciones más estables y productivas del estudio. Finalmente, las formulaciones optimizadas permitieron aumentos de la tasa específica de producción de anticuerpos tipo VHH entre 1,35 y 6,03 veces respecto al medio de referencia.

Conclusiones

Este estudio demuestra que la adaptación racional de medios de cultivo definidos es clave para el éxito de procesos continuos de larga duración en *P. pastoris*. La reducción de la fuerza iónica del medio, la selección adecuada de sales traza y la elección de la fuente de nitrógeno tienen un impacto directo sobre la tasa específica de producción de VHH. Las formulaciones optimizadas de BSM y RDM desarrolladas en este trabajo, además de aumentar la producción específica, permiten minimizar el coste de estos medios y los problemas de precipitación.

Palabrasclave: *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), Producción de proteína recombinante, Sistema de expresión libre de metanol, Optimización de medios de cultivo, VHH.

El presente trabajo se ha redactado conforme al estilo de la revista *Microbial Cell Factories*.

1. Introducción

La industria biotecnológica avanza de forma exponencial hacia el escalado de procesos viables a nivel económico, productivo y sostenible, ya que la creación de nuevas empresas biotecnológicas y la consolidación de productos biotecnológicos por parte de grandes empresas farmacéuticas está permitiendo que este sector adquiera un gran impacto global a nivel macroeconómico [1,2].

Según la consultora especializada en análisis de mercado Grand View Research, el sector global biotecnológico facturó 2,002 billones de dólares en 2025, proyectándose que alcance los 3,879 billones de dólares para 2030, lo cual supondría una tasa de crecimiento anual compuesto del 14,1 %. Teniendo en cuenta que el crecimiento promedio de la economía mundial ronda normalmente el 3,0 %, podemos decir que la biotecnología se posiciona como un campo con una gran proyección [3].

No obstante, este campo presenta un amplio margen de mejora en áreas clave como el escalado de procesos, la optimización de la etapa de purificación y el desarrollo de cepas robustas [4]. Un escalado eficiente no solo implica tener biorreactores capaces de mantener la homogeneidad del cultivo, optimizar la transferencia de oxígeno o controlar de forma precisa las condiciones del proceso, sino que además precisa del desarrollo de factorías celulares resistentes capaces de mantener en el tiempo la viabilidad celular y la productividad. Por otra parte, sigue siendo vital una buena optimización de las etapas de *downstream* que nos permita recuperar la mayor cantidad posible de producto con el menor número de pasos factibles. Esto es especialmente importante, ya que esta etapa puede contribuir hasta un 70% en los costes totales de producción [5].

1.1. *Pichia pastoris* como factoría celular

En este estudio usamos como factoría celular *Komagataella phaffii* anteriormente conocida como *Pichia pastoris*. Esta levadura metilotrófica, aunque fue aislada en 1920 de los exudados de un castaño en Francia, ha sido de gran interés biotecnológico desde finales de 1960 [6,7].

Hoy en día, *P. pastoris* se posiciona como uno de los huéspedes microbianos más relevantes para la producción de proteínas recombinantes, compitiendo directamente con *E. coli* y mostrando un desempeño superior al de *S. cerevisiae*. Tanto es así, que hasta ahora se han producido más de 5000 proteínas diferentes usando *P. pastoris* como hospedador [8].

El gran interés en el uso de esta levadura como factoría celular radica en la presencia de una amplia gama de características que la hacen idónea para ser cultivada a escala industrial. Entre ellas, destaca su capacidad para crecer a alta densidad celular, realizar modificaciones postraduccionales y secretar las proteínas sintetizadas, además de su resistencia al estrés cortante, osmótico y oxidativo [9–11]. También debemos destacar su alto rendimiento biomasa sustrato, la disponibilidad de construcciones genéticamente estables y el gran número de herramientas genéticas accesibles para modificar su genoma [12,13]. Incluso cuenta con la ventaja de tener modelos metabólicos bien establecidos [14].

Aunque *P. pastoris* es estable genéticamente, como se comentó anteriormente, la gran mayoría de artículos publicados tratan de cultivos por lotes (*batch*) o lotes alimentados (*fed-batch*), los cuales suelen ser de corta duración, por lo que las células no suelen presentar problemas de estabilidad genética. Actualmente, existe cierta tendencia en investigación hacia los cultivos

en continuo [15], debido en gran parte a que este modo de operación nos proporciona una mayor productividad volumétrica y un mayor rendimiento espacio temporal [16], permitiéndonos operar biorreactores entre 5 y 10 veces más pequeños en comparación con los empleados en procesos tipo *batch* o *fed-batch* [17].

Sin embargo, los cultivos operados en continuo pueden extenderse hasta los 30 días o más. Por ello, será relevante emplear una cepa genéticamente estable la cual sea capaz de minimizar la producción de impurezas y por supuesto mantener su productividad a lo largo del cultivo. De esta forma, es estrictamente necesario hacer pruebas de productividad verificando así la estabilidad de nuestra cepa [16].

En cultivos de larga duración, el uso de *P. pastoris* se ve mermado por la aparición de pseudohifas entorno a las 100 horas de cultivo, cuando se emplea glucosa o glicerol como fuente de carbono. En la naturaleza, este crecimiento filamentosos permite a la levadura acceder a nutrientes de manera más eficiente, pues dicha morfología no solo incrementa la relación superficie-volumen, aumentando así el área disponible para la absorción de nutrientes, sino que también le permite adherirse a la superficie para buscar nutrientes [18].

Por el contrario, este fenotipo en el laboratorio presenta una seria desventaja, ya que conlleva una notable disminución de la tasa específica de producción (q_p). Actualmente, se han identificado los genes de la familia FLO como los causantes de este cambio en la morfología, descubriéndose que la delección del gen *FLO8* permite frenar la aparición de estas pseudohifas manteniendo así la producción incluso pasadas 100 horas [19,20].

1.2. Sistema de expresión libre de metanol

Históricamente *P. pastoris* ha despertado un gran interés a nivel industrial por su capacidad de crecer usando metanol como fuente de carbono. Fruto de este interés, se identificó el promotor de la alcohol oxidasa 1 (*PAOX1*), fuertemente inducible por metanol [21], llegando a patentarse su uso como regulador de la expresión de proteínas recombinantes [22].

Sin embargo, el uso de metanol conlleva ciertos riesgos a nivel industrial, favoreciendo como alternativa el uso de promotores no inducibles por metanol como el promotor constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*P_{GAP}*), gen esencial de la glucólisis [23]. En la actualidad, ambos promotores se utilizan fundamentalmente como referencia en estudios comparativos orientados a la identificación y caracterización de promotores más potentes como *P_{DF}* y *P_{UPP}*, entre otros [24].

En este proyecto se emplea *P_{GAP}* como regulador de la expresión de nuestra proteína recombinante. Antes de analizar dicho promotor, hay que añadir que los niveles de expresión para una proteína dada no solo dependen del promotor empleado, pues también varían significativamente en función de diversos aspectos como las propiedades de la proteína y el hospedador empleado [25,26].

En el caso de *P_{GAP}*, este nos permitirá tener una expresión génica fuerte y constitutiva cuando la levadura crezca usando glucosa, glicerol u otras hexosas como sustrato. Además, el uso del promotor *P_{GAP}* resulta especialmente ventajoso en cultivos operados en modo quimiostato, pues bajo limitación de carbono, provoca un aumento del flujo glucolítico que conduce a una mayor actividad transcripcional de los genes regulados por este promotor [27]. Otras estrategias como la limitación del suministro de oxígeno también producen un aumento en el flujo metabólico a través de la glucólisis [28].

Por último, y aunque según la literatura P_{GAP} posee una eficiencia de expresión relativamente baja en comparación con P_{AOXI} [29], la ventaja de tener un sistema de expresión libre de metanol es mucho más atractiva a nivel industrial en el ámbito de seguridad. Además, el uso de metanol como fuente de carbono requiere un mayor aporte de oxígeno y conlleva una mayor producción de calor [30].

1.3. Dominio variable de anticuerpos de cadena pesada (VHH)

Los anticuerpos propios de mamífero como la inmunoglobulina γ (IgG), normalmente presentan una estructura formada por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). La cadena ligera (L) presenta dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL). Mientras que la cadena pesada (H) la componen cuatro dominios, uno variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2 y CH3). Los extremos N-terminales de ambas cadenas corresponden a los dominios VH y VL, responsables de la unión específica al antígeno (Figura 1).

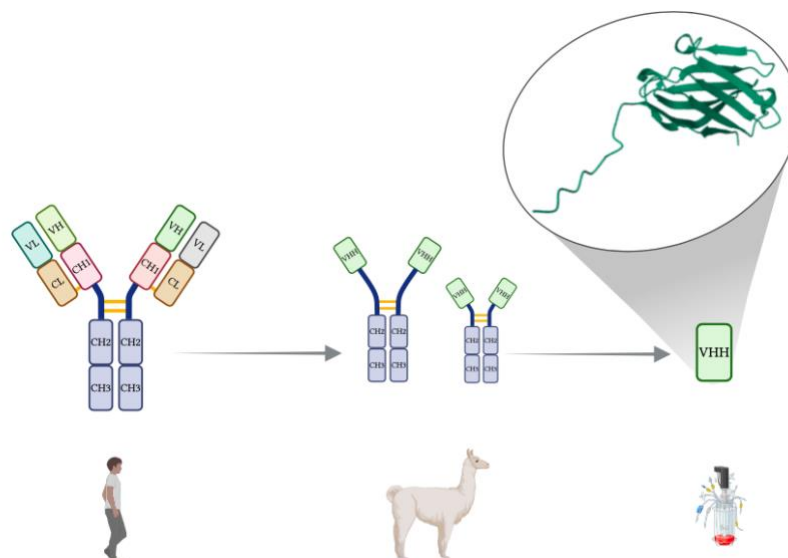


Figura 1. Comparación estructural entre la inmunoglobulina γ de humano, los anticuerpos de camélidos y la subunidad variable de cadena pesada (VHH) derivada de anticuerpos de camélidos (creada en BioRender).

Sin embargo, en las especies de la familia *Camelidae*, encontramos anticuerpos de cadena pesada con estructuras ligeramente diferentes, pues estos carecen de la cadena ligera (L) y del primer dominio constante de la cadena pesada (CH1), así como del dominio variable de la cadena ligera (VL). De esta forma, la región variable está formada exclusivamente por un único dominio denominado VHH, definido como el dominio variable de unión al antígeno de la cadena pesada de los anticuerpos de cadena pesada. En consecuencia, su tamaño será más pequeño, con un peso molecular de aproximadamente 90 kDa en lugar de 150 kDa para los anticuerpos convencionales. Cuando este dominio VHH se encuentra aislado también es denominado *nanobody* y su peso molecular varía entre 12 y 15 kDa [31].

Estos poseen un gran número de aplicaciones, sirviendo como herramientas mejoradas de diagnóstico, biosensores o agentes terapéuticos [32]. Aunque actualmente a nivel industrial la producción recombinante de anticuerpos está gobernada por anticuerpos monoclonales (mAbs) y los fragmentos de unión al antígeno (Fab), los VHH poseen numerosas ventajas que facilitan su producción a gran escala frente a los dos tipos de anticuerpos mencionados

anteriormente [33].

La primera ventaja a destacar de los VHH es su tamaño, pues al ser considerablemente menor, pueden acceder a epítomos inaccesibles para los mAbs manteniendo altas afinidades de unión. De esta forma, difunden y penetran con mayor eficacia en los tejidos convencionales, favoreciendo así sus propiedades farmacocinéticas. Además, normalmente los VHH presentan una mayor estabilidad frente a temperatura, pH y proteasas [34]. Respecto a su producción a nivel industrial, la alta solubilidad de estos dominios VHH los hace independientes de las modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, para un plegamiento adecuado, lo que simplifica su producción recombinante [35].

Por tanto, pueden producirse fácilmente mediante sistemas de expresión microbiana, lo que resultará en cultivos más rápidos, con mayores rendimientos y menores costes de producción, pues la carga metabólica que supone para el hospedador es mucho menor debido a que su secuencia es reducida [36].

En la producción de proteínas recombinantes, la correcta formación de enlaces disulfuro constituye uno de los principales cuellos de botella del proceso. Los comúnmente llamados *nanobodies* (*variable domain of heavy-chain-only antibodies*, VHH) presentan un número reducido de enlaces disulfuro en comparación con anticuerpos convencionales, lo que facilita su plegamiento y, por tanto, favorece su expresión heteróloga [37,38]. Estas subunidades forman típicamente uno o dos puentes disulfuro, por lo que requieren un ambiente oxidante para formar estos enlaces. Esto apoya el uso de *P. pastoris* como hospedador, ya que la secreción de proteínas al medio proporciona un entorno oxidante favorable [39].

Para finalizar este apartado y de cara a establecer cierta comparación entre los niveles de producción de VHH de nuestro estudio y otros trabajos centrados en la producción de VHH en *P. pastoris*, presentamos a continuación una serie de tablas que recogen los datos mencionados anteriormente para procesos tipo *batch*, *fed-batch* y continuo. Esto nos permitirá analizar y caracterizar a fondo la producción de VHH recombinante más adelante.

Tabla 1. Recopilación de trabajos basados en la producción de VHH y similares en *P. pastoris* mediante procesos tipo *batch*.

Cepa	Promotor	Modo de operación	Medio	Fuente de carbono	Proteína recombinante	Antígeno	Concentración de VHH	Concentración de biomasa	q _P	Volumen de trabajo	Condiciones	Método analítico	Referencias
GS115	P _{GAP}	Shake flasks	BMGY	Glucosa Glicerol Sacarosa Metanol Sorbitol	VHH	CEACAM5	13-47 mg/L	4-11 g/L	n. d.	50 mL	pH 5-7; T=28°C; 220 rpm	SDS-PAGE	[40]
	P _{GAP}		YPG	Glicerol			43-47 mg/L	11-12 g/L					
	P _{GAP}		BMMY	Glucosa			52 mg/L	11-12 g/L					
	P _{AOXI}		BMMY	Metanol			42 mg/L	n. d.					
GS115	P _{AOXI}	Baffled shake flasks	BMGY-BMMY	Glicerol-Metanol	VHH	MUC1	10–15 mg/L.	n. d.	n. d.	100 mL	pH 5-6.5; T=25°C; 250 rpm	ELISA	[41]
Pink strain (Δade2)	P _{AOXI}	n.d.	BMMG-BMMY	Glicerol-Metanol	VHH	<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin E	16 mg/L	n. d.	n. d.	n. d.	pH 6; T=28°C	SDS-PAGE	[42]
X-33	P _{AOXI}	Shake flasks	BMMG-BMMY	Glicerol-Metanol	Anti-kappa NBs fused to a Hisx6-tag (κNB)	Mouse kappa chain NB	18 mg/L	n. d.	n. d.	200 mL	pH 6; T=28°C; 250 rpm	SDS-PAGE	[43]
X-33	P _{AOXI}	Shake flasks	BMMG-BMMY	Glicerol-Metanol	NbAahI'22	AahI' scorpion toxin	10-15 mg/L	n. d.	n. d.	n. d.	pH 6; T=30°C; 250 rpm	SDS-PAGE	[44]

n. d.: No detectado

Tabla 2. Recopilación de trabajos basados en la producción de VHH y similares en *P. pastoris* mediante procesos tipo *fed-batch*.

Cepa	Promotor	Modo de operación	Medio	Fuente de carbono	Proteína recombinante	Antígeno	Concentración de VHH	Concentración de biomasa	q _P	Volumen de reactor	Condiciones	Método analítico	Referencias
NRRL Y-11430-P _{PDC} -HAC1	P _{AOXI}			Metanol			2,3-3,5 g/L						
NRRL Y-11430	P _{DF}	<i>Fed-batch</i>	Medio complejo	Glucosa	VHH	n. d.	0,5-1,5 g/L	n. d.	n. d.	2,0 L	pH 6; T=30°C;500-1200 rpm; DO=30%	PA-HPLC	[45]
NRRL Y-11430-P _{PDC} -HAC1	P _{DF}			Glucosa			1,0-4,0 g/L						
H55 (GSS152-P2S2-Va-55p-HAC1)	P _{55p}	<i>Fed-batch</i>	BMMG-BMMY	Glicerol-Metanol	VHH	n. d.	2,1 g/L	n. d.	n. d.	3,0 L	pH 5; T=29°C; DO=40%	ELISA	[46]
n.d.	n.d.	<i>Fed-batch</i>	n.d.	n.d.	VHH	RBDs SARS-CoV-2	20 g/L	n. d.	n. d.	7,0 L	n. d.	SDS-PAGE	[47]
CBS7435 MutS	P _{AOXI}	<i>Fed-batch</i>	BSM	Glicerol-Metanol	VHH	n. d.	4,0-8,0 g/L	480-500 g/L	n. d.	1,0 L	pH 5; T=28°C;700-1200 rpm; DO=30%	CE-SDS	[48]
CBS7435 MutS	P _{AOXI}	<i>Fed-batch</i>	BSM	Glicerol-Metanol	scFv	n. d.	2,0-5,0 g/L	480-500 g/L	n. d.	1,0 L	pH 5; T=28°C;700-1200 rpm; DO=30%	CE-SDS	
CBS2612 MutS							3,5 g/L	130 g/L	0,205 mg/g·h				
CBS2612 Mut-	P _{AOXI}	<i>Fed-batch</i>	BSM	Glicerol-Metanol	VHH	n. d.	1,6 g/L	105 g/L	0,088 mg/g·h	0,50 L	pH 5-5,5; T=28°C;750 rpm; DO=20%	HPLC	[49]
CBS2612: Mut- P _{AOXI} Adh2							2,4 g/L	85 g/L	0,234 mg/g·h				

n. d.: No detectado

CBS2612: Mut- P_{FLD1} Adh2							2,6 g/L	90g/L	0,237 mg/g·h				
CBS2612 Mut- PAOX1	P_{AOX1}	<i>Fed-batch</i>	BSM	Glicerol- Metanol	VHH	n. d.	1,6 g/L	120 g/L	0,062 mg/g·h	0,50 L	pH 5-5,5; T=28°C;750 rpm; DO=20%	HPLC	[50]
CBS7435 FLO8 wt	P_{G1-3}						0,1 g/L						
CBS7435 $\Delta hcp1\Delta flo8$	P_{G1-3}						0,6-1,0 g/L						
CBS7435	P_{GS4}						1,5 g/L						
CBS7435 $\Delta hcp1\Delta flo8$	P_{GS4}	<i>Fed-batch</i>	GFM	Glucosa	VHH 6-HisTag	n. d.	7,0 g/L	n. d.	n. d.	0,25 L	pH 5; T=25- 30°C;750 rpm; DO=30%	HPLC	[20]
CBS7435	P_{GS5}						1,0 g/L						
CBS7435 $\Delta hcp1\Delta flo8$	P_{GS5}						6,8 g/L						
CBS2612	P_{G1-3}	<i>Fed-batch</i>	GFM	Glucosa	VHH 6-HisTag	n.d.	0,2 g/L	92 g/L					
CBS2612 $\Delta flo8$							1,1 g/L	91 g/L	n. d.	1,00 L	pH 5; T=25- 30°C;400-1200 rpm; DO=20%	ELISA	[51]

Tabla 3. Recopilación de trabajos basados en la producción de VHH y similares en *P. pastoris* mediante procesos tipo continuo.

Cepa	Promotor	Modo de Operación	Medio	Fuente de carbono	Proteína recombinante	Antígeno	Concentración de VHH	Concentración de Biomasa	q _p	Volumen de reactor	Tasa específica de crecimiento	Método analítico	Referencias
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Retentostato					≈0,5 g/L	≈5 g/L	≈0,125 mg/g·h	1,40 L	μ = 0,015 h ⁻¹		
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Retentostato					≈0,6 g/L	≈7 g/L	≈0,230 mg/g·h		μ = 0,025 h ⁻¹		
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Quimiostato					≈1 g/L	≈13 g/L	≈0,375 mg/g·h	0,60 L	μ = 0,050 h ⁻¹		
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Quimiostato	Medio definido	Glucosa	VHH	n. d.	≈0,1 g/L	≈14 g/L	≈0,520 mg/g·h	0,60 L	μ = 0,075 h ⁻¹	SDS-PAGE	[52]
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Quimiostato					≈0,9 g/L	≈15 g/L	≈0,625 mg/g·h	0,60 L	μ = 0,100 h ⁻¹		
CBS2612 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Quimiostato					≈0,7 g/L	≈18 g/L	0,640 mg/g·h	0,60 L	μ = 0,170 h ⁻¹		
CBS7435 <i>Δflo8</i>	P _{G1-3}	Quimiostato	Medio definido	Glucosa	VHH	n. d.	≈0,2-0,4 g/L	≈5-20 g/L	≈0,160-0,030 mg/g·h	n. d.	μ = 0,027-0,001 h ⁻¹	SDS-PAGE	[53]
GS115	P _{AOXI}	Quimiostato	Medio definido	Metanol	HBsAg	n. d.	0,2 g/L	450 g/L	0,011 mg/g·h	5,00-300,00 L	μ = 0,009 h ⁻¹	ELISA	[54]
X-33	P _{AOXI}	Perfusión	BFM21	Glicerol-Metanol	scFv13R5	β-galactosidasa	0,2-0,6 g/L	55-74 g/L	0,018-0,045 mg/g·h	0,32 L	-	SDS-PAGE	[55]

n. d.: No detectado

1.4. Evolución y aplicación de los medios de cultivo en *Pichia pastoris*

Hasta ahora, se han realizado numerosos esfuerzos en desarrollar y optimizar medios de cultivo enfocados en la producción de biomasa y proteína recombinante en *P. pastoris*. A continuación, se presentarán los medios más utilizados para el cultivo de *P. pastoris*, entre los que se incluyen medios químicamente definidos y medios complejos como los siguientes: Genophys, D'Anjou, FM22, MBSM, BSM, BFM21, RDM, BMG, BMGY, BMMY [56].

Empezaremos por el medio comúnmente más utilizado para fermentaciones de alta densidad celular, el medio basal salino (BSM). Este medio, fue publicado como parte de las pautas del proceso de fermentación de *P. Pastoris* propuestas por Invitrogen (EE. UU.) [57]. La escasez de otras formulaciones para lograr altas densidades celulares con esta levadura permitió que el uso del BSM se expandiera.

Por ello, actualmente es considerado un medio de referencia a la hora de optimizar medios de cultivo. Sin embargo, presenta ciertos problemas importantes como su composición desequilibrada, la cual resulta en una elevada fuerza iónica y precipitación de sales en el medio [58]. Teniendo en cuenta que la estructura de ciertas proteínas heterólogas puede desestabilizarse debido a la alta carga salina, provocando así la agregación y precipitación de estas, el BSM podría no ser óptimo para la producción de ciertas proteínas [59,60].

Estos problemas de precipitación se convirtieron en un tema a tener en cuenta por parte de la comunidad científica. De forma que, usando como base la patente de Wegner propiedad de Philips Petroleum, sobre el efecto que los principales elementos del medio tienen en el crecimiento de *P. pastoris*. Se definió un rango de concentración óptimo para cada elemento [61]. Eso llevó al desarrollo y optimización de medios de cultivos centrados principalmente en alcanzar altas densidades celulares en *fed-batch* [58]. Así, surgieron los medios D'Anjou [62], FM22 [63] y BFM21[64].

El medio de D'Anjou presenta concentraciones elementales cercanas al límite inferior de los requerimientos metabólicos descritos por Wegner. Además, números artículos han descrito que, aunque suele ser el medio en el que más rápido crece *P. pastoris*, generalmente presenta una menor producción de biomasa y proteína recombinante. Mientras que para el FM22 algunos estudios han descrito niveles de densidad celular y producción superiores [56].

En cuanto al BFM21, fue desarrollado con el claro objetivo de crear un medio químicamente definido que fuera completamente soluble y capaz de alcanzar altas densidades celulares. Sin embargo, a pesar de cumplir su función, los autores observaron que a una mayor escala los ciclos de esterilización *in situ* (SIP) afectaban al medio de manera distinta al autoclave convencional, resultando en densidades celulares menores a las esperadas [64], pues la esterilización térmica o el ajuste del pH pueden dar lugar a la precipitación de sales [65].

En esta línea de optimización surge el medio MBSM, una modificación racional del BSM tradicional. El objetivo principal fue el de obtener un medio químicamente definido, sencillo y económicamente viable que garantizase la disponibilidad efectiva de nutrientes, permitiera alcanzar altas densidades celulares y una producción eficiente de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, corrigiendo así los desequilibrios nutricionales y los problemas de precipitación observados a pH superior a 5 y tras la esterilización térmica [66].

Otro estudio con el objetivo de desarrollar un medio rico definido para *P. pastoris* utilizando transcriptómica para identificar nutrientes críticos logró optimizar la tasa de crecimiento y la producción de varias proteínas operando en perfusión, dando lugar así al medio RDM [67]. No obstante, sus autores resaltaron como desventajas su baja estabilidad frente a variaciones de pH y la precipitación observada a niveles de pH cercanos a 6,5. Por ello, estos mismos autores intentaron desarrollar un medio a partir de este RDM reduciendo dichos problemas. Para ello, sustituyeron el sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ por urea. No solo consiguieron el objetivo, sino que también observaron una mejora en la producción y la densidad celular al emplear urea como fuente de nitrógeno a pH 6 [68]. Así, ambas variables han sido consideradas y evaluadas posteriormente en el presente estudio.

Es importante señalar que la falta de nitrógeno se relaciona directamente con un aumento de la actividad proteolítica y, en consecuencia, con la degradación de proteínas extracelulares [69]. Este hecho debe ser considerado con especial atención en aquellos medios cuya fuente de nitrógeno se añade al controlar el pH usando NH_4OH , pues si se alcanza una alta densidad celular puede presentarse dicho efecto proteolítico. Sin embargo, es necesario evitar su acumulación, ya que puede inhibir el crecimiento y prolongar la fase de latencia [70].

Conociendo los diferentes medios desarrollados para la producción recombinante en *P. pastoris* y sus posibles problemas, en este trabajo de fin de máster se pretende adaptar medios de cultivos definidos, ya existentes, a la operación en continuo. El principal objetivo es el de maximizar la productividad específica optimizando la composición del medio, llevando a cabo, a su vez, una exhaustiva monitorización del proceso.

2. Resultados y discusión

2.1. Análisis inicial y evaluación de diferentes medios de cultivo

Durante la primera serie experimental se probaron un total de 6 medios de cultivos diferentes, la mayoría empleados normalmente en cultivos tipo *batch* o *fed-batch* en los que se emplea *P. pastoris* como hospedador para la producción de proteínas recombinantes.

En la Figura 2 puede observarse la tasa específica de producción para cada medio de cultivo y método analítico empleado en el estudio. Además, de la tasa específica de crecimiento alcanzada en cada una de las condiciones. En esta figura, la variabilidad de los resultados se representa mediante barras de error que expresan la desviación estándar derivada de réplicas técnicas.

Antes de analizar los resultados se debe remarcar que, en este trabajo, el medio de referencia para evaluar el efecto de las diferentes formulaciones en la producción es el medio Genophys, empleado hasta ahora en nuestro laboratorio para el cultivo de *P. pastoris* en quimiostato.

Como se observa en la Figura 2 los medios FM22, MBSM y BFM21 son los que presentan las desviaciones estándar más elevadas. Dado que esta dispersión no proviene de réplicas biológicas sino de la repetición técnica de cada método analítico sobre una misma muestra, la alta variabilidad que vemos en estos tres medios sumada a los altos valores de desviación estándar comprometen la fiabilidad y robustez de dichos resultados. La elevada variabilidad observada podría correlacionarse con la composición de estos medios, especialmente con su alta fuerza iónica, la cual puede promover la precipitación de sales y dar lugar a un medio heterogéneo.

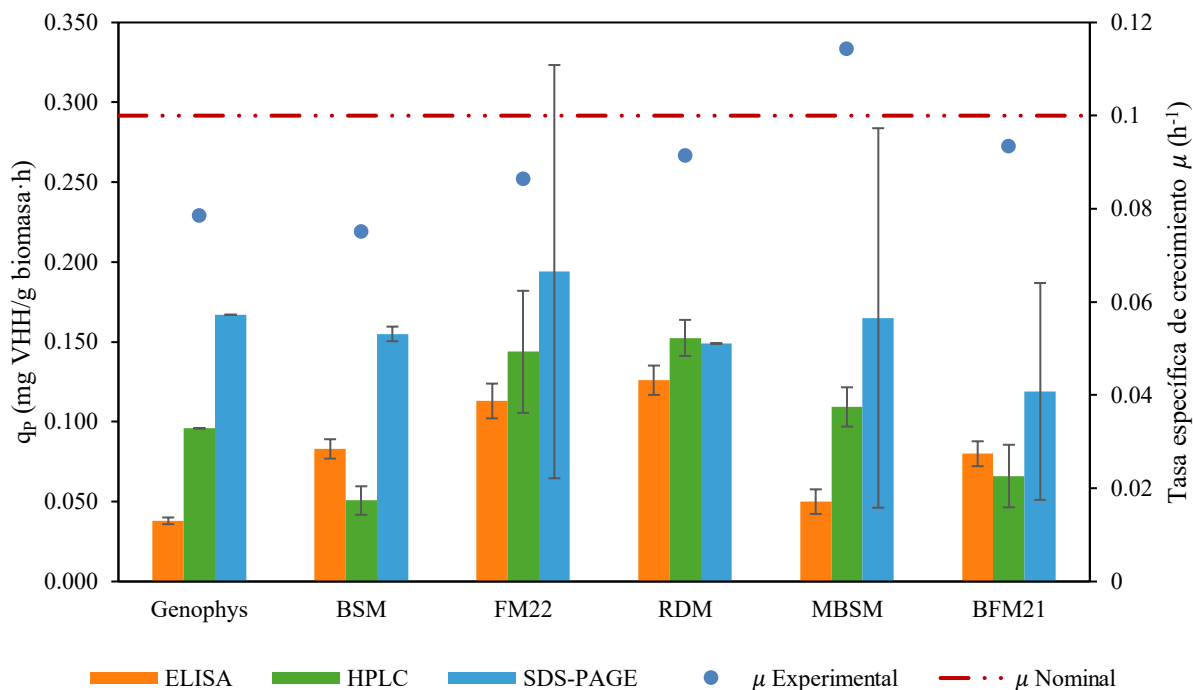


Figura 2. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para los seis medios de cultivo analizados. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos (μ Nominal = 0,1). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

Además, si analizamos la composición química de estos en la Tabla 4 (sección 4.3.1 de Materiales y métodos), destaca que el FM22 posee una concentración de 42,9 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, un valor que cuadruplica la cantidad presente en medios como el MBSM (10 g/L) o el RDM (12 g/L). Como se ha descrito en la literatura, un exceso de fosfato favorece la formación de precipitados en forma de estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), al interactuar con cationes polivalentes como el magnesio o el calcio, especialmente en pH mayores a 5,5 [71]. Las partículas de estruvita son generalmente poco solubles y resistentes al estrés cortante, pudiendo alterar la disponibilidad de nutrientes, generar interferencias en la cuantificación y consecuentemente reducir significativamente el crecimiento y la producción de proteínas heterólogas [72,73].

Es importante también tener en cuenta la μ alcanzada en cada condición, pues como ya se ha demostrado en numerosos artículos, bajo la regulación del promotor P_{GAP} la q_p está directamente relacionada con la μ de forma lineal [74]. En este caso a los argumentos expuestos para descartar FM22, BFM21, MBSM, se suma que estas condiciones fueron las que mayor μ alcanzaron. Aun así, los valores de q_p obtenidos no muestran superioridad a los demás medios, incluso podemos llegar a ver valores más pequeños en el caso de BFM21 y MBSM.

En contraste, los medios BSM y RDM presentan una desviación estándar significativamente menor. En el caso del RDM, no solo destaca la escasa variabilidad entre métodos, sino que también los valores de q_p obtenidos. Una menor variabilidad resulta deseable, debido a que indica un comportamiento más estable del sistema y una mayor robustez del medio.

Además, aunque Genophys permite un crecimiento adecuado, presenta concentraciones de los iones K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} ligeramente inferiores a los rangos óptimos propuestos por Wegner en la patente de Philips Petroleum [61]. Por el contrario, BSM, y RDM cumplen los requerimientos mínimos de macronutrientes, aunque en el caso del BSM y sus variantes esto se logra a costa de una elevada fuerza iónica, la cual favorece fenómenos de precipitación.

Así, BSM y RDM fueron seleccionados para avanzar a la siguiente fase de optimización.

2.2. Análisis de la solubilidad del VHH a distintos pH.

Para este apartado, tras finalizar uno de los conjuntos experimentales mostrados en este documento, se dividió el volumen final en 7 vasos de precipitado. Luego, se ajustó el pH de cada vaso a los siguientes valores de pH: 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 y 7,5. Tras esto se midió la concentración aparente de VHH mediante el método analítico ELISA.

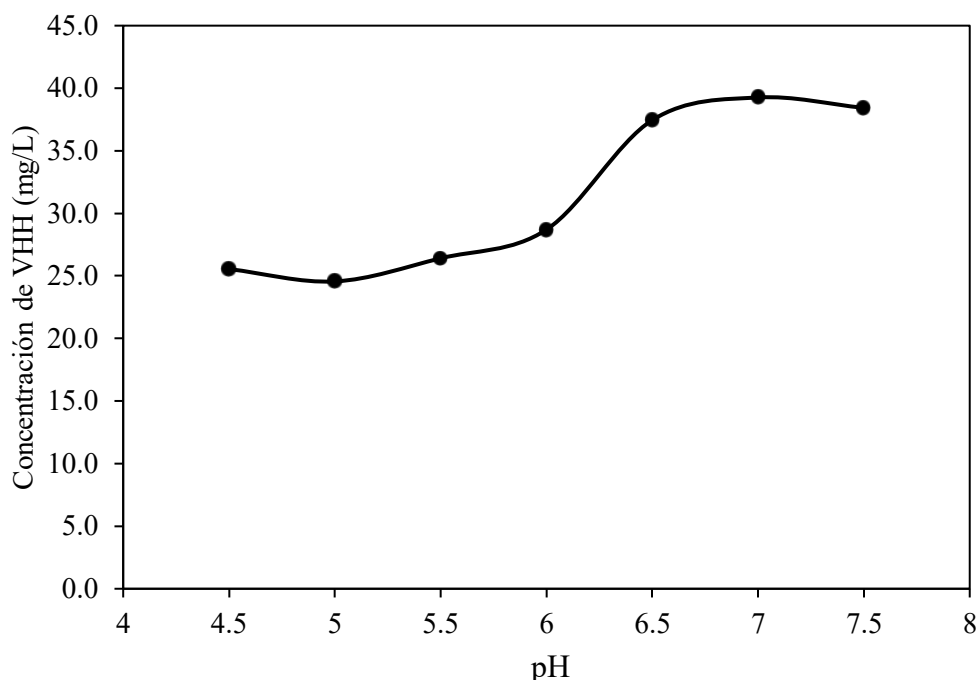


Figura 3. Efecto del pH en la concentración de VHH en el medio. Usando ELISA como método analítico.

Estos valores de pH fueron escogidos bajo la premisa de que el pH es un parámetro clave a optimizar en el cultivo de microorganismos, teniendo un gran efecto en la producción de proteína recombinante y la solubilidad del VHH [75]. De forma que normalmente es conveniente fijar valores de pH óptimos para *P. pastoris* con el fin de favorecer el crecimiento celular, incluso a costa de no maximizar la solubilidad del VHH [76].

Esto se debe a que, diversos estudios indican que la solubilidad del VHH puede verse favorecida a valores de pH más elevados, incluso por encima de pH 8. Sin embargo, la implementación de estos valores de pH en el cultivo continuo podría comprometer el crecimiento celular. Es importante evitar también la precipitación de la proteína dentro del reactor, lo cual dificultaría su posterior recuperación.

Por tanto, la selección del pH de operación debe entenderse como un compromiso entre valores compatibles con el crecimiento de *P. pastoris* y aquellos que favorecen la solubilidad del VHH, siendo esta última ajustable posteriormente durante la etapa de *downstream* mediante procesos de diafiltración [77].

En nuestro caso, al cambiar el pH tras finalizar la fermentación, sabemos que el efecto que

tenga dicho cambio será sobre la solubilidad de nuestra proteína, y no por un posible efecto del pH en la producción del propio VHH. Por tanto, según los resultados se observa que el VHH incrementa su solubilidad de forma significativa al pasar de pH 6 a pH 6,5, alcanzando la máxima solubilidad a pH 7. Para confirmar si este efecto en la solubilidad podría aparecer operando los biorreactores a diferentes pH, se plantearon varias condiciones en las que solo variara el pH, en concreto entre los siguientes valores: 5, 6 y 7. Cabe destacar que los distintos pH de las alícuotas no deberían interferir en el ensayo ELISA, ya que se aplicaron diluciones 1:50.

2.3. Optimización específica de BSM y RDM centrada en la producción de VHH.

Como se comenta anteriormente, tras el primer grupo de condiciones y según nuestro criterio, los medios con mejores perspectivas futuras fueron BSM y RDM. A continuación, se detallan los pasos de optimización llevados a cabo con cada medio.

2.3.1. Optimización de las condiciones fisicoquímicas del medio BSM.

En el caso del BSM, se evaluaron diferentes formulaciones de sales traza descritas para *P. pastoris* (PTM 1 y PTM 2), así como la concentración total de sales y de sales traza (al 100 % y 50 % respecto a la concentración original). Además, se analizó el efecto del pH, fijándose valores de 5, 6 y 7. Las distintas combinaciones experimentadas se detallan en la Tabla 6 (Sección 4.5 de materiales y métodos). En dicha tabla, aparte de detallar las variables estudiadas, también se recoge si dicha condición ha alcanzado el estado estacionario, lo cual es consubstancial a la operación en continuo debido a la relación directamente dependiente entre la tasa específica de crecimiento y la tasa de dilución [78]. Aunque en este caso todas las condiciones alcanzaron el estado estacionario.

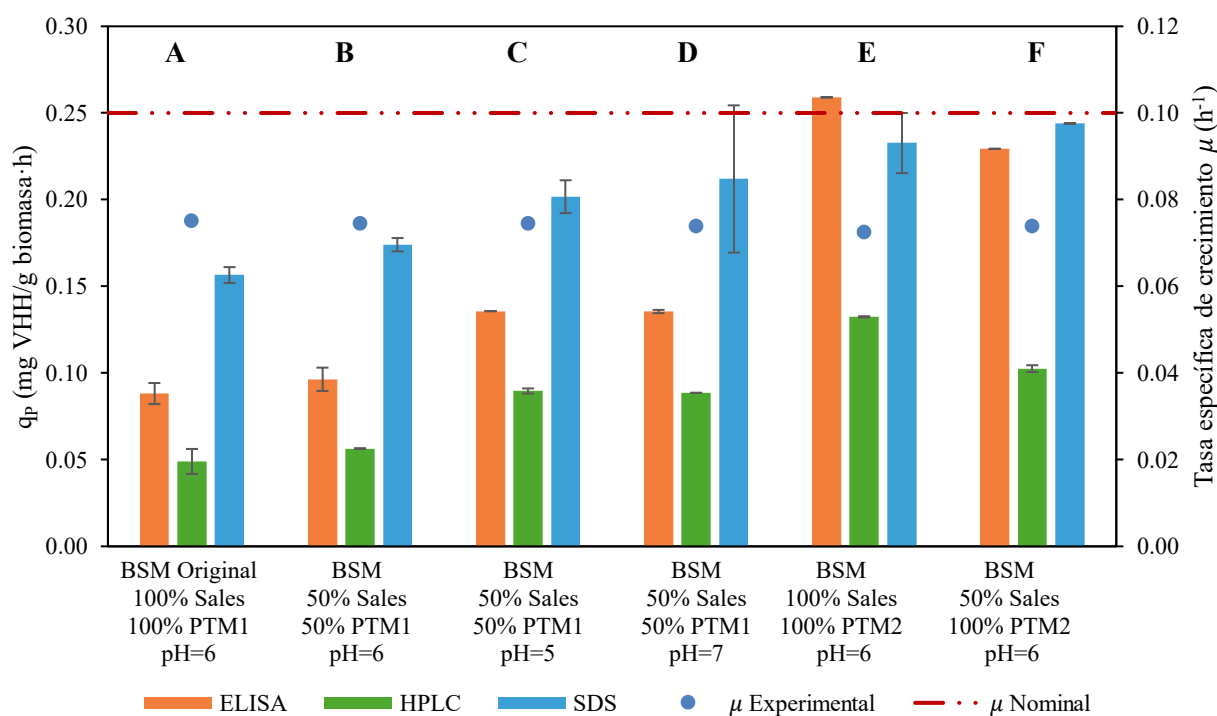


Figura 4. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para el medio BSM original y las 5 variantes de este analizadas. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos (μ Nominal = 0,1). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

Para las diferentes condiciones se analizó la tasa de producción específica (q_p), así como los distintos problemas operacionales de cada una de las condiciones para determinar la condición más favorable de las analizadas en este apartado según nuestros intereses.

Si analizamos la Figura 4, nos podemos percatar de lo siguiente: una reducción del 50% de sales respecto a la formulación original del medio BSM supone una ligera mejora en la tasa específica de producción de VHH. Esta mejora la podríamos atribuir tanto a un mejor estado fisiológico de *P. pastoris*, debido a la bajada de la osmolaridad del medio, o a una mejora en la solubilidad del VHH. Sin embargo, si comparamos entre ellas las condiciones con diferente concentración de sales en las que usamos PTM 2, vemos que la mejora favorece a la condición con el 100% de sales. Debido a la similitud y pequeñas diferencias de q_p es mejor decantarse por el medio que presente una menor concentración de sales, en este caso la condición F, minimizando así los problemas de precipitación y abaratando los costes. Este último es uno de los problemas principales en cultivos en continuo y a escala industrial [79,80].

Luego, si observamos las condiciones con la concentración de sales reducidas, PTM 1 y distintos valores de pH, aunque vemos una pequeña mejora en las condiciones con pH 5 y 7 respecto a la de pH 6, no podemos decir que estas sean significativas. Por ello, la mejora de la solubilidad comentada anteriormente sería útil en una etapa posterior de diafiltración como comentamos en el apartado correspondiente.

La diferencia más notable la encontramos al comparar las condiciones en las que solo varía la solución de sales traza empleada (A, E), pues teniendo en cuenta los distintos métodos analíticos empelados, vemos que el uso de PTM 2 supone una mejora en la q_p de entrono a 1,67 y 2,50 veces respecto a la formulación original (A).

2.3.2. Optimización de las condiciones fisicoquímicas del medio RDM.

Por su parte, para el RDM, se estudiaron distintas composiciones de sales traza empleadas en *P. pastoris* (PTM 1, PTM 2 y PTM 4), así como diferentes fuentes de nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH y urea). Asimismo, se variaron de forma controlada las concentraciones de KH_2PO_4 , urea, CaCl_2 y MgSO_4 , junto con el pH del medio (5, 6 y 7) y el tipo de base empleada para su ajuste (NH_4OH , KOH y NaOH), tal y como se detalla en las Tablas 8 y 10 (sección 4.5 de Materiales y métodos).

Todas estas variables no fueron analizadas en paralelo si no que dividimos el estudio en condiciones en las que se usó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4OH como fuente de nitrógeno, frente a condiciones en las que la urea fue la fuente de nitrógeno.

Hemos visto necesario hacer esta distinción, debido a que la forma en la que se metabolizan las distintas fuentes de nitrógeno mencionadas anteriormente es diferente. En soluciones acuosas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4OH se disocian dando lugar a amonio, el cual puede entrar a la célula directamente a través de permeasas de la familia Mep, integrándose posteriormente en el metabolismo central mediante la interconversión de glutamato y glutamina, regulada por los genes *KpGDH3*, *KpGLN1* y *KpGLT1*. Por el contrario, la urea requiere de una ruta catabólica distinta, la inducida por el gen *KpDURI,2* (urea amidoliasa) bajo limitación por nitrógeno. Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de la urea en amoniaco y CO_2 antes de su asimilación [81]. Como se discutirá en el siguiente apartado de resultados, este aspecto influye directamente en el planteamiento de las fermentaciones, ya que cuando se cambie la fuente de nitrógeno de amonio a urea o viceversa, será necesaria una fase de adaptación para que *P.*

pastoris pueda metabolizar el nitrógeno.

2.3.2.1. Análisis del efecto de sales traza, pH y concentración iónica sobre la producción de VHH en *Pichia pastoris* utilizando urea como fuente de nitrógeno.

En este apartado se evaluaron las diez condiciones detalladas en la Tabla 8 (Sección 4.5 de Materiales y métodos), en las cuales se empleó urea como fuente de nitrógeno. Esta elección se basó en evidencias bibliográficas que indican que la urea, además de minimizar los problemas de precipitación asociados al uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puede tener un efecto positivo tanto sobre la producción como sobre el crecimiento celular [68,82]. La concentración de urea empleada fue de 4 g/L, siguiendo las condiciones descritas en el artículo de referencia en el que se emplea urea como fuente de nitrógeno en el medio RDM [68]. Es importante señalar que, con el objetivo de reducir los problemas de precipitación observados en el RDM, se redujeron las concentraciones de KH_2PO_4 y urea a la mitad en algunas de las condiciones.

Hay que especificar que para estas condiciones la concentración de PTM 2 añadida fue del doble (8,70mL/L) respecto a la fijada inicialmente para las sales traza (4,35mL/L). Aunque originalmente estas surgen para reducir la concentración de ciertos elementos traza, fundamentalmente el hierro, en experimentos previos (no analizados en este documento) los cultivos en los que se empleó la solución de sales traza 2 no alcanzaron el estado estacionario. Por ello, se consideró que existía una carencia de algunos elementos del medio, asociada a estas sales traza. Por tanto, para el siguiente conjunto de condiciones, el correspondiente a este apartado, se doblaron las sales traza.

Esta hipótesis fue finalmente identificada como errónea, pues en ese momento no se había tenido en cuenta el efecto NCR. Este efecto, conocido como represión catabólica por nitrógeno, está bien caracterizado en *Saccharomyces cerevisiae* [83]. Mediante este mecanismo, la levadura prioriza el uso de la fuente de nitrógeno a la que esté acostumbrada, reprimiendo la expresión de las vías necesarias para la asimilación de otras fuentes alternativas, como la urea o determinados aminoácidos, cuyas rutas metabólicas son diferentes [84].

De esta forma, si el medio de cultivo tiene como fuente de nitrógeno amonio, ya sea en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4OH , y posteriormente se pasa a una condición en la que la fuente de nitrógeno es urea, dónde además para regular el pH se usa KOH o NaOH, *P. pastoris* no consumirá la urea, necesitará un periodo de adaptación para que no se laven las células. Esta hipótesis se ve respaldada por estudios en los que, tras una fase prolongada de inanición de nitrógeno, la adición de distintas fuentes de nitrógeno dio lugar a diferentes tiempos de fase lag en *P. pastoris*, dependientes de la fuente empleada [85].

A continuación, se analizan las condiciones correspondientes a este apartado, mediante la Figura 5. Las condiciones que no alcanzaron el estado estacionario se representan en las gráficas mediante un relleno de tramas en forma de zig-zag.

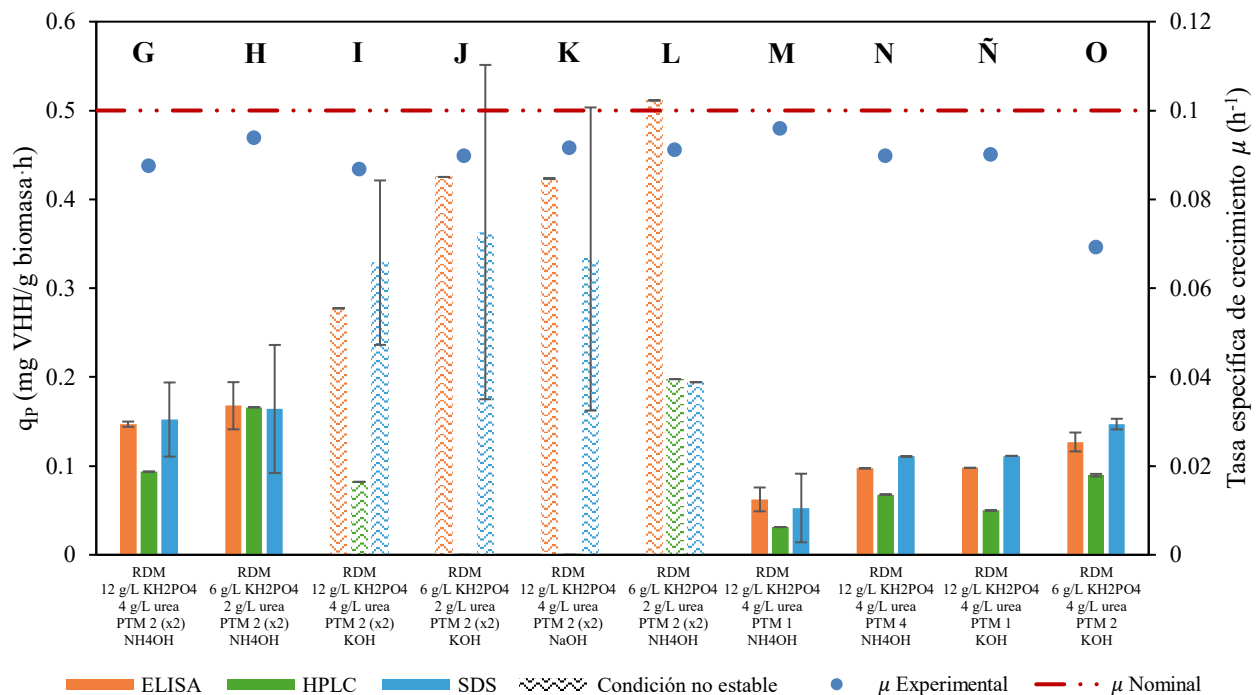


Figura 5. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para las variantes del medio RDM analizadas. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos ($\mu_{\text{Nominal}} = 0,1$). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

Al comparar las condiciones G y H podemos ver que reducir las concentraciones de KH_2PO_4 y urea a la mitad no tiene efectos negativos en la tasa específica de producción. De hecho, incluso se podría considerar una ligera mejoría a nivel de producción. Este resultado es positivo, pues como comentamos en la introducción, el fosfato puede causar problemas de precipitación al interactuar con los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Además, comparando las condiciones G y O podemos reafirmar que la disminución de KH_2PO_4 a la mitad es totalmente viable. Sin embargo, la reducción de la urea a la mitad no funcionó cuando la levadura no tenía otra fuente de nitrógeno a la cual estaba adaptada (J). Además de esta, otras tres condiciones no alcanzaron el estado estacionario. En el caso de las condiciones I y K la razón podría ser la precipitación causada por el empleo de KOH o NaOH como bases. Sin embargo, vemos que, aunque las condiciones H y L son iguales, una de ellas (L) no alcanzó el estado estacionario. Esto se debe a que esta última estuvo precedida por la condición J, que como ya hemos comentado, solo tenía urea como fuente de nitrógeno, la cual no fue suficiente para el crecimiento de *P. pastoris*. Aun así, esas células estaban adaptadas a la asimilación de urea como fuente de nitrógeno. De forma que, aunque en la condición L hubiera nitrógeno suficiente al ser suplementado por la base, las células no podían asimilarlo debido al NCR, tal y como hemos explicado anteriormente.

También es importante añadir que el efecto de doblar las PTM 2 (G y H) respecto a la concentración inicial, no supone un aumento considerable de la q_p . Y de nuevo, el uso de las PTM 2 conlleva un aumento en la q_p , en comparación con el uso de las PTM 1 y PTM4.

Finalmente, las condiciones con PTM 2 han mejorado entre 1,70 y 3,20 veces la q_p respecto a las PTM 1 y PTM 4. Por su parte, el aumento de la concentración de PTM 2 podría, a priori, parece generar un incremento de la q_p de entre 1,03 y 1,85 veces. Sin embargo, al comparar las condiciones con la concentración duplicada de PTM 2 (8,7 mL/L) frente a la concentración

típicamente empleada en el laboratorio (4,35 mL/L), se observa que las duplicadas presentan una mayor desviación estándar. Esto sumado a la similitud entre los valores de q_p , nos indica que doblar la concentración de PTM2 no tiene un efecto positivo significativo sobre la tasa de específica de producción.

2.3.2.2. Análisis del efecto de sales traza, pH y concentración iónica sobre la producción de VHH en *Pichia pastoris* utilizando NH_4^+ como fuente de nitrógeno.

En este apartado se evaluaron las 7 condiciones detalladas en la Tabla 10 (Sección 4.5 de Materiales y métodos), siendo la condición P la formulación original de RDM.

Como podemos observar en dicha tabla, algunas de estas condiciones no alcanzaron el estado estacionario debido a diferentes problemas. La condición P presentó problemas de precipitación causados aparentemente por la interacción de KOH con las sales del medio, sobre todo con las sales traza. Esto pudo limitar la disponibilidad de nutrientes haciendo que la condición no fuese estable.

En el caso de la condición S, el hecho de no ser estable fue la reconfirmación experimental de que *P. pastoris* debe adaptarse al uso de distintas fuentes de nitrógeno, según la vía de asimilación de este, pues en este caso la condición anterior a la S contenía urea como fuente de nitrógeno. Al cambiar la condición a la I, la fuente de nitrógeno pasó a ser amonio proveniente del NH_4OH . Y aunque aplicamos una fase de adaptación, esta fue demasiado corta y por tanto la condición no llegó a estabilizarse pudiendo deberse a la falta de nitrógeno.

Respecto a la última condición inestable (U), como ya se había descrito anteriormente, el medio RDM resulta difícil de operar a valores de pH superiores a 6,5 debido a la baja disponibilidad de nutrientes causada por la precipitación de sales [67]. A continuación, se analizará la producción obtenida en las distintas condiciones.

En esta serie de condiciones, la solución de sales traza 2 (PTM 2), empleada en las condiciones estables T y V vuelve a postularse como la mejor opción de cara a la producción específica de VHH, siendo esta vez una diferencia mucho más significativa respecto a las soluciones de sales traza 1 y 4 (condiciones Q y R, respectivamente). Por otra parte, si comparamos las condiciones T y V vemos que la condición V en la que se han reducido la concentración de MgSO_4 y CaCl_2 . Se obtienen valores de q_p iguales a los de la condición T o mayores si observamos los resultados obtenidos mediante HPLC. Esto reducirá los costes y favorecerá la disolución de las sales en el medio, reduciéndose así el riesgo de presentar problemas operacionales debido a la precipitación.

Es importante argumentar la reducción de la concentración de las sales de calcio y magnesio. Para que esta reducción fuese racional, no solo se han seguido los rangos descritos por Wegner en la patente de Phillips Petroleum [61], sino que también nos hemos apoyado en el estudio publicado en 2017 por Cankorur-Cetinkaya A. *et al.* [75], en el cual desarrollan un medio químicamente definido para cultivar *P. pastoris* de forma continua, combinando métodos de algoritmo genético y regresión simbólica para llevar a cabo el análisis de sensibilidad. En este, se dictamina que además del pH, las sales CaCl_2 y MgSO_4 fueron variables cuyo valor contribuía de forma significativa a la concentración de proteína recombinante en el medio. Describiendo las concentraciones adecuadas para cada sal: 0,07g/L y 2,64 g/L respectivamente. De esta forma, establecimos en nuestro medio concentraciones de 0,1 g de CaCl_2/L y 3g MgSO_4/L .

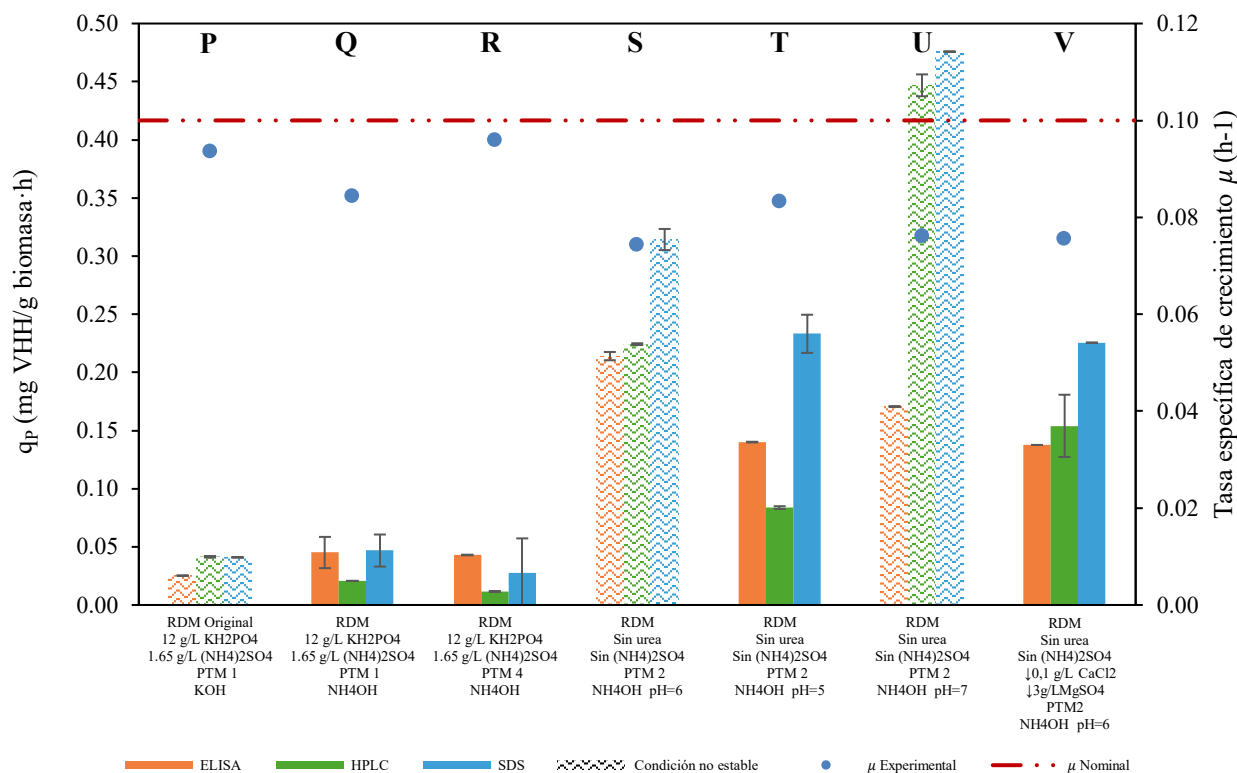


Figura 6. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para el medio RDM original y las 6 variantes de este analizadas. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos (μ Nominal = 0,1). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

En este caso, la condición V (PTM 2) presenta un incremento en la q_p entre 3,1 y 13,26 veces superior respecto a las variantes de RDM en que se usan las PTM 1 (incluyendo la formulación original de RDM) y las PTM 4. Además, si comparamos la condición V frente a la T, vemos que para los valores de q_p obtenidos con ELISA y HPLC se obtienen tasas superiores en la condición con menos sales, mientras que los valores obtenidos por SDS son muy similares entre ambas condiciones. Estos resultados confirman la superioridad en cuanto a la producción de la condición con menor concentración de sales (V) respecto a las demás, lo cual será relevante para reducir los problemas de precipitación en el medio.

2.4. Análisis comparativo de las condiciones más favorables.

Con este apartado se pretende recopilar las condiciones más prometedoras comentadas en los apartados anteriores. En primer lugar, prestaremos detalle a la Figura 7.

En ella, podremos observar que hay dos condiciones las cuales destacan respecto al resto: la F y la V. Además, si comparamos ambas con nuestro medio de referencia (Genophys), es evidente la mejora en cuanto q_p . Por ello, estas dos condiciones se posicionaron como las más favorables por el momento. Antes de decantarnos por alguno, no solo debemos observar la variabilidad entre métodos analíticos o los valores de q_p alcanzados. También debemos tener en cuenta los problemas operacionales que han ocasionado ambas.

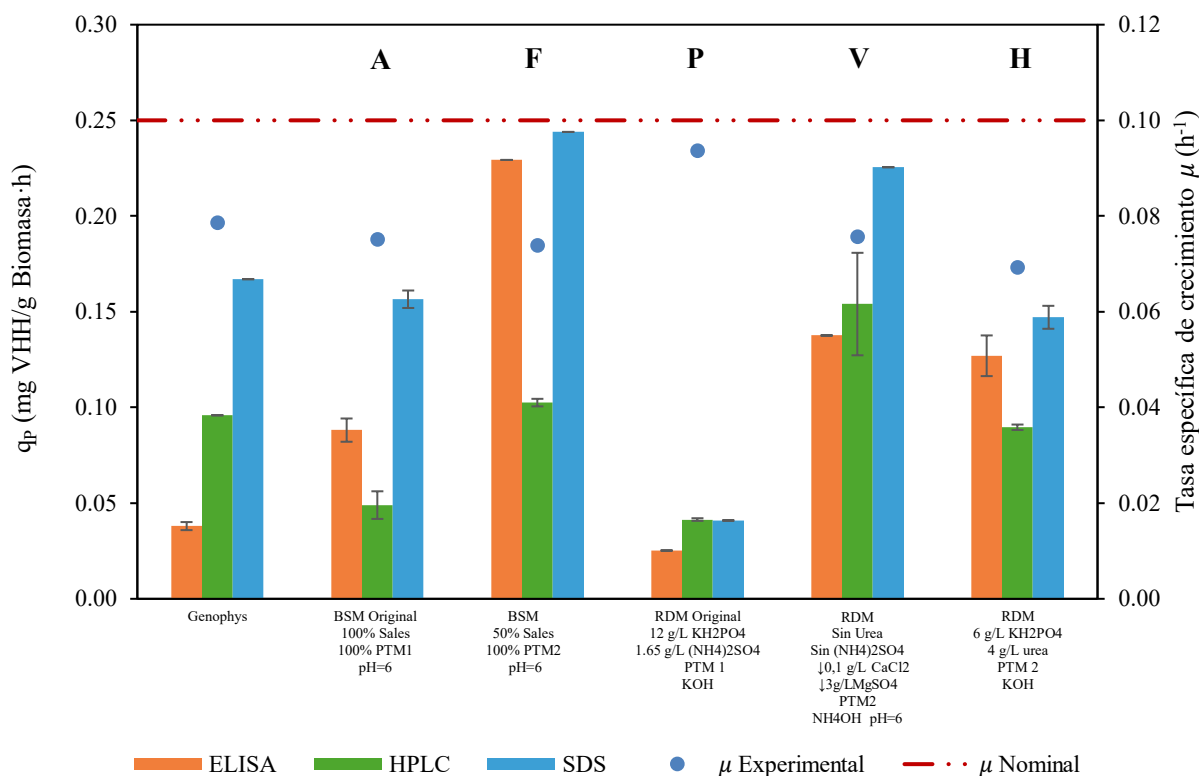


Figura 7. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para las condiciones más favorables de este estudio. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos (μ Nominal = 0,1). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

En el caso de la condición F, aunque redujimos a la mitad la concentración de sales, este medio seguía presentando una alta concentración de sales, superando el límite superior fijado por Wegner para evitar la formación de precipitados problemáticos causados por la esterilización térmica y minimizar los residuos minerales en el producto final facilitando su purificación e incluso el posterior tratamiento del efluente [61]. Esto provocó la formación de precipitados considerables alrededor de los deflectores del biorreactor y en el entorno de la entrada de base. A nivel industrial, la aparición de estos precipitados debe evitarse a toda costa ya que suelen generar diversos problemas operativos, pues además de limitar la disponibilidad de macronutrientes para las células. Estos precipitados pueden dañar los equipos al obstruir tuberías, mangueras y burbujeadores en fermentadores de tanque agitado, dificultando las tareas de mantenimiento y limpieza de los reactores, ya que, a diferencia de los reactores de laboratorio, los biorreactores industriales poseen procedimientos de limpieza in situ (CIP), sin posibilidad de apertura y limpieza manual frecuente [86].

Concretamente estos precipitados suponen un mayor problema en biorreactores en los que se emplean membranas para retener la biomasa debido al conocido *fouling* [87].

Sin embargo, la condición V presentó problemas de precipitación mucho más leves, pues a esta se le bajó considerablemente la concentración de las siguientes sales, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 . Y además se eliminó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ya que se consideró que la entrada de hidróxido de amonio para regular el pH ya suponía una entrada de nitrógeno suficiente. De hecho, esta vez el precipitado depositado cerca a la entrada de base fue de un tamaño mucho más reducido. Pudiendo deberse incluso a que una de las condiciones anteriores fue el medio RDM a pH 7,

que como ya hemos comentado anteriormente se ha descrito que genera problemas graves de precipitación.

Siguiendo con el análisis, se incorpora a la comparación la condición óptima reportada en la literatura para la producción de VHH en *P. pastoris* bajo condiciones de quimiostato [52]. En esta se empleó la cepa CBS2612 Δ flo8 con el promotor P_{G1-3} en un medio químicamente definido no especificado en el artículo. La tasa de producción específica con este promotor también se relaciona de forma lineal con la tasa específica de crecimiento, por lo que se especificarán ambas en la siguiente figura. Además, en esta ocasión solo se han presentado los datos analizados con SDS-PAGE ya que es el método analítico empleado en el artículo mencionado.

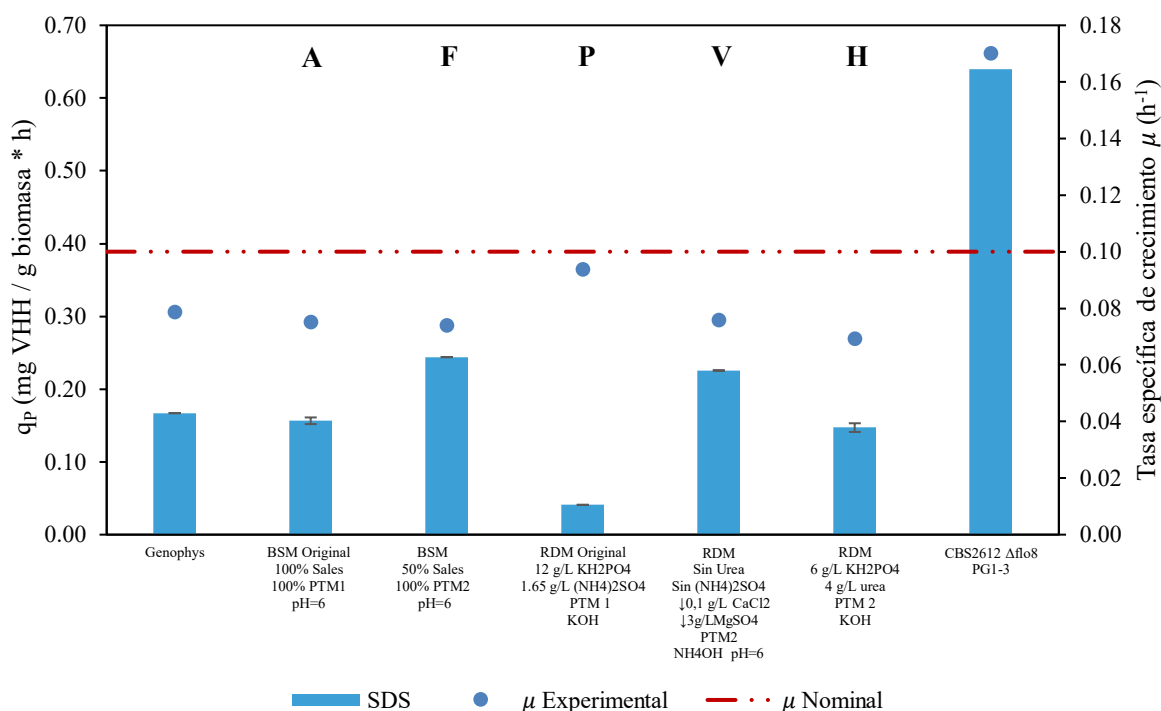


Figura 8. Comparación de la tasa específica de producción (q_p) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para las condiciones más favorables de este estudio y la literatura. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas para cada método analítico empleado. La línea horizontal discontinua marca la tasa específica de crecimiento que se pretende establecer en los cultivos (μ Nominal = 0,1). Mientras que los puntos azules marcan la tasa específica de crecimiento experimental alcanzada en cada condición.

Podemos comprobar que el dato de q_p presentado en el artículo ($q_p = 0,64$ mg VHH/g biomasa·h) es 2,80 veces mayor a la q_p obtenida en las condiciones óptimas de nuestro estudio ($q_p = 0,24$ mg VHH / g biomasa·h). Sin embargo, debemos tener en cuenta que en dicho artículo no solo emplean una μ casi dos veces superior ($\mu = 0,17$ h⁻¹), sino que también hablamos de cepas y promotores distintitos. En cambio, si comparamos nuestros resultados con los artículos encontrados para cultivos tipo *fed-batch* en los que usan BSM como medio de cultivo (Figura 9) [49,50]. Vemos que los valores alcanzados en este estudio son comparables a los resultados obtenidos por ciertos estudios realizados en *fed-batch* empleando la cepa CBS2612 cuya expresión está regulada mediante el promotor P_{AOX1} .

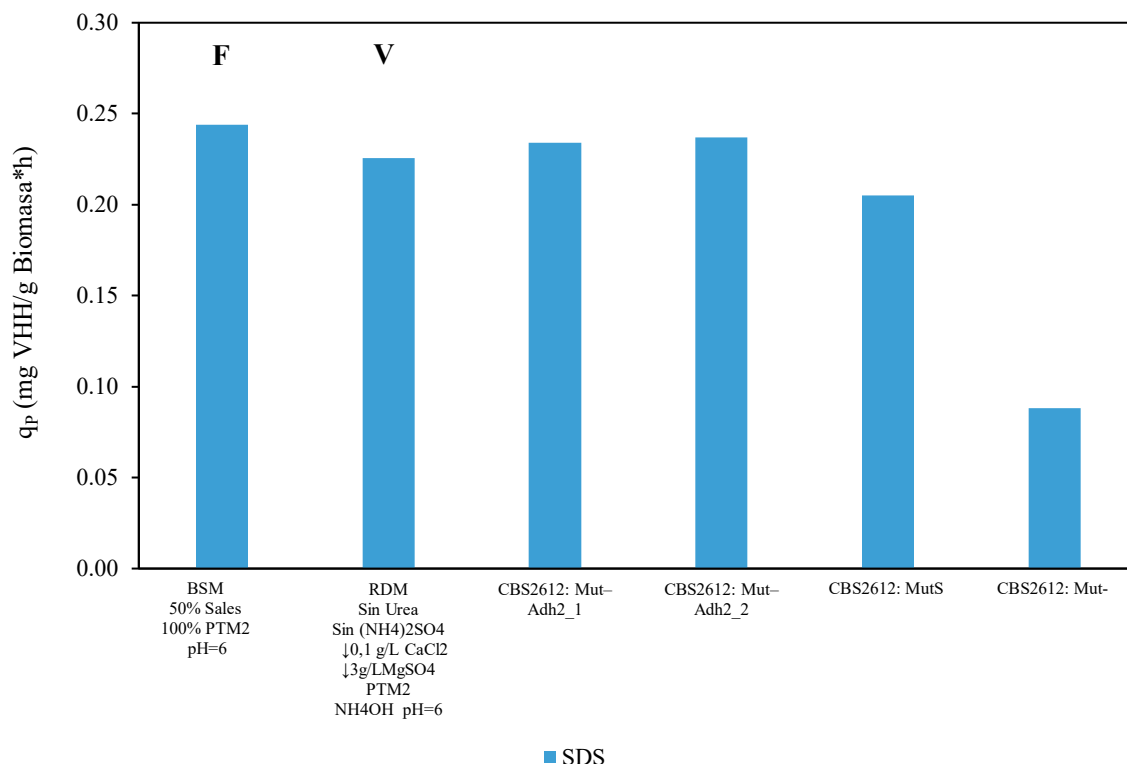


Figura 9. Comparación de la tasa específica de producción (q_P) y de crecimiento (μ) en cultivos tipo quimiostato para las condiciones más favorables de este estudio y cultivo tipo *fed-batch* de la literatura.

2.5. Análisis comparativos de los costes de los medios de cultivo de partida respecto a los optimizados

Para este último apartado de la sección de resultados, comentaremos en términos económicos las mejoras obtenidas respecto al medio de referencia y a los medios de partida BSM y RDM. Antes que nada, debemos aclarar que el coste total de estos medios ha sido calculado mediante al catálogo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), concretamente de reactivos con nivel de pureza de laboratorio. Los precios de estos reactivos no solo fluctúan atendiendo las necesidades del mercado, sino que también varían de forma considerable según la cantidad y la pureza de deseemos. Por este motivo, el análisis económico presentado no es directamente extrapolable a otros estudios ni a escala industrial, y debe interpretarse únicamente como una herramienta de comparación interna, ya que en todos los casos se han utilizado los mismos precios unitarios para cada reactivo en los distintos medios evaluados. Aun así, este análisis puede dar una idea aproximada de la repercusión que podría tener el coste del medio en un proceso a escala industrial.

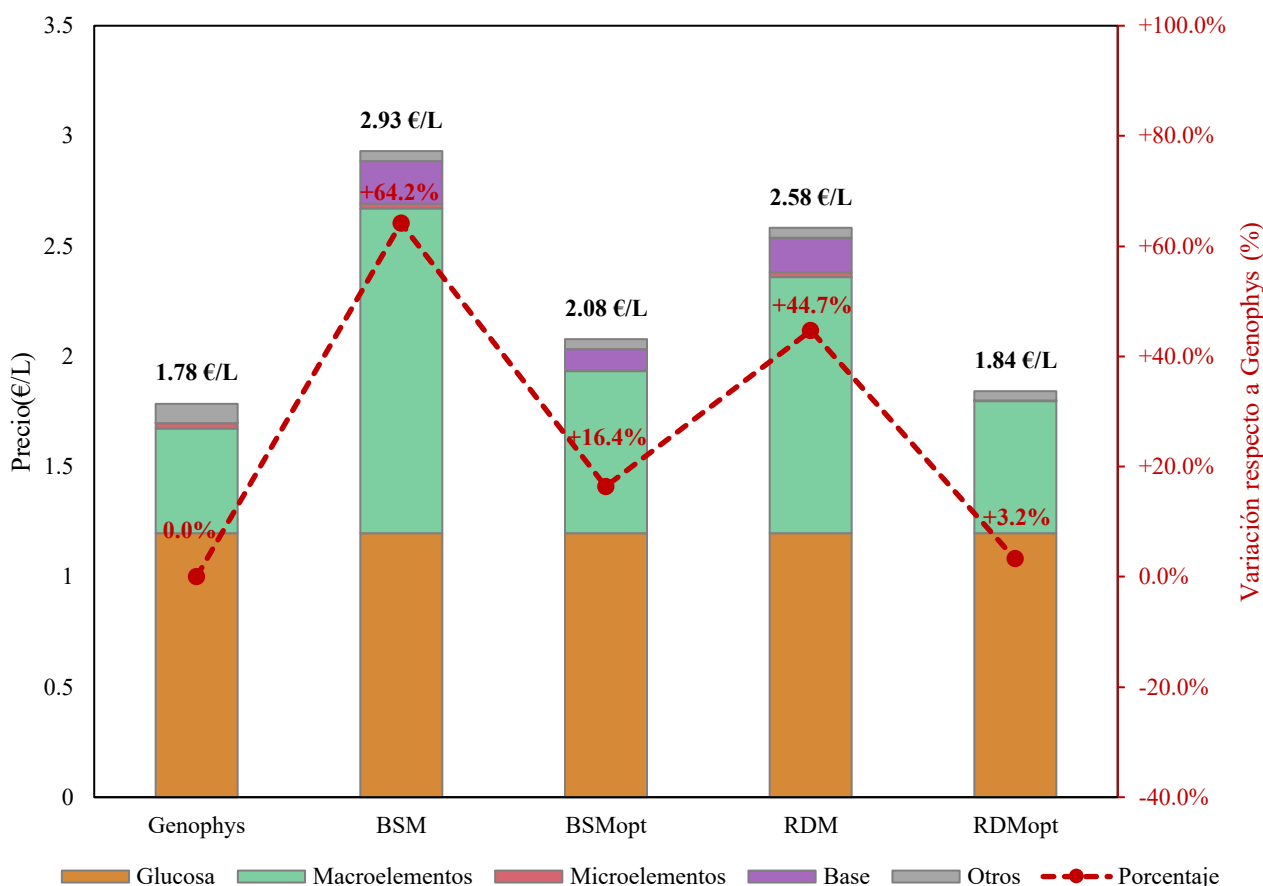


Figura 10. Comparación de los costes de los medios optimizados con sus respectivas formulaciones originales.

Observando en detalle la Figura 10 es verdad que no vemos ahorros significativos respecto a nuestro medio de referencias (Genophys). Sin embargo, el medio RDM optimizado (RDMopt) correspondiente a la condición V, solo lo supera por 0,06 €/L lo que supone un coste añadido del 3,2%. Además, si comparamos este con la formulación original de RDM, vemos que la reducción de la concertación de sales y emplear hidróxido de amonio como fuente de nitrógeno supone un ahorro de aproximadamente el 28,7%. De hecho, si hacemos lo mismo con las condiciones de BSM, obtenemos que la condición F (BSMopt) supondría un ahorro del 29%.

Este ahorro resulta especialmente relevante en procesos industriales reales, donde el medio de cultivo puede representar aproximadamente un 40 % de los costes operativos (OPEX) o el 30% de los costes totales de producción [88,89]. Por ello, la reducción de su coste es altamente significativa, ya que implica una intensificación sustancial del proceso y un efecto directo sobre la viabilidad económica a escala industrial.

3. Conclusiones

En este estudio, se han adaptado diversos medios de cultivo descritos en la literatura para procesos tipo *batch* o *fed-batch*, a la producción continua de proteínas recombinantes en *P. pastoris* realizando una comparación en detalle de su impacto en la producción de VHH. Los resultados obtenidos muestran que la utilización directa de estos medios en cultivos continuos suele provocar problemas de precipitación, lo que afecta negativamente a la disponibilidad de nutrientes esenciales para el crecimiento y la producción.

No obstante, el presente trabajo no se ha limitado únicamente a la modificación racional de la concentración de sales de medios previamente descritos para solucionar los problemas de precipitación. Adicionalmente, se ha evaluado el efecto de distintos parámetros del medio, incluyendo la formulación de las sales traza, el pH del cultivo, las diferentes fuentes de nitrógeno y las bases empleadas para el control del pH. Los resultados obtenidos evidencian que estos factores influyen de manera directa en la estabilidad del cultivo y la tasa específica de producción de la proteína recombinante.

Este amplio análisis nos ha permitido describir, entre otras cosas, la capacidad de *P. pastoris* para crecer empleando urea como fuente de nitrógeno y la necesidad de una etapa de adaptación cuando cambiamos la fuente de nitrógeno a otra que se asimila mediante otra vía metabólica, debido a la represión catabólica por nitrógeno. Aunque en este estudio no se haya comprobado a nivel transcriptómico, supone un gran punto de interés de cara a investigaciones futuras. Además, la utilización de urea como fuente de nitrógeno resulta atractiva industrialmente, pues la urea es barata y soluble.

Por otro lado, y respecto al medio RDM, sustituir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por NH_4OH como fuente de nitrógeno tiene un efecto positivo en la solubilidad del medio al reducir principalmente la concentración de sulfato. Además, recientemente se ha descrito la recuperación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de aguas residuales mediante sistemas bioelectroquímicos. En nuestro caso, el empleo directo de NH_4OH permitiría prescindir de la etapa final [90].

Incluso esto nos permitiría integrar posiblemente un sistema de captura y electrorreducción de óxidos de nitrógeno, gases de efecto invernadero emitidos generalmente por procesos de combustión a alta temperatura que utilizan aire como oxidante, pues su recuperación podría ser técnicamente viable, e incluso más sencilla, empleando tecnologías de captura ya consolidadas [91]. De este modo, dichos gases contaminantes podrían transformarse por vía electrocatalítica en amonio, permitiendo su reincorporación a nuestro cultivo como fuente de nitrógeno [92].

A todo esto, hay que sumar las notables mejoras alcanzadas a nivel de producción específica de proteína, ya es que se han logrado incrementos en la q_p de entre 1,35 y 6,03 veces respecto al medio de referencia. En gran parte esto ha sido posible gracias al monitoreo exhaustivo de las distintas variables del proceso y al amplio número de condiciones experimentales llevadas a cabo. Además, ha sido clave el diseño experimental, pues todas las condiciones tienen un homólogo comparable en el que solo cambia una variable. Esto nos ha permitido identificar de forma racional aquellas variables que tienen un mayor efecto en nuestro objetivo.

En resumen, este trabajo demuestra que la optimización racional de medios definidos es posible, puesto que el empleo de herramientas como el Diseño de Experimentos (DoE) resultaría inviable en este caso, donde se maneja un número muy elevado de variables. Además, herramientas como el DoE no identifican relaciones no lineales, pudiendo perjudicar así al análisis de sensibilidad. El diseño racional nos permite identificar relaciones entre variables lineales y no lineales gracias al monitoreo exhaustivo de las variables del proceso.

Por último, los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para seguir desarrollando un medio químicamente definido sin problemas de precipitación y que nos permita obtener niveles elevados de q_p . Para ello se podría suplementar el medio con aminoácidos bionergéticamente caros de producir para *P. pastoris* [93], vitaminas [94] o incluso ácido cítrico, el cual actuaría como agente quelante, evitando la formación de complejos insolubles entre Mg^{2+} , Ca^{2+} y fosfato. Además, contribuiría a reducir los problemas de precipitación que

pueden ocurrir debido a cambios locales de pH cuando se añade NH_4OH al medio de cultivo [95].

4. Materiales y métodos

4.1. Cepas y clones

Se empleó la cepa de *Pichia pastoris* BG10 (BSYBG10) (BioGrammatics Inc., Carlsbad, CA, EE. UU. y Bisy GmbH, Styria, Austria), derivada de la cepa BG08 (BioGrammatics Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.), producto del aislamiento de una única colonia de la cepa NRRL Y-11430 (Phillips Petroleum, Bartlesville, OK, EE. UU.) [96].

El proceso de transformación de esta fue llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología Molecular de la TU Graz. La expresión del constructo está regulada por el promotor constitutivo P_{GAP} y consta de la secuencia codón optimizada de nuestro VHH modelo (anti-IL6) junto con el factor de secreción α de *S. cerevisiae*. Además, la cepa consta con una delección que impide la formación de pseudohifas.

4.2. Operación del biorreactor.

4.2.1. Preparación del inóculo

4.2.1.1. Banco de células de trabajo

En este trabajo se prepararon crioviales de 1,5 mL con una DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) de 60. En primer lugar, se procedió al pase de la biomasa desde una placa de Petri a un matraz Erlenmeyer de 1 L con deflectores al cual se añadieron 150 mL de medio YPG estéril (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona y 1 % de glicerol).

Pasadas las horas pertinentes y estando la biomasa en la fase de crecimiento exponencial ($\text{DO}_{600} \approx 8-12$), esta se cosechó de forma estéril y posteriormente se centrifugó a 6000 g, resuspendiéndose en el volumen de YPG fresco necesario para obtener una $\text{DO}_{600} \approx 90$. Luego, por cada mL de esta suspensión concentrada de biomasa, se añadieron 0,5 mL de una disolución estéril de glicerol al 50 % p/p, alcanzando una $\text{DO}_{600} \approx 60$ con una concentración final de glicerol del 15 % p/p, aproximadamente. Finalmente, se tomaron alícuotas de 1,5 mL, se introdujeron en los crioviales y se almacenaron a -80°C .

4.2.1.2. Preparación del pre-inóculo.

Para la preparación del pre-inóculo, se descongeló un criovial correspondiente a la cepa de estudio. Seguidamente, se realizaron los cálculos necesarios para determinar el volumen de criovial a inocular en el matraz Erlenmeyer con deflectores y estéril con 150 mL de medio YPG.

A continuación, los matraces se incubaron en un agitador orbital Multitron (INFORS HT, Bottmingen, Suiza) a 25°C y 100 rpm durante aproximadamente 24 h, hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 10.

4.3. Cultivo en quimiostato.

Los cultivos en quimiostato se llevaron a cabo en un sistema de biorreactores BIONET F1

Twin (BIONET, España), el cual permite la operación simultánea de dos reactores mediante una unidad de control común (BCU). El volumen de estos reactores de tanque agitado es de 3 L, sin embargo, nuestro volumen de trabajo se fijó en 0,7 L.

4.3.1. Preparación del biorreactor y la fase *batch*.

Antes de comenzar la operación en quimiostato, se realizó una fase *batch*. Los medios empleados para la fase *batch* variaron según el medio a testar como primera condición del quimiostato. Las distintas alternativas consideradas se presentan en la tabla correspondiente. Adicionalmente, se muestra una tabla complementaria que detalla las diferentes formulaciones de soluciones de sales traza utilizadas en el presente estudio.

Tabla 4. Composición de los medios empleados en este estudio

Componentes	Unidades	FM22	Genophys	MBSM	BSM	BSM50%	BFM21	RDM
Glucosa/Glicerol	g/L	50	50	50	50	50	50	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	23,5	-	-	-	-	5	1,65
(NH ₄) ₂ HPO ₄	g/L	-	12,6	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	g/L	42,9	-	10	-	-	-	12
H ₃ PO ₄	mL/L	-	-	-	26,7	13,4	3,5	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	3,9	0,5	3,2	14,9	7,45	1,95	4,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	g/L	-	0,02	0,35	-	-	-	0,36
CaSO ₄ ·2H ₂ O	g/L	1	-	-	0,93	0,47	0,15	-
K ₂ SO ₄	g/L	14,3	-	-	18,2	9,1	2,4	-
KCl	g/L	-	0,9	-	-	-	-	-
KOH	g/L	-	-	-	4,13	2,07	0,65	3,37
Ácido cítrico	g/L	-	1,8	-	-	-	-	-
Citrato de sodio	g/L	-	-	-	-	-	2,94	-
NaOH	g/L	-	-	-	-	-	1,537	-
Biotina	mL/L	4,35	4,35	4,35	4,35	4,35	4,35	4,35
PTM 1	mL/L	-	4,35	4,35	4,35	4,35	-	4,35
PTM 2	mL/L	-	-	-	-	-	-	-
PTM 4	mL/L	4,35	-	-	-	-	4,35	-

Tabla 5. Composición de las distintas soluciones de sales traza para *Pichia pastoris*.

Componente	Unidades	PTM 1	PTM 2	PTM 4
CaSO ₄ ·2H ₂ O	g/L	-	0,015	0,5
KI	g/L	0,42	0,1	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	g/L	3	0,38	3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	g/L	1	0,24	0,2
H ₃ BO ₃	g/L	0,1	0,02	0,02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	20	2,52	-
ZnCl ₂	g/L	-	-	7
FeCl ₃ ·6H ₂ O	g/L	-	6,01	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	65	-	22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	g/L	5	-	2
H ₂ SO ₄	mL/L	10	-	1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	g/L	-	-	0,916

PTM: *Pichia trace metals*

NaI	g/L	-	-	0,08
-----	-----	---	---	------

Hay que mencionar que a estos medios se le añadieron 0,2 ml de antiespumante Glanapon 2000kz (Bussetti & Co. GmbH, Viena, Austria), por cada litro de medio empleado, y que para la fase *batch* se utilizó glicerol a 40 g/L como fuente de carbono.

La forma de proceder fue la siguiente: primero se calibró el sensor de pH con soluciones estándar de pH y seguidamente se introdujo en el fermentador el medio de cultivo sin sales traza ni biotina. El sensor de pH utilizado en los cultivos con quimiostato fue un InPro 3030/225 de Mettler Toledo (Columbus, OH, EE. UU.).

Posteriormente, se realizó un proceso de esterilización (121 °C, 30 min) con una autoclave Autester Dry 80 (JP Selecta, Abrera, España). A continuación, se añadieron las soluciones de biotina y sales traza, esterilizadas mediante microfiltración con filtros de nylon y celulosa regenerada respectivamente. Ambos filtros son hidrófilos, poseen un tamaño de poro nominal de 0,2 µm, y se les puede acoplar una aguja para introducir las soluciones citadas en el biorreactor a través del septum.

Después, se calibró el sensor de oxígeno disuelto (OD). El sensor de OD empleado fue un polarográfico InPro 6820/20/220 de Mettler Toledo (Columbus, OH, EE. UU.). Seguidamente, el inóculo se introdujo de forma estéril en el fermentador, dando inicio a la fase *batch*. Antes, la DO₆₀₀ inicial necesaria para alcanzar una OD₆₀₀ de 80 entre 20-24 horas fue calculada a partir de la Ecuación 1. Este valor resultante se aplicó en la Ecuación 2 para calcular el volumen de pre-inóculo requerido.

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (1)$$

$$V_1 \cdot OD_1 = V_2 \cdot OD_2 \quad (2)$$

Donde X_0 y X_t representan la concentración de biomasa al inicio y al final del cultivo batch, respectivamente (expresadas en unidades de OD₆₀₀ o g·L⁻¹), μ es la tasa de crecimiento específico (h⁻¹) y t el tiempo (h). Asimismo, V_1 corresponde al volumen del cultivo en el biorreactor (L) y OD₁ a la DO₆₀₀ inicial (X_0) definida en la Ecuación 1. Por su parte, OD₂ representa la DO₆₀₀ del pre-inóculo en el matraz de agitación y V_2 el volumen de pre-inóculo requerido (L).

Para evitar la fase *lag* al inicio del lote, la biomasa empleada para el inóculo debe estar en la fase de crecimiento exponencial, lo cual corresponde a una DO₆₀₀ entre 8 y 12.

Una vez calculado el volumen necesario para inocular y alcanzada la fase exponencial (OD₆₀₀ 8-12), se centrifugó en condiciones estériles y seguidamente se resuspendieron las células en agua estéril. Por último, inoculamos el biorreactor de forma aséptica.

La temperatura durante la fase *batch* se mantuvo a 25 °C mediante la unidad de control de temperatura del fermentador. Concretamente, se utilizó un enfriador externo Alpha RA8 (Lauda, Lauda-Königshofen, Alemania) para suministrar agua fría a 4 °C al sistema de control debido a la intensa generación de calor en los cultivos. El oxígeno disuelto (OD) se mantuvo siempre por encima del 30 % de la saturación del aire modificando automáticamente la velocidad de agitación, utilizando el propio controlador de cascada de OD del fermentador.

No se necesitó oxígeno en las operaciones de la fase batch, por lo que se utilizó un flujo de aire equivalente a 0,6L/min.

El pH se controló a 6,0, lejos del punto isoeléctrico del VHH ($pI=7,22$) y utilizando NH_4OH al 15 % (v/v), KOH 5M o $NaOH$ 5M.

En cuanto a las pérdidas por evaporación, estas se minimizaron mediante un condensador de gas con agua de refrigeración a 4 °C. Y los gases de entrada y salida se esterilizaron mediante su paso a través de filtros hidrófobos de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro nominal de 0,2 μm , instalados en las corrientes de entrada y salida de gas del fermentador.

4.3.2. Operación del quimiostato

Tras el final de la fase batch, marcado por un aumento repentino de DO, la tasa de dilución (D) se estableció en 0,100 h^{-1} controlando el caudal de salida a 1,167 mL/min. Es importante iniciar la operación del quimiostato justo después del final del lote para mantener la biomasa en crecimiento exponencial y evitar largos tiempos muertos. El oxígeno disuelto (OD) se mantuvo, al igual que en la fase batch, por encima del 30 % mediante la mezcla de dos corrientes gaseosas, una de oxígeno puro con un caudal de 0,100 L/min, y otra de aire, con un caudal de 0,500 L/min.

Para asegurar que se logró la tasa de dilución deseada, se midió el caudal de salida en cada toma de muestra, reajustándose la potencia de la bomba de alimentación según esta medición del caudal de salida, tal y como se detalla en trabajos previos [97].

La temperatura, el pH y la agitación se mantuvieron constantes a 25 °C y 6,0 y 700 rpm, respectivamente. Salvo en cuatro condiciones en las que el pH se estableció a 5 y 7.

Para la preparación del medio de la fase quimiostato, se disolvieron las sales en agua destilada y se introdujeron en tanques previamente esterilizados de 10 o 20 L a través de un filtro de polietersulfona estéril (PES), compuesto por una membrana de prefiltro con tamaño de poro nominal de 0,45 μm y una membrana de filtrante de 0,2 μm de tamaño de poro nominal (Sartopore 2 Midicap; Sartorius, Gotinga, Alemania).

En este proyecto se evaluaron 50 condiciones experimentales diferentes, variando la composición del medio de cultivo en términos de sales, elementos traza, pH, fuente de nitrógeno y base. Exponiéndose únicamente 29 de ellas en este trabajo de fin de máster, debido a que las 21 condiciones no mostradas presentaron problemas fatales de operación en el biorreactor, siendo estas muy inestables.

Para cada condición, se tomaron muestras en el tercer, cuarto y quinto tiempo de residencia para verificar el logro de las condiciones de estado estacionario. Acto seguido, se analizó la densidad celular, y se cuantificó el sustrato, los subproductos y el VHH mediante HPLC. Además, la cuantificación de VHH también se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, ELISA y HPLC

4.4. Métodos analíticos

4.4.1. Cuantificación de la biomasa mediante la densidad óptica (OD₆₀₀)

Para monitorizar el proceso, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando un

espectrofotómetro DR 3900 (Hach Lange, Düsseldorf, Alemania). Además, para garantizar una correlación lineal entre la DO_{600} y la concentración de biomasa, se aplicó a las muestras una dilución 1:100, de manera que los valores de la DO_{600} se situaran entre 0,2 y 0,8.

4.4.2. Cuantificación de la biomasa mediante el peso seco celular.

Además de la medición de la DO_{600} , para obtener un valor preciso y fiable de la concentración de biomasa, así como para calcular los diferentes parámetros del proceso en unidades de masa, se midió el peso celular seco (DCW) por triplicado para cada muestra de fermentación.

Primero se secaron filtros etiquetados (tamaño de poro de $0,7\ \mu\text{m}$) durante 24 h en una estufa a $105\ ^\circ\text{C}$, luego se colocaron en un desecador durante 2 h con el objetivo de enfriarlos sin que incorporen humedad. Por último, se pesaron en una báscula de precisión ME204 de Mettler (Columbus, OH, EE. UU.).

Los filtros empleados eran de fibra de vidrio (APFF04700, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Tras la toma de muestra, estos filtros tarados se humedecieron con 10 mL de NaCl al 0,9% disuelto en agua destilada, utilizando un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío y con embudo de filtración equipado en la parte superior. Así, se filtraron 2 mL de muestra fresca aplicando vacío. Acto seguido, se utilizaron 2 mL de NaCl al 0,9% para limpiar la punta de la micropipeta. Y finalmente, se vertieron 10 mL de NaCl al 0,9% en el vaso de filtración para lavar el filtro.

Tras estos pasos de preparación, los filtros resultantes se secaron durante 24 h en la estufa a $105\ ^\circ\text{C}$ y luego se colocaron en el desecador durante 2 h. Pasado este tiempo, se pesaron los filtros obteniendo así el peso celular seco al restarle el peso de la tara del filtro.

4.4.3. Análisis de gases de entrada y salida

Para el análisis de los gases se emplearon dos dispositivos, el analizador BlueInOne FERM (BlueSens, Herten, Alemania) y el analizador de gases de escape bBreath (Bionet, Murcia, España). El primero permitió monitorizar las fracciones molares de CO_2 y O_2 y la humedad absoluta, registrando los datos de forma continua y más precisa a partir de los gases de escape y de manera intermitente a partir del gas de entrada.

Ambos fueron calibrados al inicio de cada fermentación mediante una corriente de aire sintético con concentraciones conocidas de CO_2 y O_2 para establecer así una correlación lineal entre las concentraciones de los gases y la señal electrónica del sensor.

Por su parte, el bBreath permitió una medición continua y precisa de la composición del gas de salida, utilizando un sensor de zirconio (Cambridge Sensotec) para O_2 , con un rango de 0 a 30 %, y un sensor de infrarrojos (Vaisala) para CO_2 , con un rango de 0 a 20 %.

4.4.4. Cuantificación de fuentes de carbono y subproductos

La cuantificación de las concentraciones de glicerol, glucosa y posibles subproductos de la fermentación como etanol, arabitól y succinato fue llevada a cabo mediante un Vanquish HPLC (Thermo Fisher Scientific) el cual cuenta con un detector de índice de refracción (IR) apropiado para dicha tarea. A este equipo se acopló una columna de ácidos orgánicos Coregel 87H3 (300 x 7,8 mm) (Concise Separations, San José, CA, EE. UU.). El procedimiento empleado para este fin se especificó en otra publicación y gracias a la cual se obtuvo una

desviación estándar relativa (DER) inferior al 1 % [98].

4.4.5. Cuantificación de la concentración de VHH

4.4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En el caso de la cuantificación de nuestra proteína de interés VHH, empleamos el mismo equipo de HPLC, mencionado para la cuantificación de ácidos orgánicos, con la diferencia de que en este caso se empleó una columna de fase reversa XBridge Premier Protein BEH C4 (Waters, Mildford, MA, EE. UU.).

El protocolo llevado a cabo consta de dos fases móviles: una fase móvil orgánica compuesta por AcN/IPA 50:50 0,1 % y TFA y una fase móvil acuosa compuesta por H₂O 0,1 % TFA. Ambas fases se mezclaron en distintas proporciones formando un gradiente durante la medición.

Es importante remarcar que fueron necesarios estándares de nuestra proteína de interés purificada para poder relacionar la señal generada por el equipo con la concentración de VHH.

4.4.5.2. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA).

El VHH objetivo también fue cuantificado mediante un ensayo ELISA de tipo indirecto contra la cola de histidina de nuestro VHH. Estos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos de 200 µL (Fisher Scientific) utilizando como estándar nuestro VHH purificado en un rango de concentraciones de 25 a 500 mg/L.

Primeramente, se rellenaron todas las filas de la placa excepto la última con 100 µL de H₂O miliQ. Y posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias en nuestro caso para el estándar se aplicó una dilución 1:1000 a los dos primeros pocillos en de las primeras columnas de la placa, obteniendo así nuestra recta patrón por duplicado. A la tercera columna se le añadieron 200 µL de H₂O ultrapura, sirviéndonos así de blanco. A partir de la tercera columna se aplicaron diluciones 1:50 a las muestras para evitar el enmascarado que produce la alta concentración de sales a este método.

Tras depositar estas diluciones en 200 µL y en la última fila con la pipeta multicanal se mezclaron los pocillos de esta última fila y seguidamente se pasaron 100 µL a la fila siguiente. Este paso se repitió en cada fila lo cual corresponde a una dilución 1:2 en cada paso.

Una vez rellenos todos los pocillos y hechas las diluciones, procedemos a una incubación de 2 horas para el VHH se adhiera al fondo del pocillo (*clogging*).

Luego, los pocillos se lavaron con tampón TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) y los sitios de unión inespecíficos se bloquearon incubando durante 15 min a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v) en tampón TBST (TBS suplementado con Tween 20 al 0,1%).

Para la inmunodetección, las placas se incubaron durante 45 min con el anticuerpo primario monoclonal anti-His (Ref. H1029, Sigma-Aldrich), diluido 1:3000 en tampón de dilución (BSA 0,1 % en TBST). Tras un lavado secuencial con TBST y TBS, se añadió el anticuerpo secundario (Ref. A3562, Sigma-Aldrich) y se incubó durante 45 min adicionales.

La cuantificación de la concentración de VHH se realizó mediante un método colorimétrico

basado en la fosfatasa alcalina (AP). Esta enzima, conjugada al anticuerpo secundario, hidroliza un sustrato incoloro, el p-nitrofenilfosfato (pNPP, 1-Step PNPP, Thermo Fisher Scientific), generando p-nitrofenol, un producto amarillo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra. El color se desarrolló durante un tiempo controlado y la reacción se detuvo añadiendo NaOH 2 M, desplazando el equilibrio hacia la forma ionizada cromogénica y maximizando la señal de absorbancia. La lectura se realizó a 405 nm en un lector de placas.

4.4.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Empleamos la electroforesis en condiciones desnaturalizantes para determinar la concentración de VHH. Para ello usamos geles prefabricados de gradiente de poliacrilamida (4–15% Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-Rad). Las muestras de proteína se prepararon mezclándolas con tampón de carga reductor, compuesto por una mezcla 9:1 (v/v) de tampón Laemmli y β -mercaptoetanol respectivamente. Acto seguido, se llevó a cabo una desnaturalización térmica a 95–100 °C durante 5–10 min. Y la separación electroforética se realizó a voltaje constante de 120 V durante 80 minutos, utilizando tampón Tris–Glicina–SDS.

Para la visualización, los geles se sumergieron en una solución de tinción con azul de Coomassie R-250 (50% metanol, 0,1% Coomassie Blue R-250, 10% ácido acético y 40% agua destilada) bajo agitación suave durante 1 h. Posteriormente, se retiró el colorante y se procedió a la decoloración del gel mediante incubación durante 2 h en una solución de destinción compuesta por 50% metanol, 10% ácido acético y 40% agua destilada.

Finalmente, la solución de destinción se sustituyó por agua destilada para la rehidratación del gel y, una vez hidratado, se procedió a la adquisición de imágenes utilizando el sistema Gel Doc™ EZ Imaging System (Bio-Rad). La cuantificación de las bandas proteicas se realizó posteriormente mediante el software Image Lab™ (Bio-Rad).

4.5. Secuencia experimental.

A continuación, debido a la gran cantidad de condiciones se detallará la secuencia experimental seguida en este proyecto.

Durante la primera fermentación se estudiaron distintos medios descritos en la literatura: FM22, Genophys, BSM, MBSM, BFM21, RDM y CPM. Al finalizar la fermentación y según nuestras premisas que se detallarán en el apartado de resultados. Se eligieron dos candidatos para seguir optimizándolos, estos fueron BSM y RDM.

Posteriormente, a partir de cada medio base se realizaron modificaciones sistemáticas de distintos parámetros y variables, tal y como se resume en la figura 11. A continuación se mostrará en detalle cada una de las condiciones experimentadas en cada conjunto experimental, BSM, RDM (NH_4)₂SO₄ o NH₄OH y RDM urea. Además, para cada conjunto de condiciones, se detallarán los valores de la tasa específica de producción de VHH, en las tablas mostradas en este apartado.

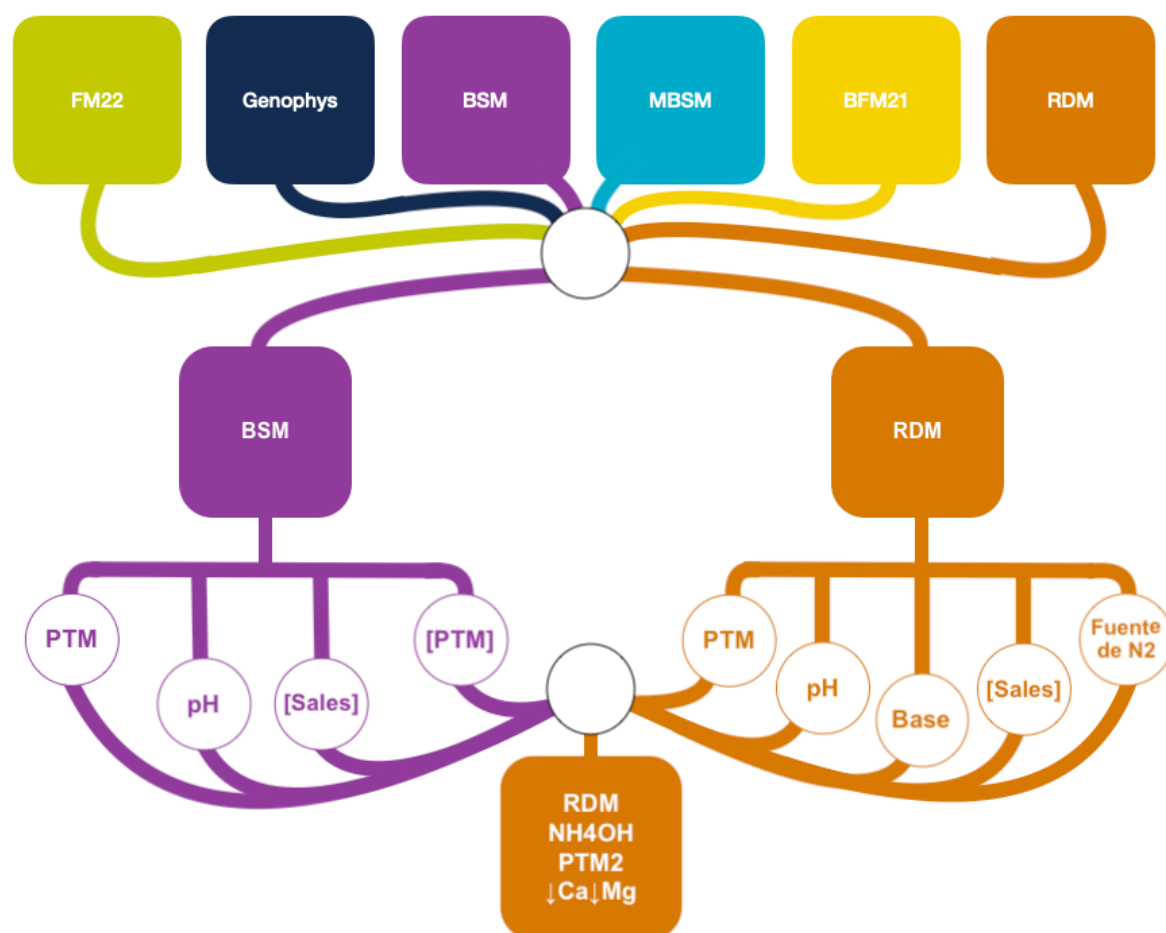


Figura 11. Secuencia experimental seguido durante el estudio.

Tabla 6. Condiciones experimentales correspondientes al medio BSM y sus variantes.

Condición	Medio	Reactor	Fuente de nitrógeno	pH	Base	PTM	Concentración de sales totales	Concentración de PTM totales	Estado estacionario
A	BSM	BN1	NH ₄ OH	6	NH ₄ OH	PTM1	100%	100%	SI
B	BSM	BN1	NH ₄ OH	6	NH ₄ OH	PTM1	50%	50%	SI
C	BSM	BN1	NH ₄ OH	5	NH ₄ OH	PTM1	50%	50%	SI
D	BSM	BN2	NH ₄ OH	7	NH ₄ OH	PTM1	50%	50%	SI
E	BSM	BN2	NH ₄ OH	6	NH ₄ OH	PTM2	100%	100%	SI
F	BSM	BN2	NH ₄ OH	6	NH ₄ OH	PTM2	50%	100%	SI

Tabla 7. Tasa específica de producción (q_p) de cada condición correspondiente al medio BSM y sus variantes

Condición	Medio	q_p SDS (mg VHH/g biomasa · h)	q_p ELISA (mg VHH/g biomasa · h)	q_p HPLC (mg VHH/g biomasa · h)
A	BSM	0,157 ± 0,005	0,088 ± 0,061	0,049 ± 0,007
B	BSM	0,174 ± 0,004	0,096 ± 0,067	0,056
C	BSM	0,202 ± 0,010	0,136	0,090 ± 0,001
D	BSM	0,212 ± 0,042	0,14 ± 0,001	0,089
E	BSM	0,233 ± 0,017	0,259	0,132 ± 0,001
F	BSM	0,244	0,229	0,103 ± 0,002

Tabla 8. Condiciones experimentales correspondientes al medio RDM empleando urea como fuente de nitrógeno.

Condición	Medio	Fuente de nitrógeno	pH	Base	PTM	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ · 2H ₂ O	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Estado estacionario
G	RDM	Urea 4g/L	6	NH ₄ OH	PTM2*	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
H	RDM	Urea 2g/L	6	NH ₄ OH	PTM2*	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
I	RDM	Urea 4g/L	6	KOH	PTM2*	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
J	RDM	Urea 4g/L	6	NaOH	PTM2*	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
K	RDM	Urea 2g/L	6	KOH	PTM2*	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
L	RDM	Urea 2g/L	6	NH ₄ OH	PTM2*	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
M	RDM	Urea 4g/L	6	NH ₄ OH	PTM1	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
N	RDM	Urea 4g/L	6	NH ₄ OH	PTM4	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
Ñ	RDM	Urea 4g/L	6	KOH	PTM1	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
O	RDM	Urea 4g/L	6	KOH	PTM2	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI

Tabla 9. Tasa específica de producción de cada condición correspondiente al medio RDM empleando urea como fuente de nitrógeno.

Condición	Medio	qp SDS (mg VHH/g biomasa · h)	qp ELISA (mg VHH/g biomasa · h)	qp HPLC (mg VHH/g biomasa · h)
G	RDM	0,152 ± 0,042	0,145 ± 0,029	0,094
H	RDM	0,164 ± 0,072	0,168 ± 0,027	0,17
I	RDM	0,329 ± 0,093	0,277	0,082
J	RDM	0,363 ± 0,188	0,425	-
K	RDM	0,333 ± 0,171	0,424	-
L	RDM	0,194	0,511	0,20
M	RDM	0,053 ± 0,039	0,062 ± 0,013	0,031
N	RDM	0,111	0,097	0,068
Ñ	RDM	0,111	0,098	0,050
O	RDM	0,147 ± 0,006	0,127 ± 0,011	0,090

Tabla 10. Condiciones experimentales correspondientes al medio RDM empleando (NH₄)₂SO₄ o NH₄OH como fuente de nitrógeno.

Condición	Medio	Fuente de nitrógeno	pH	Base	PTM	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ · 2H ₂ O	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Estado estacionario
P	RDM	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,65 g/L	6	KOH	PTM1	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
Q	RDM	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,65 g/L	6	NH ₄ OH	PTM4	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
R	RDM	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,65 g/L	6	NH ₄ OH	PTM1	12 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
S	RDM	No	6	NH ₄ OH	PTM2	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
T	RDM	No	5	NH ₄ OH	PTM2	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	SI
U	RDM	No	7	NH ₄ OH	PTM2	6 g/L	0,36g/L	4,7g/L	NO
V	RDM	No	6	NH ₄ OH	PTM2	6 g/L	0,1g/L	3g/L	SI

Tabla 11. Tasa específica de producción de cada condición correspondiente al medio RDM empleando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4OH como fuente de nitrógeno.

Condición	Medio	q _P SDS (mg VHH/g biomasa · h)	q _P ELISA (mg VHH/g biomasa · h)	q _P HPLC (mg VHH/g biomasa · h)
P	RDM	0,041	0,025	0,041 ± 0,001
Q	RDM	0,047 ± 0,014	0,045 ± 0,013	0,021
R	RDM	0,278 ± 0,029	0,043 ± 0,0003	0,012
S	RDM	0,314 ± 0,009	0,214 ± 0,004	0,224 ± 0,001
T	RDM	0,233 ± 0,016	0,140 ± 0,0003	0,084 ± 0,001
U	RDM	0,476	0,171	0,447 ± 0,009
V	RDM	0,226	0,138	0,154 ± 0,027

Por último, cabe comentar que, la tasa específica de crecimiento en el conjunto de condiciones alcanzó una media de $0,087 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, un valor muy próximo al nominal con el que se quería trabajar. Por otro lado, el rendimiento medio fue de $0,59 \pm 0,03 \text{ g biomasa/g sustrato}$, un rendimiento dentro del rango de *P. pastoris* cuando usamos glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las sales de aquellos medios que presentaron problemas de precipitación pudieron interferir con la medida del peso seco celular al quedar retenidas en el filtro [99]. De hecho, este efecto se ha descrito en diversos trabajos e inclusive se han descrito protocolos para minimizar dichas interferencias [100].

Aun así, podríamos decir que debido la proximidad del valor medio con el rendimiento teórico ($Y_{X/S} \approx 0,5 \text{ g biomasa /g glucosa}$), en estos experimentos la fuente de carbono fue la limitante tal y como se describe para las operaciones en quimiostato. Esto se confirma ya que nunca se detectó concentraciones significativas de fuente de carbono en el sobrenadante ($<0,1 \text{ g/L}$).

5. Referencias

1. Bader, B., Zinner, M., & Trübel, H. (2025). Holistic ecosystem strategies for boosting biopharma start-up success. *Trends in biotechnology*, S0167-7799(25)00483-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2025.11.011>.
2. Wei, X., Luo, J., Pu, A., Liu, Q., Zhang, L., Wu, S., ... & Wan, X. (2022). From biotechnology to bioeconomy: A review of development dynamics and pathways. *Sustainability*, 14(16), 10413. <https://doi.org/10.3390/su141610413>.
3. Biotechnology Market Size & Outlook, 2030 <https://www.grandviewresearch.com/horizon/outlook/biotechnology-market-size/global>. Accessed 20 Jan 2026.
4. Milne J. J. (2017). Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1485, 71–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_5.
5. Yenkie, K. M., Wu, W., Clark, R. L., Pfleger, B. F., Root, T. W., & Maravelias, C. T. (2016). A roadmap for the synthesis of separation networks for the recovery of bio-based chemicals:

- Matching biological and process feasibility. *Biotechnology advances*, 34(8), 1362–1383. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.003>.
6. Barone, G. D., Emmerstorfer-Augustin, A., Biundo, A., Pisano, I., Coccetti, P., Mapelli, V., & Camattari, A. (2023). Industrial Production of Proteins with *Pichia pastoris*-*Komagataella phaffii*. *Biomolecules*, 13(3), 441. <https://doi.org/10.3390/biom13030441>.
7. Guilliermond, A. (1920). *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures à copulation hétérogamique. Société mycologique de France.
8. Gasset, A., Garcia-Ortega, X., Garrigós-Martínez, J., Valero, F., & Montesinos-Seguí, J. L. (2022). Innovative Bioprocess Strategies Combining Physiological Control and Strain Engineering of *Pichia pastoris* to Improve Recombinant Protein Production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 818434. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.818434>.
9. Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Pessoa, A., & Farías, J. G. (2014). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian journal of microbiology*, 44(4), 1043–1048. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000400004>.
10. Lin, NX., He, RZ., Xu, Y. *et al.* Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Biofuels* 14, 160 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02013-w>.
11. Dragosits, M., Stadlmann, J., Graf, A., Gasser, B., Maurer, M., Sauer, M., Kreil, D. P., Altmann, F., & Mattanovich, D. (2010). The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. *BMC genomics*, 11, 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-207>.
12. Schusterbauer, V., Fischer, J. E., Gangl, S., Schenzle, L., Rinnofer, C., Geier, M., Sailer, C., Glieder, A., & Thallinger, G. G. (2022). Whole Genome Sequencing Analysis of Effects of CRISPR/Cas9 in *Komagataella phaffii*: A Budding Yeast in Distress. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(10), 992. <https://doi.org/10.3390/jof8100992>.
13. Weiss, F., Requena-Moreno, G., Pichler, C., Valero, F., Glieder, A., & Garcia-Ortega, X. (2024). Scalable protein production by *Komagataella phaffii* enabled by ARS plasmids and carbon source-based selection. *Microbial cell factories*, 23(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02368-3>.
14. Tomàs-Gamisans, M., Ferrer, P., & Albiol, J. (2016). Integration and Validation of the Genome-Scale Metabolic Models of *Pichia pastoris*: A Comprehensive Update of Protein Glycosylation Pathways, Lipid and Energy Metabolism. *PloS one*, 11(1), e0148031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148031>.
15. Kumar, A., Udugama, I. A., Gargalo, C. L., & Gernaey, K. V. (2020). Why is batch processing still dominating the biologics landscape? Towards an integrated continuous bioprocessing alternative. *Processes*, 8(12), 1641. <https://doi.org/10.3390/pr8121641>.

16. Nieto-Taype, M. A., Garcia-Ortega, X., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J. L., & Valero, F. (2020). Continuous Cultivation as a Tool Toward the Rational Bioprocess Development With *Pichia pastoris* Cell Factory. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 632. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00632>.
17. Yang, O., Prabhu, S., & Ierapetritou, M. (2019). Comparison between batch and continuous monoclonal antibody production and economic analysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(15), 5851-5863. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04717>.
18. De, S., Rebnegger, C., Moser, J., Tatto, N., Graf, A. B., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2020). Pseudohyphal differentiation in *Komagataella phaffii*: investigating the FLO gene family. *FEMS yeast research*, 20(5), foaa044. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa044>.
19. Besleaga, M., Ebner, K., Glieder, A., Spadiut, O., & Kopp, J. (2025). Chances and drawbacks of derepressed recombinant enzyme production in continuous cultivations with *Komagataella phaffii*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 13, 1523037. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1523037>.
20. Rebnegger, C., Flores-Villegas, M., Kowarz, V., De, S., Pusterla, A., Holm, H., Adelantado, N., Kiziak, C., Mattanovich, D., Gasser, B. (2024). Knock-out of the major regulator *Flo8* in *Komagataella phaffii* results in unique host strain performance for methanol-free recombinant protein production. *New Biotechnology*, 84, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2024.10.001>.
21. Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., & Gingeras, T. R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic acids research*, 15(9), 3859–3876. <https://doi.org/10.1093/nar/15.9.3859>.
22. Inan, M., Meagher, M. M., & Benson, A. K. (2004). *U.S. Patent No. 6,699,691*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
23. Zhang, A. L., Luo, J. X., Zhang, T. Y., Pan, Y. W., Tan, Y. H., Fu, C. Y., & Tu, F. Z. (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular biology reports*, 36(6), 1611–1619. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>.
24. Ebner, K., Bernat-Camps, N., Scheipel, S., Dörner, C., Valero, F., Glieder, A., & Garcia-Ortega, X. (2025). Next-generation stress-inducible *Komagataella phaffii* promoter variants. *Microbial cell factories*, 24(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02825-7>.
25. Sales-Vallverdú, A., Gasset, A., Requena-Moreno, G., Valero, F., Montesinos-Seguí, J. L., & Garcia-Ortega, X. (2024). Synergic kinetic and physiological control to improve the efficiency of *Komagataella phaffii* recombinant protein production bioprocesses. *Microbial biotechnology*, 17(2), e14411. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14411>.

26. Karbalaee, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*, 235(9), 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
27. Garcia-Ortega, X. (2016). A step forward in recombinant protein production regulated by the constitutive GAP promoter in *Pichia pastoris* through bioprocess engineering approaches. Universitat Autònoma de Barcelona.
28. Gasset Franch, A. (2023). Physiological control of *Pichia pastoris* for the production of recombinant proteins: A novel Respiratory Quotient control based on Artificial Intelligence and scale-up of the bioprocess. Universitat Autònoma de Barcelona.
29. Türkanoğlu Özçelik, A., Yılmaz, S., & Inan, M. (2019). *Pichia pastoris* Promoters. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1923, 97–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9024-5_3.
30. Garrigós-Martínez, J., Nieto-Taype, M. A., Gasset-Franch, A., Montesinos-Seguí, J. L., Garcia-Ortega, X., & Valero, F. (2019). Specific growth rate governs AOX1 gene expression, affecting the production kinetics of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) P_{AOX1}-driven recombinant producer strains with different target gene dosage. *Microbial cell factories*, 18(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1240-8>.
31. Muyldermans S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry*, 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
32. Jin, B. K., Odongo, S., Radwanska, M., & Magez, S. (2023). NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5994. <https://doi.org/10.3390/ijms24065994>.
33. Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., & Tong, A. (2022). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular biomedicine*, 3(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00100-4>.
34. Blank, L., Pander, G., Mühlberg, E., Mier, W., & Uhl, P. (2025). Exploiting the unique properties of nanobodies: enhancing therapeutics, drug delivery, and targeted diagnostics. *Drug discovery today*, 30(12), 104524. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104524>.
35. Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G., Muyldermans, S., Wyns, L., & Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11(3), 500–515. <https://doi.org/10.1110/ps.34602>.
36. Bates, A., & Power, C. A. (2019). David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(2), 28. <https://doi.org/10.3390/antib8020028>.

37. Palma, A., Rettenbacher, L.A., Moilanen, A. *et al.* Biochemical analysis of *Komagataella phaffii* oxidative folding proposes novel regulatory mechanisms of disulfide bond formation in yeast. *Sci Rep* **13**, 14298 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41375-z>.
38. Ma, Y., Lee, C. J., & Park, J. S. (2020). Strategies for Optimizing the Production of Proteins and Peptides with Multiple Disulfide Bonds. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(9), 541. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090541>.
39. Hennigan, J. N., Menacho-Melgar, R., Sarkar, P., Golovsky, M., & Lynch, M. D. (2024). Scalable, robust, high-throughput expression & purification of nanobodies enabled by 2-stage dynamic control. *Metabolic engineering*, 85, 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.07.012>.
40. Chen, Q., Zhou, Y., Yu, J., Liu, W., Li, F., Xian, M., Nian, R., Song, H., & Feng, D. (2019). An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 155, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.11.001>.
41. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh, M., & Allameh, A. A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular immunology*, 43(5), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.03.003>.
42. Baghban, R., Gargari, S. L., Rajabibazl, M., Nazarian, S., & Bakherad, H. (2016). Camelid-derived heavy-chain nanobody against Clostridium botulinum neurotoxin E in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 63(2), 200–205. <https://doi.org/10.1002/bab.1226>.
43. Orioli, S., Santos, J., Ibañez, L. I., & D'Alessio, C. (2025). Production of high-affinity glycosylated anti-mouse conjugated nanobodies in *Pichia pastoris*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 13, 1673481. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1673481>.
44. Ezzine, A., M'hirsi El Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Hmila, I., Baciou, L., & Marzouki, M. N. (2012). Efficient expression of the anti-AahI' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 59(1), 15–21. <https://doi.org/10.1002/bab.67>.
45. De Groeve, M., Laukens, B., & Schotte, P. (2023). Optimizing expression of Nanobody® molecules in *Pichia pastoris* through co-expression of auxiliary proteins under methanol and methanol-free conditions. *Microbial cell factories*, 22(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02132-z>.
46. Zheng, Y., Li, B., Zhao, S., Liu, J., & Li, D. (2024). A universal strategy for the efficient expression of nanobodies in *Pichia pastoris*. *Fermentation*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010037>.

47. Gai, J., Ma, L., Li, G., Zhu, M., Qiao, P., Li, X., Zhang, H., Zhang, Y., Chen, Y., Ji, W., Zhang, H., Cao, H., Li, X., Gong, R., & Wan, Y. (2021). A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential. *MedComm*, 2(1), 101–113. <https://doi.org/10.1002/mco2.60>.
48. Zahrl, R. J., Prielhofer, R., Burgard, J., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2023). Synthetic activation of yeast stress response improves secretion of recombinant proteins. *New biotechnology*, 73, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.01.001>.
49. Zavec, D., Troyer, C., Maresch, D., Altmann, F., Hann, S., Gasser, B., & Mattanovich, D. (2021). Beyond alcohol oxidase: the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* utilizes methanol also with its native alcohol dehydrogenase *Adh2*. *FEMS yeast research*, 21(2), foab009. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab009>.
50. Zavec, D., Gasser, B., & Mattanovich, D. (2020). Characterization of methanol utilization negative *Pichia pastoris* for secreted protein production: New cultivation strategies for current and future applications. *Biotechnology and bioengineering*, 117(5), 1394–1405. <https://doi.org/10.1002/bit.27303>.
51. Gasser B, Rebnegger C, Flores Villegas MC, Mattanovich D. Carbon-source regulated protein production in a recombinant host cell. AT; 2020.
52. Rebnegger, C., Coltman, B. L., Kowarz, V., Peña, D. A., Mentler, A., Troyer, C., Hann, S., Schöny, H., Koellensperger, G., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2024). Protein production dynamics and physiological adaptation of recombinant *Komagataella phaffii* at near-zero growth rates. *Microbial cell factories*, 23(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02314-3>.
53. Coltman, B. L., Rebnegger, C., Gasser, B., & Zanghellini, J. (2024). Characterising the metabolic rewiring of extremely slow growing *Komagataella phaffii*. *Microbial biotechnology*, 17(1), e14386. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.1438>.
54. Rahimi, A., Karimi, A., Hosseini, S. N., Aghdasinia, H., & Mianroodi, R. A. (2021). Implementing chemostat fermentation of *Pichia pastoris* producing recombinant hbsag to optimize cell density affected by methanol rate. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 11(5). <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1263312641>.
55. Linova, M. Y., Kodiripaka, S. K., Martins, E., Sripada, S. A., Menegatti, S., & Woodley, J. M. (2025). Effect of cell retention techniques in *Komagataella phaffii* lab-scale continuous processes. *Biotechnology progress*, e70092. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/btpr.70092>.
56. Joseph, J. A., Akkermans, S., Van Impe, J., VanImpe, J. F. M., & Polanska, M. E. (2022). Studying the effect of media composition and pH on growth of *Pichia pastoris* and production of recombinant thaumatin II. *FOODSIM 2022*, 209–213.

57. *Pichia* fermentation process guidelines. Invitrogen 2000.
58. Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial cell factories*, 5, 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>.
59. Žitkus, E., Čiplys, E., Žiaunys, M., Sakalauskas, A., & Slibinskas, R. (2025). Development of an efficient expression system for human chaperone BiP in *Pichia pastoris*: production optimization and functional validation. *Microbial cell factories*, 24(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02679-z>.
60. Ghosalkar, A., Sahai, V., & Srivastava, A. (2008). Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource technology*, 99(16), 7906-7910. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.059>.
61. Wegner GH. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. Patent US4414329. 1983.
62. d'Anjou, M.C., Daugulis, A.J. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters* 22, 341–346 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1005612415737>.
63. Stratton, J., Chiruvolu, V., & Meagher, M. (1998). High cell-density fermentation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 103, 107–120. <https://doi.org/10.1385/0-89603-421-6:107>.
64. Kumbuka Omonde, A. (2014). Defined Media Design for High Cell Density *Pichia pastoris* Fermentations in Shake Flasks, a 24 Well Microreactor and a 30L Bioreactor. North Carolina State University.
65. Zhang, W., Inan, M. & Meagher, M.M. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5, 275–287 (2000). <https://doi.org/10.1007/BF02942184>.
66. Pais-Chanfrau, J. M., & Trujillo-Toledo, L. E. (2016). Optimization of culture medium for large-scale production of heterologous proteins in *Pichia pastoris* to be used in nanoscience and other biotechnological fields. *Biol. Med*, 8, 279. <http://dx.doi.org/10.4172/0974-8369.1000279>.
67. Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., & Love, J. C. (2018). Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering*, 115(1), 103–113. <https://doi.org/10.1002/bit.26440>.

68. Biedermann, A. M., Gengaro, I. R., Rodriguez-Aponte, S. A., Love, K. R., & Love, J. C. (2022). Modular development enables rapid design of media for alternative hosts. *Biotechnology and bioengineering*, 119(1), 59–71. <https://doi.org/10.1002/bit.27947>.
69. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., & Ohmura, T. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)88050-0](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)88050-0).
70. Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial cell factories*, 5, 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>.
71. Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in microbiology*, 7, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>.
72. Siegel, R. S., & Brierley, R. A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology and bioengineering*, 34(3), 403–404. <https://doi.org/10.1002/bit.260340315>.
73. Bhuiyan, M., Mavinic, D. S., & Beckie, R. D. (2007). A solubility and thermodynamic study of struvite. *Environmental technology*, 28(9), 1015–1026. <https://doi.org/10.1080/09593332808618857>.
74. Sales-Vallverdú, A., Nieto-Taype, M. A., Gasset, A., Montesinos-Seguí, J. L., Valero, F., & Garcia-Ortega, X. (2026). Fed-Batch Operational Strategies for Efficient and Robust *Pichia pastoris* Cultivations Achieving High Cell Densities. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2697, 457–480. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4779-0_31.
75. Cankorur-Cetinkaya, A., Dias, J. M. L., Kludas, J., Slater, N. K. H., Rousu, J., Oliver, S. G., & Dikicioglu, D. (2017). CamOptimus: a tool for exploiting complex adaptive evolution to optimize experiments and processes in biotechnology. *Microbiology (Reading, England)*, 163(6), 829–839. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000477>.
76. Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource technology*, 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>.
77. Yenkie, K. M., Wu, W., Clark, R. L., Pflieger, B. F., Root, T. W., & Maravelias, C. T. (2016). A roadmap for the synthesis of separation networks for the recovery of bio-based chemicals: Matching biological and process feasibility. *Biotechnology advances*, 34(8), 1362–1383. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.003>.

78. Herbert, D., Elsworth, R., & Telling, R. C. (1956). The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *Microbiology*, 14(3), 601-622. <https://doi.org/10.1099/00221287-14-3-601>.
79. Xu, S., Gavin, J., Jiang, R., & Chen, H. (2017). Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes. *Biotechnology progress*, 33(4), 867–878. <https://doi.org/10.1002/btpr.2415>.
80. Pasitka, L., Wissotsky, G., Ayyash, M., Yarza, N., Rosoff, G., Kaminker, R., & Nahmias, Y. (2024). Empirical economic analysis shows cost-effective continuous manufacturing of cultivated chicken using animal-free medium. *Nature food*, 5(8), 693–702. <https://doi.org/10.1038/s43016-024-01022-w>.
81. Makeeva, A., Sidorin, A., Ishtuganova, V., Sambuk, E., Padkina, M., & Rumyantsev, A. (2024). Specific features of the transcriptomic response to nitrogen starvation in methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. *Biological Communications*, 69(4), 214-228. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2024.402>.
82. Guo, C., Huang, Y., Zheng, H., Tang, L., He, J., Xiang, L., Liu, D., & Jiang, H. (2012). Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*. *Experimental and therapeutic medicine*, 4(6), 1063–1068. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.719>.
83. Zhao, X., Zou, H., Fu, J., Chen, J., Zhou, J., & Du, G. (2013). Nitrogen regulation involved in the accumulation of urea in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 30(11), 437–447. <https://doi.org/10.1002/yea.2980>.
84. Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS yeast research*, 4(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>.
85. Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., & Guillamón, J. M. (2013). Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PloS one*, 8(6), e67166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067166>.
86. Steimann, T., Wollborn, D., Röck, F., Horstmann, R., Schmitt, E., Christ, J. J., Blank, L. M., & Büchs, J. (2024). Investigation into struvite precipitation: A commonly encountered problem during fermentations on chemically defined media. *Biotechnology and bioengineering*, 121(3), 1076–1089. <https://doi.org/10.1002/bit.28633>.
87. Osman, R. M., & Hodaifa, G. (2023). An overview of anaerobic membrane bioreactors: Current developments, fouling problems, and future prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(6), 111482. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111482>.

88. Chalermthai, B., Charoensuppanimit, P., Nootong, K., Olsen, B. D., & Assabumrungrat, S. (2023). Techno-economic assessment of co-production of edible bioplastic and food supplements from *Spirulina*. *Scientific reports*, 13(1), 10190. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37156-3>.
89. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J., & van Zyl, W. H. (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial cell factories*, 4, 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-31>.
90. Fernández-Verdejo, D., Galeano, M. B., Ul, Z., Pant, D., Baeza, J. A., & Guisasola, A. (2025). Customizing bioelectrochemical ammonium recovery: towards application-specific effluents. *Chemical Engineering Journal*, 172380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.172380>.
91. Alves, L., Holz, L. I., Fernandes, C., Ribeirinha, P., Mendes, D., Fagg, D. P., & Mendes, A. (2022). A comprehensive review of NO_x and N₂O mitigation from industrial streams. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 155, 111916. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111916>.
92. Liu, H., Bai, L., Bergmann, A., Cuenya, B. R., & Luo, J. (2024). Electrocatalytic reduction of nitrogen oxide species to ammonia. *Chem.* <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPR.2024.07.006>.
93. Carnicer Heras, M. (2012). Systematic metabolic analysis of recombinant *Pichia pastoris* under different oxygen conditions: a metabolome and fluxome based study. Universitat Autònoma de Barcelona.
94. Joseph, J. A., Akkermans, S., Cornillie, E., Deberlanger, J., & Van Impe, J. F. (2023). Optimal culture medium selection and supplementation for recombinant thaumatin II production by *Komagataella phaffii*. *Food and Bioproducts Processing*, 139, 190-203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.04.001>.
95. Ma, Z., Chen, M., Zhan, W., & Xia, J. (2025). Efficient Production of Unspecific Peroxygenases Using Continuous Culture of *Komagataella phaffii*. *Chemical Engineering Journal Advances*, 100997. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.100997>.
96. Sturmberger, L., Chappell, T., Geier, M., Krainer, F., Day, K. J., Vide, U., Trstenjak, S., Schiefer, A., Richardson, T., Soriaga, L., Darnhofer, B., Birner-Gruenberger, R., Glick, B. S., Tolstorukov, I., Cregg, J., Madden, K., & Glieder, A. (2016). Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *Journal of biotechnology*, 235, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.023>
97. Garcia-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2016). A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochemistry*, 51(6), 681-691. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.018>.

98. Bernat-Camps, N., Ebner, K., Schusterbauer, V., Fischer, J. E., Nieto-Taype, M. A., Valero, F., Glieder, A., & Garcia-Ortega, X. (2023). Enabling growth-decoupled *Komagataella phaffii* recombinant protein production based on the methanol-free P_{DH} promoter. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *11*, 1130583.

99. Di Caprio, F. (2020). Methods to quantify biological contaminants in microalgae cultures. *Algal Research*, *49*, 101943. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101943>.

100. Barrero, J. J., Pagazartaundua, A., Glick, B. S., Valero, F., & Ferrer, P. (2021). Bioreactor-scale cell performance and protein production can be substantially increased by using a secretion signal that drives co-translational translocation in *Pichia pastoris*. *New biotechnology*, *60*, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.09.001>.