



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

TESIS

**COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA ($k_{L,a}$) Y POTENCIA
GASEADA VOLUMÉTRICA (P_g/V) COMO CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL
BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANASA RECOMBINANTE EN
Pichia pastoris.**

PRESENTA:

Miguel Angel Marín Muñoz

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CO-TUTORES

Dr. Juan Jáuregui Rincón (UAA)

Dr. Leobardo Serrano Carreón (IBT-UNAM)

COMITÉ TUTORAL

Dra. Norma Angélica Chávez Vela (UAA)

Aguascalientes, Ags. Mayo 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **MIGUEL ANGEL MARIN MUÑOZ** con ID 128116 quien realizó la tesis titulada: **COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (kLa) Y POTENCIA GASEADA VOLUMETRICA (Pg/V) COMO CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANASA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 6 de mayo de 2019

Dr. Juan Jáuregui Rincón
Cofutor

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
 DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **MIGUEL ANGEL MARIN MUÑOZ** con ID 128116 quien realizó la tesis titulada: **COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (kLa) Y POTENCIA GASEADA VOLUMETRICA (Pg/V) COMO CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANASA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris***, y con fundamento en el Artículo.175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 "Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a mayo de 2019



Dr. Leobardo Serrano Carreón
 Cotutor

c.c.p.- Interesado
 c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
 c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
 c.c.p.- Consejero Académico
 c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

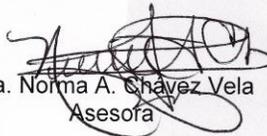
M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **MIGUEL ANGEL MARIN MUÑOZ** con ID 128116 quien realizó la tesis titulada: **COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (kLa) Y POTENCIA GASEADA VOLUMETRICA (Pg/V) COMO CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANASA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 13 de mayo de 2019.


Dra. Norma A. Chávez Vela
Asesora

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

MIGUEL ANGEL MARIN MUÑOZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (kLa) Y POTENCIA GASEADA VOLUMETRICA (Pg/V) COMO CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL BIOPROCESO PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris*”** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 13 de Mayo de 2019

“Se lumen proferre”

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi muy apreciada *alma mater* Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Departamento de Ingeniería Bioquímica por todas las facilidades prestadas para lograr este trabajo de tesis y su buena conclusión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la autoridad federal más importante para el desarrollo integral de México, por la beca otorgada (333744) durante el periodo de trabajo de tesis.

Toda la gratitud con el Instituto de Biotecnología (UNAM), en especial al personal de la unidad de Planta Piloto (Vero Albiter, Mario Caro y Raunel Tinoco) por sus más finas atenciones durante mi estancia.

Mi más sincero agradecimiento a mi comité tutorial Dr. Juan por su invaluable apoyo, Dr. Leobardo por todos sus aportaciones académicas y Dra. Norma por siempre mantener ese ánimo positivo durante el trabajo académico.

A todas las personas que directa e indirectamente manifestaron su apoyo durante mis trabajos realizados.

DEDICATORIA

Este trabajo y los esfuerzos involucrados siempre estarán dedicados a mi gran familia. Mis padres Ubaldo Marín y Leticia Muñoz, con quienes siempre cuento incondicionalmente.

Mis hermanas Deysi y Patricia, y mis sobrinos Adrián y Andrés.



"Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution."

What Life Means to Einstein (1929)

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL 1

INDICE DE TABLAS 4

INDICE DE FIGURAS 6

ACRÓNIMOS 9

RESUMEN 10

ABSTRACT 11

INTRODUCCION 12

1. ANTECEDENTES 15

 1.1. Biotecnología de las proteínas recombinantes..... 15

 1.2. Levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. 20

 1.2.1. Metabolismo de *Pichia pastoris*. 21

 1.2.2. Promotores empleados para la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. 27

 I. Promotor alcohol oxidasa. 27

 II. Promotor GAP..... 28

 III. Promotor pFLD1. 30

 IV. Promotor pICL1..... 30

 V. Otros promotores..... 30

 1.2.3. Fenotipos de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* basados en el promotor AOX1..... 31

 1.2.4. Bioprocesos para expresar proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*.

1.2.5. Alimentación de metanol en bioprocesos de expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor pAOX1.	36
1.3. Goma dextrana y enzima dextranasa.	40
1.3.1. Goma dextrana.	40
1.3.2. Enzimas industriales. La dextranasa.	42
1.3.3. Producción de dextranasa.	44
1.3.4. Producción de dextranasa recombinante con <i>Pichia pastoris</i>	46
1.4. Escalamiento de bioprocesos en biorreactores tipo tanque mezclado.	48
1.4.1. Criterios de escalamiento.	49
1.5. Escalado de bioprocesos con <i>Pichia pastoris</i>	57
2. JUSTIFICACIÓN	62
3. HIPOTESIS	63
4. OBJETIVO GENERAL	64
4.1. Objetivos específicos.	64
5. MATERIALES Y METODOS	65
5.1. Banco de trabajo y microorganismo modelo.	65
5.2. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) y potencia gaseada volumétrica (P_g/V) en biorreactor tipo tanque mezclado.	66
5.3. Producción de dextranasa recombinante en matraz agitado.	67
5.4. Bioproceso para la producción de dextranasa recombinante.	68
5.5. Escalamiento del bioproceso	70

5.6. Determinación de la concentración de glicerol, concentración de proteínas y actividad enzimática.....	70
5.7. Determinación de metanol por cromatografía de gases (GC).....	71
5.8. Electroforesis SDS-PAGE para confirmar la presencia de dextranasa recombinante en caldos de fermentación.	71
6. RESULTADOS.....	72
6.1. Expresión de dextranasa recombinante en matraz.....	72
6.1.1. Efecto de la concentración de metanol en cultivos con matraz agitado. ..	73
6.2. Determinación de k_{LA} y Pg/V en biorreactor de 3 L (escala laboratorio). .	75
6.3. Bioproceso para la producción de dextranasa recombinante.....	77
6.4. Efecto de los criterios de escalamiento k_{LA} y Pg/V en la producción de dextranasa recombinante.	80
6.5. Escalamiento del bioproceso.....	87
6.6. Estabilidad de la dextranasa recombinante en el caldo de fermentación.	92
7. DISCUSIÓN.....	93
8. CONCLUSIÓN.....	109
REFERENCIAS.....	111
ANEXOS.....	129

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de sistemas biológicos más comunes para la expresión de proteínas recombinantes (Tomada de Zhang et al., (2004))..... 19

Tabla 2. Identificación de las enzimas involucradas en el metabolismo de metanol en *Pichia pastoris* de la Figura 1 (Tomado de Calik et al., (2015))..... 26

Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso del promotor AOX (Tomado de Macauley-Patrick et al., (2005))..... 28

Tabla 4. Reportes de producción de enzima dextranasa de diferentes microorganismos con potencial aplicación biotecnológica y características de las condiciones óptimas para la mayor actividad catalítica. 45

Tabla 5. Valores característicos de operación de biorreactores tipo tanque mezclado en diferentes escalas de producción (modificada de Wynn et al., (2016)). 51

Tabla 6. Criterios de escalamiento comúnmente empleados..... 54

Tabla 7. Relaciones geométricas de los biorreactores tipo tanque mezclado usados en este estudio..... 67

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de enzima dextranasa en fermentaciones con matraz agitado. 75

Tabla 9. Tratamientos experimentales a escala laboratorio para estudiar el efecto de k_{La} y Pg/V en el bioproceso de producción de dextranasa recombinante (bioprocesos a 2 L)..... 76

Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento en la etapa lote con glicerol de los cultivos bajo las diferentes condiciones de operación de los DCA 1 y 2. 79

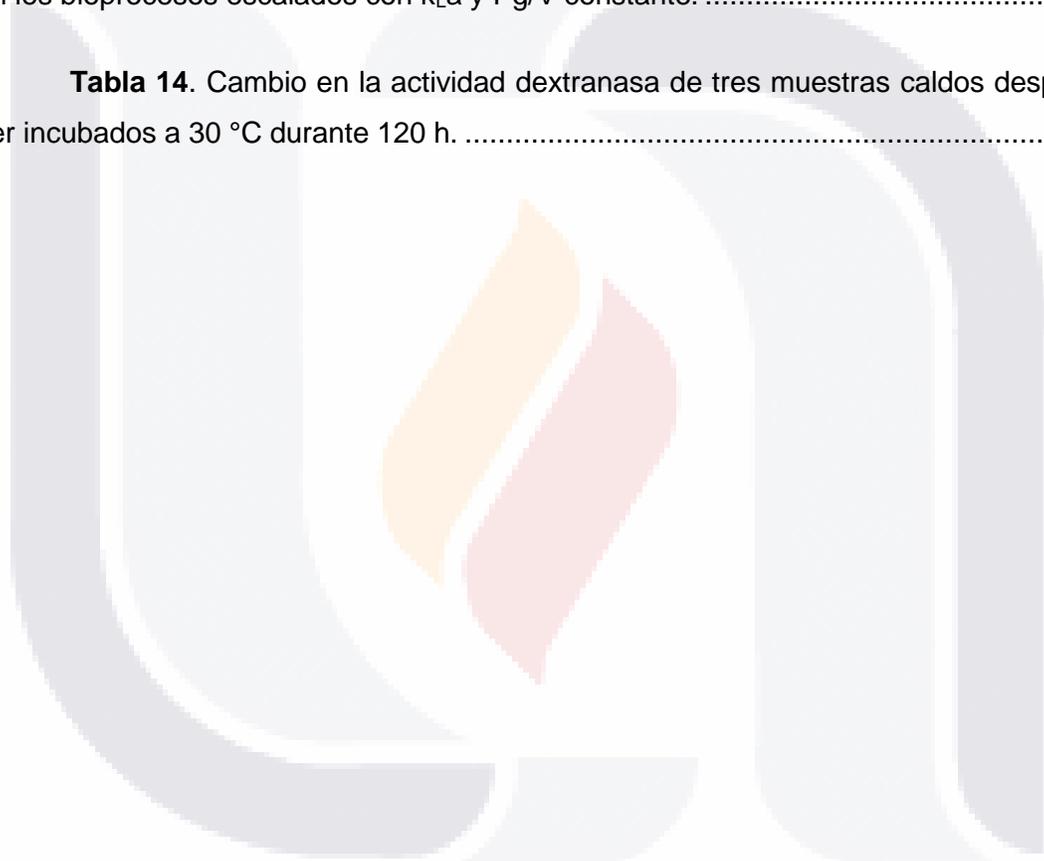
Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos del bioproceso para la producción de dextranasa recombinante durante la fase de lote alimentado. Resultados

obtenidos de los tratamientos del DCA1 donde se incrementa k_{La} , y el DCA2 para variación en Pg/V con k_{La} constante. 82

Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos durante la etapa de lote alimentado con metanol en bioprocesos a 2 L bajo condiciones de operación mayor a 2 W/L y un k_{La} contante de 240 h^{-1} 85

Tabla 13. Rendimientos y velocidad específica de crecimiento en metanol obtenida en los bioprocesos escalados con k_{La} y Pg/V constante. 91

Tabla 14. Cambio en la actividad dextranasa de tres muestras caldos después de ser incubados a 30 °C durante 120 h. 92



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de metanol y glicerol en *Pichia pastoris*. Metabolitos: GLI: glicerol, G3P: glicerol-3-fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, GAP: gliceraldehído-3-fosfato, 1, 3-PG: 1, 3- Fosfoglicerato, 3-PG: 3-Fosfoglicerato, 2-PG: 2-fosfoglicerato, PEP: fosfoenolpiruvato, PYR: piruvato, MeOH: metanol, FoA: formaldehído, SFoG: S-formil glutatión, GS-H: glutatión, FoR: formato, X5P: xilulosa-5-fosfato (Adaptado de Calik et al., (2015)). 26

Figura 2. Dependencia de la concentración del producto biotecnológico en función de los criterios de escalamiento k_La o Pg/V (adaptado de Quintero-Ramírez (1981))..... 56

Figura 3. Vector pPDEX-1 donde se encuentra el gen codificante de la dextranasa bajo el promotor *AOX1* (*pAXO1*), en el mismo se encuentra la secuencia de señalización *SUC2*, terminador *GAP* y el gen *HIS3* de *Saccharomyces cerevisiae*, y la región 3' del gen *AOX1*. Tomado de García et al., (2000). 66

Figura 4. Algoritmo de lazo cerrado empleado para la adición automática de metanol en función del OD y la bomba de metanol del controlador del biorreactor. 69

Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE de muestras obtenidas en cultivos en matraz agitado con medio complejo durante la adición de metanol..... 72

Figura 6. Caracterización cinética de la cepa Mut^S en cultivos con matraz con medio definido FM22, mediante la adición de pulsos de metanol. (a) producción de biomasa. (b) consumo de glicerol. (c) producción de proteínas solubles en el medio. (d) actividad dextranasa en el caldo. Cada viñeta indica la concentración del pulso de metanol empleado en % V/V: ▲ 0.5%, ◆ 1.0%, ■ 1.5%. 74

Figura 7. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) en función de la potencia gaseada volumétrica (Pg/V) en biorreactor de 3 L (escala laboratorio). Cada serie de datos corresponde a condiciones de agitación de 500 a 900 rpm y velocidades específicas de aireación: (•) 0.5, (◆) 1.0, (▲) 1.5 y (■) 2.0 vvm. 76

Figura 8. Cinéticas de producción de dextranasa recombinante en bioprocesos escala laboratorio (2 L) bajo diferentes condiciones de operación (Pg/V constante de 2 W/L). (a) $k_{La}= 83 \text{ h}^{-1}$. (b) $k_{La}= 100 \text{ h}^{-1}$. (c) $k_{La}= 146 \text{ h}^{-1}$. (d) $k_{La}= 154 \text{ h}^{-1}$. (—) %OD, (■) Consumo de glicerol, (◆) Producción de biomasa seca, (▲) Producción de enzima dextranasa. 78

Figura 9. Perfil de concentración de metanol en tres fermentaciones independientes a 2 L con diferentes condiciones de operación. (▲) $k_{La}= 100 \text{ h}^{-1}$ (1.0 W/L), (◆) $k_{La}= 100 \text{ h}^{-1}$ (2.0 W/L), (■) $k_{La}=154 \text{ h}^{-1}$ (2.0 W/L)..... 79

Figura 10. Efecto de k_{La} y Pg/V en la fermentación para la producción de dextranasa recombinante durante la etapa de inducción con metanol. (a) Velocidad específica de crecimiento, las viñetas corresponden a valores experimentales obtenidos de los tratamientos A-F de los DCA 1 y 2; la línea sólida corresponde a los valores de μ_{MeOH} predichos por la ecuación 10. (b) y (d) Actividad dextranasa máxima. (c) y (e) Productividad volumétrica máxima. En el caso de las figuras (b) y (c) corresponden a los resultados obtenidos con los tratamientos con una $Pg/V= 2.0 \text{ W/L}$ constante. Mientras que las figuras (d) y (e) corresponden a aquellos tratamientos con un k_{La} constante alrededor de 100 h^{-1} con valores de Pg/V de 1.0 a 2.0 W/L. 83

Figura 11. Cinética del bioproceso de producción de dextranasa recombinante con k_{La} de 240 h^{-1} . (a) $Pg/V= 3.11 \text{ W/L}$, (b) $Pg/V= 4.24 \text{ W/L}$, (c) $Pg/V= 7.42 \text{ W/L}$. (—) %OD, (■) Consumo de glicerol, (◆) Producción de biomasa seca, (▲) Producción de enzima dextranasa. 85

Figura 12. Perfil de alimentación del metanol en los bioprocesos a 10 y 30 L, donde el metanol se adicionó de manera continua de acuerdo con la ecuación (11). 87

Figura 13. Cinéticas de los bioprocesos escalados. (a) Concentración de biomasa en base seca, (b) actividad dextranasa y (c) concentración de proteínas solubles en el caldo. (■) 2L, (◆) 10 L y (▲) 30 L. 90

Figura 14. Perfil de concentración de metanol en bioprocesos escalados en los cuales se usó una alimentación de metanol continua exponencial en función de la μ_{MeOH} y q_S : (a) 10 L, (b) 30 L. Cada serie de datos representa una fermentación diferente..... 91

Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE de muestras de caldo de fermentación a diferente tiempo de inducción bajo condiciones de operación de $k_La= 240 \text{ h}^{-1}$. La muestra 2 corresponde al tiempo de fermentación de 100 h. En el rectángulo amarillo se indica la banda que corresponde al peso de la dextranasa (67 kDa).....93



ACRÓNIMOS

BS, base seca

C* y **C_L**, concentración de oxígeno en saturación y concentración de oxígeno en el líquido respectivamente (mmol/L)

D_i, diámetro de impulsor (m)

DE, desviación estándar

Fl_F, número de flujo del gas, $Fl_F = Q_G/ND^3$ (adimensional)

Fr, número de Froude, $Fr = N^2D/g$ (adimensional)

g, aceleración de la gravedad (9.81 m/s²)

G_{li}, referente a glicerol

H_T, altura del tanque (m)

MeOH, referente a metanol

N, velocidad de agitación (min⁻¹)

Na, número de aireación, $Na = Q_G/ND_i^3$

N_{CD}, velocidad mínima para la completa dispersión del gas (s⁻¹)

p, peso (g)

P₀, potencia no gaseada (W)

P_g, potencia gaseada (W)

Q_g, velocidad volumétrica del flujo de gas (m³/s)

Re, número de Reynolds, $Re = ND_i^2/\nu$ (adimensional)

S, sustrato

SP, *set point* (valor ajustado de parámetros de fermentación, como temperatura, pH, OD)

T, diámetro del tanque (m)

V, volumen (L)

V_{MeOH}/V₀, consumo específico de metanol durante la etapa de inducción= volumen consumido/volumen inicial del lote alimentado con metanol.

v_{vm}, velocidad específica de aireación (min⁻¹)

ν, viscosidad cinemática (m²/s)

u_s, velocidad lineal del gas en la superficie, (m/s)

RESUMEN

La levadura metilotrónica *Pichia pastoris* es uno de los sistemas biológicos más usado para la producción de proteínas recombinantes, debido a su capacidad de producir proteínas funcionalmente plegadas. Sin embargo, los bioprocesos con *P. pastoris* tienen limitaciones importantes para su escalamiento como la elevada demanda de oxígeno y altos requerimientos energéticos para agitación en biorreactores tipo tanque mezclado. En este trabajo se analizó la producción de dextranasa recombinante en cultivos de 2 L, empleando condiciones de operación generalmente encontradas en biorreactores de gran escala. Los cultivos se caracterizaron por desarrollarse bajo condiciones limitadas de oxígeno y metanol, alcanzando una producción máxima de dextranasa de 97.34 ± 0.52 U/mL. La productividad del bioproceso con estas condiciones se vio reducida en dos tercios con respecto a resultados previamente reportados para la misma cepa Mut^S. Sin embargo, la producción y productividad fue 1.2 veces más alta en comparación con resultados obtenidos con una cepa Mut⁺, en cultivos sin limitaciones de oxígeno y metanol. También se realizó un proceso de escalamiento con k_{La} constante de 154 h^{-1} y una alimentación continua de metanol en bioprocesos de 10 y 30 L. Durante el escalamiento se pudo mantener la velocidad específica de crecimiento de 0.01 h^{-1} ; sin embargo, la producción de dextranasa recombinante disminuyó en alrededor 35% después del proceso de escalamiento. Esta caída en la producción de la dextranasa recombinante se atribuye al efecto inhibitorio causado por acumulación de metanol. Por lo tanto, los cultivos con cepas Mut^S de *P. pastoris* con condiciones limitadas de oxígeno requieren también de condiciones limitadas de metanol. Bioprocesos con requerimientos mínimos de oxigenación y agitación son de gran interés para aplicaciones en productos biotecnológicos donde un alto gasto energético y uso de oxígeno puro no es rentable

ABSTRACT

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is one of most widely used biological systems to produce recombinant proteins, due to his capacity to synthesize functionally full folded proteins. Nevertheless, bioprocesses developed for *P. pastoris* have important issues to be scale-up to large-scale units; the most important are the high oxygen demand and large energy requirements for agitation in stirred tank bioreactors. In this work was analyzed the production of recombinant dextranase in 2 L cultures by using operating conditions attained in large scale bioreactors. Cultures were developed under oxygen and methanol limited conditions; achieving a maximum recombinant dextranase production of 97.34 ± 0.52 U/mL. The productivity of the bioprocesses at 2 L was reduced in two-thirds with respect to previously published results obtained with the same recombinant Mut^S strain. However, the production and productivity were 1.2 times higher than those results obtained with a recombinant Mut⁺ strain. It was made a scale-up process to 10 and 30 L bioprocesses by keeping constant a k_{La} of 154 h^{-1} and by using a constant methanol feed. It was possible to keep constant a specific growth rate of 0.01 h^{-1} ; however, dextranase production felled down around 35% after scale-up process. The reduction in dextranase production was attributed to inhibition phenomena due to methanol accumulation in the media culture. In this line, *P. pastoris* (Mut^S) bioprocesses under oxygen limited conditions also require methanol limited conditions. Bioprocesses with minimal oxygen and agitation requirement are of high interest to be applied in biotechnological products where high energetic spend and pure oxygen supply is not economically feasible at large scale operations.

INTRODUCCION

La producción de proteínas recombinantes es una de las mayores aplicaciones de la Biotecnología ya que ofrece varias ventajas frente a la producción de proteínas a partir de las fuentes naturales. Desde los años 80's que se inició la revolución de la tecnología del ADN recombinante, cientos de los productos y sus bioprocesos han sido desarrollados a escala laboratorio. Con la producción de proteínas recombinantes se incrementa la disponibilidad de estas biomoléculas de alta calidad para aplicaciones en diferentes áreas como: (i) investigación, (ii) alimentos y bebidas, (iii) productos domésticos, (iv) farmacéutica y/o terapéutica.

En la actualidad son solo algunos los sistemas biológicos recombinantes que son empleados para la mayor parte de los trabajos de producción recombinante de proteínas, entre los que se incluye: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células animales y células vegetales. Las levaduras tienen varias ventajas con respecto a otros sistemas biológicos de expresión recombinante principalmente, se reproducen de manera análoga a las bacterias y cuentan con una vía postraduccional y secretoria de proteínas eucariotas. *P. pastoris* tiene la capacidad de crecer en cultivos de altas densidades celulares empleando medios definidos con bajas exigencias nutricionales. Dentro de la capacidad más importante de esta levadura es la de metabolizar metanol como fuente de carbono y energía. La vía metabólica para la asimilación de metanol en *P. pastoris* es usada para controlar la expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor de la enzima alcohol oxidasa, el cual es altamente inducible por metanol.

Desde que *P. pastoris* fue descrita como levadura metilotrófica ha sido empleada para la producción de proteína unicelular a partir de metanol y más de 600 proteínas recombinantes han sido expresadas usando este microorganismo hasta el día de hoy. La mayoría de las aplicaciones incluye proteínas recombinantes para el sector farmacéutico y terapéutico. Sin embargo, una vasta cantidad de los trabajos publicados actualmente, contribuyen solo con el desarrollo de nuevas cepas recombinantes, y la producción de la proteína recombinante a escala laboratorio en volúmenes de hasta 10 L en fermentadores tipo tanque mezclado y/o matraz agitado. La investigación a nivel laboratorio es importante porque es aquí donde se ha desarrollado la mayoría de los trabajos de optimización de bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes con *P. pastoris*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sin embargo, son pocos los trabajos que han abordado el escalamiento de estos bioprocesos con un enfoque de la ingeniería de fermentaciones. Pues en los pocos reportes donde se habla de escalamiento, en su gran mayoría el escalamiento se realiza solo al cambiar de cultivos en matraz a cultivos de alta densidad celular en fermentadores. Estos escalamientos son específicos y no brindan información para la realización de posteriores procesos escalamientos con otras proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris*.

Los escalamientos de bioprocesos reportados hasta día de hoy no realizan un análisis sobre el efecto que tienen los criterios de escalamiento en la productividad y rendimiento de éstos. Además, los escalamientos se basan principalmente en procesos donde se mantienen las condiciones óptimas determinadas a escala laboratorio, sin considerar la factibilidad económica y tecnológica que implica mantener dichas condiciones a escala comercial y/o industrial, lo cual puede comprometer la factibilidad técnica y económica del escalamiento. De esta manera, mientras a escala laboratorio es permisible el suministro de oxígeno puro, medios de cultivo complejos y altas velocidades de agitación con altos consumos energéticos; a escala comercial se requiere poner en marcha bioprocesos con bajos requerimientos de energía, sin el gasto en suplementar oxígeno puro y con medios de cultivo económicos; más aun tratándose de bioproductos de bajo valor comercial o con una elevada competencia en el mercado. La enzima dextranasa es un ejemplo de este tipo de productos.

Actualmente el mercado de la enzima dextranasa está saturado, diversos fabricantes se han retirado de esta área debido a la baja rentabilidad y no contar con la tecnología que les de competitividad en este sector. Por otro lado, grandes corporativos como Novozymes y Amano Enzyme tienen la mayor participación en el mercado global. Por lo tanto, la dextranasa como única enzima a ofrecer por un fabricante tiende a disminuir su margen de ganancia año con año. Al mismo tiempo, el negocio de la dextranasa en sus principales aplicaciones en las áreas de alimentos y bebidas, y la tecnología farmacéutica mantienen márgenes de ganancias muy variados, de acuerdo con la demanda que pueden llegar a tener estos sectores industriales. Por lo tanto, se vuelve necesario el desarrollo de nuevas tecnologías de fermentación que incremente la competitividad de pequeños fabricantes frente a grandes multinacionales con gran disponibilidad de recursos.

Desde el inicio del desarrollo de los bioprocesos y la biotecnología industrial, la Ingeniería Bioquímica ha desarrollado conocimiento para el escalamiento de bioprocesos, que incluye la aplicación de principios de similitud, desarrollo de números adimensionales para la descripción de los fenómenos de transporte en biorreactores, criterios de escalamiento, métodos fundamentales, que facilitan el desarrollo de bioprocesos a escala comercial. Para el escalamiento exitoso de procesos biotecnológicos aerobios se han detallado criterios de escalamiento adecuados que describen los fenómenos de transferencia limitantes en dichos bioprocesos. El escalamiento es una tarea necesaria en el desarrollo de procesos biotecnológicos para la puesta en marcha de unidades de producción comercial que permitan obtener un beneficio económico de los desarrollos biotecnológicos. Además, es una de las áreas de relevante desarrollo donde se requiere vasto conocimiento de los bioprocesos para ser establecidos a escala comercial donde operen con condiciones tecnológica y económicamente factibles.

En este trabajo se presenta el estudio de los criterios de escalamiento más empleados, coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) y potencia gaseada volumétrica (P_g/V), para la producción de dextranasa recombinante con *P. pastoris*. Estos criterios de escalamiento son de relevante importancia para el tipo de bioprocesos empleados en la producción de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*. Dicho estudio se realizó a escala laboratorio con la finalidad de determinar las mejores condiciones de escalamiento, las cuales estaban limitadas por condiciones generalmente encontradas en unidades de gran escala de producción comercial.

De esta manera, con el desarrollo de bioprocesos poco demandantes en energía y recursos se puede dar una ventaja competitiva en la producción de proteínas recombinantes con *P. pastoris* para aquellos fabricantes con limitados recursos, e inclusive para favorecer la pronta disponibilidad de nuevos productos desarrollados con esta levadura recombinante. El estudio aquí abordado, se basa en el trabajo realizado a escala laboratorio y planta piloto, donde siempre se mantuvo en consideración la escalabilidad técnica del bioproceso tanto en los aspectos operativos como el uso de recursos. Se espera, los conocimientos aquí expuestos puedan ayudar al escalamiento de nuevos bioprocesos basados en la levadura *P. pastoris* para su aprovechamiento a nivel comercial.

1. ANTECEDENTES

1.1. Biotecnología de las proteínas recombinantes.

Con la creciente demanda en alimentos, productos nutraceuticos, farmaceuticos, combustibles y otros materiales para el desarrollo sustentable de la economía y el ambiente, las fermentaciones microbianas usando estrategias de producción de bajo costo se han convertido significativamente importantes. En las últimas décadas, las fermentaciones a escala industrial han utilizado un amplio rango de microorganismos, células vegetales y mamíferas para la producción de varios productos comerciales, entre otros: alimentos, biomateriales, biofarmacos, vacunas, biocombustibles y pigmentos (Wang et al., 2015). Grandes esfuerzos se han realizado para mejorar los rendimientos, títulos y productividades de ciertos bioproductos a través de estrategias de la ingeniería de bioprocesos desde los comienzos de la industria de la fermentación. Entre estas estrategias las de mayor relevancia se encuentran: (i) la producción recombinante de productos, (ii) la optimización de los procesos de fermentación y (iii) los métodos de escalamiento hacia procesos industriales (Xia et al., 2016).

La necesidad de contar con sistemas de producción de proteínas de interés en cantidades suficientes que pudieran atender la elevada demanda hacia la década de los 80's dio paso al desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante. Las proteínas recombinantes son ampliamente usadas en aplicaciones industriales, farmacéuticas, alimentarias, así como también en trabajo de investigación básica. Muchas proteínas tienen aplicaciones importantes y tienen un gran valor económico, por lo que la producción a gran escala es de gran interés (Potvin, Ahmad, & Zhang, 2012).

Con el desarrollo del conocimiento y la tecnología aplicada a los bioprocesos, se han desarrollado estrategias para asegurar la rentabilidad de los mismos, al hacerlos más eficientes y fáciles de ejecutar. Así mismo, el desarrollo de la biotecnología apoyada de la Ingeniería Bioquímica, ha traído consigo importantes avances en los sistemas biológicos usados en procesos biotecnológicos; de tal forma que el diseño de un nuevo bioproceso se limita a elegir el sistema recombinante de expresión que represente mayores ventajas durante el desarrollo del proceso biotecnológico y las tareas de escalamiento (N. Zhang, Daubaras, & Suen, 2004).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A finales del siglo XX el incremento en la demanda de productos biológicos contribuyó al crecimiento acelerado de la biotecnología industrial. En una primera etapa los microorganismos eran seleccionados por la capacidad que poseían para generar algún producto de interés. Actualmente, con el avance en las áreas de la biología molecular y las técnicas de ingeniería genética esto ha cambiado; ya que ahora se emplean unos cuantos microorganismos manipulados genéticamente para la producción de una gran mayoría de metabolitos biotecnológicos de interés (López-Pérez & González-Cervantes, 2014).

En principio, la capacidad de fermentación es altamente dependiente de dos importantes partes compiladoras; la primera es la **maquinaria celular** (determinada por la carga genética y el metabolismo de las células productoras) y el **ambiente extracelular** (determinado por la dinámica del fluido en el biorreactor). De esta manera, es una tarea permanente y retadora para los investigadores biotecnólogos la investigación para ganar más conocimiento de la cinética celular, la dinámica de fluidos de los biorreactores y la interacción de las dos partes, en el afán de acelerar la transición del proceso desde el laboratorio hasta la aplicación industrial (Xia et al., 2016).

Los microorganismos producen hoy en día 58% de las proteínas recombinantes y enzimas usadas en la industria. Por lo tanto, éstos son de gran interés económico porque representan un valor de mercado de alrededor de 100 millones de dólares en productos biotecnológicos (Dreher et al., 2014). Los productos típicos son vacunas, plásmidos, y proteínas recombinantes producidas en sistemas de expresión tales como *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. La producción de proteínas recombinantes actualmente representa una industria de más de 80 mil millones de dólares, y para 2009 el 50 % de estas proteínas eran producidas solo por: *E. coli* (30%) y *Saccharomyces cerevisiae* (20%) (Spohner, Müller, Quitmann, & Czermak, 2015).

Hoy en día, las enzimas son usadas rutinariamente en múltiples aplicaciones industriales como los alimentos, detergentes, bebidas de jugos, textiles, lavandería, farmacéutico, cosméticos y la síntesis de químicos finos; así es que las aplicaciones industriales de las enzimas representan el 80% del mercado global de las enzimas. Los microorganismos han servido y continúan siendo las más grandes fuentes de la mayoría de las enzimas usadas en la industria. La investigación y desarrollo intensivo de la tecnología de los bioprocesos y el uso de las técnicas de la ingeniería genética, han mejorado

considerablemente los rendimientos de los procesos de fermentación, incrementando la estabilidad y alterando la especificidad y la selectividad de las enzimas (Kumar, Sangwan, Singh, & Kaur Gill, 2014).

En la industria de los alimentos muchos procesos emplean enzimas y la demanda por estos catalizadores biológicos se mantiene en un constante crecimiento. Las enzimas son productos de un elevado valor agregado porque mejoran la viabilidad económica de múltiples procesos en varias áreas de aplicación. En 2013 la industria mundial de las enzimas tenía un mercado valuado en 3.27 mil millones de euros; de acuerdo con el líder mundial en producción de enzimas Novozymes (que representa el 47% del mercado global), otros productores de enzimas importantes son: Danisco con 21% del mercado, DSM con el 6%, AB Enzymes 5% y BASF con 4%. Las enzimas para alimentos y bebidas representan el 29% de las ventas globales de esta industria biotecnológica, superadas por las enzimas de uso doméstico y cuidado de la salud con un 31%, mientras que otras enzimas empleadas en piensos animales y otras tecnologías representan el 13% (Spohner et al., 2015).

El mercado de las enzimas presenta una tasa de crecimiento anual compuesta de hasta 7% desde 2015, y se estima se mantenga con este ritmo de crecimiento hasta 2020. En términos de las regiones de mayor consumo de enzimas industriales se encuentra Norteamérica y Europa; sin embargo, las economías emergentes como Asia del Pacífico, África y regiones del Medio Este, son mercados emergentes prometedores para las enzimas industriales. El mercado global de las enzimas industriales es muy competitivo debido a las grandes empresas transnacionales presentes, como Novozymes, DSM y DuPont (Kumar et al., 2014).

Al presente, cerca de 4000 enzimas son conocidas, y de estas aproximadamente 200 son de origen microbiano y son usadas comercialmente. Sin embargo, solo 20 enzimas son producidas a gran escala y tienen diversas aplicaciones en múltiples industrias. La demanda global de enzimas es satisfecha solamente por 12 mayores productores y, a pesar de su variado uso de las enzimas en la industria, el estatus actual no es suficiente para satisfacer todas las necesidades industriales y biotecnológicas (Kumar et al., 2014). Por lo tanto, existe aún un gran potencial para el desarrollo de mercado para nuevas enzimas y procesos enzimáticos, dicho mercado tiene un potencial estimado de 5 mil millones de dólares (mmd). De acuerdo con los análisis de mercado, el valor de mercado de las enzimas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a escala global fue de 4 mmd, ya para 2015 este valor alcanzó en tan solo 3 años 8 mmd. Los grupos de enzimas donde se registran las mayores alzas en aplicación son las lipasas, proteasas e hidrolasas de carbohidratos (Kumar et al., 2014).

En la Tabla 1 se indican algunas ventajas y desventajas de diferentes tipos de células para la expresión recombinante de proteínas más comúnmente usados. Las levaduras han sido empleadas desde tiempos históricos para procesos biotecnológicos debido a la habilidad de reproducirse de manera análoga a las bacterias, lo que las vuelve altamente rentables en procesos de producción comerciales (López-Pérez & González-Cervantes, 2014). Para la industria farmacéutica y de productos finos, las levaduras cuentan con ciertas ventajas importantes: (i) ser libres de endotoxinas, (ii) generar proteínas modificadas después de la traducción, (iii) producir proteínas recombinantes y otros compuestos de alto valor agregado, (iv) herramientas de manipulación genética fáciles de usar, (v) rápido crecimiento en medios de cultivo definidos y económicos con altas densidades celulares (Gerngross, 2004).

La creciente demanda por mejorar la expresión de biofarmacéuticos ha conducido a investigadores a regresar al estudio de los sistemas de expresión fúngicos, los cuales proveen altos títulos de proteínas recombinantes (>1 g/L) en procesos de fermentación cortos y escalables hasta 100 m³. Décadas de investigación y producción de varias enzimas industriales en levaduras y hongos han resultado en procesos robustos y escalables que permiten la producción a bajo costo de muchas enzimas recombinantes (Gerngross, 2004). Considerando la habilidad de las levaduras para expresar anticuerpos completos, citocinas, proteínas séricas y otras proteínas terapéuticas relevantes, se espera que los sistemas de expresión basados en levaduras se conviertan en una tendencia manufacturera de gran alcance.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de sistemas biológicos más comunes para la expresión de proteínas recombinantes (Tomada de Zhang et al., (2004)).

Sistema biológico	Ventajas	Desventajas
<i>Escherichia coli</i>	Manipulación genética sencilla, rápido crecimiento, medios de cultivo sencillos y de bajo costo, no hay portabilidad de virus humanos.	Formación de cuerpos de inclusión, proteínas intracelulares, falta de modificación postraduccional.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medios de cultivo baratos y de fácil crecimiento, regulación genética bien entendida, proteínas extracelulares, no hay riesgos de infección por virus humanos.	Sobre-glicosilación, dificultades para romper la célula, niveles de expresión limitados.
<i>Pichia pastoris</i>	Altos niveles de expresión, emplea medios de cultivo económicos y químicamente definidos para alcanzar altas densidades celulares, regulación genética bien conocida, secreción de proteínas, sin infección por virus humanos.	Las regalías por el uso de la tecnología pueden ser costosas, potencial de sobre-glicosilación, célula difícil de romper.
Hongos filamentosos	Altos niveles de expresión, sistema de secreción buenos, modificación postraduccional, medios de cultivo baratos.	No existen vectores comerciales disponibles, tiempos de cultivo prolongados, las esporas pueden representar algún problema para la salud, documentación limitada en la producción de proteínas terapéuticas.
Células de insectos	Escalamiento sencillo hasta 400 L, manipulación genética sencilla, crecen en sistemas similares a las células mamíferas.	Bajos niveles expresión, medios de cultivos caros, rentabilidad baja.
Líneas celulares mamíferas	Expresión de proteínas nativas con modificaciones postraduccionales apropiadas para proteínas terapéuticas, uso extensivo, niveles de expresión razonables, libres de endotoxinas.	Medio de cultivo costoso, biorreactores especiales, requerimientos de CO ₂ , riesgo de contaminación por virus, tiempos de expresión prolongados.

1.2. Levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris es una levadura de la familia *Saccharomycetaceae*; es un ascomiceto homotálico que puede ser manipulado mediante métodos genéticos clásicos. Esta levadura fue renombrada en 1995 como *Komagataella pastoris*; sin embargo, en la actualidad se sigue utilizando el nombre de *Pichia* para hacer referencia al mismo microorganismo (Spohner et al., 2015). Es uno de los sistemas biológicos de expresión de proteínas recombinantes de mayor uso y en constante crecimiento debido a las múltiples ventajas que presenta al ser cultivada en medios simples y económicos.

En el presente, más de 600 proteínas han sido clonadas y expresadas en *P. pastoris* provenientes de diversas fuentes incluyendo bacterias, hongos, plantas, protistas, vertebrados e invertebrados (Cos, Ramón, Montesinos, & Valero, 2006). Esta levadura ha sido seleccionada para la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos y otras proteínas de interés médico que incluyen (i) el precursor de la insulina (Mansur et al., 2005), (ii) citocinas como la interleucina 2, (iii) seroalbúmina humana, (iv) factor de necrosis tumoral, (v) fragmento C de la toxina del tétanos (Clare, Rayment, Ballantine, Sreekrishna, & Romanos, 1991); y una variedad de receptores recombinantes acoplados a proteína G (Bawa et al., 2014). Así mismo, *P. pastoris* ha sido utilizada en la producción de enzimas de interés industrial como xilanasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas, fosfatasas, fitasas, lacasas y pectinasas (Choi & Park, 2006).

P. pastoris ha sido acreditado como un microorganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*, por sus siglas inglés), y ha sido usada para la implementación y escalado de procesos biotecnológicos de producción de proteínas recombinantes (Noseda, Blasco, Recúpero, & Galvagno, 2014). Esta levadura prefiere un crecimiento aerobio, por lo que no produce metabolitos de la fermentación como ácido acético o etanol y tiene la capacidad de secretar las proteínas recombinantes en el medio de cultivo (Noseda, Recúpero, Blasco, Ortiz, & Galvagno, 2013). *P. pastoris* refleja un gran interés como una alternativa en la producción de proteínas terapéuticas, y las patentes recientes se enfocan en diferentes aspectos como: (a) optimización en la secreción de la proteína recombinante, (b) modificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante para eliminar sitios de glicosilación, (c) ingeniería de cepas con propiedades de glicosilación similares a las encontradas en proteínas humanas (glicoingeniería) y (d) mejorar la actividad de las

proteínas en ambientes bajo condiciones diferentes a las óptimas; otras se enfocan en el uso de otros promotores que no funcionen a base de metanol (Bollók, Resina, Valero, & Ferrer, 2009).

La mayor ventaja de *P. pastoris* sobre las plataformas bacterianas de expresión de proteínas recombinantes es el potencial de llevar a cabo variedad de modificaciones postraduccionales asociadas a células eucariotas, como el plegado adecuado, formación de puentes disulfuro, adición de lípidos y carbohidratos, y/o O-/N- glicosilación (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005). Además, las proteínas heterólogas expresadas con esta levadura pueden ser conducidas para ser excretadas o no en el medio de cultivo, lo cual facilita el diseño de las tareas para la recuperación y purificación del producto (G. P. L. Cereghino, Cereghino, Ilgen, & Cregg, 2002).

1.2.1. Metabolismo de *Pichia pastoris*.

Al igual que otras levaduras, las células de *P. pastoris* tiene la capacidad de producir energía mediante la fermentación de diferentes fuentes de carbono como: maltosa, lactato, glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, glicerol, metanol, etanol, galactosa y manosa. La velocidad de transporte de estas fuentes de carbono del medio extracelular al citoplasma de la célula determina la cinética de crecimiento de la levadura. En un medio con diferentes fuentes de carbono y energía (FCE) las células consumen a éstos en cierto orden con una fase de retardo entre cada uno de ellos, debido al fino control a nivel de transcripción de las enzimas involucradas en las vías metabólicas de la degradación de cada FCE. Por ejemplo, en el caso de la glucosa, ésta tiene un impacto negativo en el metabolismo de otros carbohidratos, porque la maquinaria enzimática involucrada en su degradación a través de la glicólisis es diferente a la de las demás FCE y tiene una velocidad de consumo limitada, debido a una menor presencia de transportadores de hexosas (Calik et al., 2015).

P. pastoris no tiene la habilidad de metabolizar sacarosa porque carece de la enzima invertasa; pero si puede transportar a su interior maltosa mediante el transportador α -glucósido. De manera similar a *S. cerevisiae*, *P. pastoris* no puede metabolizar lactosa, debido a la ausencia de genes que codifican para la α -galactosidasa o la β -galactosidasa en el genoma de *P. pastoris* (Calik et al., 2015). Mediante la herramienta bioinformática de búsqueda local de alineación básica (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) se ha

encontrado que esta levadura tiene 4 genes para la codificación de proteínas integrales de membrana simportes H^+ /glicerol. Los productos de estos genes guardan una alta similitud con transportadores de glicerol de *Kluyveromyces lactis*. De esta manera se ha reportado para *P. pastoris* una velocidad específica de consumo de glicerol máxima de hasta 0.37 g/g h. Además, la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) para glicerol puede llegar a ser hasta de 0.26 h^{-1} , lo cual implica que el glicerol es un mejor sustrato que la glucosa debido a su elevado grado de reducción. También el manitol y sorbitol pueden ser usados por *P. pastoris* como FCE, aunque no existen transportadores específicos para estos compuestos parece ser que la célula los internaliza mediante sistemas de fosfotransferasas (Calik et al., 2015).

La vía catabólica del glicerol en la levadura involucra la difusión pasiva del glicerol a través de la membrana (Figura 1), la fosforilación por una glicerol kinasa, y la oxidación del mismo por una glicerol fosfato ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial; luego de ser convertido a gliceraldehído-3-fosfato, éste entra a la glicólisis. El catabolismo del glicerol es independiente de la ruta metabólica del metanol. La disponibilidad de nitrógeno también es de elevada importancia para la levadura, una correcta suplementación de nitrógeno conduce a mejores rendimientos en la generación de biomasa y producción de proteínas recombinantes. Se ha reportado que la adición de fuentes de nitrógeno orgánico durante etapas de inducción con metanol mejora los niveles de producción de proteínas recombinantes. Estas fuentes de nitrógeno orgánicas, como las mezclas de peptona y extractos de levadura, producen mejores rendimientos en la fermentación en comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánicas debido a que las primeras tienen un mayor contenido de aminoácidos esenciales para la levadura que las fuentes inorgánicas (Choi & Park, 2006).

Las levaduras como *P. pastoris* no pueden crecer en un medio deficiente de biotina, debido a que esta vitamina está involucrada como cofactor en diversas enzimas del metabolismo de carbohidratos; la más importante es la enzima piruvato carboxilasa la cual está involucrada en la reposición anaplerótica de oxaloacetato en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) a partir de fosfoenolpiruvato (Calik et al., 2015). Por otro lado, cepas modificadas genéticamente para la producción de proteínas recombinantes exhiben una velocidad específica de crecimiento (μ) menor a la observada en cepas silvestres. Esta disminución en μ ha sido relacionada con la carga genética introducida en las células que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a su vez representa una carga energética en la síntesis de la nueva proteína. En estas cepas recombinantes la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) no cambia con relación a μ ; además la actividad en el ciclo CAT se mantiene constante aun con reducciones significativas en la velocidad de crecimiento. Estos datos sugieren que los recursos adicionales requeridos para la producción de la proteína recombinante resultan en la reducción de la velocidad específica de crecimiento. Las diferencias en los parámetros cinéticos de crecimiento en cepas recombinantes de *P. pastoris* también pueden llegar a depender del tipo de promotor empleado (Looser et al., 2015).

La base conceptual para el uso de *P. pastoris* como sistema de expresión nace de la observación de que algunas enzimas requeridas para el metabolismo del metanol están presentes en niveles considerables cuando las células usan este sustrato como FCE (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Esta levadura tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo con metanol para desarrollar cultivos de alta densidad celular (CADC). El primer paso del metabolismo del metanol se lleva a cabo en el peroxisoma por la enzima alcohol oxidasa (AOX), con el uso de oxígeno molecular el metanol es oxidado a formaldehído con la generación de peróxido de hidrógeno (Figura 1). La enzima AOX tiene una afinidad por el oxígeno muy pobre y para compensar esta limitación, las células de levadura generan grandes cantidades de la enzima. Esta enzima AOX puede llegar a representar hasta el 35% de la proteína total celular cuando la levadura crece en metanol; sin embargo, cuando la levadura crece con glucosa, etanol o glicerol, la expresión de esta enzima está reprimida (Potvin et al., 2012).

Existen dos genes en el genoma de *Pichia pastoris* que codifican para la enzima AOX: *AOX1* y *AOX2*; el primero es responsable de más del 90% de la enzima disponible en la célula, dejando el resto en función del gen *AOX2*. En aplicaciones biotecnológicas principalmente es usado el promotor del gen *AOX1* (*pAOX1*) para controlar la expresión recombinante de proteínas, este promotor es inducido fuertemente por el metanol, pero es reprimido durante el crecimiento en glicerol. La expresión de estos genes está regulada a nivel de transcripción inducida por la presencia de metanol en el medio de cultivo (Cos et al., 2006). La regulación de la transcripción del gen *AOX1* involucra dos mecanismos: un mecanismo de represión/desrepresión junto con el de inducción; esto se debe a que no solamente con la ausencia de la fuente de carbono represora resulta en una transcripción

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sustancial del AOX1. La presencia de metanol es esencial para inducir altos niveles de transcripción de dicho gen (J. L. Cereghino & Cregg, 2000).

En el caso de todas las levaduras metilotróficas, la cinética de crecimiento en lote en medio con una mezcla de glucosa y metanol resulta en un crecimiento diaúxico clásico, donde la glucosa se consume primero debido a la represión de las enzimas para la utilización de sustratos C₁. Es bien conocido que la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la vía oxidativa del metanol (AOX, dihidroxiacetona sintasa (DAS) y formaldehído deshidrogenasa (FLD)) es reprimida cuando las células crecen en presencia de glucosa (Figura 1) (Inan & Meagher, 2001). En el caso de *P. pastoris*, la glucosa ha sido reportada como un represor de la expresión de la enzima AOX. Así mismo, las regiones reguladoras de los genes para las enzimas AOX y DAS se ven reprimidas cuando las células de *P. pastoris* crecen en mezclas de glucosa y metanol. Sin embargo, los genes AOX1 y AOX2 muestran algún grado de desrepresión en condiciones de inanición de carbono y condiciones limitadas de glicerol y glucosa.

Previamente se ha reportado que la glucosa, glicerol, etanol y acetato pueden soportar el crecimiento de las células de *P. pastoris*, pero reprimen la actividad del pAOX1 (Inan & Meagher, 2001). Así mismo, mientras se ha reportado que el glicerol es un una FCE que puede reprimir la expresión de la AOX, varios trabajos han reportado el uso de mezclas metanol-glicerol durante la etapa de inducción de proteínas recombinantes bajo el pAOX1; lo cual conduce a una mejora en la productividad de los bioprocesos (Carmen Jungo, Marison, & von Stockar, 2007).

Así por ejemplo, en la producción de una avidina recombinante con una cepa Mut⁺ en cultivos bajo condiciones limitadas de carbono y usando mezclas glicerol-metanol, ambos sustratos fueron consumidos completa y simultáneamente, y la proteína recombinante fue expresada aun con la presencia de glicerol en el medio (Carmen Jungo et al., 2007). Además, del hecho que el glicerol no reprimió la expresión de la avidina recombinante, la mezcla de metanol-glicerol permitió incrementar la velocidad de producción de la avidina, debido a una mayor producción de biomasa durante la inducción. Así, mientras se mantenga una concentración baja residual de glicerol en el medio, la síntesis de la AOX inducida por el metanol no se ver reprimida. Por lo que el uso de

alimentaciones mixtas de glicerol-metanol durante la fase de inducción representa una ventaja interesante que el uso de metanol simple.

Generalmente los microorganismos usan oxígeno molecular para actividades de respiración durante el catabolismo de carbohidratos, en el caso de las levaduras metilotróficas, el oxígeno también es requerido para la oxidación inicial del metanol a formaldehído (Figura 1). Todo el metanol que es consumido por las células es oxidado a formaldehído en un par de reacciones acopladas que involucran las enzimas AOX y catalasa (CAT) en el peroxisoma, estas reacciones usan oxígeno molecular como aceptor de electrones (M. Jahic, Rotticci-Mulder, Martinelle, Hult, & Enfors, 2002).

El formaldehído generado por la oxidación del metanol puede seguir dos rutas, la primera hacia anabolismo y la segunda dirigida al metabolismo energético. En el primer caso, el formaldehído es integrado en una vía cíclica que inicia con la condensación del formaldehído con xilulosa 5-monofosfato, una reacción que es catalizada por la enzima DAS que se encuentra también en el peroxisoma; los productos de esta reacción, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona dejan el peroxisoma y entran a la vía citoplasmática que regenera xilulosa 5-monofosfato. Por cada tres ciclos, una nueva molécula neta de gliceraldehído 3-fosfato es producida, la cual se usa para la síntesis *de novo* de material celular (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). En la Tabla 2 se encuentran descritas las principales enzimas involucradas en las vías metabólicas de asimilación de metanol y glicerol en células de *P. pastoris*.

En el metabolismo energético una porción del formaldehído generado deja el peroxisoma y es oxidado hasta CO₂ y H₂O en un par de reacciones mediadas por dos deshidrogenasas citoplasmáticas que requieren del cofactor NAD⁺ para generar energía para las células y donde el oxígeno molecular también es usado como aceptor final de electrones en estas reacciones (M. Jahic et al., 2002).

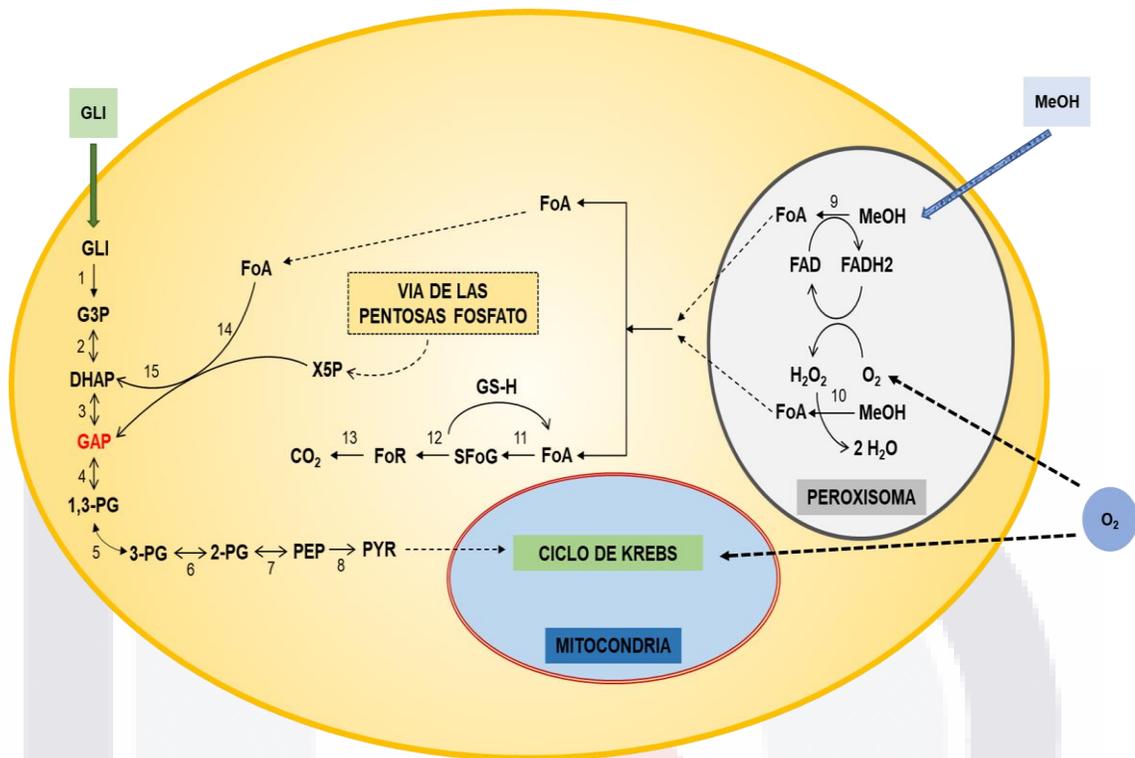


Figura 1. Metabolismo de metanol y glicerol en *Pichia pastoris*. Metabolitos: GLI: glicerol, G3P: glicerol-3-fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, GAP: gliceraldehído-3-fosfato, 1, 3-PG: 1, 3- Fosfoglicerato, 3-PG: 3-Fosfoglicerato, 2-PG: 2-fosfoglicerato, PEP: fosfoenolpiruvato, PYR: piruvato, MeOH: metanol, FoA: formaldehído, SFoG: S-formil glutatión, GS-H: glutatión, FoR: formato, X5P: xilulosa-5-fosfato (Adaptado de Calik et al., (2015)).

Tabla 2. Identificación de las enzimas involucradas en el metabolismo de metanol en *Pichia pastoris* de la Figura 1 (Tomado de Calik et al., (2015)).

Número	Nombre de la enzima	Número EC
1	Glicerol kinasa	2.7.130
2	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8
3	Triosa-fosfato isomerasa	5.3.11
4	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12
5	3-fosfoglicerato kinasa	2.7.2.3
6	Fosfoglicerato mutasa	5.4.2.11
7	Fosfopiruvato hidratasa (enolasa)	4.2.1.11
8	Piruvato kinasa	2.7.1.40
9	Alcohol oxidasa	1.1.3.13
10	Catalasa	1.11.1.6
11	Formaldehído deshidrogenasa	1.2.1.46
12	S-Formil-Glutation hidrolasa	3.1.2.12
13	Formato deshidrogenasa	1.2.1.2
14	Dihidroxiacetona sintasa	2.2.1.3
15	Dihidroxiacetona kinasa	2.7.1.29

1.2.2. Promotores empleados para la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.

El uso de *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes no solo tiene las ventajas de ser un organismo eucariote con un crecimiento análogo a los sistemas bacterianos. El desarrollo de la ingeniería genética aplicada a esta levadura ha permitido establecer diferentes configuraciones genómicas para la expresión recombinante genes heterólogos de manera constitutiva o inducida. Esta tecnología permite el control óptimo de productos recombinantes, que por lo general se realiza a través de la alimentación de diferentes sustratos al medio de cultivo, lo cual permite el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de fermentación. A continuación, se describen los promotores más empleados para la producción recombinante de proteínas con *P. pastoris*.

I. Promotor alcohol oxidasa.

Dos de las enzimas en la vía de asimilación del metanol, AOX y DHAS, están presentes en altos niveles en células creciendo en metanol. En el caso de la AOX las regiones codificantes de los genes funcionales AOX1 y AOX2, y los productos de éstos tienen un 92% y 97% de homología respectivamente; sin embargo, las regiones de los promotores son distintas, el promotor AOX1 (pAOX1) produce aproximadamente el 90% de la enzima AOX en células inducidas por metanol (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Este pAOX1 es usado para la construcción de vectores de expresión recombinante donde se integra el gen heterólogo, los cuales a su vez son integrados al genoma de la levadura, resultando en cepas donde la producción de la proteína recombinante está bajo el control de la concentración de metanol en el medio (Kupcsulik & Sevilla, 2004). Algunas ventajas y desventajas del uso del pAOX1 se indican en la Tabla 3.

Aunque el pAOX1 ha sido usado satisfactoriamente en la expresión de diversos genes recombinante, existen algunos casos en los que este promotor no resulta ser el indicado debido a la serie de desventajas que éste tiene (Tabla 3). Por lo tanto, se han descrito otras opciones de promotores que a continuación se describen (J. L. Cereghino & Cregg, 2000).

Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso del promotor AOX (Tomado de Macauley-Patrick et al., (2005)).

Ventajas	Desventajas
La transcripción de la proteína foránea está altamente regulada y controlada por un mecanismo directo de represión/desrepresión.	El monitoreo del metanol durante el proceso regularmente es difícil, debido a la baja confiabilidad de sensores <i>on-line</i> y las complicaciones de las mediciones <i>off-line</i> .
A los niveles de proteínas recombinantes pueden ser expresados, inclusive si son tóxicas para las células.	El metanol es altamente inflamable; por lo que el almacenamiento de grandes cantidades para estos procesos es indeseable.
Debido a la represión de la transcripción de la proteína recombinante por la FCE inicial, se asegura una adecuada densidad celular antes de la sobreexpresión del producto.	El metanol es un derivado del petróleo, lo cual puede resultar inseguro en la producción de ciertos alimentos y aditivos.
La inducción de la transcripción del gen recombinante es fácilmente alcanzada por la adición de metanol.	Se requieren de dos fuentes de carbono, y el cambio de una a otra debe realizarse en un punto preciso durante la fermentación.
Menor riesgo de contaminación debido al uso de metanol como FCE.	

II. Promotor GAP.

El promotor del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (pGAP) es un promotor constitutivo cuando la levadura crece sobre glucosa o una fuente de carbono asimilada mediante la ruta de la glicolisis. Tiene niveles de expresión comparables a los vistos con el pAOX1, e inclusive en algunas ocasiones mejores niveles de expresión han sido alcanzados. Cabe destacar, que se ha reportado que el incremento en el número de copias del gen recombinante bajo este pGAP puede potenciar los niveles de expresión (Cos et al., 2006). Sin embargo, el uso del pGAP debido a su naturaleza constitutiva no representa una buena opción cuando las proteínas producidas resultan tóxicas para la levadura. El pGAP es el sistema de regulación más usado después del pAOX1, de las grandes ventajas del pGAP es la expresión de proteínas recombinantes asociadas al crecimiento, usando fuentes de carbono como la glucosa, glicerol y otros compuestos asociados al metabolismo central de la levadura (X. García, Ferrer, Montesinos, & Valero, 2013). Cultivos continuos estables y eficientes usando el pGAP pueden alcanzar periodos

de producción de hasta 30 días. Este promotor evita el uso de metanol, con lo cual se reducen fenómenos de lisis celular y proteólisis asociados al uso de esta FCE.

Mientras que las condiciones durante la fase de inducción deben ser estrictamente controladas en los sistemas bajo el *pAOX1*, en los sistemas *pGAP* se requieren de mínimos controles. Se ha planteado también la construcción de cepas bajo el control de ambos promotores *pAOX1* y *pGAP* como una estrategia para incrementar los rendimientos. El desarrollo de las cepas recombinantes involucra la transformación secuencial con vectores que contienen por separado el *pAOX1* y el *pGAP*, lo cual resulta en cepas que pueden expresar proteínas de manera constitutiva e inductiva a través de mecanismos no competitivos (Potvin et al., 2012).

Uno de los problemas asociados con el uso del *pAOX1* es la limitación de oxígeno impuesta por las condiciones de cultivo, las cuales limitan la proliferación celular. Mantener la concentración de oxígeno disuelto a ciertos niveles es complicado con altas densidades celulares; ya que, aunque la velocidad específica de consumo de oxígeno se mantenga constante, el incremento en la concentración celular incrementa la velocidad de consumo de oxígeno. Varios problemas se pretenden resolver con el uso del sistema *pGAP* como la acumulación de subproductos del metabolismo del metanol como el formaldehído y el peróxido de hidrógeno, los cuales tienen incidencia en la pérdida de viabilidad celular (Figura 1). Adicionalmente, la generación de calor debido a la oxidación del metanol es considerablemente mayor que aquel liberado por la oxidación de la glucosa y el glicerol. Ya que la temperatura es un parámetro crucial en los cultivos de *P. pastoris*, para evitar la degradación del producto, los requerimientos de enfriamiento se incrementan significativamente con el uso de metanol. Dado que la transferencia de calor se vuelve más complicada a mayor escala de los biorreactores, los sistemas que usan el *pGAP* pueden representar una mayor ventaja en el manejo de la temperatura de los bioprocesos (Calik et al., 2015).

Este sistema es más adecuado para procesos de producción de gran escala, porque se evitan los riesgos y costos asociados con el almacenamiento y la adquisición de grandes volúmenes de metanol (Cos et al., 2006). El promotor *GAP* ofrece también la ventaja de que la optimización de los bioprocesos puede ser conseguida mediante estrategias de alimentación de una sola fuente de carbono (Calik et al., 2015).

III. Promotor pFLD1.

Este promotor está asociado al gen codifica para una enzima aldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión la cual se encuentra en la vía inducible para la asimilación de metanol (Figura 1). Esta enzima tiene un importante papel en el catabolismo del metanol como fuente de carbono, así como en el metabolismo de las aminos como fuente de nitrógeno (Cos et al., 2006). Después que el metanol es oxidado en el peroxisoma por la AOX, la porción de formaldehído producida deja el peroxisoma y es oxidado en el citosol por la formaldehído-deshidrogenasa (FLD). En adición al metabolismo de metanol, FLD está involucrada en la asimilación de aminos metiladas como fuente de nitrógeno. La oxidación de la metilamina en el peroxisoma genera formaldehído, peróxido de hidrógeno y iones de amonio. El gen *FLD1* de *P. pastoris* es alta e independientemente inducido por metanol o metilamina. Este promotor presenta la ventaja de usar aminos metiladas para inducir la expresión y glucosa o glicerol como fuente de carbono en lugar de metanol. Sin embargo, el manejo de metilamina como fuente de carbono y nitrógeno en cultivos con *P. pastoris* representa varios riesgos importantes en el bioproceso y para los productos; esto debido a la alta inflamabilidad, corrosividad y toxicidad de estas aminos y los riesgos que conlleva el almacenaje y manejo de grandes cantidades en aplicaciones de escala industrial. Llegando a representar más riesgos que inclusive el manejo de metanol. Este promotor también se ha usado de manera simultánea con el pAOX1 para la expresión de proteínas recombinantes (Potvin et al., 2012).

IV. Promotor pICL1.

En adición a los promotores dependientes de metanol (pAOX, pFLD1), otros promotores inducibles han sido aislados que no requieren metanol. El gen *ICL1* inducible con etanol expresa una enzima isocitrato liasa. El etanol es más seguro de manejar y almacenar que el metanol. Bajo pICL1 se ha expresado dextranasa recombinante, el promotor fue regulado en respuesta a la fuente de carbono, siendo la expresión de la proteína recombinante controlada por las condiciones de cultivo (Cos et al., 2006).

V. Otros promotores.

En algunas aplicaciones, los promotores pAOX1, pGAP y pFLD1 resultan en niveles bastante elevados de expresión de las proteínas recombinantes, lo cual puede resultar en

la expresión de proteínas mal plegadas debido a la saturación de la vía de maduración y secreción de la levadura. Existen entonces alternativas menos populares como el promotor PEX8 que codifica para una proteína matriz peroxisomal, la cual es esencial para la biogénesis del peroxisoma, inducida por metanol y ácido oleico. En adición a pGAP, también existen otros promotores constitutivos que han sido usados para la producción de proteínas recombinantes. El gen *YPT1* codifica para una proteína GTPasa involucrada en la secreción, y su promotor mantiene niveles bajos de expresión constitutivos en medios que contienen glucosa, metanol o manitol. También, la DAS involucrada en la ruta de asimilación del metanol, su promotor (pDHAS) inducible por metanol ha sido propuesto para el uso en vectores recombinantes (Potvin et al., 2012). Debido a que también es un promotor fuerte, la DAS puede llegar a representar hasta el 20% de la proteína total celular.

1.2.3. Fenotipos de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* basados en el promotor AOX1.

En cepas recombinantes bajo el pAOX, dependiendo si uno u otro de los genes *AOX1* o *AOX2* son deletados durante el evento de integración del vector de expresión recombinante en el sitio del promotor, se pueden distinguir 3 fenotipos de cepas de *P. pastoris* (Looser et al., 2015). La integración de casetes recombinantes bajo el pAOX en el genoma de la levadura en el sitio del gen *AOX1* puede derivar en eventos de integración o reemplazo del gen *AOX1*, resultando en una cepa funcional Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) o en una cepa disfuncional en el gen *AOX1* Mut^S (*Methanol utilization slow*) respectivamente. En el caso de cepas Mut⁻ (*Methanol utilization negative*), si bien no son capaces de metabolizar el metanol, éste actúa solamente como agente inductor para la expresión del gen heterólogo.

El fenotipo Mut⁺ contiene ambos genes *AOX1* y *AOX2*, por lo que puede metabolizar metanol a la misma velocidad que las cepas silvestres. Estas cepas Mut⁺ son muy sensibles a altas concentraciones de metanol residual. En presencia de un exceso de metanol y oxígeno, se logran producir altos niveles de formaldehído debido a la oxidación del metanol alcanzando niveles tóxicos que dañan a las células (Figura 1). Por lo tanto, la producción exitosa de proteínas recombinantes con cepas Mut⁺, es crítico mantener concentraciones de metanol por debajo del 3% (V/V) en el fermentador. La ventaja de estas cepas para la expresión de proteínas recombinantes es su alta velocidad de crecimiento en metanol (por

lo tanto, la velocidad de producción también lo es), siempre y cuando la concentración de metanol se mantenga sensiblemente regulada entre 0.4 y 3% (Looser et al., 2015)

Las cepas Mut^S carecen del gen *AOX1* y metabolizan al metanol de forma más lenta debido a una menor disponibilidad de enzima AOX; sin embargo, requieren de menores cantidades de metanol que las cepas Mut⁺. De esta manera, estas cepas Mut^S crecen de manera más lenta en metanol debido a que cuentan solo con el gen *AOX2* para la asimilación del metanol. Para estas cepas, el control de la concentración de metanol en el medio tiene límites más estrechos que en cepas Mut⁺, ya que el metanol debe mantener en un rango de 0.2-0.8% (V/V) en el fermentador (Stratton, Chiruvolu, & Meagher, 1998). Sin embargo, una de las grandes ventajas de las cepas Mut^S es que no son igual de sensibles a altas concentraciones de metanol como las cepas Mut⁺; por lo tanto, no requieren de un control muy estricto en la concentración residual de metanol en el medio. Así pues, en el caso de una excesiva acumulación de metanol, las células no aceleran su crecimiento como lo haría una cepa Mut⁺, y no se producirán concentraciones tóxicas de formaldehído en el medio. Esto supone una ventaja para la ejecución de los procesos de fermentación en especial cuando no se tienen las herramientas necesarias para el control y alimentación adecuada de metanol, por lo que el control del bioproceso a escala comercial puede ser más sencillo y facilita el escalamiento de los bioprocesos al tener menores requerimientos de sistemas de control (Looser et al., 2015).

Las células recombinantes Mut^S han sido usadas para la correcta expresión de la superficie antigénica de la hepatitis B humana para la producción de vacunas, ya que la alta velocidad de crecimiento de cepas Mut⁺ aunado a la alta tasa de expresión resultó insatisfactorio en la producción de dichas partículas que requieren un alto grado de ensamblado postraduccion. Las cepas modificadas Mut^S tienen una menor velocidad específica de crecimiento y tasa de producción, por lo que son preferibles para aquellas proteínas con una alta complejidad de plegamiento (Kim et al., 2015).

Cabe mencionar que el metanol es tóxico para los tres fenotipos de utilización de metanol en concentraciones superiores al 3% (V/V). Sin embargo, en el caso de las cepas Mut^S, éstas tienen la capacidad de seguir consumiendo metanol cuando éste alcanza más del 3% en el medio. Esto implica la inhibición de crecimiento, sin embargo, una vez que la concentración alcanza niveles no inhibitorios las células pueden reanudar su crecimiento,

alguno que las cepas Mut⁺ no tienen la capacidad (Kupcsulik & Sevelle, 2004). Como se mencionó las cepas Mut⁻ no contiene genes AOX, por lo tanto, no puede metabolizar al metanol. En medios con exceso de metanol como sustrato a una temperatura de 30 °C, las cepas Mut⁺ alcanzan una μ de hasta 0.15 h⁻¹; para las cepas Mut^S esta $\mu_{\text{máx}}$ puede llegar a ser considerablemente menor de hasta 0.035 h⁻¹ (Looser et al., 2015).

1.2.4. Bioprocesos para expresar proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris puede crecer en medios de cultivo complejos y mínimos definidos con una adecuada suplementación de nutrientes apropiados para su desarrollo óptimo; entre los más importantes se encuentran la FCE y macronutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre y biotina (Stratton et al., 1998). Es aquí donde se encuentra el mayor interés para su uso en aplicaciones comerciales; ya que a partir de medios definidos con fuentes de carbono simples como glicerol y metanol, esta levadura puede llegar a generar CADC con concentraciones superiores a 50 g/L de peso seco (C. Jungo, Schenk, Pasquier, Marison, & von Stockar, 2007).

La mayoría de los reportes de expresión de proteínas recombinantes con *P. pastoris* han empleado el pAOX1 para controlar la expresión del gen heterólogo mediante cultivos en lote alimentado, donde el metanol es la única FCE (Cos et al., 2006). En los bioprocesos para la expresión de proteínas recombinantes con *P. pastoris* es posible alcanzar a producir concentraciones de productos recombinantes que van del orden de los miligramos hasta gramos por litro (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Generalmente, en los procesos de fermentación, la composición del medio, la concentración de oxígeno disuelto (la cual está en función de las velocidades de aireación y agitación), pH y la temperatura son parámetros que influyen en la calidad y cantidad de la proteína recombinante. Los reportes de cultivos de *P. pastoris* hasta hoy realizados muestran que la selección de la fuente de carbono depende de: (i) el régimen de cultivo empleado, (ii) el promotor para la expresión del gen heterólogo y (iii) el enfoque de la estrategia de fermentación para producir un alto rendimiento de la proteína recombinante (Calik et al., 2015). Los cultivos con *P. pastoris* comúnmente se realizan en régimen de lote alimentado; los cultivos en lote no son empleados debido a los bajos rendimientos de biomasa celular y proteína recombinante que resultan. De esta manera, las fermentaciones en lote alimentado son aplicados para extender el tiempo de cultivo e incrementar la producción del producto recombinante.

Las células de *P. pastoris* tienen baja capacidad fermentativa, una de sus mayores ventajas frente a *S. cerevisiae*. Con su preferencia por crecimiento aeróbico, *P. pastoris* puede ser cultivada a extremadas altas densidades celulares (hasta 130 g/L de biomasa en peso seco) en ambiente controlados de un fermentador. El crecimiento celular es especialmente importante para proteína extracelulares, ya que la concentración del producto en el medio es proporcional a la concentración de las células en el caldo de cultivo (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Otro aspecto positivo del crecimiento de *P. pastoris* en fermentadores es que el nivel de transcripción inicial del pAOX1 puede ser 3 a 5 veces más grande en células creciendo a una velocidad limitada por el metanol que en células creciendo en condiciones saturadas de metanol. Además, el metabolismo del metanol (Figura 1) utiliza oxígeno a una velocidad alta, y la expresión de los genes recombinantes se ve negativamente afectada por limitaciones de oxígeno. Solamente en el ambiente controlado de un biorreactor es viable el monitoreo y control de los niveles de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo (G. P. L. Cereghino et al., 2002).

En general, para lograr CADC de cepas recombinantes de *P. pastoris* se emplea un régimen en lote alimentado donde se emplea comúnmente al glicerol como FCE para la producción de biomasa celular. En el caso de utilizar el pAOX1 después de terminar el lote alimentado, se comienza con la alimentación de metanol bajo el mismo régimen de cultivo (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Así mismo, se prefiere el uso de medios de cultivo definidos, ya que estas condiciones de crecimiento son ideales para la producción a gran escala de proteínas heterólogas. Los medios definidos son libres de ingredientes indefinidos que pueden ser la fuente de pirógenos o toxinas y entonces son compatibles con la producción de productos farmacéuticos. Además, dado que los cultivos de *P. pastoris* se realizan en medios con un pH relativamente bajo y metanol, las probabilidades de contaminación por otros microorganismos son menores.

En los CADC en lote alimentado, inicialmente las células son reproducidas en un medio definido con glicerol como FCE, durante este tiempo la biomasa es acumulada pero la expresión de la proteína recombinante está totalmente reprimida (Potvin et al., 2012). Cuando el glicerol es totalmente consumido, una fase de transición es iniciada en la cual se alimenta glicerol al cultivo a una velocidad limitada de crecimiento. En cepas recombinantes bajo el control del pAOX1, en una última etapa se suministra metanol o una mezcla metanol/glicerol para inducir la expresión (J. L. Cereghino & Cregg, 2000).

Otro aspecto positivo de cultivos de *P. pastoris* en fermentadores es que el nivel de transcripción del *pAOX1* puede ser 3-5 veces mayor en procesos donde el metanol es adicionado de forma limitante para el cultivo en régimen de lote alimentado, comparado con células creciendo en exceso de metanol (J. L. Cereghino & Cregg, 2000). Como el metabolismo de metanol demanda altas velocidades de consumo de oxígeno, y la expresión de proteínas recombinantes está afectada negativamente por la limitación de oxígeno, los cultivos en biorreactor mezclado son adecuados para monitorear y ajustar los niveles de OD en el medio de cultivo y, aunque algunas proteínas recombinantes han sido expresadas con éxito en cultivos con matraz agitado, la producción de la proteína recombinante generalmente es menor en comparación con los cultivos en biorreactor tipo tanque mezclado (J. L. Cereghino & Cregg, 2000; Lee, Lee, Jung, Katoh, & Lee, 2003).

Las células de *P. pastoris* se caracterizan por tener altas velocidades específicas de consumo de oxígeno (q_o) especialmente cuando crecen en metanol (M. Jahic et al., 2002). En CADC la demanda de oxígeno puede llegar a ser tan elevada que para evitar condiciones limitantes de oxígeno es necesario suministrar oxígeno puro al biorreactor, en su caso la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor limita el rendimiento del bioproceso (X. García et al., 2013). En los cultivos se recomienda mantener una concentración de OD de entre 20-30% de la saturación (Li et al., 2007). Cuando existe carencia de oxígeno en el medio existe un incremento en el *flux* de metabolitos de la ruta de la glicólisis, lo cual aumenta la fluidez y permeabilidad de la membrana celular generando un incremento en la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés, disminuyendo la viabilidad de las células (M. Jahic, Gustavsson, Jansen, Martinelle, & Enfors, 2003). La pérdida de viabilidad en los cultivos genera lisis celular, lo cual resulta en la liberación de proteasas citoplasmáticas al medio de cultivo disminuyendo el rendimiento de la proteína recombinante de interés.

La mayoría de los bioprocesos se realizan a 30 °C, pero se ha reportado que una disminución en la temperatura de 10 °C durante la fase de inducción con metanol, incrementó el rendimiento de la proteína recombinante hasta en tres veces, debido a una reducción en el *flux* de metabolitos en el CAT, reduciendo los niveles de proteínas involucradas en la respuesta oxidativa, así la excreción de la proteína recombinante es más eficiente debido a la disminución del estrés en la célula (Calik et al., 2015).

La tendencia en los bioprocesos actuales con *P. pastoris* describen estrategias de cultivo diferentes a protocolos estándar disponibles, y se encaminan al desarrollo de procesos específicos basados en estrategias que conjuntan un producto con su diseño genético específico y las características específicas del equipo de biorreactor. Sin embargo, el concepto desarrollado debe poder aplicado de manera general, y por lo tanto transferible a diferentes cepas y equipos (Looser et al., 2015). Los procesos de manufactura tienen como objetivo producir la mayor cantidad posible de producto con las especificaciones de calidad adecuadas y en un mínimo de tiempo de proceso; por lo tanto, la productividad específica (q_p), máxima producción de biomasa (X_V) y la productividad volumétrica, son factores críticos para el proceso biotecnológico.

1.2.5. Alimentación de metanol en bioprocesos de expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor pAOX1.

Los factores que tienen particular importancia en los procesos de fermentación donde se incluyen cepas recombinantes de *P. pastoris* incluyen (i) la concentración residual de metanol en el medio, (ii) la velocidad de producción de la proteína y (iii) la densidad celular (Potvin et al., 2012). Uno de los parámetros clave más importantes en los sistemas de expresión con el pAOX1 es la concentración de metanol. El monitoreo y control de la alimentación del metanol es muy importante porque altas concentraciones pueden ser tóxicas para las células; mientras que bajos niveles de metanol pueden no ser suficientes para iniciar la transcripción de las enzimas AOX (Cos et al., 2006). Generalmente, mantener niveles constantes de metanol es la estrategia más usada durante la etapa de inducción con el pAOX1 (T. Charoenrat, Ketudat-Cairns, Stendahl-Andersen, Jahic, & Enfors, 2005; Gurramkonda et al., 2009; Khatri & Hoffmann, 2006a).

Después del crecimiento de la levadura en una fuente de carbono represora del pAOX1, la adaptación del cultivo previo a la etapa de inducción con metanol se puede realizar mediante dos estrategias: (1) suministro de un flujo pequeño que se incrementa hasta un valor máximo y (2) la disminución gradual en la alimentación de glicerol junto con el incremento en la alimentación de metanol. Después de un periodo de adaptación al nuevo sustrato, la alimentación de metanol debe realizarse de tal manera que se suministre al cultivo de la FCE necesaria que asegure una inducción total del pAOX1 (Dietzsch, Spadiut, & Herwig, 2011a).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Suficientes niveles de concentración de metanol son requeridos durante la fase de inducción para maximizar la producción de la proteína recombinante. Rangos excesivos de concentración de metanol entre 3 hasta 20 g/L han sido reportados citotóxicos y conducen a la inhibición del crecimiento. Mientras que concentraciones entre 2 a 3.5 g/L han sido reportadas como óptimas para la producción de proteínas heterólogas (Potvin et al., 2012). En el caso de cepas Mut^s se ha recomendado mantener la concentración de metanol entre 1-2 g/L en el medio de cultivo para garantizar una completa inducción del pAOX1; así mismo, se ha establecido que altas concentraciones de metanol en el medio no son requeridas para la expresión de proteínas recombinantes (Dietzsch et al., 2011a).

La cantidad disponible de metanol afecta de manera directa la velocidad de crecimiento celular, por lo que mantener una concentración constante de metanol durante la etapa de inducción es una estrategia simple para el escalamiento a fermentaciones industriales (Wu et al., 2011). Dado que el metanol actúa como FCE y agente inductor para el pAOX1, el incremento en el consumo de metanol puede ayudar al crecimiento celular y la expresión en niveles adecuados de la proteína heteróloga; ya que la energía necesaria para la producción de la proteína puede competir con la necesaria para el crecimiento celular al inicio de la inducción (Mayson, Kilburn, Zamost, Raymond, & Lesnicki, 2003).

Altos niveles de expresión de proteínas recombinantes pueden crear una carga importante en las vías postraduccionales de las proteínas, lo que deriva en la secreción de proteínas incompletamente plegadas y sin modificaciones postraduccionales. Diferentes estudios indican que altos niveles de expresión de proteínas recombinantes son una carga fisiológica para las células que disminuye su capacidad para las modificaciones postraduccionales de las proteínas recombinantes. Esto demuestra que es necesario encontrar la adecuada estrategia de inducción con metanol para cada tipo de producto recombinante producido (Wu et al., 2011).

La velocidad específica de consumo de metanol (q_s) es un parámetro importante que determina la producción de proteínas recombinantes bajo el control del pAOX1. El incremento en q_s mejora la producción de biomasa y de la proteína recombinante en cepas Mut^t, donde q_s puede alcanzar valores de hasta 0.57g/g h; sin embargo, las cepas con valores altos de q_s tienen demandas altas de oxígeno por lo que generalmente estos cultivos se ven limitados por la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor. Para

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sobrepasar esta alta demanda de oxígeno se han usado cepas Mut^S; las cuales consumen menores cantidades de metanol ($q_s = 0.02$ g/g h) y tienen menor demanda de oxígeno, lo cual representa una ventaja para CADC (Theppanya Charoenrat et al., 2015).

Para cepas Mut^S se ha determinado un q_s de hasta 0.03 g/g h para el periodo de adaptación y de 0.06 g/g h como valor máximo, así mismo se propone que los cultivos deben mantenerse inducidos todo el tiempo para obtener la máxima productividad. El coeficiente de mantenimiento para una cepa recombinante Mut^S está alrededor de 0.016 g/g h, cuando q_s es menor a este coeficiente de mantenimiento, la mayoría de la energía es usada para el metabolismo de mantenimiento y no para el crecimiento celular o la producción de proteína, el empleo de valores mayores a 0.016 g/g h, garantiza una cantidad de energía suficiente para mantenimiento y crecimiento (Dietzsch et al., 2011a).

Cuando existe limitación de oxígeno, el consumo de metanol es limitado por la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), sin embargo, cuando existe una concentración adecuada de OD la q_s de metanol es alta inmediatamente después de la inducción, pero ésta disminuye a niveles de requerimientos de mantenimiento cuando la densidad celular incrementa como en los CADC. Se ha sugerido para la producción eficiente de proteínas recombinantes bajo condiciones limitadas de oxígeno suministrar altas concentración de metanol (hasta 24 g/L), de otro modo se requiere de la adición costosa de oxígeno puro al cultivo (Khatri & Hoffmann, 2006b). Mientras que la alimentación de metanol puede ser más eficiente de manera limitada, esto puede causar lisis celular y degradación del producto. Evitar las limitaciones de oxígeno ha sido prioridad en los CADC con *P. pastoris*; sin embargo, la producción de proteínas recombinantes ha sido también exitosa bajo condiciones limitadas de oxígeno (CLO). Los cultivos limitados en oxígeno, en comparación con los limitados en metanol, incrementan la pureza del producto secretado al medio (Khatri & Hoffmann, 2006a).

Muchos reportes indican que el uso de mezclas de alimentación de metanol junto con un sustrato no represor al pAOX1 durante la inducción puede incrementar la productividad volumétrica de la proteína de interés, porque se alcanzan altas densidades celulares, se provee a las células de una FCE alternativa y se puede alimentar metanol más rápido. El sorbitol es una fuente de carbono no represiva al pAOX1 y en contraste con el glicerol, las mezclas de sorbitol y metanol permite la acumulación de éstos en el medio sin

afectar la productividad de la proteína recombinante. Se ha reportado que q_S y q_P no se ven disminuidas al suministrar glicerol de manera limitada en el medio de cultivo, ya no que no se alcanza a reprimir el *pAOX1* y tampoco causa la excreción de metabolitos inhibitorios como el etanol o el acetato (Carmen Jungo et al., 2007). El uso de mezclas de sustratos durante la etapa de inducción ayuda a disminuir el estrés metabólico causado por la sobreexpresión de genes recombinantes (Ramón, Ferrer, & Valero, 2007).

En los últimos años, un número considerable de equipo para el monitoreo de metanol en cultivos de *P. pastoris* han sido desarrollados. Las principales técnicas *off-line* son la cromatografía de gases, HPLC y reacciones enzimáticas. Algunas técnicas *on-line* están basadas en el muestro automatizado y el uso de las técnicas *off-line* para la medición autónoma. El desarrollo de técnicas para la medición *on-line* del metanol permite un monitoreo y control riguroso, existen equipos de medición en línea basados en la detección del vapor de metanol en el medio; sin embargo, las desventajas de esta metodología recaen en el tiempo de respuesta del sensor (que puede llegar a ser de hasta 5 min) y la baja precisión de las mediciones (Ramon et al., 2004). Otras técnicas utilizan principios bioquímicos como el uso de enzimas, donde la determinación es selectiva para metanol, pero el rango de linealidad es muy bajo (Almuzara, Cos, Baeza, Gabriel, & Valero, 2002). Los sensores de metanol están basados en el uso de membranas selectivas para la recuperación del metanol del medio líquido mediante arrastre con un gas, la detección de los gases se puede realizar mediante el uso de metales oxidantes los cuales incluyen óxido de estaño (SnO_2), óxido de hierro (FeO) y óxido de zinc (ZnO) (Austin, Sankhe, & Tsao, 1992). Sin embargo, dichos dispositivos pueden verse afectados por la presencia de etanol y otros subproductos de la fermentación que pueden resultar en lecturas erróneas.

En los procesos, donde no está disponible una retroalimentación sobre la concentración del metanol instantánea en el cultivo, es necesario establecer una velocidad de alimentación apropiada, especialmente cuando el proceso es escalado y la densidad celular en el cultivo cambia, y que la producción de la proteína de interés depende de q_S , la cual a su vez es afectada por la concentración celular, la disponibilidad de metanol y oxígeno, y el fenotipo empleado (Theppanya Charoenrat et al., 2015).

1.3. Goma dextrana y enzima dextranasa.

1.3.1. Goma dextrana.

Los exopolisacáridos (EPS) son un grupo de importantes metabolitos producidos por bacterias ácido lácticas (BAL); se trata de un diverso grupo de polisacáridos de largas cadenas de alto peso molecular, las cuales varían en su composición y características fisicoquímicas (Lynch, Zannini, Coffey, & Arendt, 2018). Estos EPS tienen un amplio potencial de uso debido a su principal característica de formar geles que retienen humedad.

La goma dextrana o dextranos es un EPS de alto peso molecular formados por moléculas de glucosa mediante uniones α -1,6 y ramificaciones α -1,3, con varias aplicaciones industriales. Las moléculas de dextrana presentan problemas de solubilidad conforme aumenta el grado de polimerización de las cadenas (Y.-Q. Zhang, Li, Zhang, Wu, & Hu, 2017). Los dextranos se sintetizan a partir de la molécula de sacarosa por acción de la enzima dextranasa (E.C. 2.4.1.5), la cual es producida principalmente por BAL como *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus lactis*. Fracciones de bajo peso molecular de dextrana tienen muchas aplicaciones biotecnológicas importantes. Diferentes fracciones de dextrano han sido usadas como expansores de volumen de sangre, vehículos en vacunas y fármacos en la industria médica, aditivos en alimentos y cosméticos, y en la separación con gel en tareas del bioprocesamiento *downstream* para la purificación y concentración de productos biotecnológicos (Wakil, Ibikunle, & Akinyele, 2018).

En el presente, los α -glucanos son frecuentemente degradados mediante hidrólisis ácida a alta temperatura. Sin embargo, con este proceso se obtienen una gran heterogeneidad en el tamaño de las dextrinas formadas, debido a la aleatoriedad del proceso para cortar la cadena de dextrana. Por lo tanto, la degradación enzimática de los α -glucanos es una tecnología verde para la producción industrial (Y.-Q. Zhang et al., 2017).

La goma dextrana puede ser usada como sustrato para la producción de isomalto-oligosacárido de alto peso molecular. Estos isomalto-oligosacáridos producidos a partir de la degradación de dextrano se les ha conferido también propiedades prebióticas. La manufactura de este tipo de productos se realiza a partir de la hidrólisis controlada de dextrana con enzimas endodextranasas (Rastall, 2010).

La presencia de dextrana en los jugos de la caña de azúcar en las corrientes de proceso de las instalaciones de fábrica de azúcar, no solamente indica una baja calidad de la caña como materia prima y baja eficiencia en la producción; sino también, tiene un impacto negativo en la producción de azúcar que resultan en pérdidas económicas. Los problemas de procesamiento claramente ocurren debido al incremento en la viscosidad que conduce a una pobre clarificación, velocidades bajas de filtración, bajas velocidades de evaporación y elongación y contaminación de los cristales de sacarosa (Ninchan, Vanichsriratana, & Sriroth, 2017). Las gomas de dextrana son productos indeseables en la manufactura de azúcar a partir del jugo de la caña. Durante el procesamiento del jugo de la caña de azúcar, las dextranas pueden alcanzar niveles de hasta 10 mil ppm (1% p/V).

Para controlar la formación de polímeros de dextrana en la industria azucarera se han establecido tareas rigurosas de coordinación entre el cosechado de la caña y la recepción de la misma en la planta de procesamiento, así como el tratamiento del equipo con vapor y biocidas (Efraín Rodríguez Jiménez, 2009). También se han propuestos métodos físicos como la ultrafiltración, diálisis, ósmosis reversa que son de alto rendimiento para la eliminación de dextranas, sin embargo, esta tecnología aún no ha sido desarrollada para aplicaciones industriales. El único método aplicable y económicamente viable hasta hoy en la industria azucarera es la hidrólisis enzimática (Ninchan et al., 2017). Se ha determinado que prolongados tiempos de reacción y baja concentración de dextranas son condiciones favorables para la hidrólisis enzimática, y que la dextranasa debe agregarse lo más pronto posible en el proceso de molienda o en los evaporadores.

Por ejemplo, se ha investigado la degradación de dextrano T2000 mediante el uso de una dextranasa aislada de *Talaromyces piphilus* la cual produjo polímeros de pesos moleculares pequeños (10-70 kDa) al emplear una actividad enzimática de 5 U/mL y una concentración de dextrano del 6% en un tiempo de reacción de 150 min. Los glucanos obtenidos fueron adecuados para aplicaciones médicas (Y.-Q. Zhang et al., 2017). Esta enzima exhibió una alta actividad específica (14 894 U/mg), con una razonable estabilidad térmica entre 30-60 °C. Adicionalmente, esta dextranasa fue significativamente estable sobre un rango de pH de 3-10.

1.3.2. Enzimas industriales. La dextranasa.

Las enzimas industriales son catalizadores usados ampliamente en una variedad de procesos para mejorar la velocidad de las reacciones necesarias para la manufactura de algún producto. Las aplicaciones actuales de las enzimas están enfocadas en tres diferentes mercados que incluye (i) técnico en la manufactura de detergentes principalmente, (ii) procesamiento de alimentos y bebidas y (iii) producción de piensos animales (Kumar et al., 2014). La dextranasa (α -1,6-D-glucan-6-glucanohidrolasa; E.C. 3.2.1.11) es una enzima inducible que actúa principalmente reconociendo y clivando enlaces α -1,6 del dextrano (α -glucano), los principales productos son isomaltosa, isomaltotriosas, pequeñas cantidades de D-glucosa y una serie de polisacáridos de bajo peso molecular (Huang et al., 2019).

Las dextranasas se pueden clasificar en endodextranasas y exodextranasas. Las endodextranasas hidrolizan de manera aleatoria los enlaces glicosídicos α -1,6 para liberar isomalto-oligosacáridos. Mientras que las exodextranasas rompen secuencialmente los enlaces glicosídicos α -1,6 para producir moles de glucosa mediante el reconocimiento del lado no reductor del dextrano. El peso molecular de las enzimas dextranasas generalmente se encuentra en el rango de 40-80 kDa; con la más pequeña (26.5 kDa) producida por *P. lilacinum* y la dextranasa más grande (175 kDa) producida por *Streptococcus sobrinus* (Yang, Zhou, & Tian, 2018).

Las dextranasas microbianas han reemplazado satisfactoriamente la hidrólisis química del dextrano. El espectro de aplicación de las dextranasas ha sido extendido a varios campos, como el clínico, médico y el de la química analítica; así como su aplicación en la producción de azúcar y la prevención de la placa bacteriana (Huang et al., 2019). Esta enzima también puede ser usada directamente sobre dextrano comercial para la síntesis de isomaltosas e isomalto-oligosacáridos, los cuales exhiben efecto prebióticos (Ren et al., 2018). En el caso de la producción comercial del azúcar, el uso de la dextranasa para la degradación de dextranos ha sido el método más adecuado para la solución de problemas de la pobre clarificación de los jugos y en la pérdida de sacarosa, ambos problemas asociados a la presencia de dextranos (Wakil et al., 2018). La dextranasa también ha sido usada en investigación para la dilucidación de estructura de polisacáridos (Yang et al., 2018; Y.-Q. Zhang et al., 2017)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Marcas comerciales como Novo dextranase® de *P. lilacium* (Dinamarca) y dextranasa Hutten DL-2® de *Chaetomium gracile* (Japón) han sido exitosamente usadas para el tratamiento de jugos de caña de azúcar contaminadas con dextranas. Incluso a relativos bajos niveles de dextrano en el jarabe (alrededor de 75 ppm) la velocidad de filtración es marcadamente reducida y la capacidad del equipo se ve reducida hasta en un 50%. Con una dosis de alrededor de 10 U/g_{dextrano} de dextranasa fueron suficientes para restaurar la capacidad de filtración hasta un 90% de la capacidad nominal del filtro (Efraín Rodríguez Jiménez, 2009). Cabe destacar que los niveles óptimos de dosis de la enzima dependerán ampliamente de la calidad de los jugos de caña, las condiciones de operación como el pH, temperatura y el tiempo de procesamiento (Ninchan et al., 2017). Es recomendado, que a partir de las dosis calculadas se adicione un 25% de ésta durante la primera etapa de molienda; el resto de la dosis al final del último evaporador.

Cada etapa del procesamiento del azúcar involucra diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de sacarosa. Estas condiciones afectan la actividad enzimática y la habilidad para hidrolizar las moléculas de dextrano. Por ejemplo, a partir de experimentos de un factor a la vez y mediante análisis de superficies de respuesta se han establecido las condiciones óptimas para la degradación de una mezcla de dextrano de 40, 500 y 2000 kDa, con una enzima comercial dextranasa de *Cheotomium* sp. con una actividad enzimática de 30000 U/mL. Las condiciones óptimas para la hidrólisis de 1500 ppm de dextrano puro a partir de los experimentos de un factor a la vez son; (i) 5-15 ppm de sólidos solubles totales de la preparación de dextranasa, (ii) un tiempo de retención de 5 a 15 min, (iii) 50-65 °C, (iv) pH 4.5-6.5 y (v) una concentración de sacarosa menor del 30% (Ninchan et al., 2017). En la práctica la eliminación de la contaminación causada por dextranos en las corrientes de proceso es más que complicada debido a la presencia de una gran variedad de dextranos de diferente peso molecular, así como las diferentes condiciones que se tienen a cada etapa del procesamiento.

Debido al incremento en la demanda de esta enzima en varias industrias, existe un enorme interés en el desarrollo de nuevas enzimas con mejores propiedades en las condiciones de reacción para las aplicaciones industriales con costos. Las investigaciones alrededor de la dextranasa se han enfocado principalmente en la mutación, búsqueda de nuevas fuentes, construcciones genéticas, optimización de los medios de fermentación y de las condiciones de fermentación y purificación de la enzima (Huang et al., 2019).

1.3.3. Producción de dextranasa.

Durante los años 80's las compañías comenzaron a producir preparaciones enzimáticas. Desde que se inició el uso de la dextranasa en la industria azucarera, los precios de las formulaciones enzimáticas llegaron a alcanzar precios de hasta 30 mil USD por tonelada (Efraín Rodríguez Jiménez, 2009). Actualmente el mercado de la enzima dextranasa está saturado, diversos productores se han retirado de la manufactura de dextranasa debido a la baja rentabilidad y no contar con los recursos que les de competitividad en este sector. Por otro lado, grandes corporativos como Nozymes y Amano Enzyme tienen la mayor participación en el mercado global. Por lo tanto, la dextranasa como única enzima a ofrecer por un productor tiende a disminuir su margen de ganancia año con año.

Las bacterias y hongos son las principales fuentes para producir dextranasa. Las dextranasas de bacterias usualmente tienen una favorable estabilidad térmica pero relativamente baja actividad dextranasa (Huang et al., 2019). Las dextranasas producidas por hongos han recibido especial atención por su elevada actividad enzimática y los productos que generan de la hidrólisis del dextrano (Y.-Q. Zhang et al., 2017). Además, la mayoría de las dextranasas producidas por los hongos son enzimas con actividades óptimas a temperaturas entre 50-70 °C, valores de pH entre 5.-6.5 e inestables bajo condiciones alcalinas (Ren et al., 2018).

Las especies de hongos que pueden producir dextranasas pertenecen a diferentes géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetoceros*, principalmente. Además, la levadura *Lipomyces starkeyi* también ha sido reportada como productora de dextranasas, aunque con baja actividad. Otros microorganismos como *Arthrobacter globiformis*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Bacteriodes* también producen dextranasas (Yang et al., 2018).

Los microorganismos extremófilos han recibido especial atención en las últimas décadas como fuentes importantes de enzimas de alto interés industrial. Esto debido principalmente a su elevada estabilidad en un amplio rango de condiciones de temperatura, pH y presión (Dumorné, 2018). Las enzimas de organismos extremófilos encuentran aplicación en diversas áreas industriales como la farmacéutica, biocombustibles, bebidas y alimentos, biología molecular, síntesis de químicos finos, bioprosesamiento sustentable de

productos antibióticos, entre otras (Cai et al., 2014). Por ejemplo, una dextranasa alcalina puede ser adecuada para el tratamiento de la caries dental, porque los productos empleados en estas aplicaciones suelen ser básicos.

Recientemente se ha propuesto el uso de una enzima obtenida de un microorganismo marino *Catenovulum*, la cual es una dextranasa alcalófila con una actividad dextranasa a temperaturas menores de 40 °C. Esta dextranasa, presentó mejor actividad contra biopelículas de *S. mutans* en comparación de la dextranasa obtenida del hongo *Penicillium* cuando ambas se usaron en una concentración de 40 U/mL. Además, la primera no mostró inhibición por sustancias encontradas en los productos comunes de salud bucal. Estas propiedades hacen de esta enzima un buen candidato para su uso en las aplicaciones de la salud bucal (Ren et al., 2018).

En la Tabla 4 se concentran algunos ejemplos de microorganismos silvestres productores de enzima dextranasa. Debido a que son reportes sobre aislamiento e identificación de cepas, la producción de la enzima se realiza en cultivos con matraz agitado. Así mismo, se indican las condiciones de máxima actividad enzimática para la degradación de goma dextrana.

Tabla 4. Reportes de producción de enzima dextranasa de diferentes microorganismos con potencial aplicación biotecnológica y características de las condiciones óptimas para la mayor actividad catalítica.

Microorganismo	Sistema de cultivo	Actividad específica (U/mg)	Condiciones de actividad	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i>	Matraz agitado	---	pH 6 40 °C	(Zohra et al., 2013)
<i>Catenovulum</i> sp.	Matraz agitado	---	pH 8.0 40 °C	(Cai et al., 2014)
<i>Talaromyces pinophilus</i> H6	Matraz agitado	14894	pH 3.0-10 60-65 °C	(Y.-Q. Zhang et al., 2017)
<i>Catenovulum</i> sp.	Matraz agitado	2309	pH 8.0 40 °C	(Ren et al., 2018)
<i>Chaetomium globosum</i>	Matraz agitado	7535.8	pH 4.5-7.0 60 °C Endodextranasa	(Yang et al., 2018)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Matraz agitado	37.68	pH 5.5. 50 °C	(Wakil et al., 2018)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Matraz agitado	350.29	pH 5.0 55 °C	(Huang et al., 2019)

Como se ha expresado en párrafos anteriores, las enzimas provenientes de organismos extremófilos son de gran interés para las diversas aplicaciones industriales, ya que son enzimas que no requieren de ingeniería de proteínas para ser usadas directamente en condiciones especiales de pH y temperatura. Sin embargo, las dextranasas provenientes de hongos muestran una mayor actividad específica. Para mejorar la actividad dextranasa de las preparaciones enzimáticas de estas fuentes de microorganismos con baja actividad específica, la producción recombinante puede ser una alternativa de alto interés (Spohner et al., 2015).

1.3.4. Producción de dextranasa recombinante con *Pichia pastoris*.

La expresión recombinante de dextranasa obedece al hecho de contar con alternativas que puedan satisfacer la demanda de esta enzima por la industria con preparaciones enzimáticas de calidad. La dextranasa comercial es producida por fermentación ya sea con cepas de hongos *Penicillium* sp. o *Chaetomium* sp. Sin embargo, dado que estos hongos también producen una variedad de antibióticos y metabolitos tóxicos además de la dextranasa, esto puede dificultar la aprobación del producto por la FDA. Las únicas levaduras reportadas para producir dextranasa son miembros de la familia Lipomycetaceae como *L. kononenkoe* y *L. starkeyi* (Kang, Ji-Young, Joon-Seob, Seung-Heuk, & Doman, 2009). En 1996, en Cuba se expresó la primera enzima dextranasa recombinante a partir del hongo *Penicillium minioluteum*, y en 1995 de la universidad Osaka se publica la expresión de la dextranasa en la bacteria bucal *Streptococcus salivarius* (Efraín Rodríguez Jiménez, 2009).

Debido a que en los últimos años *Pichia pastoris* se ha convertido en el hospedero de mayor interés de proteína eucariotas recombinantes existen algunos reportes de la producción de dextranasa con esta levadura con cultivos basados principalmente en el promotor $pAOX1$. *P. pastoris* tiene el potencial de producir una mayor cantidad de enzima con un menores costos de producción y recuperación, en comparación con la fuente nativa a partir de hongos miceliares; puede inclusive mejorar las características de la enzima para hacerla más estable a altas temperaturas y mayores rangos de pH (Efraín Rodríguez Jiménez, 2009; Roca et al., 1996).

Estudios realizados en la expresión recombinante del gen de la dextranasa de *Penicillium minioluteum* en *P. pastoris* han sido realizados a escala laboratorio en fermentaciones en régimen de lote alimentado con metanol con cepas Mut^S (Roca et al., 1996). Estas fermentaciones se llevan a cabo mediante tres etapas: una primera etapa de lote en glicerol, seguido por un lote alimentado con mezclas glicerol/metanol y una etapa final de inducción con metanol. Los rendimientos en cantidad de proteína recombinante van desde los 0.10 hasta 3.2 g/L y actividades enzimáticas específicas de hasta 950 U/mg (Bentancourt et al., 2001; E. R. Jiménez, Sánchez, Roca, & Delgado, 1997).

Una alternativa al uso del *pAOX1* para la producción de dextranasa con *P. pastoris* también ha sido propuesta basada en el promotor del gen de la enzima isocitrato liasa (*p/ICL1*) (Menendez, Valdes, & Cabrera, 2003). Este promotor permite que, en cultivos de lote con glucosa el gen recombinante se mantenga reprimido durante el crecimiento exponencial, pero se encuentra desreprimido en la fase estacionaria del crecimiento. Las células transformadas mostraron altos niveles de expresión de la enzima en cultivos donde etanol fue usado como fuente de carbono o en ausencia de glucosa en el medio de cultivo. Actividades enzimáticas de hasta cerca de 35 000 U/mL fueron alcanzados en cultivos durante la fase estacionaria del cultivo (Menendez et al., 2003).

Por su parte, la expresión del gen *LSD1* que codifica para una dextranasa de *Lipomyces starkeyi* se realizó con una cepa de *P. pastoris*. La producción de dextranasa inducida por metanol en cultivos de lote alimentos en un fermentador de 8 L, fue hasta 4.2 veces mayor en *P. pastoris* en comparación con *S. cerevisiae*; donde la primera alcanzó a producir hasta 0.63 g/L de dextranasa activa secretada al medio después al final de la inducción con metanol (Kang et al., 2009). En cultivos en fermentador, se alcanzó a producir hasta 134 U/mL, frente a las 32 U/mL producidas por una cepa de *S. cerevisiae*, hecho que demuestra la robustez del sistema *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes frente a otros sistemas. Por su parte Lin Chen et. al. (2008) también clono el gen de la dextranasa de *L. starkeyi* en una cepa de *P. pastoris* bajo el control del promotor *AOX1*. Las clonas fueran cultivadas en un fermentador bajo un régimen de lote alimentado con glicerol y metanol para alcanzar al final de la fermentación hasta 0.46 g/L de dextranasa y una actividad de 84 U/mL.

Los reportes de dextranasa recombinante producida con *P. pastoris* se han realizado en régimen de lote alimentado en fermentadores de hasta 10 L. Se han empleado diferentes promotores (diferentes FCE), con resultados prometedores para emplear estos procesos a escala industrial. Sin embargo, no existe información sobre la ingeniería del bioproceso para llevar a cabo un escalamiento de la producción de dextranasa recombinante. Pues como es en la mayoría de las ocasiones, los reportes disponibles tratan sobre el aislamiento del gen de interés, la clonación del mismo en la levadura y el establecimiento del proceso de fermentación en unidades de escala laboratorio.

1.4. Escalamiento de bioprocesos en biorreactores tipo tanque mezclado.

La industria de los bioprocesos más que ahora requiere de rutas eficientes y sustentables para la manufactura de bioproductos. Sin embargo, la distancia que existe entre el ambiente celular a escala laboratorio, donde la ingeniería del proceso es desarrollada, y a escala industrial sigue siendo la barrera que no permite un escalamiento rápido y exitoso en la mayoría de los casos. Este es un cuello de botella para la transición desde la innovación hasta la comercialización de los bioprocesos. Trabajos a escala laboratorio, donde se reproducen las condiciones que tendrán las células en fermentadores de gran escala, pueden servir como antecedente para investigar la interacción de los bioprocesos bajo condiciones de producción real (Delvigne & Noorman, 2017).

Los reactores tipo tanque mezclado son ampliamente usados para llevar a cabo procesos donde se requiere el contacto de dos gases líquida/gaseosa para la manufactura de productos a gran escala. El diseño y escalamiento de biorreactores con dos fases no es una tarea sencilla, principalmente porque las reacciones químicas están generalmente relacionadas con mecanismos de transporte molecular de masa y momento de una manera compleja. El estado actual que concierne al escalamiento y diseño de biorreactores está basado en correlaciones empíricas y en ciertas normas rutinarias que han demostrado algún grado de éxito (Bashiri, Bertrand, & Chaouki, 2016).

Los tanques mezclados han sido estudiados extensivamente para ser usados como biorreactores a escala industrial (>1 m³) para la producción de especialidades químicas costosas como proteínas y otros metabolitos. La optimización de la energía para el rendimiento del reactor para estos productos de alto valor comercial no ha sido necesaria

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Nauha, Visuri, Vermasvuori, & Alopaeus, 2015). Sin embargo, en años recientes el interés sobre la optimización de la energía en fermentaciones ha sido dirigido para sistemas microbianos como fuentes de combustibles y otras especialidades químicas de alto volumen de producción. De esta forma, para hacer rentables dichos bioprocesos, la escala del reactor requiere ser de cientos de metros cúbicos mientras que el consumo de energía debe ser bajo.

Además de la producción anaeróbica de etanol por levaduras, la mayoría de los microorganismos crecen aeróbicamente. Por lo tanto, éstos requieren de grandes cantidades de oxígeno para crecer eficientemente. De manera general, los procesos aeróbicos están limitados por la resistencia a la transferencia de masa, lo cual a la vez limita la productividad de los sistemas de biorreactor (Nauha et al., 2015). El punto de inicio para el diseño de un nuevo proceso involucrando un biorreactor requiere de trabajo experimental realizado a escala laboratorio, donde comúnmente se mantienen velocidades de aireación tan altas como sean posibles. También es común el uso de altos valores de potencias volumétricas para el mezclado. Los resultados obtenidos con estas condiciones son regularmente una alta concentración de biomasa.

1.4.1. Criterios de escalamiento.

El escalamiento basado en cálculos fundamentales es una labor intensiva y requiere de vasta experiencia. Por esta razón, métodos simples son regularmente utilizados. Los métodos semi-fundamentales incluyen cálculos de ecuaciones fundamentales simplificadas las cuáles son dependientes de la escala (García-Ochoa & Gomez, 2009). El escalamiento realizado por análisis dimensional requiere de mantener grupos adimensionales constantes como la velocidad de bombeo o el número de Reynolds. Sin embargo, mantener todos los grupos adimensionales constantes no es posible y se tiene que tomar decisiones para definir los grupos más importantes. Regularmente, para el escalamiento se utilizan las *reglas de oro* (Nauha et al., 2015).

Existen diferentes reglas de oro para el escalamiento de biorreactores. Uno de los más usados es mantener una velocidad de aireación específica (vvm) constante y el consumo de potencia volumétrica (P_0/V) (P_g/V , para la potencia gaseada volumétrica). La conservación de vvm constante es un acercamiento estequiométrico, como la preservación

de la cantidad de oxígeno disponible para el reactor. Sin embargo, el cambio de escala tiene una influencia profunda en la dinámica del fluido en los recipientes mezclados, por lo que es más conveniente el uso de la velocidad superficial del gas (v_s) y P_g/V como criterios de escalamiento de biorreactores. El escalamiento mediante un coeficiente volumétrico de transferencia de masa constante (k_{La}) es también de los más usados cuando se tienen procesos de fermentación aireados o se alimenta algún gas al líquido (Nauha et al., 2015).

Este tipo de escalamiento es basado en correlaciones empíricas para el coeficiente de transferencia de masa, las cuales son función de v_s , v_{vm} , velocidad de agitación (N), P_g/V y viscosidad (μ_a). Estas correlaciones regularmente toman la forma de la siguiente ecuación:

$$k_{La} = C \cdot v_s^\alpha \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^\beta \cdot \mu_a^\gamma \quad (1)$$

Donde C es una constante que depende de la geometría del sistema y los sistemas de agitadores empleados. Los exponentes α , β y γ también son función del sistema de biorreactor, y en ocasiones el efecto de estos parámetros puede ser despreciado. El uso de exponentes hace de estas correlaciones dependientes de la escala, y muy poca evidencia de su aplicabilidad en reactores de gran escala ha sido publicada.

Hasta ahora, el escalamiento usualmente se ha realizado por la elección aleatoria de un conjunto de experimentos, los cuales son realizados de acuerdo con la infraestructura disponible. Si un cierto grado de reproducibilidad entre las escala piloto e industrial es logrado, el escalamiento generalmente será considerado como exitoso. Con los procedimientos convencionales de escalamiento, los valores de parámetros hidrodinámicos son asumidos constantes en todo el reactor (criterio de un reactor perfectamente mezclado). Sin embargo, en casos reales, especialmente a nivel de producción comercial, los valores de dichos parámetros (coeficientes de transferencia de masa, por ejemplo) pueden variar significativamente. La productividad de muchos procesos está limitada por la transferencia de masa entre fases, especialmente en el caso de especies pobremente solubles en diferentes fases (Bashiri et al., 2016).

Cuando se realiza un escalamiento geométrico manteniendo constante k_{La} basado en correlaciones empíricas en función de P_g/V y v_s el tiempo de mezclado incrementa

inherentemente. Este fenómeno es el mayor reto cuando se realiza escalamiento bajo este acercamiento. De hecho, cuando el tiempo de mezclado incrementa con el escalamiento, su valor gradualmente se convierte igual al tiempo características de la transferencia de masa ($1/k_L a$), que es la frontera cuando se comienzan a presentar heterogeneidades en el medio de cultivo (Bashiri et al., 2016).

Un problema importante del escalamiento de los bioprocesos son los campos de flujo heterogéneos en los biorreactores de escala industrial y su efecto negativo en la fisiología celular. Los bioprocesos realizados en biorreactores de gran escala siempre presentan problemas de mezclado y transferencia de masa, los cuales no se presentan a escala laboratorio o piloto. El ambiente heterogéneo los biorreactores de gran escala está catalogado como el principal problema del escalamiento (Wynn, Hanchar, Kleff, Senyk, & Tiedje, 2016; Xia et al., 2016). En la Tabla 5 se muestran los valores de trabajo comunes para biorreactores tipo tanque mezclado a diferentes escalas donde se aprecia la disminución de la Pg/V y la VTO, así como el incremento en el tiempo de mezclado conforme el volumen incrementa.

Tabla 5. Valores característicos de operación de biorreactores tipo tanque mezclado en diferentes escalas de producción (modificada de Wynn et al., (2016)).

Escala del fermentador	Volumen (L)	Pg/V (W/L)	VTO (mmol/L*h) ^a	Tiempo de mezclado (s) ^a
Laboratorio	1-10	8-10	400	1
Piloto	1, 000-3, 000	3-5	200	30
Industrial	> 50, 000	1-3	100	100

^a Valores típicos promedio, encontrados en los biorreactores.

Tradicionalmente, el escalamiento es principalmente basado en principios de similitud y análisis dimensional. Sin embargo, bajo estas circunstancias, las propiedades biológicas no han sido tomadas en cuenta, y entonces principios universales no pueden ser deducidos para un escalamiento exitoso (Xia et al., 2016). Debe ser notado, que los resultados de los procesos de fermentación están limitados por la capacidad de las cepas, pero son gobernados por el ambiente nutricional que rodea a las células, especialmente en los biorreactores de escala industrial. Debido al insuficiente tiempo de mezclado y limitaciones en la transferencia de masa en fermentadores de gran tamaño, varios gradientes, incluyendo de sustrato, OD, pH y CO₂, ocurren inevitablemente y las células

están sometidas a ambientes cíclicos cambiantes. Como consecuencia la biomasa, la productividad y el rendimiento son severamente afectados.

Un ambiente dinámico con altas heterogeneidades espaciales y temporales es siempre producido en fermentadores de gran escala, especialmente en regímenes de operación en lote alimentado. Muchos aspectos cambiarán inevitablemente durante el escalamiento de laboratorio a industrial. Por ejemplo, (i) incrementa la presión hidrostática en el fondo del biorreactor, (ii) incremento en el tiempo de mezclado, (iii) gradientes de pH y temperatura (Wynn et al., 2016; Xia et al., 2016). Cuando el tiempo de mezclado es de igual magnitud que el tiempo de reacción, las heterogeneidades pueden ser evitadas. Sin embargo, durante el escalamiento y en fermentadores de gran escala, mantener el tiempo de mezclado es bastante complicado principalmente debido a la limitación en la Pg/V que puede ser alcanzada en los biorreactores.

Debido al hecho del relativo elevado costo de suministrar oxígeno molecular a fermentaciones sumergidas, las fermentaciones aeróbicas han sido históricamente aplicadas principalmente para producir bajos volúmenes de compuestos del alto valor como moléculas para farmacéuticos y especialidades químicas (Humbird, Davis, & McMillan, 2017). Los retos se vuelven mayores para bioprocesos de gran escala cuando se pretenden alcanzar procesos aeróbicos económicos, donde los costos asociados a materiales y utilidades generalmente dominan la economía de la fermentación. Los altos costos de operación y de capital en las fermentaciones aeróbicas ha motivado la investigación y el desarrollo de rutas biológicas anaeróbicas para la producción biológica.

Las restricciones económicas se vuelven más significativas para procesos aeróbicos de productos de bajo margen de ganancia y altos volúmenes de demanda, por lo que la implementación de estrategias que puedan mejorar la solvencia de estos procesos biológicos son de importante relevancia (Humbird et al., 2017). En el caso de fermentaciones aeróbicas, ya se ha establecido que los mayores costos de producción están asociados a las operaciones necesarias para este tipo fermentaciones; donde los compresores y los agitadores representan la demandad de energía más grande del bioproceso completo.

Si el escalamiento es realizado manteniendo variables constantes como el k_{LA} , esto puede conducir a heterogeneidades a escala industrial. Alternativamente, si el tiempo de circulación del líquido a escala de producción es igual que el de escala laboratorio, un increíble suministro de potencia será necesario. Por lo tanto, es bastante complicado realizar un escalamiento exitoso debido a limitaciones de suministro de potencia a escalas industriales y la falta de conocimiento sobre los mecanismos de respuesta celular. En los biorreactores de escala industrial, el tiempo de mezclado está en el orden de las decenas hasta centenas de segundos. Esto es más prolongado que los tiempos de reacción celular relevantes; especialmente con respecto a los intermediarios del metabolismo central que tienen tiempos de recambio del orden de los segundos. Como resultado, heterogeneidades en el sistema inevitablemente ocurren.

Dado que la velocidad en la punta del impulsor incrementa con el escalamiento para limitar la reducción de la potencia volumétrica, la velocidad de corte también incrementa cerca del agitador. El mantenimiento de la velocidad de corte es especialmente importante para líneas celulares que son sensibles a los efectos de corte por el medio. Entonces, éste representa un criterio de escalamiento adecuado para este tipo de cultivos.

Uno de los parámetros de proceso importantes, el cual afecta la disponibilidad de oxígeno, es la Pg/V . Mientras los gradientes existen en los biorreactores de gran escala, el coeficiente Pg/V puede ser considerado como un parámetro sin gradiente, cuando solamente se considera la potencia suministrada por el agitador. Debido a la facilidad de medir este criterio de escalamiento, Pg/V ha sido empleado como criterio de escalamiento en muchos estudios (Neubauer & Junne, 2016). Además, Pg/V en los cultivos sumergidos es de particular importancia en los sistemas líquidos multifase, debido a que el tamaño de burbuja depende de la velocidad máxima de disipación de energía o del consumo de potencia. Se ha demostrado que Pg/V es el mejor criterio para mantener constante el área interfacial de las burbujas del gas (Wynn et al., 2016).

Si bien el incremento en la eficiencia de mezclado puede ser resuelto con el uso de agitadores más grandes durante el escalamiento, la aplicación de esta posibilidad está limitada por dos razones, económica y biológica. Con el objetivo de incrementar el mezclado, altos suministros de potencias son requeridos lo cual puede generar procesos de fermentación no factibles económicamente. Con impulsores más grandes, las máximas

fuerzas de corte en el líquido que se pueden experimentar pueden incrementar a una velocidad de agitación dada (Wynn et al., 2016). Fuerzas de corte elevadas pueden tener un impacto directo en la fisiología e inclusive en la viabilidad de las células productoras. Así mismo, excesivas fuerzas de corte pueden producir un impacto en la calidad del producto, particularmente en aquellos de naturaleza proteica.

El escalamiento de los sistemas de fermentación es intrínsecamente complicado debido a la combinación de diferentes causas: las ecuaciones representativas del proceso no se pueden resolver (y frecuentemente ni siquiera se puede expresar), parámetros físicos, biológicos y químicos están interconectados, las soluciones obtenidas en el laboratorio y a nivel planta piloto no son válidos para la escala comercial y el funcionamiento del equipo actual al tamaño comercial es desconocido o ni siquiera se ha probado. La solución de ingeniería para alcanzar escalamientos exitosos es la similitud geométrica cuando sea posible y algunos criterios de escalamiento (Tabla 6).

Tabla 6. Criterios de escalamiento comúnmente empleados.	
Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	$k_L a$
Potencia por unidad de volumen	P_0/V
Flujo volumétrico del gas	V_G/V
Velocidad de la punta del impulsor	nD_i
Velocidad de agitación	N
Tiempo de mezclado	θ_{mix}

La lógica detrás del razonamiento para el uso de criterios de escalamiento obedece al hecho de mantener constantes las características correspondientes del ambiente extracelular en las diferentes escalas. Si las propiedades ambientales influyen de manera crítica para la productividad del microorganismo, se puede lograr un escalamiento exitoso cuando éstas se mantienen constantes (García-Ochoa & Gomez, 2009).

Un escalamiento satisfactorio puede requerir procedimientos empíricos en el cual el volumen del reactor se va incrementando progresivamente hasta llegar al volumen de tamaño industrial. Dicho procedimiento puede ser muy demandante en tiempo y recursos económicos (Wynn et al., 2016). En el caso de los procesos biológicos, un factor de escalamiento de 10, se considera como un factor seguro, a consecuencia de la falta de control de todos los elementos que tienen efecto en el desarrollo del proceso de fermentación (Nauha et al., 2015).

Los criterios de escalamiento más usados en la industria son: (i) potencia volumétrica (P_0/V); (ii) coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_{L,a}$); (iii) velocidad de la punta del impulsor (V_{tip}); (iv) y la concentración de oxígeno disuelto (Imamoglu & Sukan, 2013). El $k_{L,a}$ es el criterio más usado para los procesos de escalamiento; debido a que, en el caso de las fermentaciones aerobias, el principal problema es la alimentación de oxígeno. Sin embargo, una adecuada alimentación de oxígeno no asegura un buen mezclado (Junker, 2004). De hecho, todos estos parámetros están relacionados uno con otro y también a las variables del bioproceso. Siempre se debe tratar de seleccionar como base de escalamiento la propiedad de transporte más crítica para el rendimiento del bioproceso; lo cual no es sencillo de determinar, debido a la potencial sensibilidad y las diversas respuestas de las células a cada fenómeno de transporte influenciado por el tamaño del agitador, la velocidad de agitación y aireación (Xia et al., 2016).

Los diferentes trabajos de escalamiento reportados muestran que el escalamiento basado en un coeficiente P_g/V constante incrementa la velocidad de corte en el líquido hasta en un 28% y que el uso de un número Reynolds constante en el impulsor no es un buen criterio de escalamiento, porque resulta en valores de P_g/V muy bajos, lo cual puede provocar deficiencias en el mezclado. El criterio V_{tip} tiene algunas ventajas en el caso de que se empleen microorganismos sensibles a efectos de corte inducidos por el agitador. Los mejores criterios y los más usados para el escalamiento de bioprocesos aerobios es mantener el suministro de potencia por unidad volumen (P_0/V) y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa constante $k_{L,a}$ (García-Ochoa & Gomez, 2009).

Los escalamientos realizados para *E. coli* y cultivos de levaduras están ampliamente basados en mantener equivalencias en C_L , $k_{L,a}$ y VTO. En estas fermentaciones, el oxígeno es el sustrato limitante, debido a las altas velocidades específicas de consumo de estos microorganismos, además el efecto que tiene la viscosidad del medio en la transferencia de oxígeno es despreciable, a diferencia de como sucede en los cultivos de hongos filamentosos y cuando hay producción de polímeros extracelulares; donde la viscosidad tiene un efecto negativo en los valores de $k_{L,a}$ (Díaz-Barrera, Gutierrez, Martínez, & Altamirano, 2014). La reología del medio del cultivo es menos importante para las fermentaciones donde se emplean bacterias y levaduras en comparación con las magnitudes de las velocidades de consumo específico de sustratos, por lo que

escalamiento basado en C_L , VTO o k_La regularmente es exitoso para estos cultivos de alta densidad celular y viscosidad moderada (Junker, 2004).

En la Figura 2 se esquematiza de manera general el efecto que tiene potencia volumétrica suministrada al cultivo y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa sobre la concentración de un producto obtenido a partir de un bioproceso, este comportamiento hiperbólico puede encontrarse en todos los microorganismos. Lo mejor, es seleccionar las variables de operación cuando la concentración del producto ya no aumente y ésta sea máxima (Quintero Ramírez, 1981). Otros factores tales como requerimientos de energía, conveniencia de operación y disponibilidad de equipo deben considerarse para determinar el valor óptimo de escalamiento de k_La y Pg/V .

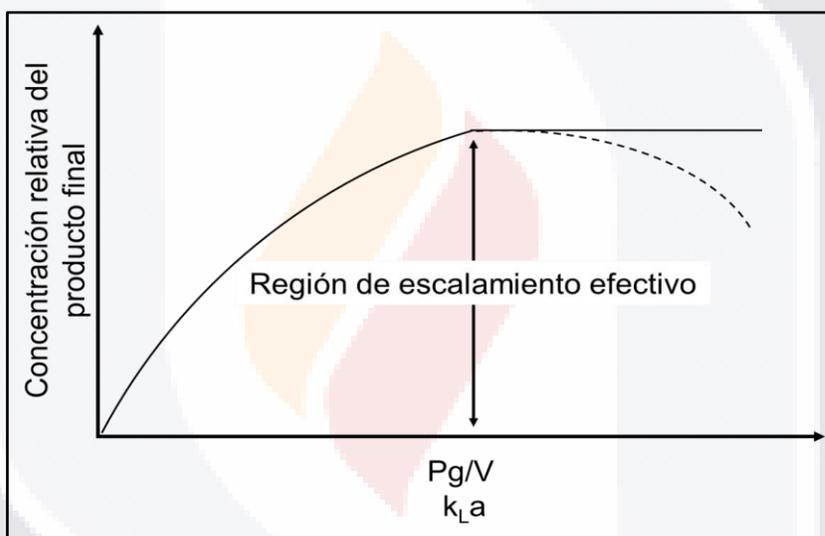


Figura 2. Dependencia de la concentración del producto biotecnológico en función de los criterios de escalamiento k_La o Pg/V (adaptado de Quintero-Ramírez (1981)).

El escalado basado en una VTO constante, asume que la velocidad de transferencia de oxígeno es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO); es decir, $VTO = VCO$. Si se mantiene constante la temperatura y la presión en el sistema de fermentación, entonces el gradiente $C^* - C_L$ no se verá afectado y el k_La será el único factor que deberá ser tomado en cuenta para el diseño del biorreactor, asumiendo que la acumulación de oxígeno está dada por la ecuación 2.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_La(C_L^* - C_L) - q_{O_2}X \quad (2)$$

Dónde C_L^* y C_L son la concentración de oxígeno en el líquido de saturación y al tiempo t respectivamente, q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno y X la concentración de biomasa al tiempo t .

La mayoría de los procesos de escalamiento están centrados en asegurar un adecuado grado de mezclado y de transferencia de masa entre las fases gaseosa y líquida conforme la escala del bioproceso incrementa. A pesar, de la gran variedad de escalamientos exitosos realizados bajo diferentes términos par diferentes cultivos y proceso de fermentación, aún no existe un solo acercamiento universal que pueda ser aplicado. Parece ser que no existe una estrategia común y universal aplicable. Esto se debe a que los procesos de fermentación realizados en biorreactores son sistemas muy complejos, dado que la célula es un ente viviente, tiene un mecanismo de control preciso el cual muestra diferentes respuestas a perturbaciones ambientales en diferentes escalas. Esto es creído, es la principal causa de varios problemas del escalamiento.

El entendimiento del efecto de las heterogeneidades sobre las células en el biorreactor es de gran importancia para el escalamiento racional de bioprocesos industriales (Wang et al., 2015). Un escalamiento racional es vital, a pesar del microorganismo o el producto objetivo, para la transferencia de un bioproceso de escala laboratorio a escala de producción industrial. La estimación de la sensibilidad de los parámetros específicos en el rendimiento del proceso en la escala industrial es de interés básico.

1.5. Escalado de bioprocesos con *Pichia pastoris*.

En el caso del escalamiento de bioprocesos con *P. pastoris* está bien definido que la VTO (descrita a su vez por el k_{La}) entre las fases líquido-gas determina la productividad del proceso de fermentación (Tervasmäki, Latva-Kokko, Taskila, & Tanskanen, 2018). Mediante el uso de modelos de crecimiento en función del k_{La} y Pg/V , con rangos de entre 250-500 h^{-1} y 0.25-1.0 W/L respectivamente, y en base a datos experimentales del cultivo de diferentes cepas de *P. pastoris*, se encontró que el principal factor que afecta el crecimiento celular en reactores de diferente escala son los niveles de OD.

Teóricamente para biorreactores de hasta 10 m^3 , los perfiles de concentración de oxígeno disuelto se mantienen uniformes, y mediante el incremento en el suministro de potencia de agitación de 0.25 hasta 1.0 W/L podría ser suficiente para incrementar los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

niveles de oxígeno disuelto y prevenir la limitación de éste. Sin embargo, en biorreactores mayores de 10 m³ los gradientes de concentración de OD son más pronunciados en dirección axial del biorreactor, este efecto es más intenso cuando la velocidad superficial del gas es baja, además el incremento en la potencia de agitación para estas escalas no es suficiente para sobrepasar dicha situación (Tervasmäki et al., 2018).

En base a los resultados obtenidos, la disminución en el rendimiento celular durante el escalamiento se atribuye principalmente al incremento en el tiempo de residencia de la fase gaseosa y a la depleción del oxígeno, así como a la misma variación en la concentración de OD a lo largo del biorreactor. Así mismo, el incremento en la potencia de agitación resulta en mínimas mejoras del rendimiento de la fermentación, por lo que altos suministros de energía a gran escala no son recomendados. Por lo tanto, el mejoramiento en la capacidad de manejo del gas del agitador a niveles moderados de suministro de potencia, y el mejoramiento global del mezclado en el biorreactor podrían mejorar significativamente el rendimiento de la fermentación a gran escala (Tervasmäki et al., 2018).

Particularmente, existen pocos trabajos reportados sobre procesos de escalamiento de tecnología de fermentaciones basada en cepas recombinantes de *P. pastoris*. En especial aquellos trabajos donde se realiza un escalamiento basados en un criterio de escalamiento común, pues en su mayoría de los reportes de escalamiento disponibles proceden con solo el cambio de volumen y configuración geométrica del biorreactor; sin el análisis previo de la ingeniería del proceso de fermentación.

Por ejemplo, la factibilidad de la producción a gran escala de una quitinasa humana recombinante mediante expresión constitutiva con el *pGAP* se ha demostrado en cultivos continuos de 21 L (Schilling, Goodrick, & Wan, 2001). En estos cultivos se alcanzó una concentración estable de proteína de 250 mg/L y una densidad celular de 110 g/L base seca, con una velocidad de dilución de 0.042 h⁻¹ alcanzando una productividad de 10 U/L*h.

A partir de los datos de cultivo continuo se determinó una velocidad de consumo de oxígeno de 150 mmol/L h, la cual puede ser cubierta con un k_{La} de 846 h⁻¹ bajo las condiciones con las que se realizó el cultivo. Los autores proponen se puede realizar un escalamiento exitoso manteniendo k_{La} y Pg/V (8 W/L) constantes hasta un biorreactor de 1500 L, del mismo cultivo continuo con una velocidad de dilución de hasta 0.05 h⁻¹,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

manteniendo los rendimientos alcanzado en los cultivos de 21 L y empleando aire convencional para el suministro de oxígeno (Schilling et al., 2001).

Otros autores también han realizado el escalamiento del proceso de fermentación para la producción de lipasa recombinante (bajo el pAOX1), desde biorreactores “miniatura” de 0.012 L hasta biorreactor de 1500 L empleando una VTO de 230 mmol/L*h como criterio de escalamiento (Schmieder et al., 2015). El éxito del proceso de escalamiento quedo demostrado cuando en las tres escalas del bioproceso la concentración de biomasa y la actividad lipasa fue la misma. De esta manera la concentración de biomasa seca alcanzada en las tres escalas fue de alrededor de 60 g/L y una concentración de lipasa de 1 g/L que corresponde a una actividad de alrededor de 16000 U/L con una productividad de cerca de 400 U/L*h. Debido al éxito del proceso de escalamiento, la VTO se consideró como un criterio de escalamiento adecuado para este tipo de cultivos.

Otros trabajos de escalamiento reportados con *P. pastoris* no están basados estrictamente en criterios de escalamiento de la bioingeniería. Por ejemplo, el CAD para la producción de lipasa recombinante mediante el promotor constitutivo pGAP fue escalado entre biorreactores tipo tanques mezclados de 5, 30 y 800 L (Zhao, Wang, Deng, & Wang, 2008). En los cultivos a 5 L fueron evaluadas velocidades específicas de crecimiento y se determinó una estrategia de fermentación con una μ constante de 0.15 h⁻¹ (μ -stat). Durante el escalamiento, la producción de biomasa se mantuvo constante en las tres escalas con un rendimiento $Y_{x/s}$ de 0.36 g/g. En este caso, la actividad lipasa en el caldo de fermentación incremento en las diferentes etapas de escalamiento con resultados de 2273, 7663 y hasta 14000 U/mL, en los fermentadores de 5, 30 y 800 L respectivamente, considerándose un escalamiento exitoso.(Zhao et al., 2008). Los autores atribuyen este incremento en la expresión de la lipasa a la disminución de la actividad proteolítica en los biorreactores conforme incrementan su volumen.

Para el escalamiento de procesos de fermentación con *P. pastoris*, también se han propuesto nuevas alternativas tanto para el suministro de metanol como mantener niveles adecuados de concentración de OD en el cultivo. En un trabajo, donde se utiliza la respuesta fisiológica de la levadura a la falta de metanol en el medio, se diseñó un régimen de lote alimentado con metanol en función de la concentración de OD en biorreactores de 1.5 L y 19.5 L. Los resultados de este escalamiento lograron producir igual actividad lipasa

de 164 U/mL en ambos volúmenes, con una productividad de 1100 U/L*h (Markošová, Weignerova, Rosenberg, Křen, & Rebroš, 2015).

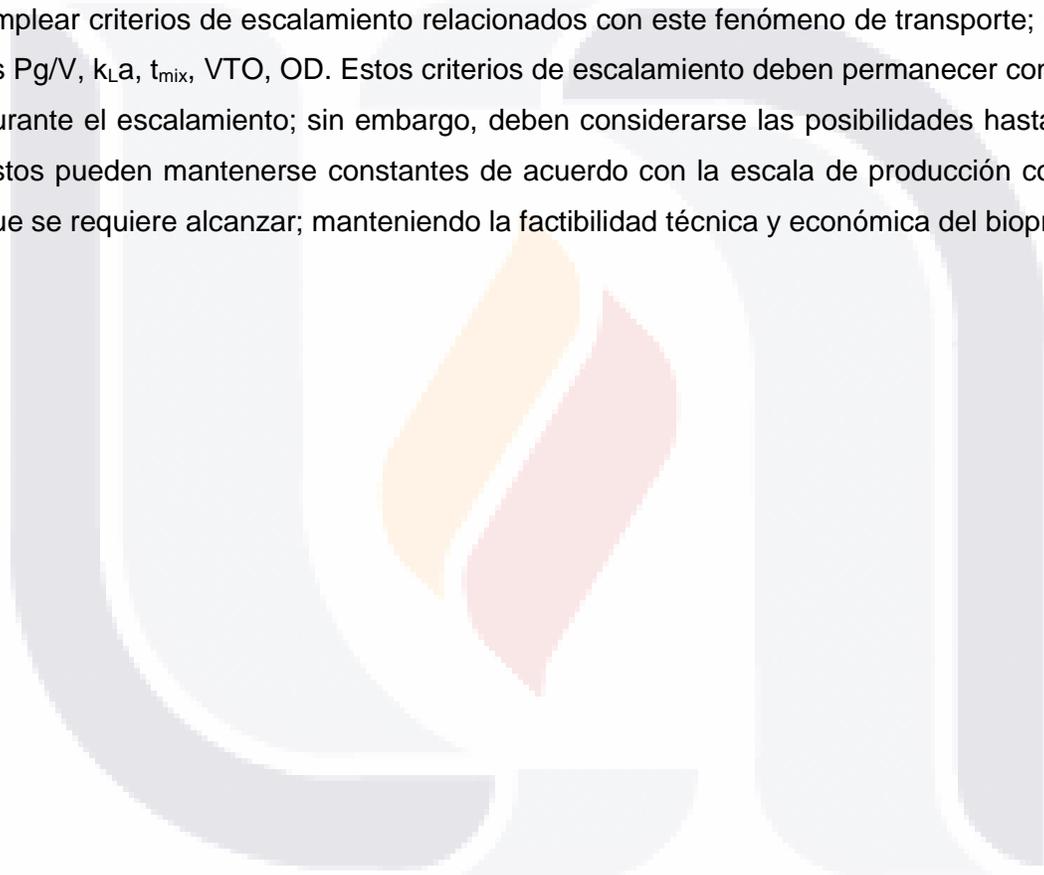
Por su parte, Cang Liu et al., (2016) propone elevar la presión dentro del biorreactor hasta en 0.1 MPa en lugar de suministrar oxígeno puro a los cultivos con *P. pastoris* durante el escalamiento. Esta estrategia fue probada en biorreactores de 10, 100 y 1000 L para la producción de una enzima glicósido hidrolasa de *Lentinula edodes*. Si bien para el escalamiento no se empleó criterio de escalamiento alguno, los resultados obtenidos en las tres escalas fueron similares. La actividad enzimática se encontró alrededor de 3.5×10^7 U/L con una productividad específica de 12 U/g*h. Así pues, la estrategia empleada resultó también en un escalamiento exitoso al mantenerse los rendimientos de la fermentación durante el escalamiento.

También se han realizado simulaciones de productividad de bioprocesos con *P. pastoris* para comparar diferentes mezclas de alimentación metanol-glicerol-sorbitol durante la fase de inducción, con biorreactores entre 10-10000 L. Para esto se predijeron valores de k_{La} entre 450-650 h^{-1} para una concentración de biomasa seca inicial de 40 g/L. los resultados indican que es necesario suministrar oxígeno puro al cultivo para alcanzar el CADC, lo cual puede incrementar considerablemente los costos de operación (Berrios et al., 2017). También concluyen, que la máxima concentración celular que puede ser alcanzada en un biorreactor está normalmente limitada por la capacidad de transferencia de oxígeno de éste.

Por último, existen varios trabajos donde el escalamiento del bioproceso se realizó a partir de la optimización de las condiciones de cultivo realizado en matraces agitados, luego nuevas estrategias de fermentación en lote alimentado son establecidas para mejorar la factibilidad de escalamiento del bioproceso; es decir, solo se reporta el cambio de geometría del sistema de biorreactor y condiciones de operación. Así por ejemplo diferentes proteínas como; (i) quimosina bovina (Noseda et al., 2013); (ii) receptores proteínicos humanos (Cerini et al., 2016); (iii) proteína anticongelante de *Glaciozyma antártica* (Tab et al., 2018); (iv) una vacuna recombinante contra la filariasis linfática (Paul, Karthik, Vimalraj, Meenakshisundaram, & Kaliraj, 2018) y (v) una enzima monoamino oxidasa (Markošová et al., 2018); son primero producidas en matraces agitados. Después el bioproceso es cambiado de escala a biorreactores de volumen máximo de escala piloto. En todos los

casos, el cambio de escala de matraz a tanque mezclado resulta en un incremento de hasta 12 veces en el título de la proteína recombinante.

Los reportes de escalamiento arriba descritos mostraron resultados exitosos cuando el proceso de escalamiento se realizó manteniendo un criterio relacionado con el suministro de oxígeno al cultivo, ya que el fenómeno de transporte limitante de estos bioprocesos es la transferencia de oxígeno. Entonces, el escalamiento de bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes con *P. pastoris* es muy probable se alcance con éxito al emplear criterios de escalamiento relacionados con este fenómeno de transporte; como lo es P_g/V , k_{La} , t_{mix} , VTO, OD. Estos criterios de escalamiento deben permanecer constantes durante el escalamiento; sin embargo, deben considerarse las posibilidades hasta donde éstos pueden mantenerse constantes de acuerdo con la escala de producción comercial que se requiere alcanzar; manteniendo la factibilidad técnica y económica del bioproceso.



2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la levadura *Pichia pastoris* es un sistema biológico de relevante importancia para la expresión de proteínas recombinantes para su aplicación en diversas áreas industriales; sin embargo, existe aún una brecha importante en el conocimiento para la puesta en marcha de este tipo de bioprocesos a escala comercial, por lo que los trabajos de escalamiento para esta levadura son de gran interés en la manufactura industrial de proteínas recombinantes. Además, el escalamiento de bioprocesos es una de las disciplinas de la biotecnología que siempre requiere del desarrollo de nuevas estrategias y procedimientos para realizarse.

De manera relevante se tiene que los bioprocesos empleados para la producción de proteínas recombinantes en cultivos de alta densidad celular con *P. pastoris* son altamente demandantes en oxígeno y energía para el manejo de biorreactores mezclados; dichas condiciones limitan su aplicación en unidades comerciales donde se tiene que optimizar los recursos disponibles. Actualmente la mayoría de los trabajos reportados sobre la producción de proteínas recombinantes con *P. pastoris* se realizan bajo condiciones operativas que no son permisibles a escala comercial. Además, hoy en día no existe disponible un estudio previo sobre el efecto de los criterios de escalamiento más comunes (Pg/V y k_La) en el rendimiento de los bioprocesos con la levadura recombinante bajo condiciones de operación a escala industrial, para determinar las condiciones óptimas de escalamiento para cepas Mut^S.

Así mismo, la enzima dextranasa tiene múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y preparación de detergentes, y si bien el mercado se encuentra saturado por grandes firmas productoras, es necesario la creación de nuevas estrategias de fermentación para su producción y mejorar la competitividad en el mercado de pequeños productores con recursos limitados para los procesos de fermentación. Del mismo modo, estas nuevas estrategias de fermentación puede ser la plataforma para la producción de otras proteínas recombinantes durante la implementación inicial de nuevos bioprocesos.

3. HIPOTESIS

El escalamiento exitoso del proceso de fermentación para la producción de dextranasa recombinante con una cepa Mut^S de *Pichia pastoris*, se logra al mantener constantes ambos criterios de escalamiento potencia gaseada volumétrica (P_g/V) y coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{LA}).



4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de dextranasa (EC 3.2.1.11) recombinante en una cepa de *Pichia pastoris* Mut^S, bajo diferentes condiciones de potenciada gaseada volumétrica (Pg/V) y coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) en procesos de fermentación a escala laboratorio. Con los resultados obtenidos en los cultivos a escala laboratorio, realizar el escalamiento del bioproceso manteniendo constantes los criterios de escalamiento Pg/V y k_{La} , así como la factibilidad económica y técnica del mismo.

4.1. Objetivos específicos.

Establecer las condiciones de operación relevantes para un proceso de escalamiento factible del bioproceso para la expresión de proteínas recombinantes con cepas Mut^S de *P. pastoris*, a partir de los resultados obtenidos en la expresión de una proteína recombinante modelo (dextranasa).

Evaluar la producción de la dextranasa recombinante y el rendimiento del bioproceso bajo diferentes condiciones de operación basadas en los criterios de escalamiento k_{La} y Pg/V, limitados a condiciones de operación encontradas en unidades de producción comercial.

Evaluar la producción de dextranasa recombinante a escala laboratorio y durante un proceso de escalamiento, empleando un medio definido y las condiciones de operación que dicten los criterios de escalamiento seleccionados manteniendo la factibilidad económica y tecnológica del bioproceso.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Banco de trabajo y microorganismo modelo.

Todos los compuestos químicos utilizados fueron grado reactivo, y en su caso en los experimentos se utilizó agua destilada. Como microorganismo modelo se utilizó una cepa Mut^s de *Pichia pastoris* que contiene el gen recombinante de la dextranasa (EC 3.2.1.11) del hongo *Talaromyces minioluteus* bajo el promotor alcohol oxidasa (pAOX1); la dextranasa recombinante es secretada al medio debido a la secuencia de señalización SUC2 (Figura 3). Dicha cepa fue construida por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba (Roca et al., 1996).

Para la generación del banco celular de trabajo se resuspendió una porción de levadura liofilizada en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio modificado de Toan (2009), composición por litro: glicerol 10 g, (NH₄)₂ SO₄ 3.0 g, KH₂PO₄ 4.3 g, MgSO₄·7H₂O 3.2 g, CaCl₂ 0.22 g, EDTA disódico 0.4 g, peptona de caseína 10 g, extracto de levadura 20 g y 4.35 mL/L de sales PTM4 (composición por litro: CuSO₄·5H₂O 2.0 g, NaI 0.08 g, MnSO₄·H₂O 3.0 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g, H₃BO₃ 0.02 g, Ca₂SO₄·2H₂O 0.5 g, ZnCl₂ 7.0 g, FeSO₄·7H₂O 22.0 g, CoCl₂ 0.5 g, H₂SO₄ 1.8 g, biotina 0.2 g; esterilizada mediante filtración). El matraz fue incubado en agitación orbital (Lab. Companion SK-300) a 125 rpm por 72 h. La biomasa generada fue recuperada en microtubos de 2 mL, lavada dos veces con medio fresco estéril, y se formaron alícuotas de 1 mL empleando el medio modificado de Toan con glicerol (50% p/V) como agente crio-protector. Las alícuotas fueron congeladas a -80 °C.

En la producción de inóculos se empleó una alícuota de células congeladas ($8 \pm 0.8 \times 10^{15}$ UFC/mL), la cual era descongelada en un baño de agua a 40 °C. La biomasa fue recuperada por centrifugación (5 min a 9900 g) y depositada en matraces de 500 mL con 100 mL de medio YPG (composición por litro: glicerol 20 g, extracto de levadura 10 g, peptona de caseína 20 g). El matraz se incubaba a temperatura laboratorio (27 °C en promedio) en un agitador orbital (Lab. Companion SK-300) a 125 rpm hasta alcanzar una Abs_{600nm} de 8-10 unidades.

Para los inóculos en los bioprocesos de 10 y 30 L se usó 0.5 y 1.5 L de medio YPG en matraces Fernbach de 2.5 L, los cuales fueron incubados a 30 °C y 125 rpm en agitación orbital.

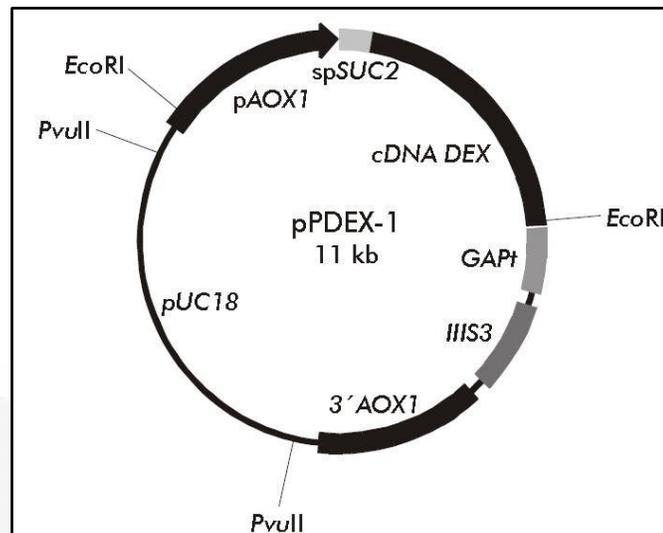


Figura 3. Vector pPDEX-1 donde se encuentra el gen codificante de la dextranasa bajo el promotor AOX1 (pAXO1), en el mismo se encuentra la secuencia de señalización SUC2, terminador GAP y el gen HIS3 de *Saccharomyces cerevisiae*, y la región 3' del gen AOX1. Tomado de García et al., (2000).

5.2. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) y potencia gaseada volumétrica (Pg/V) en biorreactor tipo tanque mezclado.

La determinación del k_{La} se realizó mediante la técnica del *gassing out* con la variante de absorción (García-Ochoa & Gomez, 2009). Para determinar el k_{La} se usó el medio de cultivo definido FM22 (composición por litro: glicerol 40.0 g, KH_2PO_4 42.9 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 11.7 g, $Ca_2SO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 g, K_2SO_4 14.3 g, NH_4SO_4 5.0 g, sales PTM4 1mL) a una temperatura de 30 °C, el oxígeno disuelto se determinó mediante sensor polarográfico en % de saturación del líquido. En el biorreactor de 3 L (Tabla 7) se usó un rango de agitación de 500 a 1000 rpm y velocidad de aireación específica (vvm) desde 0.5 hasta 2.0. La velocidad mínima de agitación fue suficiente para la completa dispersión del gas de acuerdo a la ecuación 3 (Bashiri et al., 2016). Así mismo, las velocidades de aireación empleadas no causaron fenómenos de inundación en los impulsores de acuerdo al número de flujo (Bombač & Žun, 2000). Después de integrar la ecuación 4, a partir de la recta obtenida se determinó la pendiente, la cual corresponde al valor de k_{La} .

$$N_{CD} = \frac{4Qg^{0.5}T^{0.25}}{Di^2} \quad (3)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) \quad (4)$$

La determinación experimental de P_g/V , se realizó al medir el suministro de voltaje e intensidad de corriente al servomotor de agitación bajo las diferentes velocidades de agitación (N) y aireación (vvm) usadas. También se determinó la potencia del motor trabajando en vacío para discriminar la potencia debida a la fricción (Oosterhuis & Kossen, 1981). En biorreactores donde no fue posible determinar experimentalmente la P_g/V se utilizó la ecuación de Reuss para estimar la P_g (Reuss, Bajpai, & Lenz, 1980).

$$P_g = 0.0312 Re^{0.064} Fr^{-0.156} Na^{-0.38} \left(\frac{T}{Di}\right)^{0.8} P_0 \quad (5)$$

Tabla 7. Relaciones geométricas de los biorreactores tipo tanque mezclado usados en este estudio.

Volumen nominal (V_N)	3 L	14 L	42 L
Volumen de trabajo (V_T)*	2 L	10 L	30 L
T (m)	0.13	0.21	0.26
H_T/T	2.0	2.0	2.8
No. de impulsores Rushton	2	3	3
Di (m)	0.045	0.105	0.105
Separación entre impulsores	1.4 Di	0.7 Di	1.3 Di

*El volumen de trabajo es usado como el volumen de identificación de los bioprocesos escalados.

5.3. Producción de dextranasa recombinante en matraz agitado.

En matraz de 500 mL se depositaron 100 mL de medio de cultivo modificado de Toan (2009) y se inoculó con una alícuota de 1 mL del banco celular. La incubación se realizó a temperatura laboratorio (27 °C en promedio) en agitación orbital (Lab. Companion SK-300) a 125 rpm. Después de 24 h se adicionó metanol 1% (V/V) con adiciones posteriores cada 24 h durante 4 días. Antes de la adición de metanol se recuperó 1 mL de muestra la cual fue centrifugada (10 min, 9900 g). A partir del sobrenadante se determinó la concentración de proteínas solubles y se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Los geles se hicieron con una concentración de 10% (p/V) de acrilamida.

Bajo la misma estrategia de fermentación, se usó medio de cultivo definido FM22, donde fueron probadas 3 concentraciones de metanol: 0.5, 1.0 y 1.5 % (V/V), el cual fue adicionado por pulsos cada 24 h durante 5 días. Para esto, 100 mL de medio FM22 (con una concentración inicial de glicerol de 10 g/L) en matraces de 500 mL fueron inoculados con 5 mL de un inóculo previamente desarrollado (*véase arriba*). Para evitar limitaciones por nitrógeno, antes de la inoculación se adicionó a cada matraz 0.8 mL de NH₄OH (28% p/V). Las muestras fueron recuperadas antes de cada adición de metanol para determinar glicerol, concentración de proteínas y actividad dextranasa en el sobrenadante.

De acuerdo con la densidad del metanol (0.8 g/mL), una concentración de 1.0% (V/V) corresponde a una de 8 g/L de metanol en el medio de cultivo.

5.4. Bioproceso para la producción de dextranasa recombinante.

El bioproceso a 2 L para la producción de dextranasa recombinante fue establecido en un biorreactor tipo tanque mezclado de 3 L volumen nominal (V_N) (Tabla 7), controlado mediante la estación *myControl*[®] (Applikon Biotech[®], Holanda). El bioproceso se realizó en régimen de lote alimentado (*fed-batch*). En una primera etapa (lote) con glicerol se inició con un volumen (V_0) de 1.8 L de medio definido FM22, al cual se adicionó el inóculo. La temperatura fue controlada a 30 °C y el pH se mantuvo en 5.5 (± 0.05) mediante la adición de NH₄OH al 28 % (p/V) durante la fermentación. La terminación de la etapa de lote en glicerol fue indicada por un incremento instantáneo en la concentración de OD.

Después de ser totalmente consumido el glicerol, el lote alimentado se inició con la adición de un pulso de 0.5% (V/V) de metanol (suplementado con 5 mL/L de sales PTM4) para la adaptación del cultivo al nuevo sustrato. Cuando este primer pulso de metanol se consumió totalmente (indicado por un incremento en la concentración de OD, revelando limitación de sustrato), éste se adicionó posteriormente de manera automática en función de las lecturas de OD. Para lo cual se usó un control de lazo en función de un valor de OD de 30% fijado como *set-point* (Figura 4). Cuando el OD superaba el 30%, la bomba de metanol se accionaba hasta que el OD nuevamente era igual o menor del 30%, entonces se detenía la alimentación de metanol. Para el control de la formación de espuma se adicionó antiespumante (SAG-710, Momentive[®]). La velocidad de agitación y aireación fueron ajustadas para un valor dado de k_La y Pg/V; dichas condiciones se mantuvieron

constantes durante la fermentación. Durante la fermentación se llevó un registró de la masa de metanol consumida durante la etapa de inducción.

Se recuperaron muestras durante la fermentación cada ocho horas, las cuales fueron centrifugadas (9, 950 g por 10 min) en microtubos de 2 mL previamente tarados. En el sobrenadante se determinó la concentración de glicerol y metanol, concentración de proteínas totales y la actividad dextranasa. La biomasa recuperada se secó a 60 °C durante 48 h para determinar la concentración de biomasa seca en g/L. La cinética del bioproceso se describe por las siguientes expresiones del lote alimentado:

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV \quad (6)$$

$$F_M = q_S XV \quad (8)$$

$$\frac{dPV}{dt} = q_P XV \quad (7)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{F_M}{\rho_M} \quad (9)$$

Dónde: X, concentración de biomasa seca (g/L), V, volumen de reactor (L), t, tiempo (h), μ , velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), P, actividad volumétrica dextranasa (U/L), q_P , velocidad específica de generación de producto (U/g h), F_M , flujo másico de metanol (g/h), q_S , velocidad específica de consumo de metanol (g/g h), ρ_M , densidad del metanol (800 g/L).

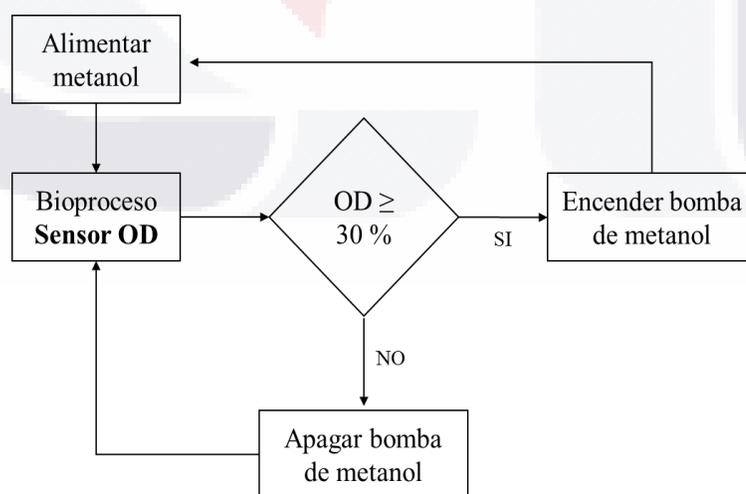


Figura 4. Algoritmo de lazo cerrado empleado para la adición automática de metanol en función del OD y la bomba de metanol del controlador del biorreactor.

5.5. Escalamiento del bioproceso

El bioproceso establecido a escala laboratorio fue escalado a volúmenes de trabajo de 10 y 30 L (Tabla 7), manteniendo k_{La} y Pg/V constantes. En las fermentaciones de 10 L se usó un biorreactor de 14 L de V_N (Labroferm New Brunswick®, NJ, USA). La etapa de lote en glicerol fue iniciada con 8.0 L de medio FM22 al cual se adicionaron 500 mL de inóculo. La adición de metanol se realizó de manera continua en base a la ecuación (8), ya que no se estableció un control de lazo cerrado como en las fermentaciones de 2 L. Los bioprocesos a 30 L fueron realizados en un biorreactor de 42 L V_N (B-Braun® U30, Diessel Biotech, Alemania). La etapa de lote en glicerol se inició con 24 L de medio FM22 y 1.5 L de inóculo. La alimentación de metanol también se realizó de manera continua en base a la ecuación (8), empleando un valor de q_s de 0.02 g/g*h. La velocidad de agitación y aireación se mantuvo constante durante la fermentación. La temperatura y pH se mantuvieron constantes en las tres escalas del bioproceso.

Los experimentos fueron realizados por triplicado ($n=3$) y el análisis estadístico incluye análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparaciones múltiples de Fischer con un nivel de significancia de 0.05, mediante el uso del programa estadístico R (Team, 2008). Para los resultados se reportan las medias ± 1 desviación estándar.

5.6. Determinación de la concentración de glicerol, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La concentración de glicerol se determinó mediante una técnica modificada de Kuhn et al. (2015). En un tubo de ensaye con 0.2 mL de muestra (en un rango de concentración de glicerol de 0-10 mg/mL) se le añadió 1 mL del reactivo de oxidación (composición por cada 100 mL: $NaIO_4$ 4.7 g, $COONH_4$ 1.13 g, CH_3COOH 10 mL), y se incubó 10 min a temperatura ambiente (27 °C temperatura promedio). Posteriormente se añadió 1 mL de solución de acetil-acetona (4.6 mL de acetil-acetona por cada 100 mL de alcohol isopropílico). La mezcla se dejó reposar por 5 min e inmediatamente se midió la absorbancia a una longitud de onda 410 nm. La concentración en las muestras se determinó a partir de una curva patrón de glicerol de 0 a 10 mg/mL.

La concentración de proteínas solubles en el sobrenadante se determinó con el uso el reactivo de Bradford, para lo cual se empleó una curva patrón de 0-1 mg/mL de albúmina

sérica bovina (BSA) y determinando la absorbancia de las muestras una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

La actividad dextranasa se determinó mediante la liberación de azúcares reductores de una solución de dextrano 2.5% (p/V) preparada a partir de un producto comercial (Rheomacrodex®, dextrano 10% en solución salina, PISA®). La muestra de reacción consistió en 400 µL de buffer de acetatos (50 mM) pH 5.0, 500 µL de solución de dextrano 2.5% (p/V) y 100 µL de muestra de dextranasa diluida; la mezcla se incubó durante 10 min a 40 °C. Los azúcares reductores liberados fueron determinados con el uso del reactivo ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se definió una unidad (U) de actividad dextranasa como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de equivalente de glucosa por minuto a 40 °C. Como control negativo se usó buffer de acetatos.

5.7. Determinación de metanol por cromatografía de gases (GC).

Para la determinación de metanol en muestras de fermentación se usó un cromatógrafo de gases TRACE® 1300 (Thermo Fischer Scientific, EUA) acoplado a un detector de ionización de flama. La columna empleada fue TG 5 SILMS® (30m, 0.25 mm con un ancho de película de 0.25µm). Se utilizó agua grado cromatográfico como solvente. La muestra se inyectó a 90 °C con un flujo de 2.4 mL/min, junto con un flujo de gas H₂ a 35 mL/min como gas acarreador. La muestra fue retenida por un periodo de 0.5 min a 40 °C, entonces la temperatura se incrementó hasta 100 °C mediante escalones de 10 °C, después se incrementó hasta 200 °C con rampas de 20 °C, al final la muestra se retuvo 1 min. La temperatura del detector fue de 300 °C. Se observó un tiempo de retención para el metanol de 1.63 min. Para determinar la concentración a partir de los espectrogramas se utilizó una curva patrón de 10 a 1000 ppm de metanol. La determinación de metanol se realizó solo en muestras obtenidas durante el tiempo de inducción en los bioprocesos.

5.8. Electroforesis SDS-PAGE para confirmar la presencia de dextranasa recombinante en caldos de fermentación.

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% (p/V) de acuerdo a Laemmli (1970). A partir de las muestras colectadas durante los cultivos, se utilizó el sobrenadante después de haber sido centrifugadas. Las muestras fueron desnaturalizadas en buffer simple por 5 min antes de ser cargadas en el gel (véase Anexo

A). Los geles con muestras se acoplaron a la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente de poder para mantener una diferencia de potencial eléctrico de 120 V, hasta que el frente de corrida alcanzó la parte inferior del gel. Para la tinción de las proteínas en los geles se utilizó la técnica del nitrato de plata de acuerdo a Chevallet et al. (2006). Véase Anexo A para más detalles de la técnica de tinción.

6. RESULTADOS

6.1. Expresión de dextranasa recombinante en matraz.

Con el objetivo de determinar la funcionalidad del *pAOX1* para ser inducido por metanol en la producción de dextranasa recombinante (rDEX) mediante la cepa recombinante Mut^S empleada se obtuvieron muestras antes y durante la adición de metanol en cultivos con matraz agitado. En la Figura 5 se muestra el patrón de bandas de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de fermentación. La zona delimitada por el rectángulo muestra el frente de corrida de las proteínas correspondiente a un peso molecular de entre 50-75 kDa. En esta área del gel se aprecia una notable banda que aparece solamente en las muestras correspondientes cuando se adicionó metanol al medio, y no se encuentra durante la etapa de crecimiento en glicerol (primeras 24 h de cultivo).

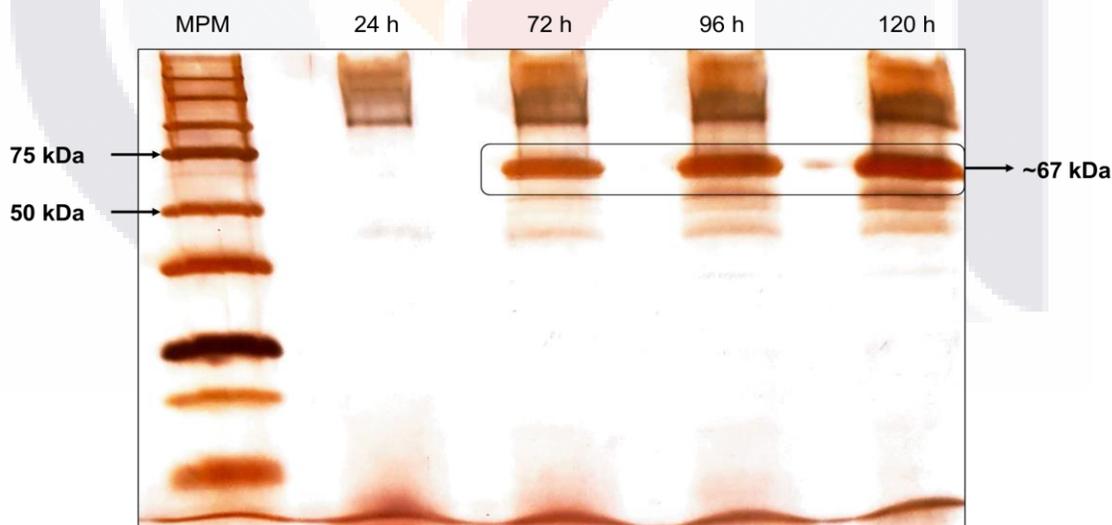


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE de muestras obtenidas en cultivos en matraz agitado con medio complejo durante la adición de metanol.

Estos resultados indican dos cosas: el pAOX1 de la cepa funciona como se espera en la presencia de glicerol y metanol y, la proteína de mayor concentración en el caldo de cultivo está asociada a la dextranasa recombinante, debido al peso molecular correspondiente a esta enzima de 67 kDa (Larsson, Andersson, Stahlberg, Kenne, & Jones, 2003). Como se aprecia en la Figura 5, la banda más representativa corresponde a aquella presente durante la inducción con metanol que está en el rango del peso de la rDEX producida.

6.1.1. Efecto de la concentración de metanol en cultivos con matraz agitado.

Para establecer el efecto que tiene la concentración de metanol en la cepa de levadura recombinante se realizó la cinética de producción de biomasa y rDEX en cultivos con matraz agitado usando el medio definido FM22. En la Figura 6 se muestran las cinéticas de producción de biomasa y dextranasa recombinante. La adición de metanol se inició a las 30 h, ya que el glicerol no fue consumido en su totalidad a las 24 h de cultivo. Se realizaron adiciones posteriores de metanol a las 48, 72 y 96 h de incubación.

La diferencia en la cinética de consumo de glicerol durante las primeras 48 h de cultivo está asociada a la técnica espectrofotométrica utilizada para determinar el glicerol. Se observó que la coloración desarrollada por la reacción de la técnica (Materiales y métodos p. 70), seguía produciendo coloración después del tiempo de reposo (5 min) por lo que, al determinar la concentración de glicerol en las diferentes muestras, las últimas en ser determinadas presentaban mayor absorbancia que las primeras (Figura 6b). Aunque en todos los cultivos se inició con 10 g/L.

Como se observa en la Figura 6d, la actividad dextranasa en el caldo se mantuvo incrementando hasta el final de la fermentación (125 h), aunque se cuantificó una disminución en la concentración de proteínas solubles en el medio (Figura 6c), es probable que una fracción importante de éstas corresponde a la rDEX, la cual es mayor conforme se adiciona más metanol al medio.

La productividad máxima también se alcanzó a las 125 h de cultivo. Los resultados obtenidos también muestran que a concentraciones de metanol superiores a 1% la producción de dextranasa disminuye hacia el final de la fermentación; con una

concentración de 1.5% la producción de rDEX disminuyó hasta en 20% con respecto al uso de 0.5%, como se aprecia también en la producción de proteínas solubles (Figura 6 c y d).

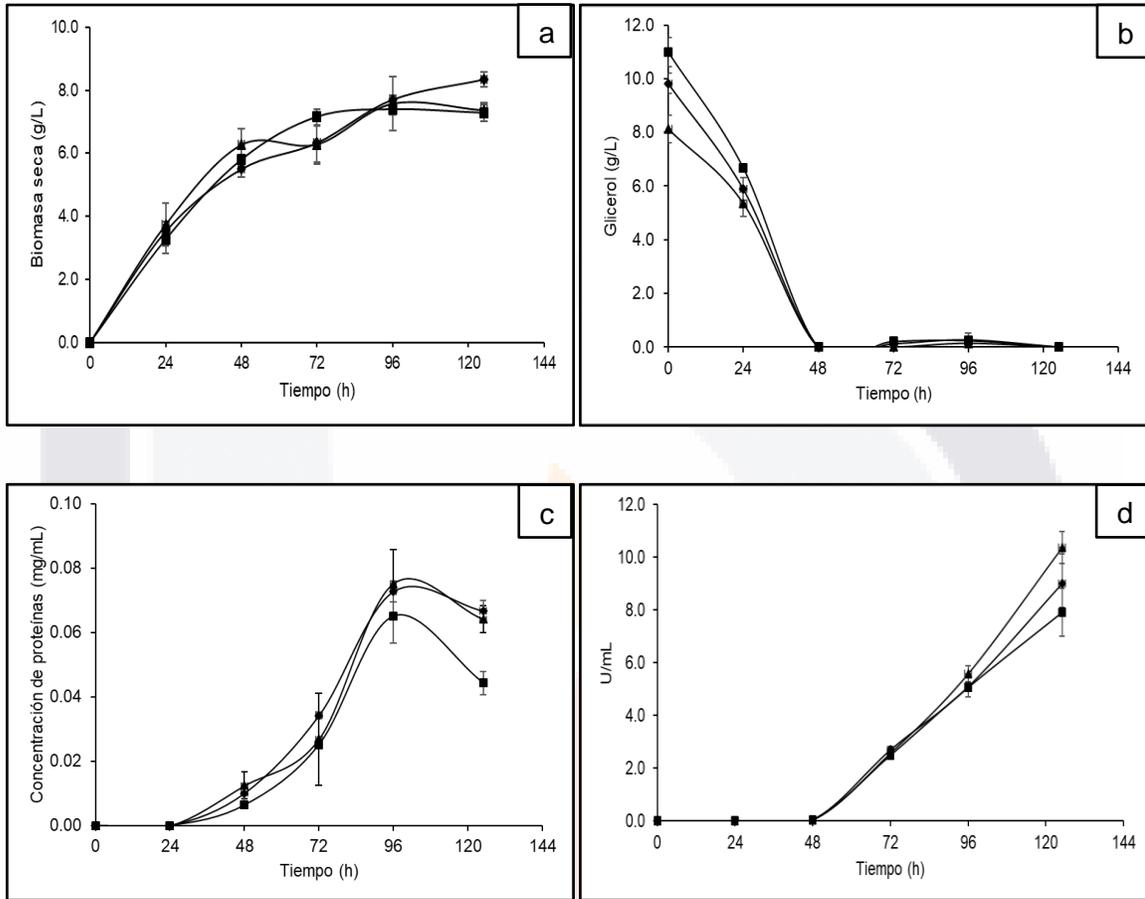


Figura 6. Caracterización cinética de la cepa *Mut^S* en cultivos con matraz con medio definido FM22, mediante la adición de pulsos de metanol. (a) producción de biomasa. (b) consumo de glicerol. (c) producción de proteínas solubles en el medio. (d) actividad dextranasa en el caldo. Cada viñeta indica la concentración del pulso de metanol empleado en % V/V: ▲ 0.5%, ◆ 1.0%, ■ 1.5%.

Los rendimientos de producción obtenidos de los cultivos en matraz de biomasa y rDEX se muestran en la Tabla 8. Durante el periodo de inducción con metanol, la velocidad específica de crecimiento fue igual en las tres concentraciones de metanol empleadas, alcanzando un valor máximo de $0.008 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$. La producción de biomasa fue mayor con el uso de 1% de metanol; sin embargo, el uso de 0.5% y 1% de metanol produjo la mayor cantidad de dextranasa recombinante. Así mismo, el mejor rendimiento producto-sustrato se obtuvo con la menor cantidad de metanol empleada. Estos resultados muestran que los mejores rendimientos de producción de rDEX requieren de concentraciones de metanol en el medio de cultivo menores a 1% (V/V), correspondiente a 8 g/L de metanol.

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de enzima dextranasa en fermentaciones con matraz agitado.

MeOH (%V/V)	X (g/L)	P _{máx} (U/mL)	q _P (U/g*h)	Y _{PS} (U/g)	P _{V máx} (U/L*h)
0.5	7.37 (0.23) ^b	10.38 (0.59) ^a	10.28 (2.73) ^a	648.53 (37.15) ^a	83.01 (4.76) ^a
1.0	8.35 (0.23) ^a	9.01 (1.11) ^{ab}	9.89 (2.05) ^a	281.44 (34.75) ^b	72.05 (8.89) ^{ab}
1.5	7.28 (0.25) ^b	7.93 (0.90) ^b	9.28 (2.45) ^a	165.13 (18.82) ^c	63.41 (7.23) ^b

X, biomasa seca [g/L]; P_{máx}, actividad dextranasa máxima [U/mL]; q_P, velocidad específica de producción [U/g*h]; P_{V máx}, Productividad volumétrica máxima [U/L*h]; Y_{PS} [U/g]. Se reportan valores de media ± (DE), con n=3. Diferente superíndice indica diferencia significativa con nivel de confianza del 95%.

6.2. Determinación de k_{LA} y Pg/V en biorreactor de 3 L (escala laboratorio).

Para evaluar diferentes condiciones de operación determinadas por los criterios de escalamiento seleccionados en la producción de rDEX, fue necesario caracterizar el k_{LA} de un biorreactor tipo tanque mezclado a escala laboratorio. La determinación de k_{LA} se realizó bajo condiciones de operación máxima de potencia gaseada de 2 W/L, con la finalidad de mantener la factibilidad técnica de escalamiento del bioproceso, ya que esta potencia corresponde a la máxima alcanzada en biorreactores de escala comercial industrial (Neubauer & Junne, 2016).

En la Figura 7 se muestra el k_{LA} en función de Pg/V alcanzado para el biorreactor de 3 L (Tabla 7). A partir de estos resultados se seleccionaron valores para elaborar tratamientos k_{LA} y Pg/V, con la finalidad analizar el efecto independiente de cada uno de estos criterios de escalamiento en el rendimiento del bioproceso. Debido a que ambas variables experimentales (criterios de escalamiento) son dependientes entre sí, se establecieron tratamientos con diferente k_{LA} y Pg/V, en donde un criterio se mantuvo constante y otro variable. De tal manera que se formaron dos diseños completamente aleatorios (DCA) de tres niveles, permitiendo así analizar de forma independiente tanto al k_{LA} como la Pg/V.

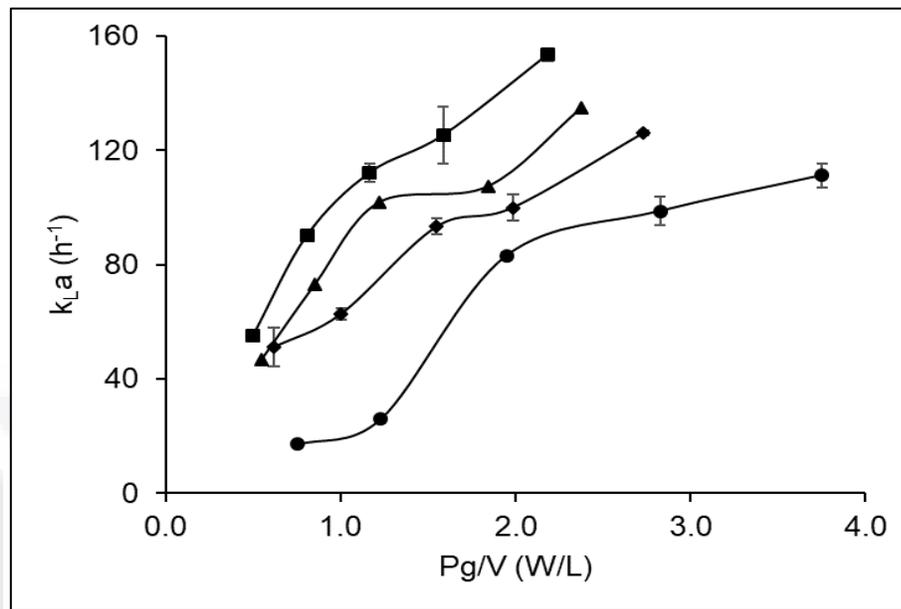


Figura 7. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) en función de la potencia gaseada volumétrica (Pg/V) en biorreactor de 3 L (escala laboratorio). Cada serie de datos corresponde a condiciones de agitación de 500 a 900 rpm y velocidades específicas de aireación: (●) 0.5, (◆) 1.0, (▲) 1.5 y (■) 2.0 vvm.

En la Tabla 9 se detallan las condiciones de operación y valores de los criterios de escalamiento determinados para los tratamientos formados. De esta manera, el DCA1 está formado por los tratamientos A, B y C, con valores de k_{La} de 83, 146 y 154 h^{-1} respectivamente en el cual la Pg/V se mantiene constante en alrededor de 2 W/L. Mientras, en el DCA2, el k_{La} se mantiene constante alrededor de 100 h^{-1} , con valores de Pg/V de 1.0, 1.5 y 1.0 W/L para los tratamientos D, E y F respectivamente.

Tabla 9. Tratamientos experimentales a escala laboratorio para estudiar el efecto de k_{La} y Pg/V en el bioproceso de producción de dextranasa recombinante (bioprocetos a 2 L).

Tratamientos experimentales	N (rpm)	Qg (vvm)	Pg/V (W/L)	k_{La} (h^{-1}) *	
DCA1	A	700	0.5	1.95	83.23 ± 0.15
	B	850	2.0	1.98	146.5 ± 3.15
	C	900	2.0	2.17	154.0 ± 2.25
DCA2	D	700	1.5	1.00	101.72 ± 4.64
	E	700	1.0	1.50	93.31 ± 2.83
	F	800	1.0	2.00	100.00 ± 4.51

* Se reportan valores promedio de $k_{La} \pm$ (DE) con $n=3$. Para Pg/V se obtuvieron valores constantes.

También se determinó k_{LA} con una Pg/V de más de 2 W/L, donde se obtuvieron tres tratamientos en los cuales se mantuvo un k_{LA} constante de alrededor de 240 h^{-1} , con una potencia creciente de 3.11, 4.24 y 7.42 W/L. En este caso, estos resultados no fueron considerados para el escalamiento, ya que no mantienen la restricción de factibilidad técnica de condiciones máximas de operación encontradas a escala industrial.

6.3. Bioproceso para la producción de dextranasa recombinante.

El bioproceso para la producción rDEX se realizó bajo las condiciones de operación establecidas por los tratamientos de los DCA 1 y 2 (Tabla 9). Con estas condiciones de operación los cultivos se desarrollaron limitados en oxígeno, ya que la capacidad de transferencia del biorreactor fue superada por la demanda de oxígeno del cultivo; además aunado al hecho que no se usó oxígeno puro en los cultivos, para mantener la factibilidad técnica de escalamiento y la implementación a escala industrial del bioproceso. La cinética general de los bioprocesos es representada en la Figura 8, donde se plasman cuatro diferentes bioprocesos con diferentes condiciones de k_{LA} y una Pg/V de 2.0 W/L. Los cultivos fueron evaluados en procesos de fermentación de 100 h. Durante este periodo de fermentación tanto las velocidades de aireación y agitación se mantuvieron constantes.

La velocidad específica de crecimiento (μ) se vio afectada de manera proporcional con los valores de k_{LA} empleados, de esta manera los bioprocesos con un k_{LA} mayor de 100 h^{-1} crecieron más rápido. En la Tabla 10 se indica la velocidad específica de crecimiento en glicerol (μ_{GII}) alcanzada para cada tratamiento. Aunque se observó una diferencia en la μ de los diferentes cultivos en la etapa de lote con glicerol, la generación de biomasa alcanzada fue similar entre los tratamientos, obteniéndose un rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S \text{ GII}}$) de 0.631. De esta manera, la biomasa inicial en la etapa de lote alimentado con metanol (etapa de inducción) fue similar en todos los tratamientos; sin embargo, la duración de la etapa de inducción fue diferente entre tratamientos.

Después de la adición del primer pulso de metanol al cultivo, se observó un periodo de adaptación de alrededor de 7 h, independientemente de las condiciones de operación usadas en el cultivo. Después del periodo de adaptación, la adición de metanol se realizó en pulsos de acuerdo con los niveles de concentración de OD. Como se aprecia en la Figura 8, cada pico en la línea de %OD es una adición de metanol. A mayor concentración de

biomasa, el intervalo de tiempo entre pulsos se fue reduciendo, debido al incremento en la velocidad volumétrica de consumo de metanol ($Q=q_sXV$).

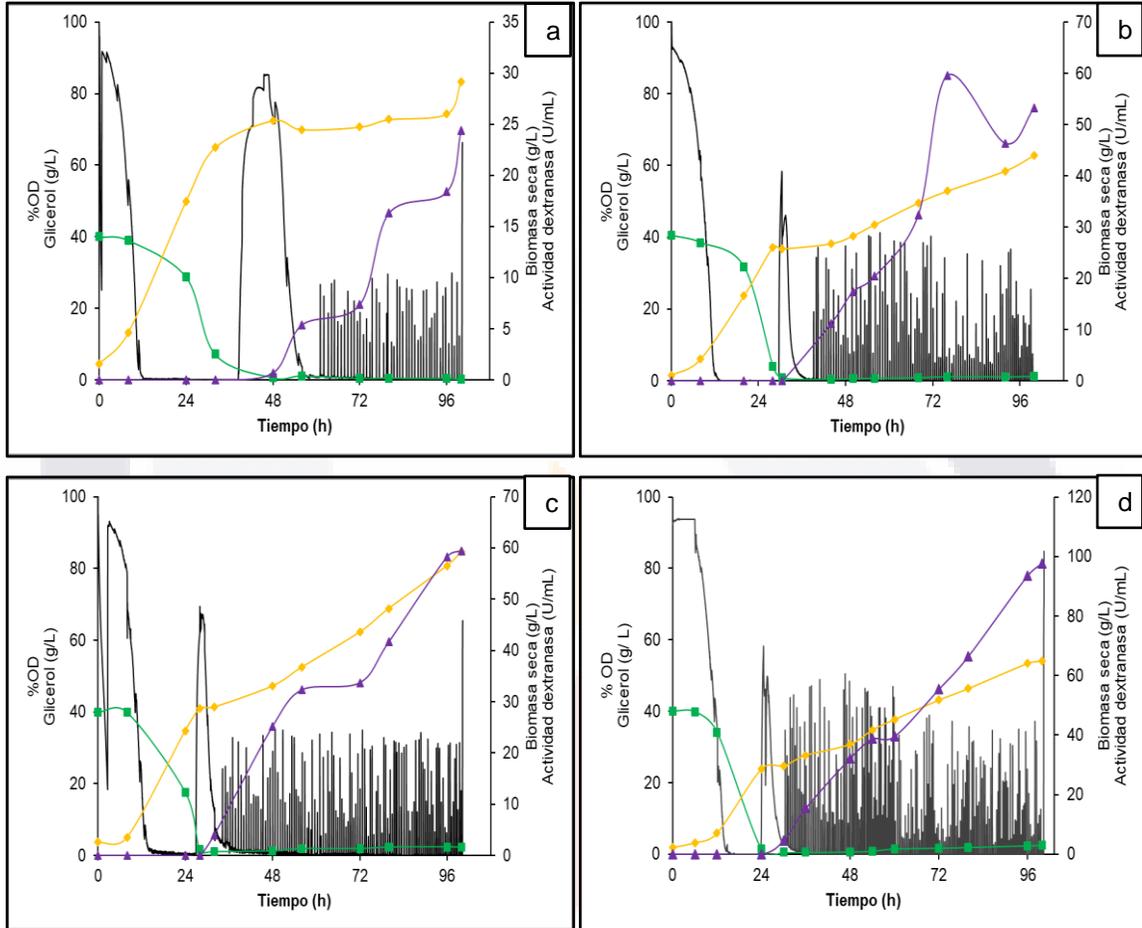


Figura 8. Cinéticas de producción de dextranasa recombinante en bioprocesos escala laboratorio (2 L) bajo diferentes condiciones de operación ($P_{g/V}$ constante de 2 W/L). (a) $k_{La}= 83 \text{ h}^{-1}$. (b) $k_{La}= 100 \text{ h}^{-1}$. (c) $k_{La}= 146 \text{ h}^{-1}$. (d) $k_{La}= 154 \text{ h}^{-1}$. (—) %OD, (■) Consumo de glicerol, (♦) Producción de biomasa seca, (▲) Producción de enzima dextranasa.

La μ_{Gli} máxima en glicerol se alcanzó cuando la concentración de OD alcanzó niveles críticos de 0%. Así mismo, durante el lote alimentado con metanol el OD también se mantuvo en 0%, indicando condiciones limitadas de oxígeno (CLO). Además, debido a la forma de adición de metanol (Figura 4), éste no se acumuló en el caldo de cultivo como más adelante se presenta (Figura 9), indicando que durante la inducción el cultivo se mantuvo limitado también por la disponibilidad de FCE.

Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento en la etapa lote con glicerol de los cultivos bajo las diferentes condiciones de operación de los DCA 1 y 2.

Tratamiento	Pg/V (W/L)	k _{LA} (h ⁻¹)	μ _{Gli} (h ⁻¹)
A	1.95	83.23	0.078 (0.005) ^b
B	1.98	146.5	0.099 (0.013) ^{ab}
C	2.17	154.0	0.106 (0.000) ^a
D	1.00	101.7	0.077 (0.002) ^b
E	1.50	93.3	0.060 (0.003) ^b
F	2.00	100.0	0.105 (0.011) ^a

Resultados ANOVA mostrados por cada DCA. Valores de media ± (DE) son presentados, n=3. Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Durante el periodo de inducción el metanol se mantuvo en concentraciones inferiores a 0.5 g/L (Figura 9). Salvo en el caso de la muestra obtenida del bioproceso con un k_{LA}= 100 h⁻¹ y una Pg/V = 1.0 W/L (Figura 9, viñetas de triángulos), la primer lectura de metanol se obtuvo justo al inicio de la etapa de inducción, que es cuando se adicionó el primer pulso de metanol para alcanzar una concentración de 4 g/L en el caldo; de ahí que se registró una concentración de más de 2.0 g/L. Mediciones posteriores, después de que la levadura se adaptó al metanol, éste se mantuvo en concentraciones cercanas a 0 g/L (Figura 9). En este caso, para todos los tratamientos de k_{LA} y Pg/V se determinó una velocidad específica de consumo de metanol (q_S) de 0.02 g/g*h.

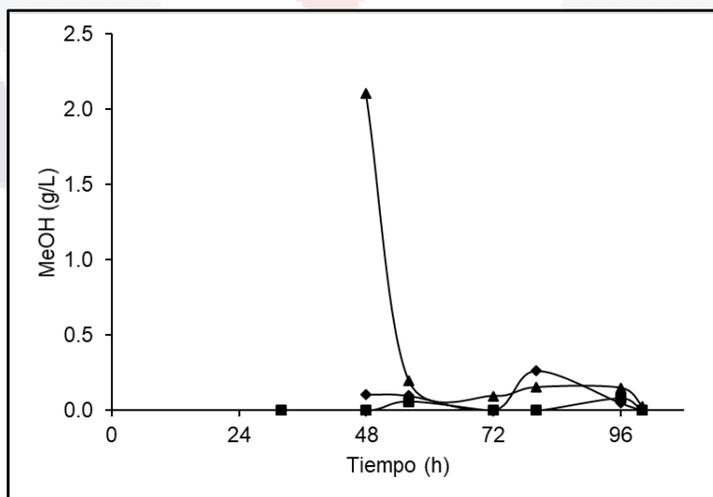


Figura 9. Perfil de concentración de metanol en tres fermentaciones independientes a 2 L con diferentes condiciones de operación. (▲) k_{LA}= 100 h⁻¹ (1.0 W/L), (◆) k_{LA}= 100 h⁻¹ (2.0 W/L), (■) k_{LA}=154 h⁻¹ (2.0 W/L).

Durante el periodo de inducción, la falta de metanol detenía la producción de rDEX y biomasa, lo cual es típico de productos asociados al crecimiento, así como al comportamiento del pAOX1. Así mismo fue muy característico que la viabilidad del cultivo se podía monitorear a través del pH; dado que el proceso tiende a la acidificación, el consumo continuo de hidróxido de amonio indicaba que las células continuaban viables en el cultivo. Ante cualquier incremento en el pH arriba de 5.5, indicaba que el cultivo se encontraba inhibido o se había perdido en su totalidad la viabilidad celular. En fermentaciones donde ocurrió este fenómeno, mediante la corrección del pH no se logró reestablecer el cultivo.

6.4. Efecto de los criterios de escalamiento k_{La} y Pg/V en la producción de dextranasa recombinante.

El rendimiento de la producción de dextranasa recombinante en función de las condiciones de operación fijadas por criterios de escalamiento, fue analizado en bioprocesos de 2 L, los cuales a su vez se realizaron bajo condiciones de operación constantes de acuerdo con los tratamientos fijados en la Tabla 9.

Anteriormente se describió que en la etapa de lote con glicerol el k_{La} influye de manera directa sobre la velocidad específica de crecimiento (Tabla 10). En la etapa de lote alimentado con metanol (etapa de inducción), el efecto del k_{La} también fue directamente proporcional en la producción de biomasa y dextranasa recombinante. En la Tabla 11 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de la etapa de lote alimentado obtenidos de los bioprocesos a 2 L. El coeficiente Pg/V presentó un efecto directamente proporcional sobre la producción de dextranasa, sin embargo, debido al valor de k_{La} usado en estos tratamientos de 100 h^{-1} , el rendimiento general de los bioprocesos se mantuvo por debajo del alcanzado con el máximo k_{La} de 154 h^{-1} .

La producción de dextranasa en función de k_{La} y Pg/V , donde uno de los criterios de escalamiento permanece constante, se muestra en la Figura 10. En las fermentaciones realizadas, la actividad dextranasa máxima se alcanzó al final del tiempo de fermentación (100 h) al igual que la productividad volumétrica. En las Figuras 10 b y c, los resultados corresponden a diferentes valores de k_{La} con una Pg/V constante de 2 W/L , como el tratamiento F del DCA 2 también tiene una potencia igual a la usada en el DCA 1, también

se incorporaron los resultados de este tratamiento en las Figuras b y c. Por otro lado, en las Figuras 10 d y e, el k_{LA} es constante alrededor de 100 h^{-1} , solo se incluyen los resultados de los tratamientos D, E y F (Tabla 9).

De acuerdo con el análisis de regresión para μ_{MeOH} en función de k_{LA} y Pg/V , con los resultados obtenidos dentro del rango de Pg/V empleado, solamente el k_{LA} tiene un efecto significativo en esta variable cinética, mientras que el efecto de Pg/V es despreciable (nivel de significancia del 5%). Así, en base a estos resultados un ajuste de regresión entre k_{LA} y μ_{MeOH} arroja una curva descrita por la ecuación (10) con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.89. Esta ecuación puede encontrar aplicación en bioprocesos para la estimación de la velocidad de crecimiento de cultivos de cepas de *P. pastoris* Mut^S bajo condiciones de operación a escala industrial; donde se tengan condiciones limitadas de oxígeno y metanol. En la Figura 10a se muestran tanto valores experimentales obtenidos como la línea de tendencia descrita por la ecuación 10 para valores de μ_{MeOH} en función del k_{LA} , esto para cultivos con una Pg/V de entre 1 y 2 W/L.

$$\mu_{MeOH} = 0.017 \ln(k_{LA}) - 0.07 \quad (10)$$

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos del bioproceso para la producción de dextranasa recombinante durante la fase de lote alimentado. Resultados obtenidos de los tratamientos del DCA1 donde se incrementa k_{La} , y el DCA2 para variación en Pg/V con k_{La} constante.

Tratamiento (Pg/V , k_{La})	μ_{MeOH}	$Y_{XS, MeOH}$	$P_{m\acute{a}x}$	$P_V m\acute{a}x$	Y_{PS}	V_{MeOH}/V_0
DCA 1						
A (1.95, 83.2)	0.003 (0.001) ^b	0.097 (0.04) ^b	23.79 (0.80) ^c	242.94 (3.93) ^c	827.94 (38.30) ^{ab}	0.04 (0.01) ^b
B (1.98, 146.5)	0.012 (0.001) ^a	0.437 (0.06) ^a	60.45 (6.19) ^b	644.52 (34.14) ^b	778.24 (107.45) ^b	0.11 (0.01) ^a
C (2.17, 153.5)	0.013 (0.001) ^a	0.410 (0.01) ^a	97.34 (0.52) ^a	973.37 (5.19) ^a	964.80 (58.70) ^a	0.12 (0.03) ^a
DCA 2						
D (1.0, 101.7)	0.005 (0.000) ^b	0.362 (0.11) ^a	33.53 (0.18) ^b	335.31 (1.79) ^b	1239.01 (99.41) ^a	0.04 (0.00) ^b
E (1.5, 93.3)	0.003 (0.001) ^b	0.133 (0.02) ^b	27.50 (4.22) ^b	277.13 (35.61) ^b	859.48 (208.41) ^a	0.03 (0.01) ^b
F (2.0, 100.0)	0.009 (0.001) ^a	0.338 (0.05) ^a	54.52 (1.82) ^a	545.26 (18.22) ^a	1103.82 (80.41) ^a	0.07 (0.00) ^a

μ_{MeOH} [h^{-1}]; $Y_{XS, MeOH}$ [g/g]; $P_{m\acute{a}x}$, actividad dextranasa máxima [U/mL]; $P_V m\acute{a}x$, Productividad volumétrica máxima [U/L*h]; Y_{PS} [U/g], V_{MeOH}/V_0 , consumo específico de metanol. Se reporta el promedio \pm (DE) de cada tratamiento para $n= 3$. Para cada DCA se realizó un ANOVA, diferentes superíndices indican diferencia significativa con un nivel de confianza de 95%.

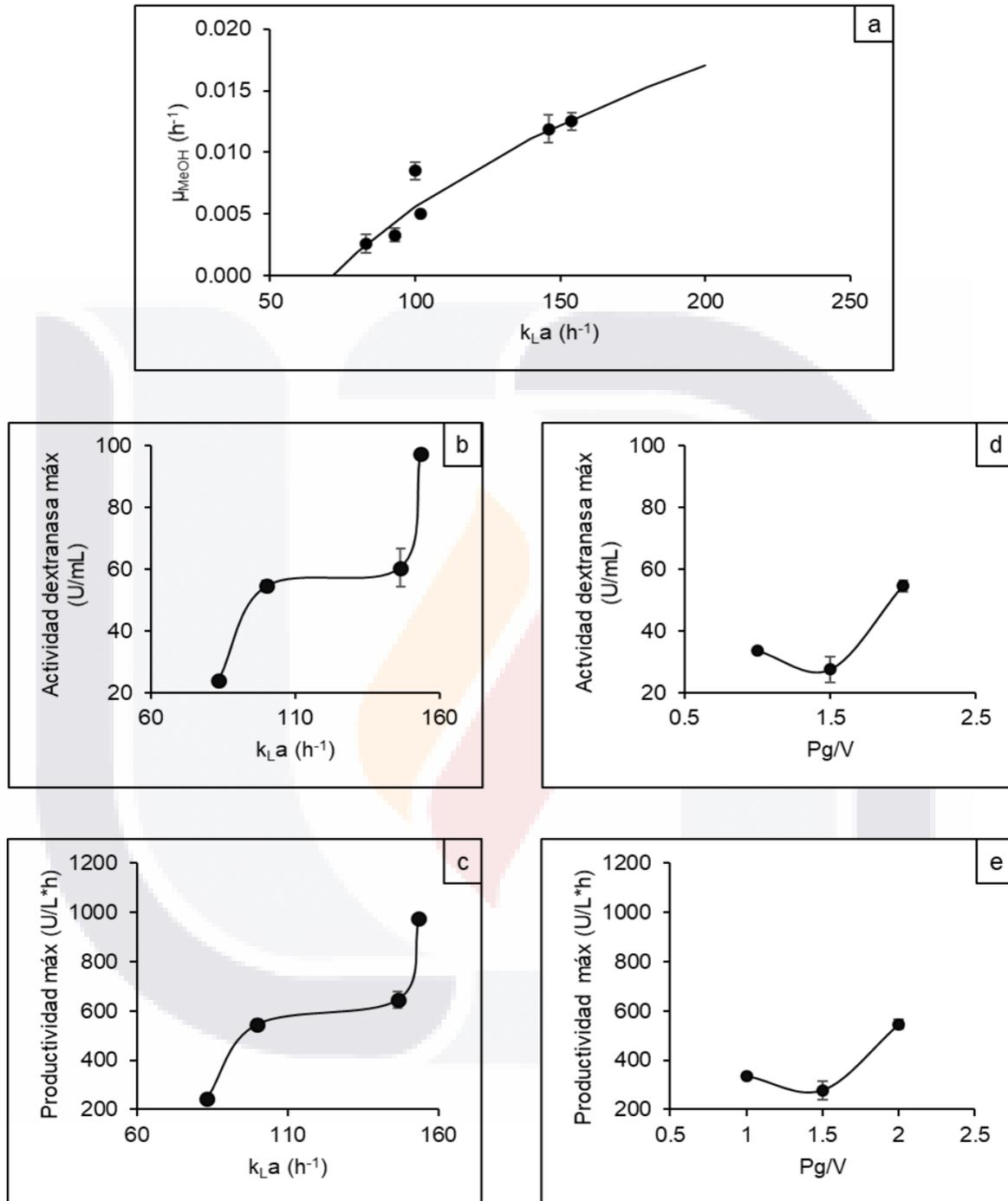


Figura 10. Efecto de $k_L a$ y Pg/V en la fermentación para la producción de dextranasa recombinante durante la etapa de inducción con metanol. (a) Velocidad específica de crecimiento, las viñetas corresponden a valores experimentales obtenidos de los tratamientos A-F de los DCA 1 y 2; la línea sólida corresponde a los valores de μ_{MeOH} predichos por la ecuación 10. (b) y (d) Actividad dextranasa máxima. (c) y (e) Productividad volumétrica máxima. En el caso de las figuras (b) y (c) corresponden a los resultados obtenidos con los tratamientos con una $Pg/V = 2.0$ W/L constante. Mientras que las figuras (d) y (e) corresponden a aquellos tratamientos con un $k_L a$ constante alrededor de $100 h^{-1}$ con valores de Pg/V de 1.0 a 2.0 W/L.

Dado que los tiempos de inducción fueron diferentes entre los tratamientos a las 100 h de fermentación (en función del tiempo de la etapa de lote en glicerol), se determinó un cociente de consumo de metanol específico (V_{MeOH}/V_0), el cual es directamente proporcional al consumo de metanol. A su vez, la producción de rDEX fue proporcional al consumo de metanol (Tabla 11). El valor de Y_{PS} resultó ser estadísticamente igual en todos los tratamientos solo para el DCA 2, mientras que en los experimentos con el DCA 1 éste incrementó hasta en 16% y 23% en el tratamiento C con respecto a los tratamientos A y B, respectivamente (Tabla 11). En cada uno de los DCA analizados, el efecto en la variación de k_{LA} y Pg/V resultó estadísticamente en la misma velocidad específica de producción (q_P). En el caso del DCA1, la q_P promedio fue de 17.33 ± 3.22 U/g*h, mientras que para el DCA2 fue de 18.45 ± 3.16 U/g*h.

El objetivo de establecer dos DCA (uno para cada criterio de escalamiento), fue el de determinar a escala laboratorio las condiciones de operación para ser escaladas, así como el de observar el efecto de condiciones limitantes encontradas a escala comercial en la producción de dextranasa recombinante. En este orden, para ambos DCA los valores más altos de k_{LA} y Pg/V fueron los de mejor rendimiento y producción de dextranasa recombinante (Tabla 11). Así pues, al comparar los tratamientos C y F, el primero fue el de mayor productividad y velocidad específica de crecimiento en metanol. Las condiciones del tratamiento C fueron seleccionados para llevar a cabo el escalamiento con k_{LA} constante.

Cómo se había descrito en la sección de resultados para la determinación de k_{LA} (pág. 75), también se realizaron bioprocesos con una Pg/V superior de 2 W/L y un k_{LA} constante alrededor de 240 h^{-1} . En estos experimentos, se analizó una Pg/V creciente de 3.11, 4.24 y 7.42 W/L. Durante el crecimiento en la etapa de lote con glicerol, la producción de biomasa fue similar a la observada en experimentos con una Pg/V de hasta 2 W/L, el rendimiento obtenido fue de 0.63 ± 0.03 g/g para estos tratamientos (G, H, I). en cuanto a la velocidad específica de crecimiento en glicerol, ésta también fue estadísticamente igual entre los tres valores de Pg/V , con un valor promedio de $0.14 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$. Así pues, el k_{LA} parece describir el fenómeno de transferencia limitante del bioproceso. En la Tabla 12 se presentan los rendimientos y parámetros cinéticos de los bioprocesos bajo estas condiciones durante la etapa de lote alimentado.

Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos durante la etapa de lote alimentado con metanol en bioprocesos a 2 L bajo condiciones de operación mayor a 2 W/L y un k_{La} contante de 240 h^{-1} .

Tratamiento (Pg/V)	μ_{MeOH}	$Y_{XS MeOH}$	P_{MAX}	$P_{V MAX}$	Y_{PS}	V_{MeOH}/V_0
G (3.11)	0.015 (0.002) ^b	0.42 (0.00) ^a	50.07 (15.58) ^a	722.26 (152.01) ^a	377.06 (233.85) ^a	0.31 (0.02) ^b
H (4.24)	0.017 (0.000) ^{ab}	0.44 (0.03) ^a	49.29 (27.68) ^a	707.26 (144.55) ^a	295.14 (234.99) ^a	0.38 (0.03) ^{ab}
I (7.42)	0.018 (0.000) ^a	0.40 (0.01) ^a	42.16 (2.24) ^a	636.92 (73.00) ^a	208.35 (61.19) ^a	0.40 (0.05) ^a

μ_{MeOH} [h^{-1}]; $Y_{XS MeOH}$ [g/g]; $P_{m\acute{a}x}$, actividad dextranasa máxima [U/mL]; $P_{V m\acute{a}x}$, Productividad volumétrica máxima [U/L*h]; Y_{PS} [U/g], V_{MeOH}/V_0 , consumo específico de metanol. Se muestran el promedio \pm (DE) para n= 3. Diferentes superíndices indican diferencia significativa con un nivel de confianza de 95%.

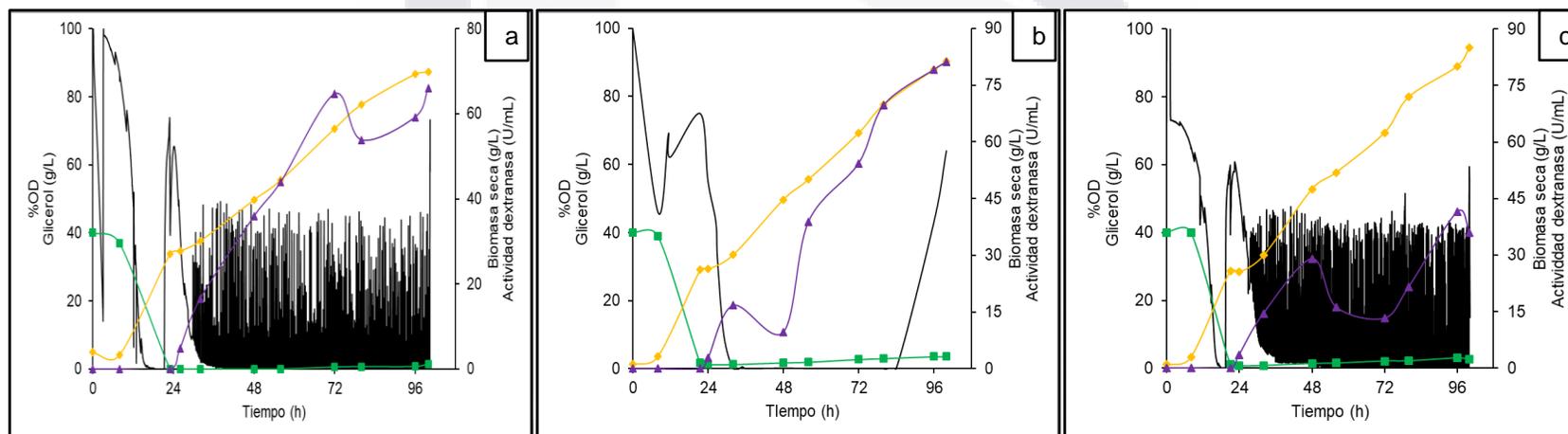


Figura 11. Cinética del bioproceso de producción de dextranasa recombinante con k_{La} de 240 h^{-1} . (a) $P_g/V = 3.11$ W/L, (b) $P_g/V = 4.24$ W/L, (c) $P_g/V = 7.42$ W/L. (—) %OD, (■) Consumo de glicerol, (♦) Producción de biomasa seca, (▲) Producción de enzima dextranasa.

Como se aprecia en la Figura 11, aun con un k_{La} de 240 h^{-1} los bioprocesos también se desarrollaron bajo CLO tanto en la etapa de lote en glicerol como durante la etapa de inducción con metanol. Si bien, durante la etapa de lote en glicerol, el tiempo de limitación de oxígeno fue menor en comparación con los experimentos realizados con los tratamientos A-F (Figura 8); en los cultivos con este valor alto de k_{La} la VTO también fue sobrepasada por la demanda de oxígeno del cultivo. La etapa en lote para estos bioprocesos concluyó a las 21 h, mientras que para valores de k_{La} de hasta 153 h^{-1} el final de esta etapa se alcanzó a las 24 h.

En el caso de la Figura 11b, la cinética del OD fue registrada manualmente, por lo cual que no hay un registro continuo de las lecturas y no se aprecian los picos instantáneos de OD durante la etapa de inducción como en las figuras a y c. Lo interesante de estos bioprocesos (Tabla 12), es la concentración de biomasa que se pudo alcanzar al final de la fermentación (100 h) la cual fue alrededor de los 80 g/L. Es de suponerse que una mayor concentración de biomasa producirá más dextranasa. Sin embargo, a diferencia de los bioprocesos con los tratamientos A-F, en la mayoría de éstos bajo las condiciones de los tratamientos G, H e I, la máxima producción de dextranasa se alcanzaba antes de finalizar el bioproceso, la cual coincidía cuando se alcanzaban más de 60 g/L de biomasa seca. Mismo fenómeno se presentó con la productividad máxima. Los cultivos se mantuvieron viables durante las 100 h, ya que el metanol se siguió consumiendo sin acumulación (datos no mostrados), así como el hidróxido de amonio.

Los resultados obtenidos en estos experimentos ($k_{La} = 240 \text{ h}^{-1}$) no indican efecto alguno en la producción de la rDEX con la variación de Pg/V de entre 3.11 y 7.42 W/L (Tabla 12). Así mismo, la q_S alcanzada también fue de $0.02 \text{ g/g}\cdot\text{h}$ para todos los tratamientos. Mientras la q_P , promedio fue de $16.80 \pm 5.47 \text{ U/g}\cdot\text{h}$ entre los experimentos con los tratamientos G, H e I. También, con estos experimentos no se alcanzó la actividad dextranasa máxima de cerca de 100 U/mL obtenida con el tratamiento C (Tabla 11). En cuanto a rendimiento de biomasa-metanol, éste fue igual al observado en los bioprocesos con tratamientos A-F. Por otro lado, el rendimiento producto-metanol se vio disminuido hasta 3 veces en comparación con los mismos experimentos (Tabla 12).

Si bien con los experimentos de los tratamientos G-I, se alcanza una μ_{MeOH} más alta y una producción de biomasa mayor que con los tratamiento A-F, la producción de la

dextranasa en estos cultivos fue menor que la observada en los tratamiento B y C; estos resultados indican que valores altos de k_{La} que conducen a cultivos de altas densidades celulares (>60 g/L) pueden perjudicar la expresión de la proteína recombinante debido a la falta de oxígeno. Aunado al hecho, que estas condiciones de Pg/V mayores a 2 W/L no son factibles para el escalamiento bajo una Pg/V constante. Por tal razón, el escalamiento del proceso de producción de dextranasa recombinante se realizó en base a las condiciones del tratamiento C (Tabla 9).

6.5. Escalamiento del bioproceso.

El escalamiento del bioproceso fue realizado en volúmenes de trabajo de 10 y 30 L (Tabla 7). Se mantuvieron constantes los criterios de escalamiento (k_{La} y Pg/V) de los bioprocesos a 2 L del tratamiento C. En cuanto a la alimentación de metanol, ésta se realizó con un perfil exponencial (ecuación 11) predeterminado en función de q_s (0.02 g/g*h) y μ_{MeOH} (0.012 h⁻¹) los cuales fueron valores obtenidos de los bioprocesos a 2 L con el tratamiento C (Tabla 11). El perfil de alimentación de metanol durante el tiempo de inducción se muestra en la Figura 12, comenzando la inducción con 25 g/L de biomasa seca.

$$F_{MeOH} = \frac{0.02X_0V_0e^{0.012t}}{0.8} [=] \frac{mL}{h} \quad (11)$$

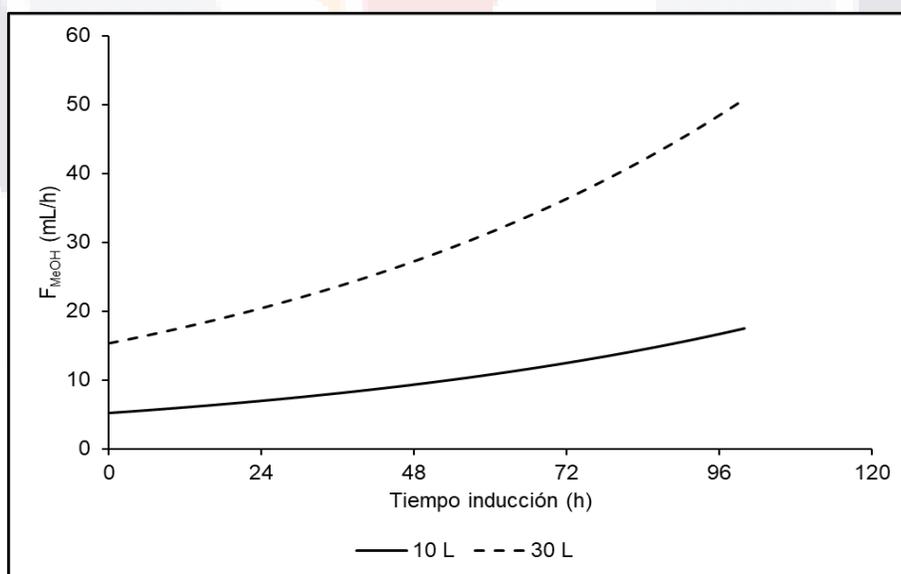


Figura 12. Perfil de alimentación del metanol en los bioprocesos a 10 y 30 L, donde el metanol se adicionó de manera continua de acuerdo con la ecuación (11).

En la etapa de crecimiento de lote con glicerol, los resultados obtenidos en bioprocesos a 10 y 30 L fueron iguales a los conseguidos en los experimentos a 2 L. La μ_{GII} alcanzada fue de $0.11 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$ y $0.14 \pm 0.020 \text{ h}^{-1}$ en las fermentaciones de 10 y 30 L respectivamente; las cuales son estadísticamente iguales a la obtenida a 2 L (0.11 h^{-1}). En cuanto a la producción de biomasa se observó un ligero aumento en las fermentaciones a 10 L, alcanzando una concentración de biomasa seca de $30.04 \pm 1.49 \text{ g/L}$. En los bioprocesos a 2 y 30 L la concentración de biomasa al inicio del lote alimentado fue de 28.43 ± 0.28 y $26.56 \pm 0.66 \text{ g/L}$ respectivamente. El incremento de biomasa en los bioprocesos de 10 L puede atribuirse a glicerol remanente en los inóculos empleados.

Durante la etapa de lote alimentado con metanol, existió una diferencia importante en la producción de la dextranasa recombinante y una ligera disminución en la generación de biomasa (aunque estadísticamente es igual entre escalas). En la Figura 13 se muestran las cinéticas de producción de biomasa y proteínas en los bioprocesos escalados. Mientras que en la Tabla 13 se indican los rendimientos obtenidos en rDEX durante la etapa de inducción en las tres escalas del bioproceso.

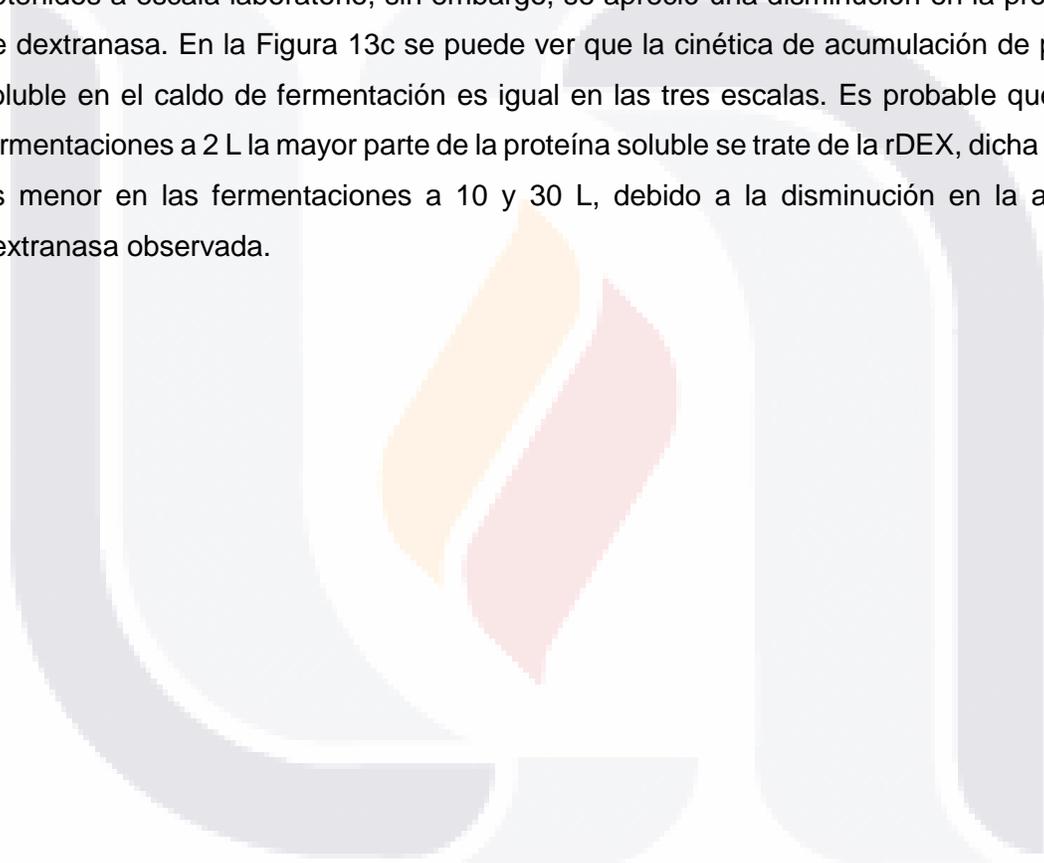
En los bioprocesos escalados también se alcanzaron condiciones limitadas de oxígeno, al superarse la VTO de los biorreactores por la VCO de las levaduras. Debido al cambio de la estrategia de alimentación de metanol, hubo periodos de acumulación de metanol durante el lote alimentado (etapa de inducción). En la Figura 14 se detalla el perfil de concentración de metanol alcanzado con la alimentación exponencial usada para los bioprocesos de 10 y 30 L. Para evitar altas acumulaciones de metanol en el medio, durante el muestreo se pausaba la alimentación de metanol y se reanudaba hasta que se observaba limitación de sustrato (incremento en la lectura de OD). La acumulación de metanol más importante se observó en los cultivos de 10 L.

Si bien la producción de biomasa se mantuvo durante el proceso de escalamiento, así como el consumo de metanol (Tabla 13), la producción de dextranasa recombinante se vio disminuida en los bioprocesos a 10 y 30 L. En las tres escalas la actividad dextranasa máxima en el caldo de fermentación se alcanzó a las 100 h de fermentación. Sin embargo, a 10 y 30 L se observó una disminución de 40 y 35% respectivamente en la actividad dextranasa máxima en comparación con el bioproceso a 2 L de tratamiento C. Aunque el V_{MeOH}/V_0 fue similar entre las escalas, se obtuvo una disminución en la producción de rDEX,

por lo tanto, el rendimiento producto sustrato disminuyó en un 15 y 38% en los bioprocesos a 10 y 30 L respectivamente.

Por otro lado, la q_p fue igual en los cultivos a 2 y 10 L (alrededor de 20 U/g*h), mientras que en los cultivos a 30 L ésta disminuyó hasta 14 U/g*h. En cuanto a la productividad máxima, ésta descendió entre 33-35% en los experimentos a 10 y 30 L.

En este punto, la producción de biomasa pudo ser escalada a partir de los resultados obtenidos a escala laboratorio, sin embargo, se apreció una disminución en la producción de dextranasa. En la Figura 13c se puede ver que la cinética de acumulación de proteína soluble en el caldo de fermentación es igual en las tres escalas. Es probable que en las fermentaciones a 2 L la mayor parte de la proteína soluble se trate de la rDEX, dicha fracción es menor en las fermentaciones a 10 y 30 L, debido a la disminución en la actividad dextranasa observada.



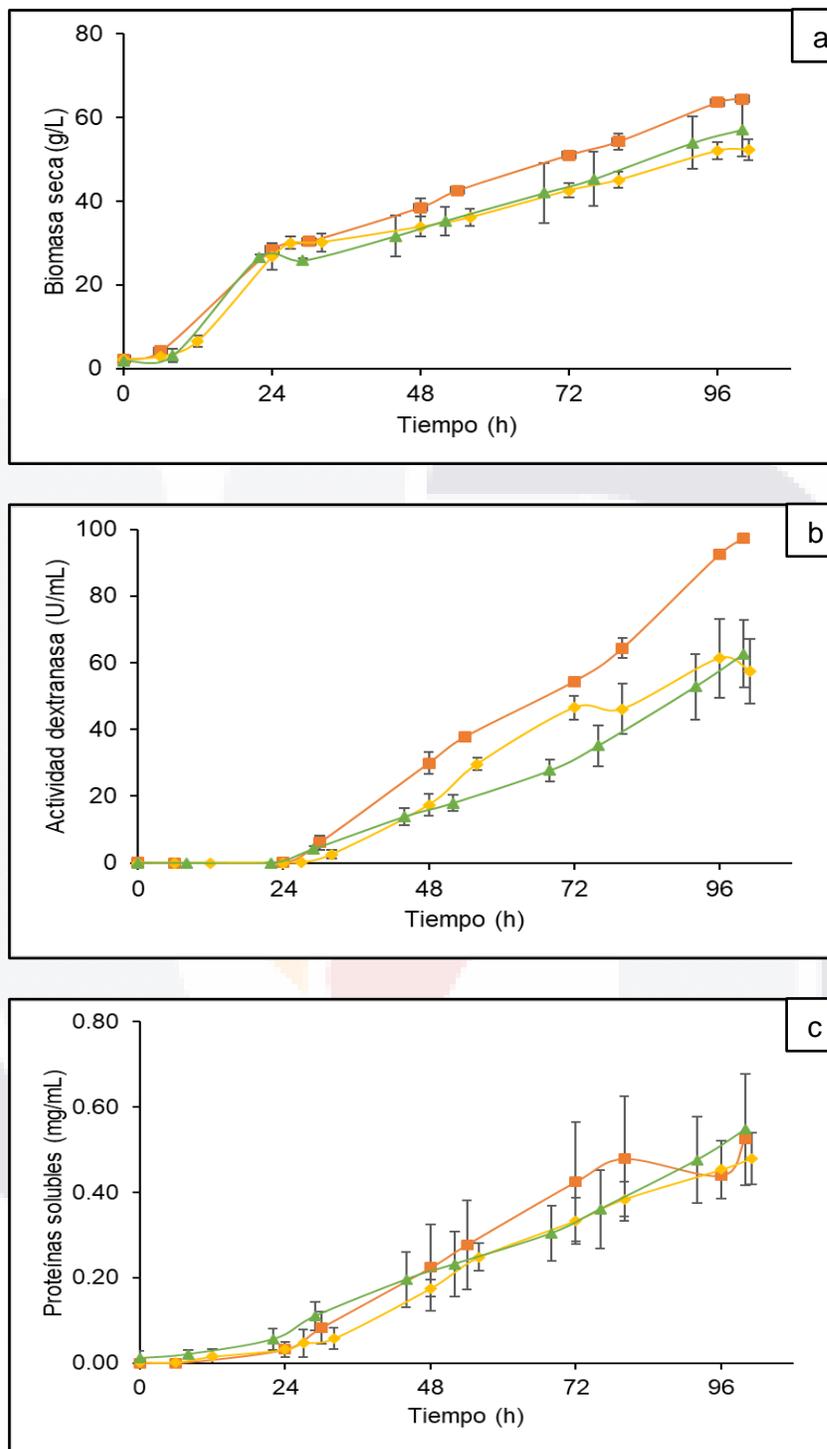


Figura 13. Cinéticas de los bioprocesos escalados. (a) Concentración de biomasa en base seca, (b) actividad dextranasa y (c) concentración de proteínas solubles en el caldo. (■) 2L, (◆) 10 L y (▲) 30 L.

Tabla 13. Rendimientos y velocidad específica de crecimiento en metanol obtenida en los bioprocesos escalados con k_{La} y Pg/V constante.

Volumen de escalamiento	μ_{MeOH}	$Y_{XS, MeOH}$	P_{MAX}	$P_{V MAX}$	Y_{PS}	V_{MeOH}/V_0
2 L*	0.013 (0.001) ^a	0.410 (0.01) ^a	97.34 (0.52) ^a	973.37 (5.19) ^a	964.80 (58.70) ^a	0.12 (0.03) ^a
10 L	0.010 (0.000) ^b	0.327 (0.04) ^a	59.33 (8.37) ^b	653.98 (54.29) ^b	814.46 (209.27) ^{ab}	0.10 (0.00) ^a
30 L	0.013 (0.001) ^a	0.339 (0.03) ^a	62.64 (10.13) ^b	626.40 (101.35) ^b	600.82 (34.61) ^b	0.14 (0.02) ^a

μ_{MeOH} [h^{-1}]; $Y_{XS MeOH}$ [g/g]; $P_{m\acute{a}x}$, actividad dextranasa máxima [U/mL]; $P_{v m\acute{a}x}$, Productividad volumétrica máxima [U/L*h]; Y_{PS} [U/g], V_{MeOH}/V_0 , consumo específico de metanol. Se muestran resultados del promedio \pm (DE) con $n=3$. Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre escalas con un nivel de confianza del 95%. *Bioproceso a 2 L con un $k_{La}=154 h^{-1}$ y una $Pg/V=2.0 W/L$.

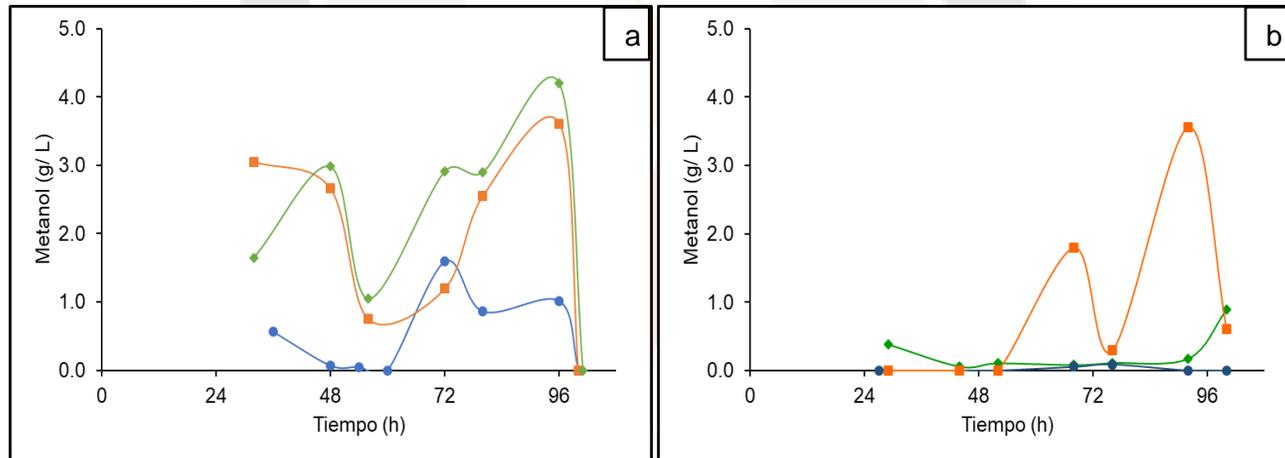


Figura 14. Perfil de concentración de metanol en bioprocesos escalados en los cuales se usó una alimentación de metanol continua exponencial en función de la μ_{MeOH} y q_s : (a) 10 L, (b) 30 L. Cada serie de datos representa una fermentación diferente.

6.6. Estabilidad de la dextranasa recombinante en el caldo de fermentación.

En los experimentos realizados la concentración de proteína soluble en el caldo fue proporcional a la actividad dextranasa en el mismo. Si bien una de las ventajas de cepas recombinantes de *P. pastoris* es la producción de proteínas excretadas al medio, donde la mayor parte corresponde a la proteína recombinante, una desventaja importante es la excreción de proteínas endógenas por procesos de lisis celular, entre las que se encuentran las proteasas (López-Pérez & González-Cervantes, 2014). En este caso la producción de rDEX puede verse comprometida por degradación debida a la acción de proteasas liberadas al medio.

Para descartar esta posibilidad, fueron realizadas mediciones de actividad dextranasa en tres caldos obtenidos al final de tres bioprocesos diferentes a 2 L. Alícuotas de estos caldos con biomasa fueron incubados a 30 °C durante 120 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Cambio en la actividad dextranasa de tres muestras caldos después de ser incubados a 30 °C durante 120 h.

Muestra	Actividad inicial (U/mL)	Actividad final (U/mL)	%Cambio actividad
1	17.48	16.7	-4.3
2	19.1	16.2	-15
3	17.4	17.3	-0.7

Los resultados reflejan que las muestras 1 y 2 son las que mayor pérdida de actividad dextranasa registraron, cabe destacar que estas muestras corresponden a cultivos de alta potencia ($Pg/V > 2.0$ W/L). En la muestra 3, la pérdida de actividad dextranasa fue menor al 1% después del tiempo de incubación, lo cual puede reflejar un menor contenido de proteasas libres en el caldo de fermentación. La muestra 3 corresponde a un cultivo con $Pg/V = 2.0$ W/L.

En la Figura 15 se muestra el gel de electroforesis de un cultivo realizado con un k_{La} de 240 h^{-1} ($Pg/V = 7.4$ W/L). De este mismo cultivo se tomó la muestra 2 (Tabla 14), que es la correspondiente a las 100 h de cultivo. En este gel se indica la banda correspondiente al peso de la dextranasa de 67 kDa (Roca et al., 1996). Dicha banda no está presente durante el crecimiento en glicerol (primeras 21 horas de fermentación). La banda correspondiente a la rDEX aparece en las muestras recuperadas durante la etapa de inducción en lote alimentado con metanol (a partir de las 21 h de cultivo).

Conforme el tiempo de fermentación avanza, la banda va ganando tamaño, pero a la vez comienzan a aparecer un barrido de proteínas en los carriles de separación. El barrido de bandas indica la presencia de diferentes proteínas en el caldo o en su caso la presencia de restos de proteínas, las cuales van incrementado en cantidad con el tiempo de fermentación. Esta presencia de otras proteínas en el caldo puede deberse al fenómeno de lisis celular en los cultivos durante la inducción con metanol, lo cual a su vez puede liberar proteasas al medio que pueden causar la degradación de la dextranasa recombinante, como paso con esta muestra 2 (Tabla 14).

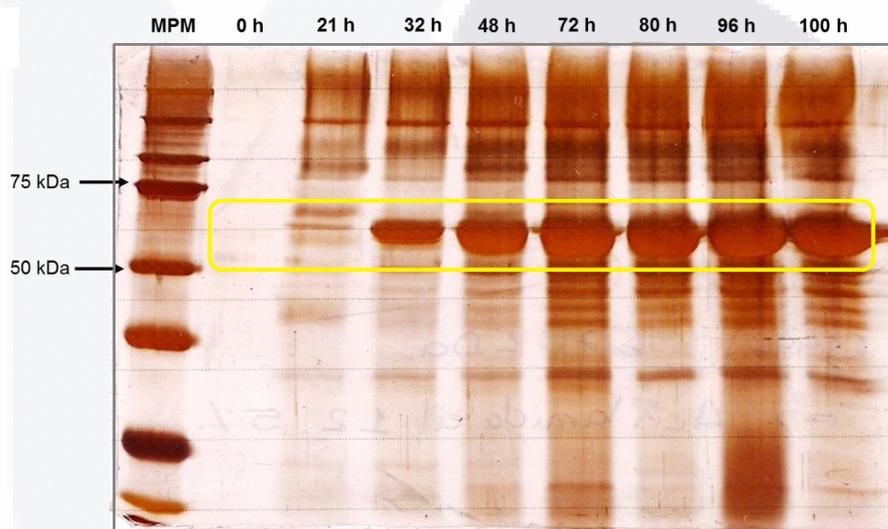


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE de muestras de caldo de fermentación a diferente tiempo de inducción bajo condiciones de operación de $k_L a = 240 \text{ h}^{-1}$. La muestra 2 corresponde al tiempo de fermentación de 100 h. En el rectángulo amarillo se indica la banda que corresponde al peso de la dextranasa (67 kDa).

7. DISCUSIÓN

El uso de promotores inducibles para la expresión de proteínas recombinantes como el *pAOX1* de *P. pastoris*, permite el establecimiento de procesos de fermentación que pueden ser controlados a conveniencia para incrementar la productividad del bioproceso (Potvin et al., 2012). En este trabajo la producción de dextranasa recombinante se realizó bajo el control del *pAOX1*. Como se observa en la Figura 5, este promotor es altamente inducible por el metanol y reprimido por glicerol, pues en este caso la enzima dextranasa solo se produjo en cuanto el metanol fue adicionado en los cultivos con matraz agitado (y como se detallas más adelante, la enzima solo se produce durante la etapa de inducción

con metanol). Por lo tanto, los cultivos en matraz indican que la cepa de levadura empleada funciona de acuerdo con el vector recombinante de construcción usado (Figura 3).

Durante el crecimiento en glicerol no se detectó la presencia de la banda distintiva de la rDEX, ni tampoco otras proteínas en el sobrenadante (Figura 5). El peso de la rDEX ha sido previamente reportado de 67 kDa determinado también por la resolución de muestras de caldos clarificados en geles de poliacrilamida (Roca et al., 1996). Los autores también reportaron un progresivo incremento en la banda correspondiente a la dextranasa durante la fermentación, y también represento el producto más abundante en el medio de cultivo clarificado.

La concentración de metanol durante el periodo de inducción para proteínas recombinantes bajo el control del pAOX1 es de gran relevancia porque es la FCE, la que determina la productividad de los bioprocesos (Khatri & Hoffmann, 2006b; Kupcsulik & Sevilla, 2004). En el caso de la cepa recombinante aquí empleada se realizaron cultivos en matraz agitado para observar el efecto de la adición de metanol mediante pulsos de diferente concentración. Los resultados obtenidos (Tabla 8) muestran que la mayor producción de biomasa (8.35 g/L) se alcanzó con una concentración de 1.0% (V/V) de metanol, mientras que 0.5 y 1.5% produjeron estadísticamente la misma biomasa. Por un lado, una concentración de metanol de 0.5% puede resultar en un limitado suministro de FCE donde se ve comprometida la síntesis de biomasa, desviándose una parte de la FCE a la síntesis de la enzima (Calik et al., 2015); mientras que, al usar una concentración de 1.5% se pudieron dar fenómenos de inhibición de crecimiento que deriva en una baja producción de biomasa, que a su vez afectó la producción de rDEX (Gurramkonda et al., 2009).

Por otro lado, la mayor producción de la rDEX se obtuvo con 0.5 y 1.0% (4 y 8 g/L de metanol respectivamente) con una actividad dextranasa máxima de entre 9-10 U/mL. De acuerdo con los resultados obtenidos, a mayor cantidad sustrato empleado Y_{PS} disminuyó. La disminución en Y_{PS} , obedece a que una menor cantidad de enzima fue producida, a pesar de un incremento en la cantidad de metanol suministrado. Esta menor producción de rDEX como se ha descrito, está asociada con la inhibición del crecimiento con concentraciones de metanol superiores a 1.0%. Así mismo, lo que parece ser una mejor opción para la producción de rDEX es el empleo de condiciones limitadas de metanol.

En la Figura 6 se muestran las cinéticas de producción de biomasa y de dextranasa recombinante. La mayor parte de la biomasa se produjo dentro de las primeras 48 h de la fermentación, mientras que la producción de la biomasa durante el periodo de inducción con metanol fue menor con respecto a la generada en la etapa de glicerol. Estos resultados son esperados ya que el rendimiento en biomasa es mayor en glicerol que en metanol (Looser et al., 2015). En la Figura 6b, la diferencia en la cinética de consumo de glicerol se atribuye a la técnica de monitoreo de concentración de glicerol. Si bien todos los cultivos comenzaron con 10 g/L de glicerol, al momento de su medición y debido a la naturaleza transitoria de la reacción (Kuhn et al., 2015); las lecturas fueron sub y super valoradas para las muestras iniciales y finales respectivamente. Se recomienda la utilización de esta técnica con un número adecuado de muestras que puedan manejarse en periodos cortos de tiempo (menos de 1 min) para la medición de la absorbancia, para mejorar la precisión de medición. Cabe destacar, que la técnica resultó bastante adecuada para conocer si existe o no glicerol remanente al final de la etapa en lote con glicerol.

La cinética de producción en los ensayos con matraz agitado muestra que, mientras el metanol es adicionado al medio la producción de la rDEX se mantiene. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 6c al final de las 120 h de fermentación se observó una caída en la concentración de proteínas en el medio, la cual fue mayor cuando se usó 1.5% de metanol. Si bien, la actividad dextranasa en el cultivo no se vio afectada por esta disminución en la concentración de proteínas (Figura 6d), puede ser que la mayor parte de las proteínas totales corresponde al producto dextranasa al final de la fermentación; mientras que durante el proceso de fermentación una cantidad de proteínas solubles proveniente del medio complejo, pudieron ser determinadas durante la prueba de Bradford.

La caída en la concentración de proteínas no fue de igual magnitud cuando se usó 0.5 y 1.0% de metanol, en donde también se obtuvo la actividad dextranasa más alta. Estos resultados indican que, no es necesaria una concentración más allá de 8 g/L de metanol para alcanzar una producción adecuada de rDEX. Resultados similares en cepas Mut^S han sido reportados, los cuales indican que el pAOX1 presenta mejores rendimientos bajo condiciones limitadas de metanol (Dietzsch et al., 2011a; Kupcsulik & Sevela, 2004; Lin, Panigraphy, Trinh, Folkman, & Shiloach, 2000); aunque una concentración mínima debe estar disponible para activar el pAOX1, de lo contrario éste no es inducido y la proteína recombinante no se secreta.

Por otro lado, para el estudio del efecto de los criterios de escalamiento k_{LA} y Pg/V en la producción de rDEX en bioprocesos a escala laboratorio, se determinó un límite en las condiciones de operación una Pg/V máxima de 2 W/L, ya que esta es la máxima Pg/V generalmente encontrada en biorreactores mezclados a escala industrial (Neubauer & Junne, 2016). Bajo esta limitante, se determinó el k_{LA} que se alcanza en el biorreactor de 3 L con el uso del medio definido FM22 (Figura 7). Los resultados obtenidos muestran un grado de similitud con aquellos reportados también para el mismo sistema de biorreactor, donde fueron usadas velocidades de agitación y aireación entre 200-800 rpm y 0.25-2.5 vvm respectivamente (Martínez et al., 2017). Dichas condiciones de operación también son del rango de las encontradas en procesos comerciales a gran escala. El valor máximo reportado de k_{LA} es del orden de 126 h^{-1} , en este trabajo fue de 154 h^{-1} . La diferencia entre los resultados reportados y los aquí alcanzados se puede deber que en nuestro caso se usaron dos turbinas Rushton (Tabla 7), mientras que en los resultados previamente reportados se usó solo un impulsor (Martínez et al., 2017). Además, los resultados reportados en este trabajo el rango de agitación se amplió hasta 900 rpm.

El incremento en los valores de k_{LA} también puede atribuirse al uso del medio definido FM22 para las mediciones de k_{LA} . Ya que el uso de medios no-coalescentes disminuyen el tamaño de la burbuja (Van't Riet, 1979). De esta manera los medios definidos presentan otra ventaja, frente a los complejos, donde sustancias de alto peso molecular pueden conferir cierto grado de viscosidad al fluido y disminuir la transferencia de oxígeno entre el gas y el líquido. El hecho de que los resultados aquí mostrados sean similares a aquellos reportados previamente para el mismo biorreactor (Martínez et al., 2017), confiere un grado de certeza a las mediciones aquí realizadas. Además, es importante mencionar que los valores de k_{LA} obtenidos en este trabajo están dentro del tiempo de respuesta adecuado del sensor de OD, ya que los valores de k_{LA} determinados siempre fueron menores a 0.3 s^{-1} (Galaction, Cascaval, Oniscu, & Turnea, 2004).

Debido a la dependencia existente entre ambos criterios de escalamiento k_{LA} y Pg/V , para crear una aproximación de variables independientes se construyeron tratamientos experimentales en dos diseños completamente aleatorios (Tabla 9). De esta manera, al mantener constante uno de los criterios mientras otro cambia, se puede apreciar el efecto por separado tanto de k_{LA} como de Pg/V . Una estrategia similar de estudio para k_{LA} y Pg/V ha sido usada para el escalamiento del bioproceso de producción de proteína recombinante

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con *E. coli* (Gill, Appleton, Baganz, & Lye, 2008). Los autores, si bien analizan diferentes valores de Pg/V y k_{LA} , no establecieron independencia alguna entre los criterios de escalamiento para sus experimentos. Por lo tanto, no se discriminó el efecto de cada criterio en el rendimiento de la fermentación cuando uno u otro cambiaba. Si bien los autores pudieron concluir que el k_{LA} provee la mejor base de escalamiento, en comparación a Pg/V , para bioprocesos aerobios en cualquier rango de condiciones de operación; no se reporta un análisis de los cambios que seguramente tuvieron lugar en k_{LA} y Pg/V cuando fueran ajustadas las condiciones de operación para cada criterio. Esto puede conducir a interpretaciones no adecuadas de los resultados, porque no toman en cuenta todas las variables interconectadas en los bioprocesos, y la identificación del fenómeno limitante para el bioproceso queda parcialmente identificado para ser usado como base de escalamiento.

Es bien sabido que k_{LA} es función de Pg/V , éste a su vez es un criterio de escalamiento de alta importancia para biorreactores tipo tanque mezclado, porque es precisamente el mezclado la operación unitaria que determina los rendimientos de los fenómenos de transporte. Ambos criterios, han sido usados de forma separada en la mayoría de los trabajos de escalamiento de procesos aeróbicos con resultados exitosos (Schmideder et al., 2015; Trujillo-Roldán et al., 2013; Woo-Shik Shin, Dohoon Lee, Sangyong Kim, Yong-Seob Jeong, & Chun, 2013). También ha sido establecido que un proceso escalamiento en base a k_{LA} muy probablemente requiera mantener constante Pg/V , por lo que el análisis de ambos criterios en el rendimiento de los bioprocesos es de especial relevancia (Xia et al., 2016).

En los bioprocesos realizados a 2 L (Figura 8), la estrategia de fermentación fue diferente a los protocolos de lote alimentado generalmente recomendados para la producción de proteína heterólogas con *P. pastoris* (Cos et al., 2006; Stratton et al., 1998). Los protocolos establecidos para cepas recombinantes con el *pAOX1* sugieren el uso de una etapa de lote alimentado con glicerol para alcanzar altas densidades celulares, seguido de la etapa de producción con la adición de metanol también en lote alimentado. Este tipo de bioprocesos requieren de la suplementación con oxígeno puro para evitar CLO, y la generación de calor es importante. Ambas situaciones son problemas considerables para la ejecución de los bioprocesos a gran escala, porque el manejo del calor generado y la adición de oxígeno representan un costo extra. Este tipo de limitaciones a gran escala pueden ser sobrepasadas con el uso de cepas Mut^S y con la implementación de estrategias

de cultivo como la de aquí desarrollada y reportada para producir rDEX (Figura 4). Esta estrategia de cultivo puede ser de gran interés a nivel comercial porque (i) evita el uso de oxígeno puro para suplementar la demanda (Khatri & Hoffmann, 2006a); (ii) facilita el suministro de metanol (Dietzsch, Spadiut, & Herwig, 2011b), (iii) evita la acumulación de metanol (Figura 9) y (iv) adapta el bioproceso a la capacidad del biorreactor. Estas características son deseadas y han sido planteadas en el diseño de nuevos bioprocesos con *P. pastoris* (Looser et al., 2015).

Los bioprocesos obtenidos produjeron una cantidad de biomasa 10 g/L superior a la considerada ya como alta densidad celular (50 g/L) (Carmen Jungo et al., 2007). En comparación con cultivos donde se pueden alcanzar hasta 100 g/L de biomasa seca, la reducción en la concentración celular puede ayudar a reducir la demanda de oxígeno y la generación de calor de los bioprocesos (Potvin et al., 2012). Así mismo, los resultados indican que los cultivos se mantuvieron limitados en metanol durante el periodo de inducción, ya que éste no se acumuló en el medio (Figura 9). En experimentos con cepas recombinantes Mut^S ya se ha demostrado que la mejor productividad se obtiene cuando el metanol se encuentra limitado en el medio (Dietzsch et al., 2011a). Por otro lado, en fermentaciones bajo CLO se ha establecido que mantener una concentración constante de metanol arriba de 8 g/L mejora la productividad de la expresión de la proteína recombinante, debido a una inducción más eficiente del pAOX1, y a una incrementada selectividad de la conversión del metanol a la proteína recombinante mediante la reducción de producción de biomasa, sin disminuir la vitalidad celular (Khatri & Hoffmann, 2006a).

Gurramkonda et al., (2009) usó un régimen de fermentación en lote alimentado similar a la reportada en esta tesis. Al inicio del bioproceso estableció una etapa de lote con 95 g/L de glicerol, después del consumo total del glicerol la etapa de inducción se llevó a cabo con una concentración constante de metanol de 6 g/L. Bajo estas condiciones de cultivo durante el periodo de inducción se alcanzaron también CLO debido a la alta densidad celular alcanzada (100 g/L, BS). Los autores atribuyen el buen rendimiento de la proteína recombinante (2.3 g/L) a las CLO y la alta concentración de metanol empleada en la etapa de inducción (Gurramkonda et al., 2009). Sin embargo, la simplicidad del bioproceso se ve limitada por el uso de sensores de metanol en línea para el control de la concentración en el medio de cultivo. Con el régimen de alimentación reportado en esta tesis, no es necesario un monitoreo directo del metanol en el medio, las lecturas de OD dan cuenta del estado

metabólico que guardan las células de levadura con respecto a la FCE (Figura 8). En este esquema de operación, solo fue necesario emplear un control de lazo entre el sensor de OD y la bomba de alimentación de metanol (Figura 4). Tarea que se puede realizar en casi cualquier sistema reciente de biorreactores.

La robustez del bioproceso aquí implementado se observó con la reproducibilidad de los resultados obtenidos de cada fermentación bajo condiciones de operación dadas (Tabla 11). Así mismo, el monitoreo del pH fue de ayuda para conocer el estado del cultivo. Durante el metabolismo normal de la levadura, el medio tiende a acidificarse por lo que el consumo de hidróxido de amonio nos mostraba de manera indirecta el estado metabólico del cultivo. También, como se ha discutido previamente el continuo consumo de metanol se mantuvo durante toda la fase de inducción sin que éste se acumulara (Figura 9), lo que se relaciona de manera indirecta con un metabolismo continuo de la FCE y nitrógeno. Se observó en los bioprocesos realizados, que después de administrar el pulso de metanol (0.5% V/V) al inicio de la etapa de inducción había una fase de adaptación al nuevo sustrato el cual se prolongaba por un periodo de alrededor de 7 h. Mismos periodos de adaptación han sido reportados bajo el mismo esquema de inducción con metanol (Dietzsch et al., 2011a; Gurramkonda et al., 2009).

Los resultados obtenidos de los bioprocesos a 2 L indican que la producción de rDEX está limitada por la velocidad de transferencia de oxígeno. Por un lado, durante la etapa de crecimiento en glicerol la μ_{GII} incrementó de manera directa al k_{LA} en los tratamientos del DCA1 (Tabla 10). Del mismo modo ocurrió para los resultados obtenidos en el DCA2 con respecto a Pg/V . Si bien, hubo diferencia en la velocidad de crecimiento durante el lote en glicerol en todos los tratamientos, al final de esta etapa siempre se produjo similar concentración de biomasa, con un $Y_{XS\ GII}$ promedio de 0.6 g/g; dicho rendimiento es característico de *P. pastoris* (Looser et al., 2015). El valor más alto de μ_{GII} alcanzado con un k_{LA} de $154\ h^{-1}$ y una Pg/V de 2 W/L, es 45% menor al valor máximo reportado para cepas Mut^S de $0.18\ h^{-1}$, en cultivos sin CLO (Cos et al., 2005).

Así mismo, la ecuación de regresión (10) propuesta considera valores de k_{LA} para un rango de Pg/V de 1 a 2 W/L. Así pues, a partir de esta ecuación para alcanzar valores de μ_{MeOH} de $0.02\ h^{-1}$ característicos de cepas Mut^S, se estima la necesidad de un k_{LA} de hasta $200\ h^{-1}$. Podría esperarse que, a partir de este k_{LA} no se presenten condiciones

limitadas de oxígeno en el cultivo y la producción de la rDEX podría incrementarse. Al mismo tiempo, para lograr valores de k_{La} mayores de 200 h^{-1} puede ser necesario un incremento en Pg/V , lo cual podría suponer el uso de condiciones de operación que no son factiblemente escalables.

Sin embargo, cuando se utilizó un k_{La} de 240 h^{-1} la μ_{MeOH} alcanzó valores cercanos a los característicos de cepas Mut^S ; pero la producción de rDEX no fue mayor a la obtenida con el tratamiento C con un k_{La} de 154 h^{-1} (Tabla 12). La disminución en la producción de rDEX bajo estas condiciones se atribuye al incremento a la densidad celular que párrafos adelante se discute. Con estas condiciones los cultivos también se alcanzaron CLO, aún con el incremento en la Pg/V . Entonces, la ecuación (10), aplica para cultivos donde las condiciones de operación estén limitadas a las de gran escala, y se mantengan condiciones limitadas de sustratos (metanol y oxígeno). De esta manera, el diseño de condiciones de operación para obtener rangos de k_{La} suficientes para los requerimientos de las células, permite determinar la cantidad de energía para la agitación y aireación donde se eviten gastos innecesarios para la producción de proteínas recombinantes de interés comercial con *P. pastoris*.

Si bien entonces, durante el crecimiento exponencial en la etapa de lote con glicerol se alcanzaron CLO (Figura 8), al parecer la falta de oxígeno no afectó las rutas anabólicas de la célula, pues bajo diferentes niveles de entrega de oxígeno el mismo rendimiento en biomasa fue obtenido. Precisamente una de las ventajas de *P. pastoris* es ser una levadura Crabtree negativa, por lo que requiere de mínimas cantidades de sustrato para cubrir los requerimientos de energía de mantenimiento; así mismo, no hay producción de subproductos de la fermentación como etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos, por lo que el sustrato consumido en su mayoría se convierte en biomasa (Prielhofer et al., 2015). Los rendimientos de biomasa con respecto al sustrato obtenidos indican que esta energía de mantenimiento no se incrementó debido a la falta de oxígeno.

En lo que respecta a la μ_{MeOH} los valores más altos obtenidos están alrededor de 0.01 h^{-1} (Tabla 11). Aunque los cultivos a 2 L estuvieron limitados en oxígeno, éstos lograron alcanzar velocidades similares de crecimiento de cultivos con una cepa Mut^S con un nivel de OD controlado a 30%, donde se ha reportado una μ_{MeOH} de hasta 0.012 h^{-1} (País et al., 2003). De la misma manera, la velocidad de consumo específica de metanol (q_s) observada

en los bioprocesos a 2 L ha sido reportada para cepas Mut^S para un rango de μ_{MeOH} de 0.004-0.01 h⁻¹, mostrando cierto grado de independencia con respecto a este parámetro, alcanzando valores de 0.02-0.03 g/g*h (Kupcsulik & Sevela, 2004). Esto coincide con los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos experimentales a 2 L. Entonces, los bioprocesos realizados con un $k_{\text{L}}a$ adecuado y dentro de los límites de operación encontrados a escala industrial, fueron suficientes para alcanzar un crecimiento característico de la cepa durante el crecimiento en metanol.

En cuanto a la producción de rDEX y biomasa, los resultados muestran una relación positiva con ambos criterios de escalamiento $k_{\text{L}}a$ y Pg/V (Tabla 11). Sin embargo, el mayor efecto se observó con los tratamientos del DCA1 (Figura 10 b y c); debido a que los experimentos del DCA2 se realizaron con $k_{\text{L}}a$ constante, 33% inferior al máximo usado en el DCA1. Como se aprecia en la Figura 10 b y c, existe una relación positiva entre el $k_{\text{L}}a$ con la μ_{MeOH} , con la producción de rDEX y con la productividad (con una Pg/V constante de 2 W/L).

El efecto del $k_{\text{L}}a$ fue mayor en la producción de dextranasa recombinante que el efecto de la Pg/V (Figura 11). Esto se debe a que, en la fermentación el transporte de oxígeno de la fase gas a la líquida es el fenómeno limitante. Inclusive, en las Figuras 11 d y e, cuando el $k_{\text{L}}a$ disminuye a 93 h⁻¹ (tratamiento E), se observa que la producción de la dextranasa disminuye hasta en 18% con respecto al tratamiento previo (D). Por otro lado, el incremento de la producción de rDEX del tratamiento D al F, aunque tienen igual $k_{\text{L}}a$, se debe a la mejora en el grado de mezclado en el fermentador al incrementar el suministro de potencia (Tervasmäki et al., 2018).

De esta manera, los resultados muestran que fueron seleccionados los criterios de escalamiento adecuados para el bioproceso de producción de rDEX, ya que describen el fenómeno de transporte limitante para éste. Al mismo tiempo, la Figura 10 presenta un comportamiento similar al mostrado en la Figura 2, donde la concentración relativa del producto incrementa de manera asintótica o parabólica con respecto a $k_{\text{L}}a$ y/o Pg/V (Quintero Ramírez, 1981). Sin embargo, en este caso los resultados obtenidos no alcanzan a describir completamente el comportamiento de la producción de la rDEX frente al $k_{\text{L}}a$, ya que se requiere aumentar los valores experimentales de este criterio de escalamiento. Dicho aumento en $k_{\text{L}}a$ limitado a una máxima Pg/V de 2 W/L, puede realizarse

disminuyendo el tamaño de burbuja en el difusor de aire y/o incrementando la presión en el biorreactor para solubilizar más oxígeno (Liu et al., 2016).

Como se ha recalcado, en los experimentos a 2 L fueron establecidas condiciones de operación encontradas en bioprocesos de escala comercial, al limitar la Pg/V a 2 W/L, no enriquecer la aireación con oxígeno puro y mediante el uso de un medio de cultivo definido. Así pues, bajo estas condiciones los bioprocesos estuvieron limitados en oxígeno (Figura 8) porque tanto en la etapa de lote como de lote alimentado la VCO fue igual a la VTO, como ha sido descrito en otros cultivos sumergidos (Anderlei, Zang, Papaspyrou, & Büchs, 2004). Considerando los resultados obtenidos con el mayor k_{La} alcanzado y la Pg/V más alta (tratamiento C), la máxima producción y productividad del cultivo fue de 97.34 ± 0.52 U/mL y 973.37 ± 5.19 U/L*h (Tabla 11). Para la misma cepa empleada en esta investigación, se ha reportado una producción y productividad máxima de rDEX de 304 U/mL y 2394 U/L*h respectivamente, en bioprocesos de 5 L con un medio complejo a base de melazas de caña de azúcar, con una alimentación de metanol continua de hasta 3.5 g/L*h (Roca et al., 1996). No se reportaron CLO, ni un nivel de control de OD. Mientras que con una cepa recombinante Mut⁺, también expresando una rDEX, en bioprocesos a 3 L con medio definido y empleando una concentración constante de metanol de 16 g/L, se alcanzó una producción y productividad máxima de 83.9 U/mL y 839 U/L*h respectivamente (Chen et al., 2008). En este último caso, el OD fue controlado constante a un nivel del 30%.

En comparación con nuestros resultados, éstos son un tercio a los alcanzados por la misma cepa Mut^S con el uso de un medio complejo (Roca et al., 1996). Las causas en la caída del rendimiento puede deberse al diferente medio de cultivo empleado, ya que los medios complejos pueden contener en su formulación fuentes de nitrógeno orgánicas que mejoran la producción de proteínas recombinantes (Choi & Park, 2006). También se puede deber a la adición continua de metanol, que promueve a que se mantenga constantemente inducido el pAOX1, a diferencia de la adición por pulsos que puede llegar a no encender por completo el promotor. Del mismo modo, la cantidad de biomasa generada alcanzó hasta 75 g/L en el previo reporte (Roca et al., 1996), esto representa una caída del 27% con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Por otro lado, con respecto a los resultados obtenidos por la cepa Mut⁺ (Chen et al., 2008) y en comparación con los obtenidos en este trabajo, la producción de rDEX incrementó en un 16% con el uso de CLO y limitación de metanol (Figura 9).

En este mismo sentido, la q_P más alta alcanzada en los bioprocesos de 2 L fue de 20 U/g*h; la cual es 120% mayor en comparación con la cepa Mut⁺ (Chen et al., 2008), y al mismo tiempo 48% menor a la reportada previamente para la misma cepa Mut^S (Roca et al., 1996). Estas diferencias en q_P afecta la producción de rDEX entre los tres trabajos aquí discutidos. Además, los resultados aquí expuestos indican que estadísticamente se tiene la misma q_P en todos los tratamientos, debido a que en el caso de cepas Mut^S, q_P es principalmente influenciada por la disponibilidad de metanol a través del pAOX1, el cual es altamente inducido a bajas concentraciones de metanol (<0.5 g/L), lo cual denota condiciones limitadas para el crecimiento celular (Kupcsulik & Sevela, 2004). Como se observa en la Figura 9, el metanol se mantuvo en concentraciones menores de 0.5 g/L bajo las diferentes condiciones de operación durante la etapa de lote alimentado.

Por otro lado, cuando se estudió la producción de rDEX con condiciones de operación más allá de los 2 W/L (Tabla 12), la producción de biomasa incrementó hasta en 20 g/L más al final del periodo de fermentación, en comparación con los bioprocesos donde se operó con la limitación de 2 W/L. Durante la etapa de lote con glicerol, la μ_{GII} alcanzada en los tres tratamiento (G, H e I) fue de $0.14 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, el cual es un valor cercano a la velocidad máxima reportada de 0.18 h^{-1} (Cos et al., 2005). La producción de biomasa al final del lote con glicerol fue igual a la producida en los tratamientos anteriores con una Pg/V máxima de 2 W/L (Figura 11). Sin embargo, la producción máxima de rDEX disminuyó hasta en un 50% con respecto a la obtenida con el tratamiento C (Tabla 11). Como se ve en la Figura 11, la etapa de inducción en estos tratamientos se prolongó hasta 79 h y también se desarrollaron bajo CLO.

La reducción en la producción puede estar atribuida en el incremento del estrés del cultivo que origina lisis celular, fenómeno que puede conducir a la degradación de la proteína recombinante debido a la alta densidad celular alcanzada (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014). Además, las CLO también repercuten negativamente en la producción de proteínas recombinantes cuando se tienen CADC (Lee et al., 2003). Como se ha propuesto previamente, para este tipo de cultivo se recomienda mantener condiciones saturadas de metanol en el medio (Khatri & Hoffmann, 2006a), y según la estrategia de alimentación empleada (Figura 4), ésta no permite la acumulación de metanol en el medio de cultivo. Además, los resultados sugieren que con el uso de la estrategia de fermentación aquí

implementada mantener una concentración de biomasa seca menor a 80 g/L mejora la producción de la rDEX (Figura 8 y Figura 11).

Como se aprecia en la Figura 15, la electroforesis de muestras de un caldo de cultivo de una fermentación con un k_{LA} de 240 h^{-1} , muestra otras bandas de proteínas de menor peso molecular en los carriles de corrida. Estas proteínas pueden provenir de la ruptura celular. Pues en comparación con el gel de electroforesis de caldos de cultivos de matraz (Figura 5), este último muestra que no hay producción de otras proteínas por la levadura recombinante durante la inducción con metanol. Además, a diferencia de los cultivos en fermentador, los cultivos en matraz tienen una densidad celular más baja.

Con los bioprocesos a 2 L realizados a escala laboratorio, usando las condiciones máximas de operación encontradas a escala comercial y con condiciones limitadas de oxígeno se obtuvieron bioprocesos robustos y más sencillos de ejecutar que los protocolos generalmente establecidos para *P. pastoris* (Barrigón, Montesinos, & Valero, 2013; T. Charoenrat et al., 2005; E. R. Jiménez et al., 1997). Con una generación moderada de biomasa se tienen una menor demanda de oxígeno, facilita los procesos de recuperación de las proteínas recombinantes, conducen a una menor generación de calor, y se pudo mejorar en 1.2 veces la producción de rDEX en comparación con una cepa Mut⁺. La simplicidad de bioprocesos, menos demandantes en recursos energéticos y de equipo de operación, son de gran interés para su explotación a escala industrial y comercial, al permitir generar productos más rentables.

Debido a que el k_{LA} describe el fenómeno de transporte limitante para el bioproceso, se realizó el escalamiento manteniendo k_{LA} constante de 154 h^{-1} , ya que representó la mejor condición para la producción de rDEX en los bioprocesos a 2 L. Los resultados obtenidos muestran un escalamiento exitoso en la etapa de lote con glicerol, al mantenerse la μ_{GII} y el $Y_{XS \text{ GII}}$ en todas las escalas (Tabla 13). Sin embargo, durante la etapa de inducción con metanol se observó una disminución en la producción de biomasa en comparación con la obtenida en las fermentaciones a 2 L (Figura 13a). En los bioprocesos a 10 y 30 L también se alcanzaron CLO durante los periodos de crecimiento en glicerol y metanol.

A pesar de mantener la velocidad de crecimiento en los bioprocesos escalados, se logró apreciar una reducción en la producción de biomasa que pudo tener un efecto

significativo en la producción de rDEX en los bioprocesos a 10 y 30 L (Figura 13). La producción máxima de rDEX disminuyó en un 40 y 35% en los bioprocesos de 10 y 30 L respectivamente, con respecto a los bioprocesos de 2 L. Mientras que la productividad máxima también se vio mermada al llegar a 654 y 626 U/L*h a 10 y 30 L respectivamente, que representa una disminución del 35% con respecto a la obtenida a 2 L (Tabla 13). Dado que el consumo de metanol específico se mantuvo entre las tres escalas, el rendimiento Y_{PS} también cayó para los bioprocesos en 10 y 30 L, en comparación con el logrado a 2 L.

Debido que en los biorreactores de 13 y 42 L no fue posible establecer una alimentación de metanol como en los bioprocesos a 2 L (Figura 4), se optó por usar una alimentación continua basada en la μ_{MeOH} y q_s (Figura 12). Este modo de alimentación de metanol pudo ser la causa por la cual se obtuvo una disminución en la producción de la rDEX a 10 y 30 L. Como se aprecia en la Figura 14, hubo periodos durante la etapa de inducción que el metanol alcanzó concentraciones superiores a 0.5 g/L. Una de las desventajas de los regímenes de alimentación de metanol basados en ecuaciones exponenciales es que tienden a la acumulación del metanol en el medio de cultivo si no se cuentan con un buen sistema de retroalimentación entre la velocidad de alimentación y la concentración en el medio del metanol (Potvin et al., 2012). Esto representa otra ventaja de la configuración usada en los bioprocesos a 2 L para la alimentación de metanol (Figura 4).

Si bien las velocidades específicas y los rendimientos de biomasa para ambos sustratos fueron estadísticamente iguales entre las tres escalas, estas acumulaciones momentáneas de metanol pudieron inhibir la generación de biomasa en los bioprocesos a 10 y 30 L. Esta inhibición en la producción de biomasa claramente conduce a una baja en la producción de la rDEX. En contraste con los cultivos en matraz, donde se tuvieron bajas densidades celulares (Tabla 8), y probablemente no se presentaron CLO; en los cultivos en fermentadores las altas densidades celulares y las CLO, pueden requerir de condiciones limitadas de metanol para la expresión adecuada del pAOX1. Dicho fenómeno ha sido previamente expuesto para la producción de una peroxidasa también en una cepa recombinante Mut^S (Dietzsch et al., 2011a).

Los resultados obtenidos en las tres escalas del bioproceso aquí evaluadas indican que la producción de rDEX bajo CLO tiene un mejor rendimiento cuando el metanol se encuentra en concentraciones limitadas. Mientras que para CLO se ha establecido que la

productividad del producto de interés se puede ver mejorada usando condiciones saturadas de metanol (T. Charoenrat et al., 2005; Gurramkonda et al., 2009; Khatri & Hoffmann, 2006a); nuestros resultados obtenidos claramente muestran lo contrario.

Una teoría que puede explicar la disminución en la producción de rDEX en los cultivos de 10 y 30 L tiene que ver con el mal plegamiento de la proteína recombinante secretada al medio. Esto se debe a los altos niveles de expresión que puede alcanzar el pAOX1 en presencia de exceso de metanol, la sobreproducción de la proteína recombinante satura las vías de modificación postraduccional en el retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi, derivando en una reducida producción de la proteína recombinante funcional (Puxbaum, Mattanovich, & Gasser, 2015). La sobreproducción de la proteína recombinante y la saturación de la capacidad de plegamiento y secreción del RE resulta en la acumulación de proteínas mal conformadas sin actividad. La sobrecarga del RE por proteínas mal conformadas conduce a la activación de la ruta de respuesta a proteínas mal conformadas y a la degradación de las mismas.

La sobrecarga de las vías de modificaciones postraduccionales son producto de diferentes condiciones, como cambios en las condiciones ambientales, altos niveles de osmolaridad, alta temperatura y la inducción con metanol, así mismo, este fenómeno es más común en cultivos con fermentadores donde se utilizan condiciones de operación de producción (Puxbaum et al., 2015). Aunado a esto, la limitación de oxígeno conduce a un desbalance del estado Redox en el RE, limitando su capacidad reductiva para la formación de puentes disulfuro en las proteínas correctamente plegadas.

En cultivos donde se usó un el promotor de la FLD (pFLD1), el cual tiene el mismo mecanismo de inducción que el pAOX1, para la producción de una lipasa recombinante se observó que cuando los cultivos se desarrollaron bajo condiciones limitadas de crecimiento la producción de la proteína recombinante fue mejor que en cultivos donde se usaron condiciones de exceso de la FCE (Resina et al., 2007). Los autores concluyen que bajo condiciones de exceso de carbono para la inducción del promotor, la eficiencia en el plegamiento adecuado de la proteína (más no la transcripción), es el mayor cuello de botella en la producción extracelular de lipasa correctamente plegada (Resina et al., 2007). Esto puede explicar porque en los cultivos a 2 L se presentó una mayor producción de actividad

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

dextranasa que en los cultivos de 10 y 30 L, ya que en los primeros se observaron condiciones limitadas de metanol (Figura 9Figura 14).

Este mismo fenómeno puede estar asociado con la disminución en la producción de rDEX de los experimentos con alta Pg/V (Tabla 12). Pues la eficiencia de plegamiento de la ruta secretoria de *P. pastoris* para las proteínas recombinante también se ve negativamente afectada por el incremento en la osmolaridad del medio de cultivo (Dragosits et al., 2010), como fue la alta densidad celular alcanzada en estos experimentos en comparación con la densidad celular en los cultivos con Pg/V de hasta 2.0 W/L.

Como se aprecia en la Figura 13c, la cinética de acumulación de proteínas en el medio es igual entre las tres escalas del bioproceso ejecutadas. Este comportamiento puede corresponder a lo expuesto anteriormente; en los cultivos de 2 L la rDEX excretada al medio en su mayor parte corresponde a la proteína correctamente plegada con actividad; mientras que, en los cultivos de 10 y 30 L la proteína en el medio de cultivo contiene una fracción de rDEX sin actividad.

Durante el escalamiento se logró mantener constantes los parámetros cinéticos del cultivo; sin embargo, la ligera disminución de la producción de biomasa y la acumulación de metanol mermaron la producción de la rDEX. En este sentido, un escalamiento exitoso, puede lograrse manteniendo k_{La} constante entre las escalas (Gill et al., 2008), y aun bajo CLO la producción de la proteína recombinante puede mantenerse usando condiciones limitadas de metanol. En este caso, una estrategia fácil, rápida y económica puede ser el uso de un control de lazo cerrado como el usado en las fermentaciones a 2 L (Figura 4), o bien, en el caso de suministros continuos de metanol como las usados en los cultivos a 10 y 30 L, se pueden emplear sistemas de monitoreo de metanol en línea para evitar la acumulación y mantener una concentración constante limitante del metanol.

Por otro lado, en los experimentos de medición de actividad dextranasa en caldos incubados a 30 °C de fermentaciones a 2 L (Tabla 14), se puede apreciar que no existe una disminución importante en la actividad dextranasa, salvo en la muestra 2. Esta misma muestra se obtuvo de un cultivo con un $k_{La} = 240 \text{ h}^{-1}$, del cual se presenta la electroforesis de muestras obtenidas a diferente tiempo de fermentación (Figura 15). Se aprecia con el avance en el tiempo de inducción, comienza a aparecer un barrido de bandas en los carriles

de corrida, debido a proteínas de diferentes pesos moleculares presentes en el caldo. Al mismo tiempo, la banda atribuida a la rDEX incrementa su densidad. Las diferentes proteínas que se aprecian en los carriles de corrida de las muestras pueden corresponder a proteínas mal plegada o degradadas que son excretadas al medio (Puxbaum et al., 2015). Y aunque no se ha caracterizado que la cepa empleada en los cultivos secrete otras proteínas al medio, salvo la rDEX como resultado en el gel de la Figura 5 (Roca et al., 1996); es posible que en los cultivos con alta densidad celular y donde se acumula el metanol, la levadura puede secretar otras proteínas al medio.

A manera de resumen, se establecieron los criterios de escalamiento que describen el fenómeno de transporte limitante para el bioproceso de producción de dextranasa recombinante con *P. pastoris*, que son el k_La y la Pg/V . Ambos criterios fueron analizados en bioprocesos a escala laboratorio, pero limitados a condiciones de operación encontradas en procesos de escala industrial, de manera que se pudiera observar los resultados esperados de la producción rDEX ya en un proceso a escala comercial.

Estas condiciones limitadas de operación fueron mantenidas en un escalamiento, y los resultados muestran que la producción de proteínas recombinantes bajo el pAOX1 requiere de condiciones limitadas de metanol para mantener la productividad aun cuando se tienen condiciones limitadas de oxígeno, contrario a lo que indica la literatura sobre este tipo de cultivos. En los bioprocesos a 2 L fue posible producir rDEX con rendimientos 1.2 veces superiores a los obtenidos por una cepa Mut⁺ en bioprocesos no limitados con oxígeno ni metanol. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron un tercio a los reportados previamente por la cepa en un medio complejo.

El proceso de fermentación empleado a 2 L, el cual se escaló a 10 y 30 L, representa varias ventajas para ser aplicado a escala comercial en especial para la alimentación de metanol. Esto debido a (i) una menor demanda de metanol en comparación de otros métodos de suministro, (ii) no requiere de la alimentación de oxígeno puro, (iii) se generan cantidades moderadas de biomasa que puede facilitar la recuperación de los productos secretados al medio, (iv) los gastos energéticos para la agitación están dentro de los valores reales encontrados en biorreactores de gran volumen y (v) se evita el empleo de equipo especializado para el monitoreo directo del consumo de metanol.

Estas condiciones de operación pueden ser aplicadas en productos recombinantes donde no se justifican elevados gastos energéticos como enzimas de alta producción donde el valor de mercado no es alto, que puedan ser aplicadas en el sector agroindustrial principalmente; así mismo, cuando se requiera obtener alguna proteína recombinante de interés como una primera posibilidad de proceso de producción y no se tenga la posibilidad de una fuerte inversión inicial de capital para equipo sofisticado. Este proceso en lote alimentados también puede ser extrapolado para la producción de proteínas recombinantes de interés farmacéutico debido a la estandarización del proceso y uso de medio de cultivo definido.

Los bioprocesos en donde las necesidades energéticas y de consumo de oxígeno puro pueden ser evitados para la producción de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*, son de gran interés para establecer unidades de producción a escala industrial y mejorar la rentabilidad del producto de interés. Esto puede impulsar el uso de dicha levadura para la producción comercial de proteínas de gran utilidad en diferentes áreas de aplicación.

8. CONCLUSIÓN

A escala laboratorio en cultivos de 2 L se produjo dextranasa recombinante bajo diferentes condiciones de operación encontradas en bioprocesos de escala comercial, alcanzando un rendimiento 1.2 veces más altos a los obtenidos con una cepa Mut⁺, con cultivos que presentaron condiciones limitadas de oxígeno y metanol.

En cultivos con densidades celulares superiores a 60 g/L las condiciones limitadas de oxígeno y metanol no mejoraron el rendimiento de la rDEX, por lo que se sugiere limitar la densidad celular para estas condiciones limitadas de cultivo.

Al tratarse de un bioproceso aeróbico el rendimiento de la producción de la dextranasa estuvo limitado por la velocidad de transferencia de oxígeno, dicho fenómeno es descrito el criterio de escalamiento k_{La} . Así mismo, debido a que k_{La} es función de Pg/V , se recomienda ambos como criterios para un proceso de escalamiento exitoso para este tipo de bioprocesos.

Los resultados obtenidos del escalamiento indican que la producción de dextranasa recombinante se ve inhibida por la acumulación de metanol en concentraciones superiores

a 24 g/L. Por lo tanto, en cultivos limitados de oxígeno no son necesarias condiciones saturadas de metanol para una inducción adecuada del pAOX1; sin embargo, es importante mantener una concentración limitante de metanol en el caldo para mantener el promotor pAOX1 siempre inducido. Debido a la acumulación de metanol, el escalamiento del bioproceso no fue completamente exitoso; aunque se logró reproducir entre las escalas la velocidad de producción de biomasa.



REFERENCIAS

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biot*, 98(12), 5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Almuzara, C., Cos, O., Baeza, M., Gabriel, D., & Valero, F. (2002). Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnol Lett*, 24(5), 413-417. doi: 10.1023/A:1014554324117
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., & Büchs, J. (2004). Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J*, 17(3), 187-194. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00181-5
- Austin, G. D., Sankhe, S. K., & Tsao, G. T. (1992). Monitoring and control of methanol concentration during polysaccharide fermentation using an on-line methanol sensor. *Bioprocess Engineering*, 7(6), 241-247. doi: 10.1007/BF00386233
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochem Eng J*, 75(15), 47-54. doi: 10.1016/j.bej.2013.03.018
- Bashiri, H., Bertrand, F., & Chaouki, J. (2016). Development of a multiscale model for the design and scale-up of gas/liquid stirred tank reactors. *Chem Eng J*, 297, 277-294. doi: 10.1016/j.cej.2016.03.102
- Bawa, Z., Routledge, S. J., Jamshad, M., Clare, M., Sarkar, D., Dickerson, I., . . . Bill, R. M. (2014). Functional recombinant protein is present in the pre-induction phases of

Pichia pastoris cultures when grown in bioreactors, but not shake-flasks. *Microb Cell Fact*, 13(1), 1-26. doi: 10.1186/s12934-014-0127-y

Bentancourt, H. L., García, R., Gonzáles, J., Montesino, R., Quintero, O., Takao, T., . . . Cremata, J. (2001). Dextranase (α -1,6 glucan-6-glucanohydrolase) from *Penicillium minioluteum* expressed in *Pichia pastoris*: two host cells with minor differences in N-glycosylation. *FEMS Yeast Res*, 1(2), 151-160. doi: 10.1111/j.1567-1364.2001.tb00026.x

Berrios, J., Flores, M.-O., Díaz-Barrera, A., Altamirano, C., Martínez, I., & Cabrera, Z. (2017). A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *J Ind Microbiol Biot*, 44(3), 407-411. doi: 10.1007/s10295-016-1895-7

Bollók, M., Resina, D., Valero, F., & Ferrer, P. (2009). Recent patents on the *Pichia Pastoris* expression system: expandin the toolbox for recombinant protein production. *Recent Pat Biotechnol*, 3. doi: 10.2174/187220809789389126

Bombač, A., & Žun, I. (2000). Gas-filled cavity structures and local void fraction distribution in vessel with dual-impellers. *Chem Eng Sci*, 55(15), 2995-3001. doi: 10.1016/S0009-2509(99)00469-8

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Cai, R., Lu, M., Fang, Y., Jiao, Y., Zhu, Q., Liu, Z., & Wang, S. (2014). Screening, production, and characterization of dextranase from *Catenovulum sp.* *Ann Microbiol*, 64(1), 147-155. doi: 10.1007/s13213-013-0644-7
- Calik, P., Ata, Ö., Günes, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., . . . Özdamar, T. H. (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J*, 95, 20-36. doi: 10.1016/j.bej.2014.12.003
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*, 13(4), 329-332. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00330-0
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24(1), 45. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
- Cerini, F., Gaertner, H., Madden, K., Tolstorukov, I., Brown, S., Laukens, B., . . . Hartley, O. (2016). A scalable low-cost cGMP process for clinical grade production of the HIV inhibitor 5P12-RANTES in *Pichia pastoris*. *Prot Expres Purif*, 119, 1-10. doi: 10.1016/j.pep.2015.10.011
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M., & Enfors, S. O. (2005). Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioproc Biosyst Eng*, 27(3), 399-406. doi: 10.1007/s00449-005-0005-4

- Charoenrat, T., Sangprapai, K., Promdonkoy, P., Kocharin, K., Tanapongpipat, S., & Roongsawang, N. (2015). Enhancement of thermostable β -glucosidase production in a slow methanol utilization strain of *Pichia pastoris* by optimization of the specific methanol supply rate. *Biotechnol Biop Eng*, 20(2), 315-323. doi: 10.1007/s12257-014-0686-0
- Chen, L., Zhou, X., Fan, W., & Zhang, Y. (2008). Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkey* dextranase in *Pichia pastoris*. *Prot Expres Purif*, 58(1), 87-93. doi: 10.1016/j.pep.2007.10.021
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, 1(4), 1852-1858. doi: 10.1038/nprot.2006.288
- Choi, D. B., & Park, E. Y. (2006). Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 41(2), 390-397. doi: 10.1016/j.procbio.2005.06.020
- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K., & Romanos, M. A. (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Nat Biotechnol*, 9, 455-460. doi: 10.1038/nbt0591-455
- 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. *Microb Cell Fact*, 5, 1-20. doi: 10.1186/1475-2859-5-17

Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., & Valero, F. (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol*, 116(4), 321-335. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.12.010

Dietzsch, C., Spadiut, O., & Herwig, C. (2011a). A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy for *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 10(1), 1-9. doi: 10.1186/1475-2859-10-14

Dietzsch, C., Spadiut, O., & Herwig, C. (2011b). A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. *Microb Cell Fact*, 10(1), 1-10. doi: 10.1186/1475-2859-10-85

Dragosits, M., Stadlmann, J., Graf, A., Gasser, B., Maurer, M., Sauer, M., . . . Mattanovich, D. (2010). The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. *BMC genomics*, 11(207). doi: 10.1186/1471-2164-11-207

Dreher, T., Walcarius, B., Husemann, U., Klingenberg, F., Zahanow, C., Adams, T., . . . Greller, G. (2014). Microbial high cell density fermentations in a stirred single-use bioreactor. En D. Eibl, R. Eibl (Ed.), *Disposable Bioreactors II* (pp. 127-147). Berlin, Alemania: Springer

Dumorné, K. (2018). Biotechnological and industrial applications of enzymes produced by extremophilic bacteria. A Mini Review. *Preprints*. doi: 10.20944/preprints201801.0198.v1

Díaz-Barrera, A., Gutierrez, J., Martínez, F., & Altamirano, C. (2014). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited

conditions. *Bioproc Biosyst Eng*, 37(6), 1133-1140. doi: 10.1007/s00449-013-1084-2

Galaction, A. I., Cascaval, D., Oniscu, C., & Turnea, M. (2004). Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochem Eng J*, 20(1), 85-94. doi: 10.1016/j.bej.2004.02.005

García, B., Rodríguez, E., Rivero, T., Hidalgo, Y., & Menéndez, J. (2000). Dextranase expression in two different host-vectors systems of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnología aplicada*, 17(1), 11-15

García, X., Ferrer, P., Montesinos, J., & Valero, F. (2013). Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem Eng J*, 79(15), 172-181. doi: 10.1016/j.bej.2013.07.013

García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv*, 27(2), 153-176. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006

Gerngross, T. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 22(11), 1409-1414

Gill, N. K., Appleton, M., Baganz, F., & Lye, G. J. (2008). Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnol Bioeng*, 100(6), 1144-1155. doi: 10.1002/bit.21852

- Gurramkonda, C., Adnan, A., Gäbel, T., Lünsdorf, H., Ross, A., Nemani, S., . . . Rinas, U. (2009). Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. *Microb Cell Fact*, 8(13). doi: 10.1186/1475-2859-8-13
- Huang, R., Zhong, L., Xie, F., Wei, L., Gan, L., Wang, X., & Liao, A. (2019). Purification, characterization and degradation performance of a novel dextranase from *Penicillium cyclopium* CICC-4022. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi: 10.3390/ijms20061360
- Humbird, D., Davis, R., & McMillan, J. D. (2017). Aeration costs in stirred-tank and bubble column bioreactors. *Biochem Eng J*, 127, 161-166. doi: 10.1016/j.bej.2017.08.006
- Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2013). Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production. *Bioresource Technol*, 144, 311-320. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.118
- Inan, M., & Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 92(6), 585-589. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80321-2
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.-K., Martinelle, M., & Enfors, S.-O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotechnol*, 102(1), 45-53. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00003-8
- Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K., & Enfors, S. O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioproc Biosys Engineering*, 24(6), 385-393. doi: 10.1007/s00449-001-0274-5

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Jiménez, E. R. (2009). Dextranase in sugar industry: A review. *Sugar Tech*, 11(2), 124-134.

doi: 10.1007/s12355-009-0019-3

Jiménez, E. R., Sánchez, K., Roca, H., & Delgado, J. M. (1997). Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase.

Biotechnol Tech, 11. doi: 10.1023/A:1018493428584

Jungo, C., Marison, I., & von Stockar, U. (2007). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J Biotechnol*, 128(4), 824-837. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.12.024

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

10.1016/j.jbiotec.2007.05.019

Junker, B. H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *J Biosci Bioeng*, 97(6), 347-364. doi: 10.1016/S1389-1723(04)70218-2

Kang, H.-K., Ji-Young, P., Joon-Seob, A., Seung-Heuk, K., & Doman, K. (2009). Cloning of a gene encoding dextranase from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Pichia pastoris*. *J Microbiol Biotechnol*, 19(2), 172-177. doi: 10.4014/jmb.0802.100

Khatri, N. K., & Hoffmann, F. (2006a). Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 93(5), 871-879. doi: 10.1002/bit.20773

- Khatri, N. K., & Hoffmann, F. (2006b). Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot*, 72(3), 492-498. doi: 10.1007/s00253-005-0306-1
- Kim, S., d'Anjou, M., Lanz, K. J., Evans, C. E., Gibson, E. R., Olesberg, J. T., . . . Arnold, M. A. (2015). Real-time monitoring of glycerol and methanol to enhance antibody production in industrial *Pichia pastoris* bioprocesses. *Biochem Eng J*, 94, 115-124. doi: 10.1016/j.bej.2014.12.002
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electron J Biotechn*, 18(3), 252-255. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.01.005
- Kumar, V., Sangwan, P., Singh, D., & Kaur Gill, P. (2014). Global scenario of industrial enzyme market. En Vikas, Beniwal, & A. K. Sharma (Eds.), *Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance* (First ed., pp. 173-196): Nova Science Publishers
- Kupcsulik, B., & Sevelia, B. (2004). Effect of methanol concentration on the recombinant *Pichia pastoris* Mut^S fermentation. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 48(2), 73-87
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0
- Larsson, A. M., Andersson, R., Stahlberg, J., Kenne, L., & Jones, T. A. (2003). Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction course, crystal structure, and product complex. *Structure*, 11(9), 1111-1121. doi: 10.1016/s0969-2126(03)00147-3

- Lee, C. Y., Lee, S. J., Jung, K. H., Katoh, S., & Lee, E. K. (2003). High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 38(8), 1147-1154. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00280-7
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotech*, 142(2), 105-124. doi: 10.1007/s12010-007-0003-x
- Lin, J., Panigraphy, D., Trinh, L. B., Folkman, J., & Shiloach, J. (2000). Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 24(1), 31-35. doi: 10.1038/sj.jim.2900766
- Liu, W.-C., Gong, T., Wang, Q.-H., Liang, X., Chen, J.-J., & Zhu, P. (2016). Scaling-up fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Scientific Reports*, 6, 18439. doi: 10.1038/srep18439
- Looser, V., Brühlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., . . . Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv*, 33(6), 1177-1193. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu Rev Food Sci T*, 9(1), 155-176. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012537
- López-Pérez, M., & González-Cervantes, R. (2014). Production and biotechnological applications of recombinant proteins by methylotrophic yeast: past, present and

future perspectives. In D. Thangadurai, J Sangeetha (Ed.), *Biotechnology and Bioinformatics* (pp. 199-229): Apple Academic Press

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. doi: 10.1002/yea.1208

Mansur, M., Cabello, C., Hernandez, L., Pais, J., Varas, L., Valdes, J., . . . Besada, V. (2005). Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 27(5), 339-345. doi: 10.1007/s10529-005-1007-7

Markošová, K., Camattari, A., Rosenberg, M., Glieder, A., Turner, N. J., & Rebroš, M. (2018). Cloning and upscale production of monoamine oxidase N (MAO-N D5) by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 40(1), 127-133. doi: 10.1007/s10529-017-2450-y

Markošová, K., Weignerova, L., Rosenberg, M., Křen, V., & Rebroš, M. (2015). Upscale of recombinant α -L-rhamnosidase production by *Pichia pastoris* Mut^S strain. *Front Microbiol*, 6, 1140. doi: 10.3389/fmicb.2015.01140

Martínez, C. J., Cisneros, G. R., Robledo, P., F., Parra, S., R., Treviño, M., A., & Alvarez, A. (2017). Optical approach for measuring oxygen mass transfer in stirred tank bioreactors. *Int J Chem React Eng* 15(4). doi: 10.1515/ijcre-2016-0209

Mayson, B. E., Kilburn, D. G., Zamost, B. L., Raymond, C. K., & Lesnicki, G. J. (2003). Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol Bioeng*, 81(3), 291-298. doi: 10.1002/bit.10464

Menendez, J., Valdes, I., & Cabrera, N. (2003). The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 20(13), 1097-1108. doi: 10.1002/yea.1028

Miller, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428

Nauha, E. K., Visuri, O., Vermasvuori, R., & Alopaeus, V. (2015). A new simple approach for the scale-up of aerated stirred tanks. *Chem Eng Res Des*, 95, 150-161. doi: 10.1016/j.cherd.2014.10.015

Neubauer, P., & Junne, S. (2016). Scale-Up and Scale-Down Methodologies for Bioreactors. In C. Mandenius (Ed.), *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications*. doi: 10.1002/9783527683369.ch11

Ninchan, B., Vanichsriratana, W., & Sriroth, K. (2017). Investigation of the optimized dextran-degrading enzyme conditions on the decomposition of different molecular weights of pure dextran using response surface methodology. *Archives of Industrial Biotechnology*, 1(1), 8-19

Nosedá, D. G., Blasco, M., Recúpero, M., & Galvagno, M. Á. (2014). Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOXI promoter. *Prot Express Purif*, 104, 85-91. doi: 10.1016/j.pep.2014.09.014

Nosedá, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., & Galvagno, M. A. (2013). Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia*

(*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter. *Prot Express Purif*, 92(2), 235-244.

doi: 10.1016/j.pep.2013.08.018

Oosterhuis, N. M. G., & Kossen, N. W. F. (1981). Power input measurements in a production scale bioreactor. *Biotechnol Lett*, 3(11), 645-650. doi: 10.1007/BF00158694

Paul, R., Karthik, S., Vimalraj, P., Meenakshisundaram, S., & Kaliraj, P. (2018). Cloning, large-scale production and characterization of fusion protein (P-TUFT-ALT-2) of Brugian abundant larval transcript-2 with tuftsin in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotech*, 48(9), 823-833. doi: 10.1080/10826068.2018.1514511

País, J. M., Varas, L., Valdés, J., Cabello, C., Rodríguez, L., & Mansur, M. (2003). Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnol Lett*, 25(3), 251-255. doi: 10.1023/A:1022398917213

Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J*, 64, 91-105. doi: 10.1016/j.bej.2010.07.017

Prielhofer, R., Cartwright, S. P., Graf, A. B., Valli, M., Bill, R. M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2015). *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC Genomics*, 16(1), 167. doi: 10.1186/s12864-015-1393-8

Puxbaum, V., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2015). Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot*, 99(7), 2925-2938. doi: 10.1007/s00253-015-6470-z

Quintero Ramírez, R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. México.

Ramon, R., Feliu, J. X., Cos, O., Montesinos, J. L., Berthet, F. X., & Valero, F. (2004). Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 26(18), 1447-1452. doi: 10.1023/B:BILE.0000045649.60508.c5

Ramón, R., Ferrer, P., & Valero, F. (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 130(1), 39-46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.025

Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci T*, 1(1), 305-339. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100746

Ren, W., Cai, R., Yan, W., Lyu, M., Fang, Y., & Wang, S. (2018). Purification and characterization of a biofilm-degradable dextranase from a marine bacterium. *Marine drugs*, 16(2), 51. doi: 10.3390/md16020051

Resina, D., Bollók, M., Khatri, N. K., Valero, F., Neubauer, P., & Ferrer, P. (2007). Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microb Cell Fact*, 6(21). doi: 10.1186/1475-2859-6-21

Reuss, M., Bajpai, R. K., & Lenz, R. (1980). Scale-up strategies based on the interaction of transport and reaction. Paper presented at the 6th International Fermentation Symposium.

- Roca, H., Garcia, B., Rodriguez, E., Mateu, D., Coroas, L., Cremata, J., . . . Delgado, J. (1996). Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 12(12), 1187-1200. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(19960930)12:12<1187::aid-yea986>3.0.co;2-u
- Schilling, B. M., Goodrick, J. C., & Wan, N. C. (2001). Scale-up of a high cell density continuous culture with *Pichia pastoris* X-33 for the constitutive expression of rh-Chitinase. *Biotechnol Progr*, 17(4), 629-633. doi: 10.1021/bp010041e
- Schmideder, A., Hensler, S., Lang, M., Stratmann, A., Giesecke, U., & Weuster-Botz, D. (2015). High-cell-density cultivation and recombinant protein production with *Komagataella pastoris* in stirred-tank bioreactors from milliliter to cubic meter scale. *Process Biochem*. doi: 10.1016/j.procbio.2015.11.024
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 202, 118-134. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.027
- Stratton, J., Chiruvolu, V., & Meagher, M. (1998). High Cell-Density Fermentation. In D. R. Higgins & J. M. Cregg (Eds.), *Pichia Protocols* (pp. 107-120). Totowa, NJ: Humana Press
- Tab, M. M., Hashim, N. H. F., Najimudin, N., Mahadi, N. M., Bakar, F. D. A., & Murad, A. M. A. (2018). Large-scale production of glaciozyma antarctica Antifreeze Protein 1 (Afp1) by fed-batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Arab J Sci Eng*, 43(1), 133-141. doi: 10.1007/s13369-017-2738-1

Team, R. D. C. (2008). R: A language and environment for the statistical computing. In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing

Tervasmäki, P., Latva-Kokko, M., Taskila, S., & Tanskanen, J. (2018). Effect of oxygen transfer on yeast growth — Growth kinetic and reactor model to estimate scale-up effects in bioreactors. *Food Bioprod Process*, 111, 129-140. doi: 10.1016/j.fbp.2018.08.004

Toan, H., Mariela, P., Dustet, J., Herrera, I., Padrón, S., & Valdés, J. (2009). A *Pichia pastoris* fermentation process to express *Mucor pusillus* rennin. *Biotecnología Aplicada*, 26 (4), 315-320

Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Gonzalez-Monterrubio, C. F., Acevedo-Sánchez, E. V., Martínez-Salinas, C., García-Cabrera, R. I., . . . Blancas-Cabrera, A. (2013). Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(22), 9665-9674. doi: 10.1007/s00253-013-5199-9

Van't Riet, K. (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Proc Design and Development*, 18(3), 357-364. doi: 10.1021/i260071a001

Wakil, S. M., Ibikunle, O. J., & Akinyele, H. A. (2018). Production and characterization of dextranase by *Penicillium brevicompactum* isolated from garden soil. *J Adv Microbiol*, 13(4), 1-12. doi: 10.9734/JAMB/2018/45723

- Wang, G., Tang, W., Xia, J., Chu, J., Noorman, H., & van Gulik, W. M. (2015). Integration of microbial kinetics and fluid dynamics toward model-driven scale-up of industrial bioprocesses. *Eng Life Sci*, 15(1), 20-29. doi: 10.1002/elsc.201400172
- Woo-Shik Shin, Dohoon Lee, Sangyong Kim, Yong-Seob Jeong, & Chun, G.-T. (2013). Application of scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient (k_{la}) for production of itaconic acid in a 50 l pilot-scale fermentor by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechnol*, 23(10), 1445-1453.
- Wu, D., Chu, J., Hao, Y. Y., Wang, Y. H., Zhuang, Y. P., & Zhang, S. L. (2011). High efficient production of recombinant human consensus interferon mutant in high cell density culture of *Pichia pastoris* using two phases methanol control. *Process Biochem*, 46(8), 1663-1669. doi: 10.1016/j.procbio.2011.05.015
- Wynn, J. P., Hanchar, R., Kleff, S., Senyk, D., & Tiedje, T. (2016). Biobased technology commercialization: the importance of lab to pilot scale-up. In S. San Dien (ed.), *metabolic engineering for bioprocess commercialization* (pp. 101-119). Cham: Springer International Publishing
- Xia, J., Wang, G., Lin, J., Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2016). Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. In J. Bao, Q. Ye, & J.-J. Zhong (Eds.), *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II* (pp. 137-151). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Yang, L., Zhou, N., & Tian, Y. (2018). Purification, characterization, and biocatalytic potential of a novel dextranase from *Chaetomium globosum*. *Biotechnol Lett*, 40(9), 1407-1418. doi: 10.1007/s10529-018-2599-z

- Zhang, N., Daubaras, D., & Suen, W.-C. (2004). Heterologous protein expression in yeasts and filamentous fungi. In *handbook of industrial mycology* (pp. 667-687): CRC Press
- Zhang, Y.-Q., Li, R.-H., Zhang, H.-B., Wu, M., & Hu, X.-Q. (2017). Purification, characterization, and application of a thermostable dextranase from *Talaromyces pinophilus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 44(2), 317-327. doi: 10.1007/s10295-016-1886-8
- Zhao, W., Wang, J., Deng, R., & Wang, X. (2008). Sacale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 189-195.
- Zohra, R. R., Aman, A., Zohra, R. R., Ansari, A., Ghani, M., & Qader, S. A. U. (2013). Dextranase: Hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydr Polym*, 92(2), 2149-2153. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.044

ANEXOS

Anexo A. Electroforesis SDS-PAGE y tinción de plata para proteínas en geles de poliacrilamida.

Anexo B. Artículo derivado del trabajo de tesis: “Dextranase production by recombinant *Pichia pastoris* under operational volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) and volumetric gassed power input (Pg/V) attainable at commercial large scale”.



Anexo A. Electroforesis SDS-PAGE y tinción de plata para proteínas en geles de poliacrilamida.

I. Preparación del gel de poliacrilamida para electroforesis.

Preparar persulfato de amonio (APS) al 10% (p/V) en agua destilada y guardarlo a 4 °C hasta su uso. Limpiar los cristales con etanol al 70% (V/V). Montar el juego de cristales grueso y delgado en el soporte de preparación de geles de acuerdo con el fabricante (Bio-Rad, EUA). Colocar una marca a 1 cm debajo del peine. Preparar los geles a la concentración de acrilamida de acuerdo con la naturaleza de las muestras a separar. Los geles consisten en dos partes, gel de separación y gel concentrante. Preparar primero el gel de separación según la siguiente tabla de proporciones:

% de acrilamida	5.0	7.5	10	13.5	16
Agua destilada (mL)	8.52	4.50	4.02	2.85	2.05
Buffer de separación (mL)	3.75	2.5	2.5	2.5	2.5
Acrilamida (mL)	2.5	2.5	3.33	4.5	5.3
APS 10% (µL)	75	50	50	50	50
TEMED (µL)	7.5	10	10	10	10
TOTAL (mL)	15	10	10	10	10

Composición por litro del buffer de separación: Tris base 181.6 g, SDS 4 g y ajustar pH a 8.8.

Introducir el gel entre los cristales de manera rápida y constante con ayuda de una pipeta Pasteur, cuidando que no haya fugas por la parte inferior, llenando hasta la señal previamente marcada. Agregar agua destilada hasta el borde del cristal delgado para ayudar a que el gel polimerice a nivel. Esperar a que polimerice alrededor de una hora. Una vez polimerizado, volcar el soporte para eliminar toda el agua, secar lo que reste del agua con papel filtro, sin distorsionar el gel.

Preparar el gel *concentrante* de acuerdo con las siguientes proporciones: agua destilada (3.5 mL), buffer concentrador (composición por litro: Tris base 60.55 g, SDS 4 g, ajustar el pH con HCl concentrado a 6.8) (5.0 mL), acrilamida (1.3 mL), APS 10% (50 µL), TEMED (10 µL). Colocar el peine y agregar el gel concentrante con cuidado de no hacer burbujas. Dejar que polimerice alrededor de media hora. Una vez polimerizado el gel, se

retira el peine con cuidado, y los cristales se montan en la cubeta. Secar con papel filtro cada uno de los pocillos del gel, cuidando de no distorsionar a los mismos.

II. Preparación de muestras para electroforesis.

Cargar hasta máximo 20 μg de proteína de muestra por pocillo. Se completa el volumen a 30 μL con buffer de muestra (composición %V/V: buffer concentrador 2.5, SDS (10% p/V) 4, glicerol 2, bromofenol (0.4% p/V) 0.4, β -mercaptoetanol 1), tratando siempre que el volumen mínimo de buffer sea la tercera parte del volumen total (10 μL). Colocar cada muestra en un microtubo, perforar la tapa del tubo con una aguja y colocar en baño maría durante 5 min. Después del periodo de desnaturalización, proceder a cargar las muestras en los pocillos del gel.

III. Montaje final para separar las muestras en gel de acrilamida.

Mezclar 60 mL de buffer de corrida 5X (composición por litro: Tris base 15.1 g, glicina 94 g, SDS 5 g, ajustar pH entre 8.3-8.6) con 240 mL de agua destilada. Una vez cargadas las muestras en los geles, llenar los pocillos vacíos con un poco de buffer de muestra y finalmente agregar con cuidado, el buffer de corrida a cada uno de los pocillos hasta cubrir el cristal delgado. Finalmente, agregar el resto del buffer de corrida entre los cristales y el resto, por fuera de ellos. Conectar los electrodos correctamente a la cámara de electroforesis y encender la fuente de poder, con la diferencia de potencial y/o intensidad de corriente deseada. Comenzarán a resolverse las muestras según avanza el frente de corrida que se observa por el avance del colorante en el gel.

IV. Condiciones de la electroforesis

El gel de poliacrilamida se utilizó al 10% (p/V) para determinar con cual se obtenía mejor separación de las bandas proteicas. La electroforesis fue continua y se realizó en un equipo Bio-Rad Mini Protean 3 (Bio-Rad, EUA). Se corrió la electroforesis a 80 volts por 1.5 h o hasta que las muestras eran resueltas en su totalidad en el gel.

V. Tinción con plata.

Fijar el gel de electroforesis durante una hora o bien toda la noche con una solución de metanol-ácido acético-agua (45:10:45), en agitación. Posteriormente, colocar el gel en una solución de etanol-ácido acético (10:5) en agitación durante 30 min. Lavar con agua destilada 30 min en agitación. Agregar una solución de ditioneitol (DTT) al gel, para lo cual se disuelve 1.5 mg de DTT en 100 mL de agua, reposar por 30 min el gel con la solución de DTT. Enjuagar el gel suavemente con agua destilada. Teñir el gel con una solución de nitrato de plata recién preparada al 0.2% (p/V) en agua desionizada, dejar 30 min en agitación. Lavar el gel suavemente con agua desionizada. Revelar con una solución de carbonato de sodio al 3% en formaldehído (0.5 mL/L), utilizando un poco de esta solución y sustituyendo por fresco en intervalos de 5-10 min.

Detener el revelado con ácido acético al 1%.

Anexo B.

PREPARATIVE BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
<https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591992>



Dextranase production by recombinant *Pichia pastoris* under operational volumetric mass transfer coefficient (k_La) and volumetric gassed power input (Pg/V) attainable at commercial large scale

Miguel Angel Marín Muñoz^a, Juan Jáuregui Rincón^a, Leobardo Serrano Carreón^b, and Norma Angélica Chávez Vela^a

^aDepartamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México;

^bDepartamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

ABSTRACT

Most of the reported bioprocesses carried out by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* have been performed at laboratory scale using high power inputs and pure oxygen, such conditions are not feasible for industrial large-scale processes. In this study, volumetric mass transfer (k_La) and volumetric gassed power input (Pg/V) were evaluated within values attainable in large-scale production as scale-up criteria for recombinant dextranase production by Mut^S *P. pastoris* strain. Cultures were oxygen limited when the volumetric gassed power supply was limited to 2 kW m^{-3} . Specific growth rate, and then dextranase production, increased as k_La and Pg/V did. Meanwhile, specific production and methanol consumption rates were constant, due to the limited methanol condition also achieved at 2L bioprocesses. The specific dextranase production rate was two times higher than the values previously reported for a Mut⁺ strain. After a scale-up process, at constant k_La , the specific growth rate was kept at 30L bioprocess, whereas dextranase production decreased, due to the effect of methanol accumulation. Results obtained at 30L bioprocesses suggest that even under oxygen-limited conditions, methanol saturated conditions are not adequate to express dextranase with the promoter alcohol oxidase. Bioprocesses developed within feasible and scalable operational conditions are of high interest for the commercial production of recombinant proteins from *Pichia pastoris*.

KEYWORDS

Dextranase; large-scale bioprocess; methanol utilization phenotype; oxygen-limited conditions; recombinant proteins; scale-up

Introduction

The process to scale-up bioprocesses to obtain recombinant proteins can offer an opportunity to analyze and to predict the microbial physiological response to culture conditions as an approach to the microorganisms behavior at the production scale.^[1] Around 58% of recombinant proteins used in the industry are obtained by biotechnological processes, and interest in their commercial applications is growing.^[2] At the same time, the industrial biotechnology, more than ever, requires new efficient and sustainable ways to manufacture bio-products. Up to date, there are important issues between cell environment at lab scale and the production scale due to differences in the way to control bioprocesses at each scale, causing gross feedstock and poor yields, which is a barrier of successful scale-up processes.^[1] Usually, at lab scale, we can set up specialized technology to a tight bioprocess control, which cannot be available at industrial scale. Due to the complex interaction of physical, chemical, and biological variables that affect biochemical reactions during bioprocesses, an accurate analysis of data obtained at bench scale is critical for a successful scale-up.^[3] For the sake of

bioprocess performance, it is always important to design the scale-up process bearing in mind the limiting transport parameter, which is not easy to determine due to the cell's rapid environmental response.^[4] The most frequent approach to scale-up processes is using well-known rules of thumb in which scale-up criteria such as (i) volumetric gassed power input (Pg/V), (ii) volumetric mass transfer coefficient (k_La), (iii) impeller tip speed, (iv) re number, and (v) dissolved oxygen concentration (DO) are kept constant at the different scales.^[5]

Several heterologous expression systems are available for the expression of recombinant proteins; for instance, the use of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has increased extensively, especially in pharmaceutical applications.^[6,7] This yeast presents certain advantages: (i) it is a Generally Recognized As Safe (GRAS) microorganism; (ii) it prefers an aerobic over an anaerobic metabolic pathway, which prevents the production of fermentation metabolites such as acetic acid and ethanol; (iii) as an eukaryote, it has the capacity to carry out post-translational protein modifications; (iv) it possesses an efficient protein excretion system, and (v) it grows at high cell densities in minimal

CONTACT Juan Jáuregui Rincón jjareg@correo.uaa.mx Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940 Ciudad Universitaria, Aguascalientes 20131, México.

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

defined media.^[8] The capacity of *P. pastoris* to oxidize methanol through enzymes alcohol oxidase (AOX1 and AOX2) is used in the construction of genetically modified strains.^[9] The promoter of the *AOX1* gene (*pAOX1*) is the most frequently used gene to control the expression of recombinant proteins, although other promoters have been developed.^[10]

Methanol feeding is a crucial variable in the production of recombinant products under *pAOX1* control, and it can be accomplished by three different strategies: (i) feedback control through *on-line* methanol quantification, (ii) DO retrofitting, (iii) predetermined feed profile based on kinetic parameters.^[11] Highly productive bioprocesses require high cell density culture (HCDC) and adequate control of physicochemical variables.^[12] Indeed, *P. pastoris* HCDCs are characterized by their high oxygen demand, especially when growing on methanol.^[13] Therefore, the oxygen transfer capacity of the bioreactor is frequently the limiting rate determining the yield of the bioprocesses.^[14] Commonly, bioprocesses involving this yeast require pure oxygen supply to avoid oxygen limitations.^[15] Oxygen-limited conditions affect recombinant protein expression negatively.^[13] However, the use of pure oxygen in HCDC bioprocesses can be a limiting factor for commercial applications.^[16] Several proposals have been put forward to overcome such limitation due to bioreactor oxygen transport capacity, for example: (i) using recombinant strains of the methanol utilization slow (*Mut^s*) phenotype,^[17] (ii) using other promoters as an alternative to *pAOX1*,^[9] (iii) using oxygen-limited fed-batch bioprocesses,^[18,19] and (iv) operating the reactor at low cell densities or low temperatures.^[18]

The scale-up of yeast bioprocesses has been accomplished by keeping DO, k_La , or oxygen transfer rate (OTR) at the same levels in the different scales.^[20,21] To the best of our knowledge, scale-up of processes to produce recombinant proteins by *P. pastoris* have not been undertaken after previous analyses of the effects of typical scale-up criteria on the bioprocess, and they remain as specific biotechnological applications. For example, to scale up the bioprocess to produce recombinant lipase, pH and temperature were optimized at both lab and pilot scales, and a μ -stat fed-batch from the laboratory was successfully scaled-up to 800 L.^[22] The constitutive production of recombinant human chitinase by continuous culture in 21 L was explored to determine a scale-up process with constant k_La and Pg/V; it was estimated that a k_La around 850 hr^{-1} and high Pg/V of 8 kW m^{-3} were necessary for a viable scale-up, although no experimental data of the scale-up process are provided.^[23] Schmideder et al. reported a successful scale-up process where an OTR value of $230 \text{ mmol L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ was kept constant and used a *Mut⁺* strain; in this case, specific lipase activity was kept at the 0.01, 2, and 1000 L scales, but the operational conditions used in bioreactors could be unsustainable at commercial production scale.^[24] A successful scaled-up bioprocess to express a recombinant β -xylosidase was achieved by increasing vessel pressure with biomass-*stat* strategy. For 10, 100, and 1000 L bioprocesses, volumetric enzyme activity was improved up to 50% throughout the

process, showing that pure oxygen supplementation can be omitted for HCDC if bioreactor internal pressure is increased.^[25] In these reports, the technical feasibility of the operational conditions for commercial applications of the process is not considered by the authors, especially in regard to the maximum allowed Pg/V in large scale operations of 2 kW m^{-3} .^[4] Recent works have proposed to move away from standard cultivation protocols towards the development of specific processes based on both particular product-strain and the characteristics of specific bioreactor systems; however, these approaches should be applicable and transferable between different strains and equipment.^[17]

Dextranase enzyme applications include: (i) removal of microbe-produced gum dextran, which has a negative effect on sugar recovery in the sugar industry,^[26] (ii) hydrolysis of high-molecular-weight dextran to produce low-molecular-weight fractions,^[27] (iii) oral care products, and (iv) detergents.^[28] Therefore, the economic outlook of this enzyme is highly relevant.^[26] Dextranase enzyme has been isolated and expressed in *P. pastoris* from yeast and mold.^[28,29] However, no reports of bioprocess scale-ups to produce recombinant dextranase are available. The objective of the present study is to analyze and describe the effect of k_La and Pg/V on the production of recombinant dextranase using a *P. pastoris Mut^s* phenotype at laboratory and bench scale within operational conditions limited to a maximum Pg/V value of 2 kW m^{-3} , a volumetric power supply typically used in large scale stirred tank bioreactors. This approach may be helpful to estimate the overall yield of the bioprocess in a scale-up process to industrial scale.

Materials and methods

Microorganism model and media culture

A *Pichia pastoris Mut^s* phenotype expressing recombinant enzyme dextranase (EC 3.2.1.11) from *Talaromyces minioluteus* was used as the model microorganism. This recombinant strain was constructed in the CIGB (La Havana, Cuba).^[29] All chemical compounds and reagents for media culture preparation were of chemical grade, and distilled water was used.

FM22 defined media culture was used for dextranase production (composition per liter: 40.0 g glycerol, 42.9 g KH_2PO_4 , 11.7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14.3 g K_2SO_4 , 5.0 g NH_4SO_4), which was supplemented with 1 mL L^{-1} of PTM4 trace salt solution (composition per liter: 2.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g NaI, 3.0 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g H_3BO_3 , 0.5 g $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.0 g ZnCl_2 , 22.0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g CoCl_2 , 1.8 g H_2SO_4 , 0.2 g biotin). Fed-batch bioprocesses at 2 and 30 L working volumes were started with initial volumes (V_0) of 1.8 and 24 L of FM22 media culture, respectively. Table 1 shows the geometrical specifications of the stirred tank bioreactors (STB) used in the present study.

For inoculum preparation, 1 mL *P. pastoris* cells ($8 \pm 0.8 \times 10^{15}$ c. f. u/mL kept at -80°C) were thawed in a bath at 40°C and then poured into a 500 mL shake flask containing 90 mL YPG media (composition per liter: 20 g

Table 1. Geometrical specifications and operation conditions for the bioreactors used in lab-scale and scaled-up processes.

Bioreactor nominal volume (L)	3	42
Liquid volume (L)	2	30
Rushton impellers	2	3
Di (m)	0.045	0.105
Space between impellers	1.4 Di	1.3 Di
*Ht/T	2.0	2.8
k _{1,a} (hr ⁻¹)	154	151
N (min ⁻¹)	900	500
Q (vvm)	2.0	1.0

*Ht is tank height.

Table 2. Operational strategy to screen the effect of k_{1,a} and Pg/V in 2L bioprocess to produce dextranase.

Treatment	N (rpm)	Q _{vvm}	Pg/V (kW m ⁻³)	k _{1,a} (hr ⁻¹) ^a
A	700	0.5	1.95	83.2 (0.15)
B	850	2.0	1.98	146.5 (3.15)
C	900	2.0	2.17	153.5 (2.25)
D	700	1.5	1.00	101.7 (4.64)
E	700	1.0	1.50	93.31 (2.83)
F	800	1.0	2.00	100.0 (4.51)

^aMean value (±SD) of three replicates are shown. CRD1 includes treatments A, B, and C for different k_{1,a} and constant Pg/V. CRD2 includes treatments D, E, and F for different Pg/V with constant k_{1,a}.

glycerol, 20 g peptone, 10 g yeast extract) for 2L bioprocesses. The inoculum was incubated at room temperature under orbital agitation (125 rpm) until an optical density (600 nm) of 8–10 was reached. The 30L cultures were inoculated with a 1.5L inoculum developed in 2.5L Fernbach flasks.

Determination of volumetric mass transfer coefficient (k_{1,a}) and volumetric gassed power input (Pg/V)

Characterization of k_{1,a} and Pg/V of the 3L STB (Applikon, Delft, The Netherlands) was carried out with 2L of FM22 media culture at different agitation rates (500–1000 min⁻¹) and specific air flow levels (0.5–2.0 vvm) at 30°C. The k_{1,a} measurement was made by dynamic gassing-out in the oxygen absorption modality.^[5] DO was measured by a polarographic sensor (Applisens, Applikon). Power consumption for agitation was determined by measuring the intensity of voltage and current supplied to the servomotor.^[30] Power consumption was also determined under empty conditions to discriminate power losses due to bearing friction.

Two complete random designs (CRD) were built in order to conduct independent separate analyses of the effects of both k_{1,a} and Pg/V on 2L bioprocesses for dextranase production (Table 2). According to the bioreactor performance within the operating conditions used, the CRD1 included A, B, and C treatments with k_{1,a} values of 83, 146, and 154 hr⁻¹, respectively and a similar constant Pg/V of 2 kW m⁻³. On the other hand, the CRD2 included treatments D, E, and F with Pg/V values of 1.0, 1.5, and 2.0 kW m⁻³, respectively, and similar k_{1,a} values around 100 hr⁻¹ for the effect of Pg/V on the bioprocess (Table 2). Due to the interdependence between k_{1,a} and Pg/V, this arrangement allowed for the observation of the separate effects of each scale-up criterion on the bioprocess. Experiments for dextranase production were carried out with a maximum Pg/V

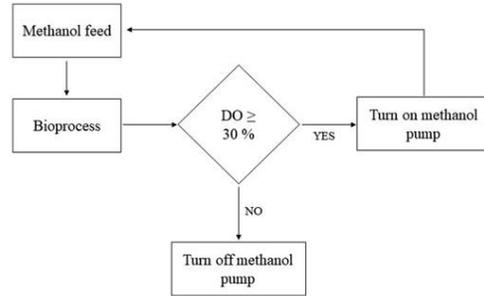


Figure 1. Dissolved oxygen control loop used to feed methanol in 2L bioprocesses to induce the production of the recombinant dextranase.

around 2 kW m⁻³ in order to maintain the technical feasibility of the scale-up process up to commercial scale,^[4] and to analyze the expected bioprocess yield at large scale operational conditions.

The Pg/V in the 42L STB (30L bioprocesses) was estimated by the Reuss correlation given by Eq. (1),^[31] and was kept constant from 2L bioprocesses. Additionally, k_{1,a} was determined by dynamic gassing-out with FM22 media at 30°C for a scale-up process at constant k_{1,a}.

$$Pg = 0.0312 \left(\frac{NDi^2}{\nu} \right)^{0.064} \left(\frac{DiN^2}{g} \right)^{0.156} \left(\frac{Qg}{NDi^3} \right)^{0.38} \left(\frac{T}{Di} \right)^{0.8} P_0 \quad (1)$$

Where: Di: impeller diameter [m]; T: tank diameter [m]; N: agitation rate [min⁻¹]; Qg: volumetric gas flow rate [m³ s⁻¹]; g: acceleration gravity constant [9.81 m s⁻²]; P₀ and Pg: ungassed and gassed power input respectively [W]; ν: kinematic viscosity [m² s⁻¹].

Bioprocess for recombinant dextranase production in 2L bioprocesses

Experiments for the 2L scale bioprocess were performed in a 3L nominal volume bioreactor (Table 1). Bioprocesses were performed in a fed-batch mode with an intermittent feeding regime of methanol during the induction phase; at 30°C and pH of 5.5, which was maintained by adding ammonium hydroxide (28% w/v). In the initial batch stage (growth on glycerol) cultures were carried out in FM22 medium. Depletion of glycerol was correlated to a decrease in oxygen demand (instantaneous DO increase). After glycerol depletion, the fed-batch methanol phase (production phase) was started by adding 0.5% (v/v) of methanol supplemented with 5 mL L⁻¹ of PTM4 salt trace solution. After a period of cell adaptation to methanol and total consumption of the first methanol pulse, indicated by a second DO increase, methanol (supplemented with 5 mL L⁻¹ of PTM4 salt trace solution) was fed by a DO control loop (Fig. 1). When DO was above 30% (indicating methanol limitation), the methanol pump was turned on until oxygen demand increased (decreasing DO below 30%), then the methanol pump was turned off. With this configuration of methanol

feeding, the inhibitory concentration was not reached, because the volume of methanol in each pulse was less than 1 mL. Also, this methanol setup was easy to perform without specialized equipment. To describe the production of recombinant dextranase under large scale operational conditions, agitation and aeration rate were constant throughout 100 hr of fermentation in bioprocesses. In this line, DO levels were a function of the oxygen transfer rate achieved by the bioreactor at those conditions (Table 2) and the yeast cells oxygen uptake rate. The use of pure oxygen was avoided to keep the bioprocess within large-scale operational conditions and technical feasibility. Foam level was controlled by the addition of antifoam (SAG-710, Momentive, NY).

Determination of biomass, glycerol, methanol, proteins, and dextranase activity

Samples of 10 mL were collected from cultures every 8 hr and centrifuged in pre-weighted 2 mL microtubes at 9000g for 10 min. Recovered biomass was dried at 70 °C for 48 hr to obtain dry weight cell biomass concentration. Supernatants were used to assess soluble protein, glycerol, and methanol concentrations, as well as volumetric dextranase activity. Glycerol concentration was measured by Malaprade and Hantzsch reactions.^[32] The intensity of the resulting dye (3,5-diacetyl-1,4-dihydroxylutidine) was directly proportional to glycerol concentration, and it could be measured at 410 nm in the range of 0–10 mg mL⁻¹. Total protein concentration was measured by the Bradford method using BSA as a standard protein. Volumetric dextranase activity was determined based on the glucose released from a 2.5% (w/v) dextran solution (Rheomacrodex, Pisa Farmaceutica, Mexico) at 40 °C in acetate buffer 50 mM at a pH of 5.0 with a reaction time of 10 min. One unit of dextranase activity was defined as the amount of enzyme producing one micromole of glucose per minute, at the conditions above mentioned. Released glucose equivalents were determined by the reaction with the 3,5-dinitrosalicylic acid reagent.^[28,29]

Methanol was determined using a gas chromatographer (TRACE 1300, Thermo Fischer Scientific, MA), coupled with a flame ionization detector. He and N₂ were used as carrier gases (35 mL min⁻¹), and H₂ as ignition gas. Column (TG 5 SILMS, Thermo Fischer Scientific) length, diameter, and film thickness were 30 m, 0.25 mm, and 0.25 μm, respectively. Chromatographic grade water was used as a solvent and the sample was injected at 90 °C at a flow of 24 mL min⁻¹. The sample was kept for 0.5 min at 40 °C, and the temperature was increased using a ramp of 10 °C to 100 °C, and finally at 20 °C until reaching 200 °C. After that, the sample was retained for 1 min and detector temperature was 300 °C.

Only glycerol consumption and biomass production were evaluated during the glycerol batch phase (GBP); meanwhile, dextranase was produced only in the methanol fed-batch phase (MFBP). Growth, substrate, and product kinetics are described by Eqs. (2)–(4). Initial conditions for fed-batch equations were those at the end of the GBP.

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV \quad (2)$$

$$\frac{dPV}{dt} = q_P XV \quad (3)$$

$$F_M = q_S XV \quad (4)$$

Where: X : dry weight biomass concentration [g L⁻¹]; P : volumetric dextranase activity [U L⁻¹]; S : substrate concentration [g L⁻¹]; V : reactor volume [L]; t : time [hr]; μ : specific growth rate [hr⁻¹]; q_P : specific production rate [U g_x⁻¹ hr⁻¹]; q_S : specific substrate consumption rate [g g_x⁻¹ hr⁻¹] and F_M : massic flow rate of methanol [g hr⁻¹]

Bioprocess scale-up

The selected conditions of culture after the analysis of the effect of P_g/V and $k_{l,a}$ at 2 L bioprocesses, were scaled up to 42 L nominal volume (B-Braun U30, Diessel Biotech, Germany) bioreactor (Table 1). This scale-up process was made to test the selected conditions for the dextranase production at 30 L bioprocesses. In this case, the methanol feed was carried out through a pre-established feed profile based on Eq. (4), which includes the kinetic and stoichiometric values obtained in the 2 L bioprocess as the conditions selected to scale-up.

Bioprocesses at 2 and 30 L scales were carried out by triplicate under the selected operational condition. Mean ± one standard deviation was reported. Analysis of variance (ANOVA) was performed using R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) to assess significant differences between treatments.

Results and discussion

Fed-batch process to produce dextranase in 2 L bioprocesses

The yield and performance of the bioprocess for dextranase production were evaluated in 2 L bioprocesses within a range of $k_{l,a}$ and P_g/V described in (Table 2). Representative bioprocess kinetics is presented in Figure 2. The maximum specific growth rate in glycerol (μ_{Gly}) observed in each treatment was achieved before DO dropped to zero (Table 3), after that lineal cell growth was observed. For all treatments in 2 L cultures, DO levels reached values of 0% while yeast cells were growing in both glycerol and methanol. Also, during cultures, two stages were observed according to the substrate, with different lengths in function of the operational conditions through the 100 hr of fermentation.

In our experiments, productive time (time during methanol feed to induce pAOX1) was started just after glycerol depletion in the GBP, without the use of a glycerol fed-batch process frequently used in *P. pastoris* bioprocesses. It was observed in cultures to take around 7 hr to adapt to methanol after the first addition, no matter under which operational condition the fermentation was performed. The process here described was easy to execute without the necessity of pure oxygen supply, which can improve the

implementation of the process at large scale with low costs of operation.^[33]

Linear cell growth when DO level is 0% during fermentation is a characteristic behavior of bioprocesses under oxygen-limited conditions, therefore it was assumed that maximum OTR was reached under this condition (Fig. 2).^[19,34] Some reports have indicated that oxygen-limited conditions in *P. pastoris* bioprocesses may be advantageous to produce recombinant proteins under the control of the pAOX1 and for the establishment of large scale bioprocesses.^[19,33,35]

In Figure 2 each sharp in DO line after glycerol depletion corresponds to a pulse addition of methanol. As expected, the period between methanol pulses decreased as biomass concentration increased. The setup to feed methanol resulted quite robust during the fermentation, this allowed stable bioprocesses and kept an adequate supply of methanol to the cells. Also, it was not necessary to implement complex techniques and equipment to control methanol concentration at adequate levels in broth to avoid catabolite repression, which is an important advantage to be employed at large scale operations.

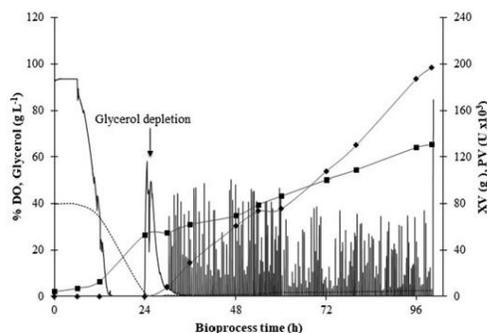


Figure 2. A representative kinetic evolution of a bioprocess at 2 L scale for dextranase production ($k_La = 153 \text{ h}^{-1}$ and $Pg/V = 2 \text{ kW m}^{-3}$). % DO (continuous line) was used as substrate consumption indicator. The end of glycerol consumption (dashed line) in the GBP was indicated by an instantaneous DO increase (black arrow). Dry biomass production (filled squares) and dextranase production (filled diamonds) kept increasing during MFBP, a characteristic behavior of growth-associated products.

At the end of the GBP under all the operational conditions tested the average biomass to glycerol ($Y_{XS \text{ Gly}}$) was $0.6 \text{ g}_X \text{ g}^{-1}$. Thanks to this, all cultivations were started at the same biomass concentration when methanol was fed, regardless of operational conditions. In spite of the oxygen limitation reached the average $Y_{XS \text{ Gly}}$ is consistent with previous reports.^[17,35] The biomass obtained at the end of the GBP in spite the oxygen limitation could be due to the physiology of *P. pastoris* which prefers a respiratory rather than fermentative mode of growth without byproducts formation.^[8] In this line, oxygen-limited conditions in cultures did not affect the glycerol conversion to biomass, only the specific growth rate. The highest μ_{Gly} achieved with the highest k_La was 41% lower than the value reported of 0.18 hr^{-1} for *P. pastoris* cells in cultures without oxygen limitation.^[36]

In all experiments, k_La and Pg/V were considered constant during the fermentation period, since operational conditions remained constant and the viscosity in the broth did not change significantly (data not shown). Also, coalescence phenomenon in yeast broth is not considerable with dry cell concentrations below 150 g L^{-1} ,^[37] in our results maximum dry biomass concentration achieved was under 70 g L^{-1} .

Effect of Pg/V and k_La on 2 L bioprocesses to produce dextranase

Specific growth rates and yields from bioprocess performed are shown in Table 3. At constant Pg/V of 2 kW m^{-3} , the maximum μ_{Gly} achieved was 0.106 hr^{-1} with a k_La of 154 hr^{-1} . Nevertheless, similar μ_{Gly} values were observed in bioprocesses in the k_La range from 100 to 154 hr^{-1} when Pg/V was kept constant at 2 kW m^{-3} . The specific growth rate on methanol (μ_{MeOH}) dropped 75, 85, and 45% in treatments D, E, and F, respectively, in comparison with μ_{MeOH} value of 0.02 hr^{-1} reported for Mut^S single copy strain in controlled DO cultures.^[36]

The increase observed in both μ_{Gly} and μ_{MeOH} for Pg/V from 1 to 2 kW m^{-3} with the same k_La of 100 hr^{-1} , could be associated with an improvement in the liquid bulk homogeneity and phase dispersion improving nutrients available for the yeast cell. It is known that an adequate oxygen supply does not guarantee proper mixing.^[20] However, the decrease in specific growth rates on methanol and glycerol observed in all the treatments tested (Table 3) compared to

Table 3. Descriptive parameters of 2 L bioprocesses to produce dextranase.

Treatment (Pg/V , k_La)	μ_{Gly}	μ_{MeOH}	P_{MAX}	$P_{V \text{ MAX}}$	q
Results from experiments with different k_La and a constant Pg/V of 2 kW m^{-3} (CRD1)					
A (1.95, 83.2)	0.08 (0.01) ^b	0.003 (0.00) ^b	23.79 (0.80) ^c	242.94 (3.93) ^c	17.43 (2.45) ^a
B (1.98, 146.5)	0.10 (0.01) ^{ab}	0.012 (0.01) ^a	60.45 (6.19) ^b	644.52 (34.14) ^b	14.89 (2.99) ^a
C (2.17, 153.5)	0.11 (0.00) ^a	0.013 (0.001) ^a	97.34 (0.52) ^a	973.37 (5.19) ^a	20.83 (0.23) ^a
Results from experiments with different Pg/V and similar k_La of 100 hr^{-1} (CRD2)					
D (1.0, 101.7)	0.08 (0.00) ^b	0.005 (0.000) ^b	33.53 (0.18) ^b	335.31 (1.79) ^b	16.15 (0.12) ^a
E (1.5, 93.3)	0.06 (0.00) ^b	0.003 (0.001) ^b	27.50 (4.22) ^b	277.13 (35.61) ^b	20.36 (4.32) ^a
F (2.0, 100.0)	0.11 (0.01) ^a	0.009 (0.001) ^a	54.52 (1.82) ^a	545.26 (18.22) ^a	17.90 (0.44) ^a

P_{MAX} , maximum volumetric dextranase activity (U mL^{-1}); $P_{V \text{ MAX}}$, maximum volumetric productivity ($\text{U L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$); q , specific production rate [$\text{U g}_X^{-1} \text{ hr}^{-1}$]. Gly, refers to GBP, while MeOH to MFBP. Mean values are presented (\pm SD), $n=3$. Different exponent script indicates a significant statistical difference among treatments in each statistical design with a p -value ≤ 0.05 .

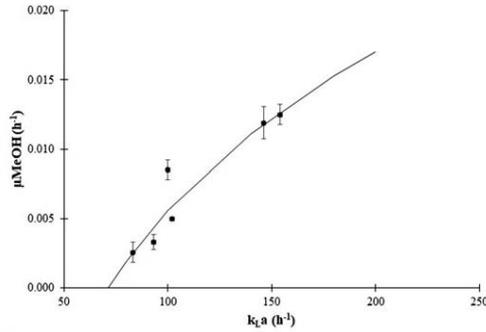


Figure 3. The specific growth rate on methanol in function of the $k_{L,a}$ within an operational range of Pg/V from 1 to 2 kW m^{-3} . Black dots represent experimental data and solid line is the model proposed by the eq. 5.

those previously reported values, demonstrate the oxygen limitation reached in the bioprocesses. Then, is expected that the specific growth rate of the yeast in large scale processes without control of DO levels and a maximum volumetric power supply of 2 kW m^{-3} will be lower than those at lab scale, in which oxygen limitation is avoided.

The scale-up criterion $k_{L,a}$ had a greater effect on the bioprocess yield than the Pg/V , as it was determined by regression models of μ_{MeOH} versus $k_{L,a}$ and Pg/V . In this way, an expression to predict μ_{MeOH} on function of $k_{L,a}$. The $k_{L,a}$ values for Eq. (5) are limited for a maximal power supply of 2 kW m^{-3} . The Eq. (5) can predict a value of μ_{MeOH} under operational conditions attainable at large scale and shows a good description with respect to the experimental values (Fig. 3). The Eq. (5) is represented within the experimental data obtained from the 2L bioprocesses from both CRD1 and 2 (Table 3).

$$\mu_{MeOH} = 0.017 \ln(k_{L,a}) - 0.07 \quad (5)$$

The expression proposed by Eq. (5) considers $k_{L,a}$ values attainable in a Pg/V range between $1\text{--}2 \text{ kW m}^{-3}$. By using Eq. (5), to reach the maximum μ_{MeOH} for Mut^S strains of 0.02 hr^{-1} is necessary a $k_{L,a}$ up to 200 hr^{-1} . Then it is supposed, that above a $k_{L,a}$ of 200 hr^{-1} , even limitation of oxygen could be avoided, and the dextranase production could be improved. To achieve this $k_{L,a}$ of 200 hr^{-1} an increase in the Pg/V could be considered, even without the supply of pure oxygen to the culture. Mathematically, specific growth rates on methanol can be predicted by Eq. (5) from $k_{L,a}$ values of 60 hr^{-1} up to 200 hr^{-1} , which corresponds to a maximum μ_{MeOH} of 0.02 hr^{-1} . Operational conditions designed to achieve a $k_{L,a}$ just sufficient enough for the culture's requirements can help to avoid energy waste during agitation and aeration in commercial *P. pastoris* bioprocesses producing proteins of economic interest.

As is shown in Table 3 as $k_{L,a}$ increased dextranase production also did. In the same way; for treatments D, E and F, dextranase production was observed to increase as Pg/V did (Table 3). These results are in line with those previously observed for specific growth rates achieved when growing on

methanol. In the case of the CRD2, as the Pg/V increased, the production of biomass and dextranase also did, probably by an improvement in bulk media homogeneity, without improvement in transfer of oxygen. However, highest dextranase production ($97.34 \pm 0.52 \text{ U mL}^{-1}$) was achieved at the highest $k_{L,a}$ value used (154 hr^{-1}). Maximum volumetric productivity was $973.37 \pm 5.19 \text{ U L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ at 100 hr of fermentation (Table 3).

The reported q_p for dextranase expressed by the Mut^S strain is $37.83 \text{ U g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$.^[29] A 45% drop in q_p reached at $k_{L,a}$ of 154 hr^{-1} may be due to the oxygen limitation observed in our experiments. For a Mut^+ strain, q_p was $8.94 \text{ U g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$,^[28] in comparison, q_p in our bioprocess is around two times higher in spite the oxygen limitation. This result agrees with previously reported results for recombinant lipase production by DO-controlled fed-batch bioprocess; it was also found that the Mut^S phenotype has higher specific productivity and specific yield than Mut^+ phenotype strains.^[36]

The increase in the dextranase production with $k_{L,a}$ values from 146 to 154 hr^{-1} is associated with the increase in μ_{MeOH} between both $k_{L,a}$ values (Table 3), due to dissolved oxygen availability in media culture had a positive effect on the expression of recombinant proteins with the $pAOXI$ system.^[15] Experiments with $k_{L,a}$ values beyond 154 hr^{-1} are needed to observe whether dextranase production increase linearly with $k_{L,a}$, nevertheless the operational conditions for $k_{L,a}$ above 154 hr^{-1} will be prohibited at commercial scale.

On the other hand, specific rates of methanol consumption ($q_{S \text{ MeOH}}$) and enzyme production (q_p) did not show difference under different $k_{L,a}$ and Pg/V tested (Table 3). In all cultures, a $q_{S \text{ MeOH}}$ of $0.02 \text{ g g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$ was obtained. Meanwhile, q_p was statically the same in both CRD1 and 2, with a global mean value of $17.85 \pm 3.13 \text{ U g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$. These results are attributed to the deficiency of AOX1 enzyme in the Mut^S strain, which has a limited methanol uptake rate that is not affected by the specific growth rate as well as q_p .^[11]

Bioprocess scale-up

Treatment C achieved the highest dextranase and biomass production levels from treatments A–F in 2L bioprocesses. Based on these results, a scale-up process was performed with constant conditions from treatment C to a 42L bioreactor (30L bioprocess). The methanol feed was made by a pre-established feed profile and data obtained in treatment C ($\mu_{MeOH} = 0.01 \text{ hr}^{-1}$ and $q_{S \text{ MeOH}} = 0.02 \text{ g g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$), because in the 42L bioreactor was not possible to set up a methanol feed configuration as in 2L bioprocesses (Fig. 1). However, the specific consumption of methanol (coefficient V_{MeOH}/V_0) during the MFBBP was significantly the same at the three scales performed, which can offer a point of comparison between scales (Table 4).

The production of biomass and dextranase obtained in the scaled-up bioprocesses are shown in Figure 4. GBP lasted around 24hr in the 30L process as in 2L bioprocesses. Bioprocesses at 30L also reached DO levels of zero

Table 4. Specific rates and yields from the scaled-up process.

Bioprocess volume	μ_{Gly}	μ_{MeOH}	P_{MAX}	P_{V_MAX}	q_p	V_{MeOH}/V_0
2 L*	0.11 (0.00) ^a	0.01 (0.00) ^a	97.34 (0.52) ^a	973.37 (5.19) ^a	20.83 (0.23) ^a	0.12 (0.03) ^a
30 L	0.14 (0.02) ^a	0.01 (0.00) ^a	62.64 (10.13) ^b	626.40 (101.35) ^b	14.00 (0.67) ^b	0.14 (0.02) ^a

*Conditions from 2 L bioprocesses with a $k_L a$ of 154 hr^{-1} and a Pg/V of 2 kW m^{-3} were the basis to scale up. P_{MAX} , maximum volumetric dextranase activity (U mL^{-1}); P_{V_MAX} , maximum volumetric productivity ($\text{U L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$); q_p , specific production rate [$\text{U g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$]; V_{MeOH}/V_0 , relation of methanol added over initial volume (L L^{-1}). Gly, refers to GBP, while MeOH to MFBP. Mean values are presented (\pm SD), $n=3$. Different exponent script indicates a significant statistical difference with a p -value ≤ 0.05 .

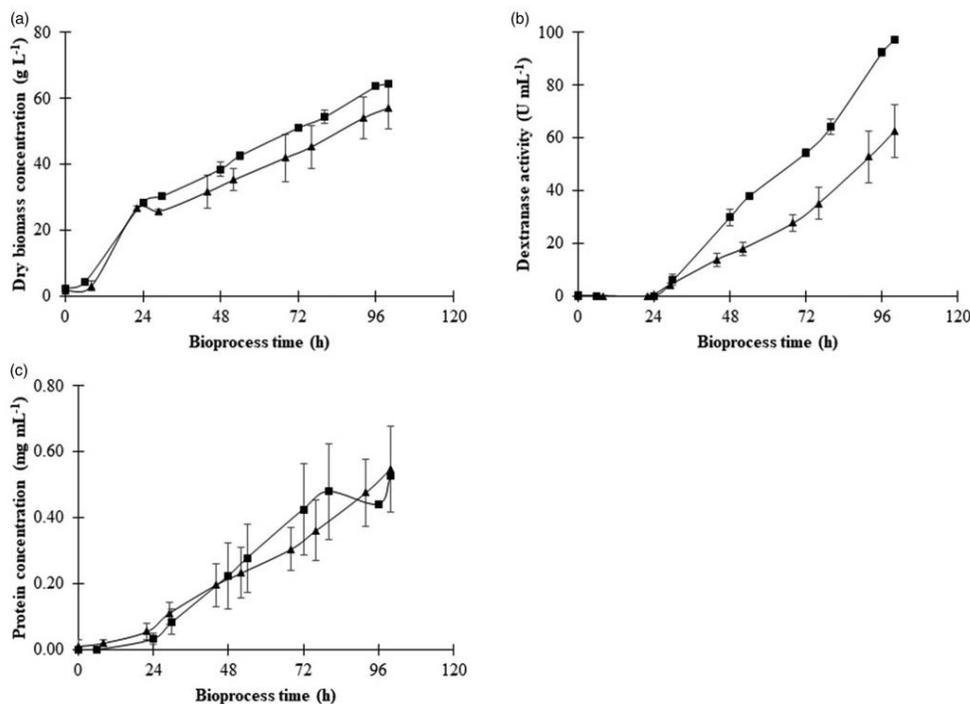


Figure 4. Kinetic comparison of (a) dry cell biomass production, (b) volumetric dextranase activity production, and (c) soluble protein accumulation in broth throughout fermentation in the different scales of the bioprocess: 2 L (filled squares), 30 L (filled triangles).

percent of saturation during growth on both GBP and MFBP (data not shown), hence the bioprocess at this scale was also under oxygen limited conditions. The results shown that μ_{Gly} and Y_{XS_Gly} were similar between the 2 and 30 L bioprocess, as well μ_{MeOH} and q_{S_MeOH} were also equivalent in both scales (Table 4).

The q_p and μ_{MeOH} are well parameters to compare the scale up process due to the different methanol feeding mode used between scales. In this line, scale-up process to 30 L is not completely successful due to the reduction in q_p achieved, even μ_{MeOH} was kept between 2 and 30 L bioprocesses. A decrease in biomass production during the MFBP was observed in the 30 L bioprocesses with respect to 2 L cultures (Fig. 4a). This low biomass production could have resulted in the lower dextranase production (Fig. 4b). With respect to results obtained in 2 L bioprocesses, maximum dextranase activity decreased by 35% ($62.64 \pm 10.13 \text{ U mL}^{-1}$) in the 30 L bioprocesses (Table 4). Additionally, the q_p value

decreased by 30% in the 30 L bioprocess to yield $14.0 \pm 0.67 \text{ U g}_x^{-1} \text{ hr}^{-1}$.

In the 2 L bioprocesses, methanol was not accumulated and was kept at a limited concentration (Fig. 5a). Then, the lower dextranase and biomass production achieved in the 30 L bioprocesses can be attributed to the methanol accumulation observed in 30 L bioprocesses during certain periods of the MFBP (Fig. 5b). Methanol accumulation is attributed to the lack of an automated system to supply methanol to the culture, like that used at 2 L bioprocesses, which keeps methanol at limited conditions. The methanol accumulation inhibited yeast growth (and dextranase production) until methanol concentration decreased to non-inhibitory levels and enzyme production was restarted as the biomass production (Fig. 4a and b). Differences between replicas in methanol concentration profiles in the 30 L bioprocesses are associated to the manual care for methanol accumulation performed based on DO levels during fermentation, without

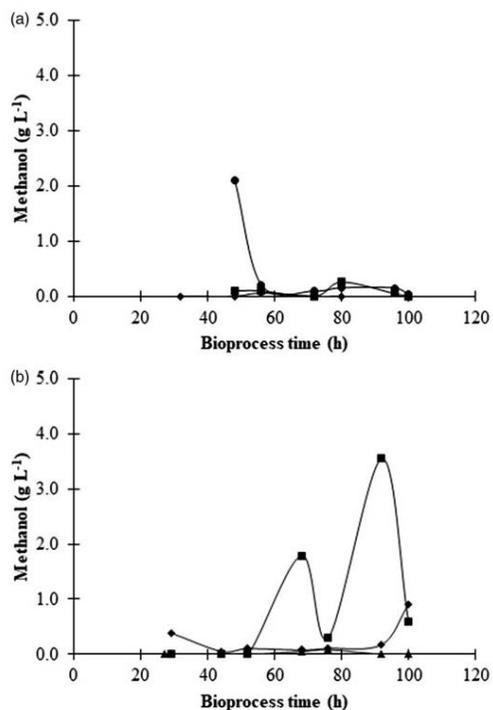


Figure 5. Methanol accumulation in bioprocesses at (a) 2L, (b) 30L scale. In 2L bioprocesses, methanol was added by DO control-loop, whereas at 30L bioprocesses used a predetermined methanol feed established as a function of μ and q_S . Each marker type represents a different fermentation run at each scale.

an online control loop linked between methanol concentration in broth and itself supply. Despite the presumable methanol accumulation in broth in 30L bioprocesses, specific growth and substrate consumption rates were similar to those in 2L, due to Mut^S strains do not accelerate its growth as fast as Mut^+ would do in the case of methanol accumulation.^[17]

Methanol concentration is highly relevant for recombinant *P. pastoris* strains under the control of pAOX1, which is turned off at concentrations below 0.2 g L^{-1} , and methanol inhibits cell growth at concentrations above 2 g L^{-1} .^[38] Our results are in accordance with reports on bioprocesses using controlled DO and methanol feed as a function of $q_{S \text{ MeOH}}$; where it was determined that high residual concentrations of methanol are not required for an adequate recombinant protein production in Mut^S strains.^[39] Also, according to our results obtained under oxygen-limited condition at the two scales performed, may indicate that a methanol build-up has more negative effects than a limited methanol concentration for Mut^S strains. These results are contrary to those previously established in other works with oxygen-limited conditions.^[33]

Methanol accumulation can result in cell intoxication due to the increase in metabolic intermediates such as hydrogen

peroxide and formaldehyde, which may cause cell lysis.^[40] Cell lysis can release protein products as proteases into the broth and reduce the dextranase concentration. In MFBP soluble protein production was similar in both scales (Fig. 4c). Due to the lower dextranase production in 30L bioprocesses, is quite possible that in 2L bioprocesses the main soluble protein fraction was dextranase as opposed to 30L bioprocesses, where other proteins than dextranase could be released to the broth.

Conclusion

The recombinant dextranase production by a *P. pastoris* Mut^S strain in bioprocesses with operational conditions founded in large scale bioreactors results in cultures under oxygen limited conditions. Due to the methanol feed mode used in 2L bioprocesses based on oxygen consumption by the yeast cells, methanol limited conditions were also achieved. Besides the oxygen limitation, carbon source conversion into biomass was similar to those values achieved by Mut^S strain in cultures with adequate oxygen supplementation, meanwhile dextranase q_p was two times higher than that obtained by a Mut^+ strain. The fed-batch bioprocess used here avoids the necessity of complex and expensive equipment for methanol supply, while avoiding methanol build up. Bioprocesses using *P. pastoris* to produce recombinant proteins without pure oxygen supply and easy to set up are highly interesting for commercial applications where the high cost of production is not worthy. To the best of our knowledge, this is the first study where the effects of two closely related scale-up criteria in *P. pastoris* bioprocesses have been evaluated at lab scale under operational conditions attainable at commercial production scale.

The results obtained from the scale-up process indicate that methanol feed must be limited for the expression of proteins under pAOX1 control even in cultures with oxygen-limited conditions. Even though the production of dextranase decreased in the scaled-up bioprocesses due to methanol accumulation, the conditions used for the scale-up process resulted in similar specific growth rate and biomass substrate yields.

Acknowledgments

Authors acknowledge technical support from Planta Piloto staff at the Instituto de Biotecnología (UNAM, México): V. Albiter, M. Caro and R. Tinoco. Also, thanks to E. Reynel for the determination of methanol in samples by GC. Special thanks to ALOPROT SA de CV (Aguascalientes, Mexico) for providing the recombinant yeast strain for the study.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) under Grant No. [333744].

References

[1] Delvigne, F.; Noorman, H. Scale-Up/Scale-Down of Microbial Bioprocesses: A Modern Light on an Old Issue. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 685–687.

[2] Dreher, T.; Walcarius, B.; Husemann, U.; Klingenberg, F.; Zahanow, C.; Adams, T.; de Wilde, D.; Casteels, P.; Greller, G. Microbial High Cell Density Fermentations in a Stirred Single-Use Bioreactor. In *Disposable Bioreactors II*, Eibl, D., Eibl, R., eds. Springer, Berlin Heidelberg, Germany, **2014**; pp. 127–147.

[3] Oldshue, J.Y. Fermentation Mixing Scale-Up Techniques. *Biotechnol. Bioeng.* **1966**, *8*, 3–24.

[4] Ju, L.K.; Chase, G.G. Improved Scale-Up Strategies of Bioreactors. *Bioprocess Eng.* **1992**, *8*, 49–53.

[5] Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. Bioreactor Scale-Up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 153–176.

[6] Vogl, T.; Hartner, F.S.; Glieder, A. New Opportunities by Synthetic Biology for Biopharmaceutical Production in *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotech.* **2013**, *24*, 1094–1101.

[7] Spohner, S.C.; Müller, H.; Quitmann, H.; Czermak, P. Expression of Enzymes for the Usage in Food and Feed Industry with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **2015**, *202*, 118–134.

[8] Nosedá, D.G.; Blasco, M.; Recúpero, M.; Galvagno, M.A. Bioprocess and Downstream Optimization of Recombinant Bovine Chymosin B in *Pichia (Komagataella) Pastoris* under Methanol-Inducible AOX1 Promoter. *Protein Express. Purif.* **2014**, *104*, 85–91.

[9] Cos, O.; Ramón, R.; Montesinos, J.L.; Valero, F. Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* under Different Promoters: A Review. *Microb. Cell Fact.* **2006**, *5*, 1–20.

[10] López-Pérez, M.; González-Cervantes, R. Production and Biotechnological Applications of Recombinant Proteins by Methylophilic Yeast: Past, Present and Future Perspectives. In *Biotechnology and Bioinformatics*, Thangadurai, D., Sangeetha, J., eds. Apple Academic Press, New York, USA, **2014**; pp. 199–229.

[11] Kupcsulik, B.; Sevelia, B. Effect of Methanol Concentration on the Recombinant *Pichia pastoris* Mut⁵ Fermentation. *Period. Polytech.-Chem.* **2004**, *48*, 73–87.

[12] Stratton, J.; Chiruvolu, V.; Meagher, M. High Cell-Density Fermentation. In *Pichia Protocols*, Higgins, D.R.; Cregg, J.M., eds. Humana Press, Totowa, NJ, **1998**; pp. 107–120.

[13] Trentmann, O.; Khatri, N.K.; Hoffmann, F. Reduced Oxygen Supply Increases Process Stability and Product Yield with Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1766–1775.

[14] García, X.; Ferrer, P.; Montesinos, J.; Valero, F. Fed-Batch Operational Strategies for Recombinant Fab Production with *Pichia pastoris* Using the Constitutive GAP Promoter. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *79*, 172–181.

[15] Lee, C.Y.; Lee, S.J.; Jung, K.H.; Katoh, S.; Lee, E.K. High Dissolved Oxygen Tension Enhances Heterologous Protein Expression by Recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* **2003**, *38*, 1147–1154.

[16] Baumann, K.; Maurer, M.; Dragosits, M.; Cos, O.; Ferrer, P.; Mattanovich, D. Hypoxic Fed-Batch Cultivation of *Pichia pastoris* Increases Specific and Volumetric Productivity of Recombinant Proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 177–183.

[17] Looser, V.; Brühlmann, B.; Bumbak, F.; Stenger, C.; Costa, M.; Camattari, A.; Fotiadis, D.; Kovar, K. Cultivation Strategies to

Enhance Productivity of *Pichia pastoris*: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1177–1193.

[18] Potvin, G.; Ahmad, A.; Zhang, Z. Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*: A Review. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *64*, 91–105.

[19] Charoenrat, T.; Ketudat-Cairns, M.; Stendahl-Andersen, H.; Jahic, M.; Enfors, S.O. Oxygen-Limited Fed-Batch Process: An Alternative Control for *Pichia pastoris* Recombinant Protein Processes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2005**, *27*, 399–406.

[20] Junker, B.H. Scale-Up Methodologies for *Escherichia coli* and Yeast Fermentation Processes. *J. Biosci. Bioeng.* **2004**, *97*, 347–364.

[21] Cerini, F.; Gaertner, H.; Madden, K.; Tolstorukov, I.; Brown, S.; Laukens, B.; Callewaert, N.; Harner, J.C.; Oommen, A.M.; Harms, J.T.; et al. A Scalable Low-Cost cGMP Process for Clinical Grade Production of the HIV Inhibitor 5P12-RANTES in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **2016**, *119*, 1–10.

[22] Zhao, W.; Wang, J.; Deng, R.; Wang, X. Scale-Up Fermentation of Recombinant *Candida Rugosa* Lipase Expressed in *Pichia pastoris* Using the GAP Promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35*, 189–195.

[23] Schilling, B.M.; Goodrick, J.C.; Wan, N.C. Scale-Up of a High Cell Density Continuous Culture with *Pichia pastoris* X-33 for the Constitutive Expression of rh-Chitinase. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 629–633.

[24] Schmideder, A.; Hensler, S.; Lang, M.; Stratmann, A.; Giesecke, U.; Weuster-Botz, D. High-Cell-Density Cultivation and Recombinant Protein Production with *Komagataella Pastoris* in Stirred-Tank Bioreactors from Milliliter to Cubic Meter Scale. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 177–184.

[25] Liu, W.-C.; Gong, T.; Wang, Q.-H.; Liang, X.; Chen, J.-J.; Zhu, P. Scaling-Up Fermentation of *Pichia pastoris* to Demonstration-Scale Using New Methanol-Feeding Strategy and Increased Air Pressure instead of Pure Oxygen Supplement. *Sci. Rep-UK.* **2016**, *6*, 18439.

[26] Purushe, S.; Prakash, D.; Nawani, N.N.; Dhakephalkar, P.; Kapadnis, B. Biocatalytic Potential of an Alkalophilic and Thermophilic Dextranase as a Remedial Measure for Dextran Removal during Sugar Manufacture. *Bioresource Technol.* **2012**, *115*, 2–7.

[27] Zohra, R.-R.; Aman, A.; Zohra, R.-R.; Ansari, A.; Ghani, M.; Qader, S.-A.-U. Dextranase: Hyper Production of Dextran Degrading Enzyme from Newly Isolated Strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 2149–2153.

[28] Chen, L.; Zhou, X.; Fan, W.; Zhang, Y. Expression, Purification and Characterization of a Recombinant *Lipomyces Starkey* Dextranase in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **2008**, *58*, 87–93.

[29] Roca, H.; Garcia, B.; Rodriguez, E.; Mateu, D.; Coroas, L.; Cremata, J.; Garcia, R.; Pons, T.; Delgado, J. Cloning of the *Penicillium minioluteum* Gene Encoding Dextranase and Its Expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **1996**, *12*, 1187–1200.

[30] Oosterhuis, N.M.G.; Kossen, N.W.F. Power Input Measurements in a Production Scale Bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **1981**, *3*, 645–650.

[31] Reuss, M.; Bajpai, R.K.; Lenz, R. In *Scale-Up Strategies Based on the Interaction of Transport and Reaction*. Presented at the 6th International Fermentation Symposium, London, Ontario, July 20–25, **1980**.

[32] Kuhn, J.; Müller, H.; Salzig, D.; Czermak, P. A Rapid Method for an Offline Glycerol Determination during Microbial Fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* **2015**, *18*, 252–255.

[33] Khatri, N.K.; Hoffmann, F. Impact of Methanol Concentration on Secreted Protein Production in Oxygen-Limited Cultures of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 871–879.

[34] Diaz-Barrera, A.; Gutierrez, J.; Martínez, F.; Altamirano, C. Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* Grown at Two Bioreactor Scales under Oxygen-Limited Conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 1133–1140.

- [35] Gurramkonda, C.; Adnan, A.; Gäbel, T.; Lünsdorf, H.; Ross, A.; Nemani, S.; Swaminathan, S.; Khanna, N.; Rinas, U. Simple High-Cell Density Fed-Batch Technique for High-Level Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris*: Application to Intracellular Production of Hepatitis B Surface Antigen. *Microb. Cell Fact* **2009**, *8*, 1–8.
- [36] Cos, O.; Serrano, A.; Montesinos, J.L.; Ferrer, P.; Cregg, J.M.; Valero, F. Combined Effect of the Methanol Utilization (Mut) Phenotype and Gene Dosage on Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris* Fed-Batch Cultures. *J. Biotechnol.* **2005**, *116*, 321–335.
- [37] Montes, F.J.; Catalán, J.; Galán, M.A. Prediction of $k_{1,a}$ in Yeast Broths. *Process Biochem.* **1999**, *34*, 549–555.
- [38] Lin, J.; Panigraphy, D.; Trinh, L.B.; Folkman, J.; Shiloach, J. Production Process for Recombinant Human Angiostatin in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2000**, *24*, 31–35.
- [39] Dietzsch, C.; Spadiut, O.; Herwig, C. A Dynamic Method Based on the Specific Substrate Uptake Rate to Set up a Feeding Strategy for *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, 1–9.
- [40] Jungo, C.; Marison, I.; von Stockar, U. Regulation of Alcohol Oxidase of a Recombinant *Pichia pastoris* Mut⁺ Strain in Transient Continuous Cultures. *J. Biotechnol.* **2007**, *130*, 236–246.