



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA**

**Millora en el procés de producció d'una  
lipasa de *Rhizopus oryzae* en *Pichia  
pastoris* mitjançant tècniques de  
monitoratge i estratègies de cultiu  
alternatives**

Programa de Doctorat:

**Biotecnologia**

Memòria que per a optar al grau de Doctora per la

Universitat Autònoma de Barcelona presenta:

**Anna Surribas i Casalprim**

Bellaterra, 2008



FRANCISCO VALERO BARRANCO, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JOSÉ LUIS MONTESINOS SEGUÍ, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que la llicenciada en Enginyeria Química Anna Surribas i Casalprim ha dut a terme sota la nostra direcció el treball amb el títol "Millora en el procés de producció d'una lipasa de *Rhizopus oryzae* en *Pichia pastoris* mitjançant tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu alternatives", que es presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè es prengui coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, novembre de 2008

Dr. Francisco Valero Barranco

Dr. José Luis Montesinos Seguí



Quan a causa dels anys no puguis córrer, trota.

Quan no puguis trotar, camina.

Quan no puguis caminar, fes servir el bastó.

Però no t'aturis mai!

Teresa de Calcuta

A en Jaume



M'agradaria agrair aquesta tesi a les següents persones:

Als meus directors, en Paco i en Jose Luis, per haver-me donat la oportunitat de fer aquesta tesi i haver-me fet costat durant tot aquest temps.

A les lipaseres i lipaserus amb qui he treballat: en Pau, l'Aina, l'Oriol, en Ramon, en Resi, l'Anna, en Manuel, la Kristin, la Carol i la Dolors. Ens ho hem passat molt bé, tant treballant com fora de la feina.

A totes i tots els que formàveu o formeu part del Departament d'Enginyeria Química de la UAB i de la Planta Pilot amb qui he compartit aquests anys. Ara que miro enrere m'adono que a banda de tot el que he après, la gent del departament sereu un dels bons records d'aquests anys.

Als de la meva colla d'Olot i als de la colla de Colomers. Finalment acabarem les tesis i tornarem a recuperar la nostra "vida social", els sopars, els tocs i, a partir d'ara, moltes passejades amb "cotxets". Quan vaig començar la tesi només pensàvem en viatjar i a viure la vida i ara ja passejarem una nova generació.

A la meva nova colla de Barna: la Houses, la Sandra, l'Eudald i en Riqui, que em fan les setmanes més divertides.

Ich möchte gerne allen Leutendanken, die ich in Hannover kennengelernt habe. Insbesondere Prof. Thomas Scheper, der mir die Gelegenheit für meinen Aufenthalt in Hannover gegeben hat. Ich habe viel Spass am TCI gehabt und würde, auf jedem Fall, das Institut und ihrer Leute empfehlen.

Thank you very much also to Elisa and all the other Erasmus students that made my weekends and free time in Hannover a very funny experience.

A en Santi MasPOCH, en Jose Manuel Amigo i en Jordi Coello del Departament de Química Analítica de la UAB, per tota l'ajuda rebuda i el treball que han fet amb les dades de fluorescència. Gràcies també per les dues publicacions que hem fet junts.

I would also like to thank Prof. Sven-Olof Enfors and Dr. Mehmedalija Jahic for my stay at KTH, Stockholm. Thank you also to all the people I met at KTH Biotechnology School. You made my stay there a very pleasant time, especially Magda. I would also like to thank my stay there to Irene Bergren, who has been the best landlady I have ever had. Your place was really a palace! Thank you also to Antoine and the other Erasmus students I met there, especially Balbina and Eduard.

Ich möchte auch der "Deutschen Gruppe im Stockholm" danken: Rainer, Andrea und Jörn. Rainer, wir haben viel miteinander gemacht und auch sehr viel gelacht, ich hoffe wir treffen uns schon bald wieder.

A la meva família de Colomers: la Dolors, en Josep, l'Helena, en Xus, en Pere, en Pol i l'Ona.

Al meu pare i la meva mare, l'Albert i la Mercè, perquè encara que soni a tòpic sense vosaltres no hauria fet mai aquesta tesi. A l'altra Surri, la Mireia, i a en David. A les meves iaies i al meu avi, als tiets i tietes i a la nova generació de "petites Casalprimes". Família encara que no sembli possible acabo la tesi: guardeu-vos un dia que això ho celebrarem!

I finalment voldria agrair aquesta tesi a en Jaume, perquè si hi ha una persona incondicional a la meva tesi ets tu. Ens hem *perseguit* per mig món, hem passat grans moments i hem compartit males estones però encara mantenim tota la nostra energia. Ara acabarem les tesis i espero que comencem una nova etapa amb molts altres projectes...

També agraeixo al Ministeri d'Educació la concessió d'una beca predoctoral FPU que ha estat el suport bàsic per portar a terme aquest treball.



<b>Resum</b> .....	<b>1</b>
<b>Objectius</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Introducció</b> .....	<b>7</b>
1.1 Sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants.....	8
1.1.1 Sistemes procariotes.....	8
1.1.2 Sistemes eucariotes.....	9
1.1.2.1 Els llevats.....	9
1.1.2.2 Els fongs filamentosos.....	10
1.1.2.3 El sistema cèl·lules d'insecte-baculovirus.....	11
1.1.2.4 Sistemes d'expressió basats en cèl·lules de mamífer.....	11
1.1.2.5 Animals transgènics.....	12
1.1.2.6 Sistemes d'expressió basats en plantes transgèniques.....	13
1.2 La lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> : la proteïna d'interès.....	13
1.3 <i>Pichia pastoris</i> com a sistema d'expressió.....	14
1.3.1. El metabolisme del metanol en <i>P. pastoris</i> .....	15
1.3.2. Els promotors en <i>P. pastoris</i> .....	17
1.4 Producció de proteïnes heteròlogues en <i>P. pastoris</i> .....	18
1.4.1. El medi de fermentació i les condicions de cultiu.....	18
1.4.2. L'estratègia de cultiu.....	20
1.5 El monitoratge del cultiu.....	22
1.6 Treballs previs amb la ROL.....	25
1.7 Referències bibliogràfiques.....	26
<b>2. Materials i mètodes generals</b> .....	<b>31</b>
2.1 Soques.....	33
2.2 Manteniment de soques.....	33
2.3 Preparació de l'inòcul.....	33
2.4 Medis de cultiu.....	34
2.4.1 Medi Invitrogen.....	34
2.5 Equipament emprat.....	34
2.5.1 Cultius discontinus.....	35
2.5.2 Cultius discontinus alimentats.....	36
2.5.2.1. Control de la sobrepressió.....	36
2.5.2.2. Mesura i control de la concentració de metanol al medi de cultiu.....	37
2.5.2.3. Addició de substrat.....	38
2.5.2.4. Monitoratge de les concentracions d'oxigen i CO <sub>2</sub> dels gasos de sortida.....	38
2.6 Estratègia de cultiu.....	38
2.6.1 Cultius discontinus.....	38
2.6.2 Cultius discontinus alimentats.....	39
2.7 Mètodes analítics.....	41
2.7.1. Determinació de la concentració de biomassa total.....	41
2.7.2. Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular.....	41
2.7.3. Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular.....	43
2.7.4. Determinació de la proteïna total.....	43
2.7.5. Determinació de les concentracions de substrat.....	43
2.7.5.1. Glicerol.....	43
2.7.5.2. Metanol.....	44
2.8 Càlculs dels cultius i determinació de velocitats específiques.....	44
2.9 Referències bibliogràfiques.....	45

### **3. Monitoratge en línia de la concentració de metanol residual al medi de cultiu: aplicació d'un analitzador d'injecció seqüencial (SIA).....47**

3.1 Introducció.....	49
3.2 Materials i mètodes.....	52
3.2.1 Soca.....	52
3.2.2 Condicions de cultiu.....	52
3.2.3 Reactius i solucions emprades al SIA. ....	53
3.2.4 Equipament i programari del SIA. ....	53
3.2.5 Equip de presa de mostres. ....	54
3.3 Resultats.....	55
3.3.1 Esquema de l'analitzador SI. ....	55
3.3.2 Diagrama de flux de l'anàlisi.....	59
3.3.3 Calibratge de l'analitzador i factors que afecten l'anàlisi.....	60
3.3.4 Seguiment d'una fermentació de <i>P. pastoris</i> . ....	61
3.4 Conclusions.....	64
3.5 Referències bibliogràfiques.....	65

### **4. Monitoratge de la biomassa en cultius discontinus de *P. pastoris* a partir d'anàlisis fluorimètriques *off-line*.....69**

4.1 Introducció .....	71
4.1.1 Mètodes per a la determinació de la biomassa. ....	71
4.1.2 La fluorescència com a tècnica per al monitoratge dels cultius de <i>P. pastoris</i> .....	74
4.2 Materials i mètodes.....	75
4.2.1 Medis, reactius i solucions utilitzades. ....	75
4.2.2 Equipament.....	76
4.3 Resultats.....	77
4.3.1 Determinació de les longituds d'ona òptima pels diferents fluoròfors cel·lulars .....	77
4.3.2 Estudis de fluorescència en mostres de fermentació. ....	79
4.3.3 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del triptòfan. ....	81
4.3.4 Estimació de la biomassa a partir de mesures fluorimètriques <i>off-line</i> en cultius discontinus de 40 g·l <sup>-1</sup> de glicerol i 10 g·l <sup>-1</sup> de metanol .....	84
4.3.5 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del NADH. ....	89
4.4 Conclusions .....	90
4.5 Referències bibliogràfiques.....	91

### **5. Aplicació de la fluorimetria in situ en el monitoratge de cultius discontinus de *P. pastoris*.....95**

5.1 Introducció.....	97
5.2 Materials i mètodes .....	102
5.2.1 Medis i condicions de cultiu .....	102
5.2.2 Anàlisi del glicerol i del metanol .....	103
5.2.3 Mesures de fluorescència del cultiu .....	103
5.2.4 Mètodes quimiomètrics .....	105
5.3 Resultats .....	107
5.3.1 Cultius no induïts.....	107
5.3.2 Cultius induïts.....	111

5.3.3 Aplicació del <i>Parallel Factor Analysis</i> (PARAFAC) combinat amb regressions PLS per al monitoratge de cultius no induïts de <i>P. pastoris</i> mitjançant fluorimetria <i>in situ</i> .....	115
5.4 Conclusions .....	120
5.5 Referències bibliogràfiques .....	122

## **6. Monitoratge de l'expressió extracel·lular de la ROL en *Pichia pastoris* mitjançant la seva fusió a la *Green Fluorescence Protein* com a proteïna indicadora.....125**

6.1 Introducció.....	127
6.2 Materials i mètodes .....	129
6.2.1 Soques .....	129
6.2.2 Construcció del plàsmid i la soca.....	129
6.2.3 Medis i condicions de cultiu .....	131
6.2.4 Anàlisi del sorbitol .....	131
6.2.5 Mesures fluorimètriques.....	132
6.2.6 Anàlisi SDS-Page i Western Blot .....	132
6.3 Resultats .....	133
6.3.1 Construcció, aïllament de transformants i estudis d'expressió.....	133
6.3.2 Monitoratge dels nivells de fluorescència extracel·lular de la GFP en cultius en bioreactor.....	134
6.4 Conclusions.....	140
6.5 Referències bibliogràfiques .....	142

## **7. Estudi de l'efecte de la concentració de metanol sobre la producció de ROL en cultius discontinus alimentats i avaluació d'estratègies de producció alternatives en soques de fenotip Mut+.....145**

7.1 Introducció.....	147
7.2 Materials i mètodes .....	153
7.2.1 Inòcul.....	153
7.2.2 Medi de cultiu per al discontinu i condicions d'operació.....	153
7.2.3 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants (MNLFB, en sigles angleses).....	154
7.2.4 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions limitants (MLFB, en sigles angleses) .....	154
7.2.5 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions de temperatura limitant (TLFB, en sigles angleses) .....	155
7.2.6 Determinació del metanol.....	155
7.2.7 Mesures per citometria de flux .....	156
7.2.8 Assaig d'activitat d' AOX. ....	156
7.3 Resultats.....	157
7.3.1 Estudi de la producció de ROL en cultius discontinus alimentats a diferents concentracions de metanol residual .....	157
7.3.2 Efecte de la inducció amb metanol sobre la viabilitat cel·lular .....	167
7.3.3 Evolució de l'activitat intracel·lular d'alcohol oxidasa durant la fase d'inducció amb metanol.....	171
7.3.4 Avaluació de tècniques de producció alternatives: La limitació per temperatura i la utilització d'un medi de cultiu de menor osmolaritat. ....	172

7.3.4.1 Anàlisi dels nivells d'activitat intracel·lulars d'AOX aplicant les diferents estratègies de cultiu.....	180
7.3.5 Avaluació de la puresa del producte quan s'utilitzen estratègies alternatives d'operació.....	181
7.4 Conclusions.....	182
7.5 Referències bibliogràfiques.....	184
<b>8. Estudi del canvi d'escala del procés de producció de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> en el sistema d'expressió de <i>P. pastoris</i>.....</b>	<b>187</b>
8.1 Introducció.....	189
8.2 Materials i mètodes.....	191
8.2.1 Inòcul.....	191
8.2.2 Sistema de cultiu experimental.....	192
8.2.3 Sistema de monitoratge i addició de metanol.....	193
8.3 Resultats.....	194
8.3.1 Implementació del sensor de metanol Model 2.1 al sistema experimental. Calibratge.....	194
8.3.2 Cultius a escala pilot.....	196
8.4 Conclusions.....	205
8.5. Referències bibliogràfiques.....	206
<b>Conclusions.....</b>	<b>209</b>
<b>Llistat de publicacions.....</b>	<b>213</b>
<b>Abreviatures.....</b>	<b>215</b>
<b>Apèndix.....</b>	<b>221</b>

# Resum

En el present treball s'exposen dues línies de treball centrades en el procés de producció d'una lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *Pichia pastoris*: la utilització de diferents tècniques de monitoratge i l'aplicació d'estratègies de cultiu que permetin millorar la producció ROL en una soca Mut<sup>+</sup> d'aquest sistema d'expressió.

D'una banda, s'avaluen diferents tècniques de monitoratge per al seguiment tant del metanol, substrat inductor amb un efecte clar sobre la producció, com d'altres variables de cultiu importants: biomassa i producte d'interès. L'objectiu principal de la utilització d'aquestes tècniques és millorar el coneixement en temps real d'aquestes variables i utilitzar-les, quan sigui possible, per millorar la producció de la ROL. D'altra banda, s'estudia el procés de producció de la ROL i les seves limitacions. S'avalua l'aplicació de tècniques de cultiu alternatives i els seus avantatges i inconvenients prèviament a l'escalat del procés a nivell pilot.

Per al monitoratge del metanol, sorgeix la necessitat de desenvolupar un mesurador que permeti disposar de lectures en línia de la seva concentració residual en temps real. Per aquest motiu, es desenvolupa un analitzador d'injecció seqüencial que permet mesurar en línia la concentració de metanol en cultius discontinus alimentats. La freqüència d'anàlisi és adequada per a cultius Mut<sup>s</sup> però no és suficient per a soques Mut<sup>+</sup>. En aquest cas, s'opta per mesuradors comercials de metanol en fase gas.

Per optimitzar una estratègia de producció no només és necessari disposar de mesures en línia de la concentració de substrat sinó que cal mesurar altres variables de procés, com ara la biomassa i la proteïna d'interès. En aquest sentit, s'ha treballat amb el senyal de fluorescència com a una eina de monitoratge alternativa aplicable al seguiment de més d'una variable de procés.

Inicialment s'aborda el seguiment de l'evolució de la biomassa en cultius discontinus tant induïts com no. En aquest primer estudi s'utilitza un fluorímetre de sobretaula amb determinacions *off line* de la fluorescència. La determinació de la biomassa es fa de forma indirecta a partir del senyal d'un fluoròfor cel·lular típic, el triptòfan. Per poder fer el seguiment durant tot el cultiu cal aplicar un sistema de dilució de les mostres.

Posteriorment, s'observen les limitacions d'un sistema *off line* de mesura d'aquest tipus de senyal i es comprova el comportament d'una sonda *in situ* de determinació de fluorescència a múltiples longituds d'ona. Aquest sistema presenta dos avanços respecte el primer estudi: no és necessari prendre mostra ni diluir-la i es

pot mesurar el senyal de més d'un fluoròfor cel·lular. L'objectiu es centra en determinar no només la biomassa, sinó també el substrat i la proteïna d'interès.

Es tracta l senyal multivariable resultant de l'aplicació de la fluorimetria 2D *in situ* mitjançant mètodes quimiomètrics, que permeten correlacionar les variables de procés amb la informació recollida rellevant. En el marc d'aquest treball, s'apliquen els mètodes quimiomètrics PLS i PARAFAC+PLS per a la predicció de la biomassa i el substrat a partir del senyal 2D de fluorescència recollit de diferents cultius discontinus de *P. pastoris*, induïts i no. El seguiment de la biomassa millora respecte el sistema *off line* i es realitza a partir de la combinació del senyal de tres fluoròfors: el triptòfan, el NAD(P)H i la riboflavina. L'evolució del substrat es pot predir de manera correcta atesa la correlació que hi ha entre ell i la biomassa. Pel que fa a la proteïna d'interès no és possible fer-ne una bona determinació.

Per aquest motiu, es fusiona la ROL a la *Green Fluorescence Protein* (GFP). Així quan es secreta la ROL al medi de cultiu està unida a aquesta proteïna fluorescent, detectable per fluorimetria. A diferència d'altres treballs publicats, en el cas de la fusió de la GFP amb la ROL, s'afecten els nivells d'expressió respecte als de la ROL únicament. D'altra banda, es detecta que la fluorescència de la riboflavina, que excreta *P. pastoris* al medi de forma natural, exerceix una interferència considerable al senyal de fluorescència de la GFP S65T escollida. Aquest problema es pot solucionar operacionalment filtrant les mostres prèviament a la determinació del senyal de la GFP o, des d'una perspectiva biològica, si es fusionés la ROL a un altre mutant de la GFP amb una fluorescència més allunyada a la de la riboflavina. Optimitzar aquest sistema de seguiment de l'expressió de la proteïna d'interès permetria aplicar una única tècnica de monitoratge per a les tres variables de procés.

En la línia d'estudi de la producció de la ROL, s'havia observat que la concentració de metanol present al medi de cultiu era un paràmetre important per a l'optimització de la seva producció amb la soca Mut<sup>s</sup>. Per això, es decideix estudiar quin és l'efecte del nivell de metanol residual en cultius discontinus alimentats amb la soca Mut<sup>+</sup>, des de concentracions de 0.5 g·l<sup>-1</sup> fins a aproximadament 5 g·l<sup>-1</sup>. Existeix una concentració de metanol òptima entorn els 2.5 g·l<sup>-1</sup> i a concentracions superiors s'aprecia inhibició per substrat. També s'observa un fenomen de limitació per transferència d'oxigen al final del cultiu i una important disminució de la viabilitat cel·lular.

Per aquest motiu, s'avaluen estratègies de cultiu alternatives. D'una banda es s'aplica una estratègia de metanol limitant (MLFB) quan apareix la limitació d'oxigen al

final d'un discontinu alimentat a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol (MNLFB). Amb això es pot allargar el cultiu i millorar-ne la productivitat un 40%. També s'aplica una estratègia de temperatura limitant per avaluar el seu efecte sobre la viabilitat del cultiu i la producció. Aquesta estratègia no aporta resultats millors als observats. Finalment, es decideix avaluar l'efecte de l'osmolaritat del medi de cultiu sobre la viabilitat cel·lular i s'aplica una estratègia MNLFB a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual però amb un medi amb un menor contingut en sals i una fase final amb limitació de temperatura. S'aconsegueix reduir la mortalitat cel·lular durant la fase d'inducció. Malgrat que la productivitat disminueix amb aquesta estratègia un 26% respecte el cultiu on es s'aplica una fase de MLFB al final de la inducció, s'obté un producte final un 30% més net en quant a activitat lipolítica respecte proteïna total.

Un cop avaluades les millors condicions per a la producció de la ROL amb la soca Mut<sup>+</sup> es procedeix a escalar la producció en planta pilot. Durant aquest estudi, s'observa de nou la importància de la transferència d'oxigen. La limitació d'oxigen en fases inicials de la inducció origina l'aparició d'un subproducte que redueix la producció de ROL extracel·lular. Millorar l'aport d'oxigen a escala pilot resulta en una minimització d'aquesta limitació i en una millora de la producció. No s'aconsegueixen els mateixos nivells de productivitat que a escala laboratori però es continua treballant en la línia de la millora de la transferència de matèria.



# Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és aplicar diferents tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu que permetin millorar la producció d'una lipasa de *R. oryzae* (ROL) en el sistema d'expressió de *P. pastoris* i, en concret, d'una soca Mut<sup>+</sup> d'aquest llevat.

Per tal de millorar la producció de la ROL en *P. pastoris* caldrà determinar l'efecte que hi juguen diferents variables i com es poden monitorar al llarg del cultiu. Així mateix, com a objectiu general per a l'optimització d'un bioprocés, és necessari disposar d'un seguiment en línia de les principals variables del cultiu que permetin fer un seguiment de la reproduïbilitat del cultiu i poder-lo controlar en cas que sigui necessari.

Aquest objectiu general es desenvolupa al llarg del treball a través de:

1. El desenvolupament de diferents tècniques de monitoratge aplicades al sistema d'expressió de *P. pastoris*.
  - Per al seguiment del metanol al llarg de cultius induïts es desenvoluparà un analitzador d'injecció seqüencial (SIA) automàtic i es compararà amb l'aplicació de diferents sensors comercials.
  - Per al seguiment de la biomassa, el substrat i la proteïna d'interès s'avaluarà el monitoratge del senyal de fluorescència del cultiu.
2. L'avaluació de l'efecte de la concentració de metanol residual sobre la productivitat del procés i el disseny i aplicació d'estratègies de cultiu alternatives per al fenotip Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*.
  - S'avaluarà l'efecte de la concentració de metanol residual sobre el sistema d'expressió i la concentració òptima de substrat que maximitza la producció extracel·lular de la ROL en una soca Mut<sup>+</sup>.
  - Es determinaran les limitacions de l'estratègia de cultiu convencional, en especial les relacionades amb la transferència d'oxigen però també d'altres associades al sistema biològic.
  - S'aplicaran estratègies de cultiu alternatives a l'esquema clàssic de bioprocés per fenotips Mut<sup>+</sup> per millorar les limitacions que s'hi hagin observat. Es treballarà amb tècniques de limitació de temperatura, reducció i control de la pressió osmòtica i limitació per metanol.
  - S'estudiaran els paràmetres que afecten el canvi d'escala, especialment els relacionats amb la transferència d'oxigen.

# 1

## Introducció

1.1 Sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants.....	9
1.1.1 Sistemes procariotes.....	9
1.1.2 Sistemes eucariotes.....	10
1.1.2.1 Els llevats.....	10
1.1.2.2 Els fongs filamentosos.....	11
1.1.2.3 El sistema cèl·lules d'insecte-baculovirus.....	11
1.1.2.4 Sistemes d'expressió basats en cèl·lules de mamífer.....	12
1.1.2.5 Animals transgènics.....	12
1.1.2.6 Sistemes d'expressió basats en plantes transgèniques.....	13
1.2 La lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> : la proteïna d'interès.....	14
1.3 <i>Pichia pastoris</i> com a sistema d'expressió.....	14
1.3.1. El metabolisme del metanol en <i>P. pastoris</i> .....	16
1.3.2. Els promotors en <i>P. pastoris</i> .....	17
1.4 Producció de proteïnes heteròlogues en <i>P. pastoris</i> .....	19
1.4.1. El medi de fermentació i les condicions de cultiu.....	19
1.4.2. L'estratègia de cultiu.....	20
1.5 El monitoratge del cultiu.....	22
1.6 Treballs previs amb la ROL.....	25
1.7 Referències bibliogràfiques.....	26

## 1.1 Sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants.

Els sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants estan basats en sistemes procariotes i eucariotes, cadascun amb els seus avantatges i inconvenients. Per tal d'escollir el sistema d'expressió més correcte cal considerar diferents aspectes que van des de la productivitat del sistema, les característiques físico-químiques i la bioactivitat de la proteïna fins a aspectes econòmics o de seguretat del sistema (Yin *et al.* 2007).

### 1.1.1 Sistemes procariotes.

Dintre aquest grup de sistemes hi trobem microorganismes que han estat àmpliament utilitzats per a l'expressió de proteïnes recombinants, és el cas de ***Escherichia coli***. Aquesta bactèria presenta grans avantatges en quant a l'elevada velocitat específica de creixement i el relatiu baix cost dels seus cultius però també té limitacions: no pot realitzar modificacions post-translacionals (N- i O-glicosilacions, fosforilacions, formar ponts disulfur). Aquestes modificacions són importants per a les estructures terciàries i quaternàries de les proteïnes i, per tant, per a la seva activitat, estructura i estabilitat. D'altres proteïnes es pleguen malament degut a la manca de les xaperones adequades pel seu plegament.

Una altra limitació important és l'optimització dels codons més adients per a l'expressió d'una determinada proteïna. No obstant això, s'estan desenvolupant diferents estratègies per corregir aquestes limitacions (Sahdev *et al.* 2008).

Malgrat totes aquestes limitacions *E. coli* ha estat utilitzat com a sistema d'expressió per a moltes proteïnes en escala de grams/litre (Georgiou & Segatori 2005).

Hi ha altres sistemes d'expressió procariotes que permeten evitar alguna d'aquestes limitacions. ***Bacillus subtilis*** és un microorganisme reconegut com a generalment segur (GRAS, en sigles angleses) que presenta alguns d'aquests avantatges: no produeix liposacàrids al medi, un subproducte típic d'*E. coli* que pot produir desordres degeneratius en humans i animals, és de fàcil manipulació genètica i pot ser fàcilment transformat, pot secretar proteïnes plegades al medi i pot créixer fins a altes densitats cel·lulars en medis senzills i barats.

No obstant això encara hi romanen algunes limitacions comunes amb *E. coli* com serien la degradació de les proteïnes expressades per proteases, la inestabilitat dels plàsmids i en ocasions la impossibilitat d'expressar algunes proteïnes o de fer-ho a nivells acceptables.

A banda d'aquests sistemes procariotes, n'han aparegut d'altres d'alternatius en els últims anys com ara *Pseudomonas fluorescens* i *Ralstonia eutropha*. Tot i que poden ser prometedores alternatives a *E. coli* encara hi ha poc coneixement sobre aquests sistemes (Georgiou & Segatori 2005).

### 1.1.2 Sistemes eucariotes.

#### 1.1.2.1 Els llevats.

Els llevats com a sistema d'expressió combinen amb els sistemes procariotes la simplicitat de cultiu, les velocitats relativament altes de creixement i uns costos baixos amb la disponibilitat d'un sistema que permet que proteïnes expressades intracel·lularment siguin secretades al medi. En ser sistemes eucariotes tenen la possibilitat de produir proteïnes solubles que hagin experimentat les modificacions post-translacionals necessàries per a la seva funcionalitat. Els llevats són cèl·lules més fàcilment manipulables genèticament que les cèl·lules animals i es poden cultivar fins a altes densitats cel·lulars.

Aquests microorganismes reuneixen condicions segures ja que no alberguen patògens, inclusions virals o pirògens (Boer *et al.* 2007).

Altres avantatges serien la presència de promotors forts que permeten conduir l'expressió de la proteïna d'interès i facilitar l'obtenció de grans quantitats de productes.

No obstant això aquests sistemes difereixen de les cèl·lules animals en la forma en què N- i O- glicosilen les proteïnes d'interès. Malgrat tot, s'estan produint avanços per humanitzar aquestes glicosilacions (Hamilton *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006).

El primer llevat utilitzat per a l'expressió de proteïnes heteròlogues va ser *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest microorganisme presenta algunes limitacions ja que tendeix a hiperglicosilar les proteïnes i les N- glicosilacions a acabar en un enllaç  $\alpha$ 1,3-manosa potencialment al·lergen.

Han aparegut sistemes alternatius per evitar aquests desavantatges com serien les espècies metilotròfiques *Candida boidinii*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris* i *Pichia angusta* (anteriorment *Hansenula polymorpha*) i també *Kluyveromyces lactis*, *Arxula adenivorans* i *Yarrowia lipolytica*. Boer i col·laboradors fan una bona descripció d'aquests sistemes i dels seus avantatges i aplicacions (Boer *et al.* 2007).

### 1.1.2.2 Els fongs filamentosos.

Els fongs filamentosos també han estat explotats com a factoria cel·lular. Tenen la capacitat de secretar grans quantitats de proteïnes extracel·lulars. *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae* han estat utilitzats en el camp de l'alimentació des de fa temps i estan reconeguts com a segurs.

No obstant això, la producció de proteïnes no fúngiques en fongs filamentosos a vegades està limitada. El sistema de secreció dels fongs filamentosos és poc conegut en comparació amb el dels llevats. Malgrat tot, s'han reportat diferents mètodes per evitar aquest desavantatge i a la bibliografia es poden trobar bones revisions d'aquest tòpic (Punt *et al.* 2002).

### 1.1.2.3 El sistema cèl·lules d'insecte-baculovirus.

Aquest sistema d'expressió es basa en la infecció per baculovirus de cèl·lules d'insecte. La infecció per baculovirus està limitada als insectes, per tant, no són perillosos ni per humans ni per bestiar o aviram. Cal insertar el gen d'interès en un vector de transfecció que s'incorpora al genoma del baculovirus. S'han expressat molts gens heteròlegs amb aquest sistema (Lecina *et al.* 2006; Douris *et al.* 2006).

Un dels majors avantatges d'aquest sistema d'expressió és la capacitat de processament de les proteïnes expressades i està considerat com una bona eina per a l'expressió de glicoproteïnes. Els productes expressats tenen una conformació semblant a la nativa, els processos post-translacionals es donen correctament, no hi ha contaminació per endotoxines i la proteïna d'interès és transportada correctament.

Aquest sistema presenta, però, algunes deficiències. Cada síntesi requereix la infecció d'una nova cèl·lula i això fa que aquest sistema sigui inferior en capacitat de cultiu en continu als sistemes d'expressió procariotes o basats en llevats.

Així mateix les cèl·lules d'insecte i les de mamífer difereixen en els seus patrons de glicosilació, en la longitud dels oligosacàrids i en el contingut de manoses. Per això la bioactivitat de les proteïnes produïdes poden diferir de les natives. Malgrat aquests inconvenients, s'han transformat cèl·lules d'insecte amb gens constitutius de mamífer i es poden expressar glicoproteïnes humanitzades en línies cel·lulars d'insectes.

#### 1.1.2.4 Sistemes d'expressió basats en cèl·lules de mamífer.

Aquests sistemes d'expressió presenten alguns avantatges respecte als anteriors sistemes ja que poden plegar, ensamblar i dur a terme correctament modificacions post-translacional. Per tant la qualitat i l'eficàcia d'aquests sistemes per a l'expressió de proteïnes eucariotes és superior a la d'altres sistemes d'expressió (Jain & Kumar 2008). Una de les principals limitacions són els baixos nivells d'expressió (Houdebine 2007).

Es poden utilitzar per l'expressió transitòria o estable depenent de si s'utilitzen **cèl·lules COS TES** o **COS SES**.

Malgrat que els elevats costos, la complexitat de la tecnologia i la potencial contaminació amb virus animals poden ser colls d'ampolla per la utilització dels sistemes basats en cèl·lules de mamífers, aquests han estat àmpliament utilitzats per expressar moltes proteïnes heteròlogues incloent proteïnes estructurals de virus i pèptids bioactius per anàlisis específics (Gasser & Mattanovich 2007; Jain & Kumar 2008).

#### 1.1.2.5 Animals transgènics.

Els animals transgènics ofereixen possibilitats atractives per a la producció de proteïnes farmacèutiques recombinants. D'entre els avantatges es destaquen l'elevada producció i el baix cost però hi ha altres inconvenients, com la dificultat de purificar la proteïna d'interès d'altres de procedència animal. També cal prendre especial precaució en comprovar que patògens animals actius en humans no es troben presents en les preparacions proteïques.

Encara que hi ha diverses espècies animals que poden produir proteïnes recombinants hi ha dos sistemes implementats: la llet de mamífers transgènics i la clara d'ou. Hi ha una proteïna produïda a partir de la llet, l'antitrombina humana III, que ha estat autoritzada per l'EMEA per sortir al mercat el 2006 (Houdebine 2007). Pel que fa a la utilització de la clara d'ou, està esdevenint més atractiva degut a la millora en l'obtenció d'aus transgèniques. En aquests sistemes s'ha produït experimentalment gran varietat de proteïnes: anticossos monoclonals, vacunes, factors sanguinis, hormones, col·làgen...

Altres sistemes utilitzats serien la sang, el plasma seminal, l'orina, les glàndules de la seda i larves d'insecte. La llet evita problemes toxicològics que es poden presentar quan es sobreexpressa una proteïna en un medi com, per exemple, la sang.



S'estan estudiant diferents mamífers per produir proteïnes (**conills, porcs, ovelles, cabres i vaques**). Normalment s'hi expressen proteïnes que es secreten de forma natural i sinó s'hi afegeix un pèptid senyal.

L'ús d'animals transgènics per a l'obtenció de proteïnes farmacèutiques no desperta molta controvèrsia ètica ni de seguretat. És poc probable que s'alliberin els animals al medi i en la majoria de casos no pateixen pel fet d'expressar una proteïna heteròloga, malgrat que s'han donat alguns exemples que demostren el contrari (Massoud *et al.* 1996).

#### **1.1.2.6 Sistemes d'expressió basats en plantes transgèniques.**

Les plantes han estat modificades genèticament per produir valuoses proteïnes i han demostrat el seu enorme valor com a bioreactors per generar anticossos monoclonals per malalties humanes i animals (Ko & Koprowski 2005).

Les plantes ofereixen diversos avantatges: no poden contenir patògens animals, tenen un baix cost de producció i són sistemes fàcilment escalables. Les proteïnes poden acumular-se en diferents parts de la planta (fulles, llavors), que poden ser emmagatzemades fàcilment. Pel contrari també presenten algunes limitacions: glicosilen les proteïnes de manera diferent a com ho fan els animals, la purificació de les proteïnes a partir de plantes pot ser una tasca laboriosa i tenen baixes eficiències de transformació i expressió (Yin *et al.* 2007).

Utilitzar plantes per produir proteïnes no desperta controvèrsies ètiques però sí preocupació per la virtual disseminació de les proteïnes si les plantes són cultivades a camp obert. Les plantes haurien de ser estèrils per evitar disseminar el gen transgènic. Es podrien cultivar les plantes en hivernacles però així s'encaririen els costos de producció, que són un dels principals atractius d'aquest sistema. Es proposen diferents alternatives per solucionar aquests inconvenients, entre elles cultivar cèl·lules de plantes (Houdebine 2007).

El potencial comercial de les plantes transgèniques no es pot obviar i s'estan desenvolupant alguns sistemes en animals model com a vacunes "sense agulla" per prevenir malalties en bestiar i humans (Giudice & Campbell 2006).

La selecció del sistema d'expressió més adient és una decisió que implica molts factors. No només cal considerar la qualitat i la quantitat desitjades de la proteïna d'interès sinó també el cost, la disponibilitat i la conveniència del sistema d'expressió.

## 1.2 La lipasa de *Rhizopus oryzae*: la proteïna d'interès.

*R. oryzae* és un fong lipolític. Els fongs del gènere *Rhizopus* són productors naturals d'enzims lipolítics. S'han referenciat més de trenta lipases produïdes per aquest gènere. La diferència entre moltes d'aquestes lipases rau en alguns aminoàcids. Per exemple les diferències entre la lipasa de *R. oryzae* (ROL) i les de *Rhizopus delemar* (RDL) i *Rhizopus javanicus* (RJL) està només en què la His134 i la Ile234 són respectivament aspargina i leucina a la ROL (Minning *et al.* 1998).

La ROL nativa és una proteïna de 392 aminoàcids dividits en uns 26 primers aminoàcids que conformen la seqüència senyal, seguits d'una pro-regió de 97 aminoàcids i finalment els 269 aminoàcids que contenen la seqüència de la proteïna madura (Beer *et al.* 1998).

La proteïna madura té un pes molecular de 32 KDa, presenta 4 punts potencials de N- glicosilació i tres ponts disulfur (entre els aminoàcids 152 - 391, el 163 - 166 i el 358 - 367). L'enzim natiu és estable a 30°C a pH entre 4.5 i 7.0 i el seu òptim d'activitat es troba a pH=8.5.



Figura 1.1. Estructura tridimensional de la ROL.

## 1.3 *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió.

En aquest treball s'utilitza *P. pastoris* com a sistema d'expressió per a la producció de ROL. S'ha escollit aquesta proteïna com a model per estudiar les possibilitats d'aquest llevat a l'hora d'expressar una proteïna amb ponts disulfur i possibles punts de glicosilació.

*P. pastoris* va emergir com a llevat important en biotecnologia a la dècada dels 80 quan la Phillips Petroleum, que als anys 70 havia desenvolupat la tecnologia per a l'obtenció de *Single Cell Proteins* (SCP, en sigles angleses) amb aquest llevat, va col·laborar amb el Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc. (SIBIA) per utilitzar-lo com a sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues.

És un llevat metilotròfic que presenta diferents avantatges respecte altres llevats com a sistema d'expressió. Tal i com s'ha comentat, la glicosilació representa una important modificació per a les proteïnes expressades amb un impacte potencial sobre la seva estabilitat, activitat o immunitat. Els mamífers generen tres tipus de N-glicosilacions: les d'alt contingut amb manoses, les complexes o les de tipus híbrid. Els llevats, en canvi, només són capaços de realitzar N-glicosilacions del tipus alta manosa. *S. cerevisiae* tendeix a hiperglicosilar les proteïnes heteròlogues mentre que en llevats com *P. pastoris* aquesta glicosilació és menys pronunciada. A banda, en *P. pastoris* els residus terminals de manosa s'enganxen amb un enllaç  $\alpha$ -1,2 no al·lergen, a diferència de *S. cerevisiae* que els enganxa amb un enllaç  $\alpha$ -1,3 (Boeer *et al.* 2007).

En el cas de la ROL produïda amb el sistema de *P. pastoris*, el pes molecular de la proteïna extracel·lular obtinguda indica aparentment un grau de glicosilació baix.

Altres característiques que fan de *P. pastoris* un sistema d'expressió interessant són: la possibilitat d'aconseguir quantitats de proteïnes en el rang de miligramms a grams, la rapidesa amb què els cultius poden ser escalats per satisfer demandes més grans i la possibilitat de controlar paràmetres que influeixen en la productivitat del sistema com ara el pH, l'aeració i l'addició de substrat.

En comparació amb les cèl·lules de mamífer, *P. pastoris* no requereix un medi o condicions de cultiu complexes, és relativament fàcil de manipular genèticament i té mecanismes eucariotes de síntesi de proteïnes. Pot ser cultivada a elevades densitats cel·lulars i el fet d'utilitzar vectors que s'integren al genoma cel·lular augmenta l'estabilitat genètica en cultius continus i/o a gran escala.

Respecte a la purificació de les proteïnes secretades, pot ser duta a terme de manera simple degut als baixos nivells de proteïnes natives secretades (Macauley-Patrick *et al.* 2005).

### 1.3.1. El metabolisme del metanol en *P. pastoris*

*P. pastoris* presenta la particularitat de ser un llevat metilotròfic, que és capaç de créixer en aquest substrat com a única font de carboni. No és l'únic gènere de llevats metilotròfics, també ho són *Hansenula*, *Candida* i *Torulopsis* (Macauley-Patrick *et al.* 2005). Tots comparteixen un mecanisme d'assimilació del metanol amb uns enzims únics.

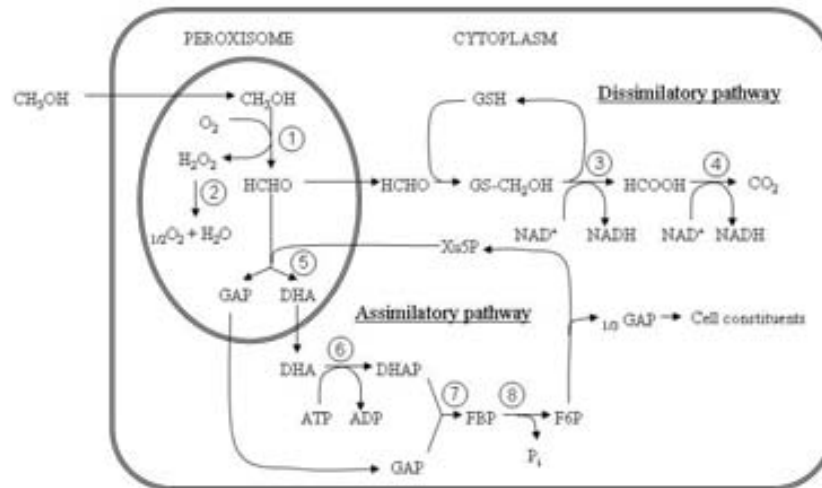
D'aquest punt parteix la base conceptual de la utilització de *P. pastoris* com a sistema d'expressió: alguns enzims necessaris per al metabolisme del metanol només són presents a nivells substancials quan les cèl·lules creixen en metanol (Egli 1980; Veenhuis *et al.* 1983).

L'enzim alcohol oxidasa (AOX) catalitza el primer pas en l'assimilació del metanol, la seva oxidació a formaldehid i peròxid d'hidrogen (Harder & Veenhuis 1989). L'AOX, així com els altres dos enzims involucrats en els primers passos de l'assimilació del metanol (la catalasa i la dihidroxiacetona sintasa -DHAS-), estan continguts als peroxisomes.

El peròxid d'hidrogen generat en el primer pas del metabolisme del metanol es degrada a aigua i oxigen amb ajuda de la catalasa.

Pel que fa al formaldehid, part abandona el peroxisoma i s'oxida a format i diòxid de carboni al citosol per donar energia i una altra part s'assimila a constituents cel·lulars. Aquesta última via comença amb la condensació del formaldehid amb la xilulosa 5-monofosfat al peroxisoma catalitzada per la DHAS. Els productes d'aquest condensació: el gliceraldehid 3-fosfat i la dihidroxiacetona abandonen el peroxisoma i entren a la via citoplasmàtica de regeneració de la xilulosa 5-monofosfat. Per cada tres cicles es genera una molècula neta de gliceraldehid 3-fosfat.

L'AOX i la DHAS estan presents en quantitats considerables durant el creixement cel·lular en metanol però no són detectables en presència d'altres fonts de carboni. En cèl·lules induïdes amb metanol l'AOX pot arribar a representar el 30% de la proteïna total soluble de la cèl·lula.



**Figura 1.2.** Representació esquemàtica del metabolisme del metanol en llevats metilotròfics. En el peroxisoma: 1, AOX; 2, catalasa; 5, DHAS. Al citoplasma: 3, formaldehid deshidrogenasa; 4, format deshidrogenasa; 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfat aldolasa; 8, fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

### 1.3.2. Els promotors en *P. pastoris*

Els investigadors del SIBIA van aprofitar el comportament d'enzims com l'AOX i, en col·laboració amb la Phillips Petroleum, van aïllar-ne els gens i el seu promotor. Van desenvolupar una sèrie de vectors, soques i mètodes per a la manipulació genètica de *P. pastoris*. Aquests nous avanços juntament amb els coneixements que es tenien sobre els medis de creixement i les operacions en bioreactor desenvolupades per a la SCP van donar lloc a un sistema d'expressió on s'obtenien alts nivells de proteïnes heteròlogues d'interès industrial i terapèutic (Cregg *et al.* 1985; Tschopp *et al.* 1987).

La presència d'un promotor fort i regulable, el *PAOX1*, és una de les qualitats de *P. pastoris* com a sistema d'expressió. Hi ha dos gens que codifiquen per dues alcohol oxidases: el gen de l'alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) i el de l'alcohol oxidasa 2 (*AOX2*). El primer és responsable del 90% de l'activitat alcohol oxidasa en la cèl·lula.

La presència d'aquests dos gens possibilita l'existència de tres tipus de soques en quant a la seva capacitat de degradació de metanol: la soca salvatge o  $\text{Mut}^+$  amb la presència dels dos gens *AOX*, la  $\text{Mut}^s$  (on s'ha delectat el gen *AOX1*) i la  $\text{Mut}^-$  (on no hi ha presents cap dels dos gens *AOX*). La soca  $\text{Mut}^s$  ha de confiar en el *AOX2* per al metabolisme del metanol i això resulta en velocitats de consum de substrat i creixement menors. Les soques  $\text{Mut}^s$  s'han vist com a avantatjoses per a la producció

de determinades proteïnes, com l'antigen de superfície per a l'Hepatitis B. Pel que fa a la soca Mut<sup>-</sup> no té capacitat de créixer en metanol com a font de carboni.

Generalment els nivells d'expressió obtinguts sota el control del promotor *AOX1* han estat molt més grans que els reportats amb l'*AOX2*. Per aquest motiu la majoria d'investigadors que utilitzen la inducció amb metanol opten per aquest primer promotor.

No obstant això, hi ha alguns treballs que reporten una major expressió utilitzant l'*AOX2* (Mochizuki *et al.* 2001). Els nivells de producció del sèrum d'albumina humana utilitzant aquest promotor es van doblar amb l'adició d'una petita quantitat d'àcid oleic (0.01%) arribant als 80 mg/l (Kobayashi *et al.* 2000). Aquests valors demostren que l'*AOX2* pot ser eficient en medis optimitzats.

Actualment s'estan cercant promotors alternatius alternatius als *PAOX*. Malgrat la possibilitat de regular eficientment la transcripció de la proteïna d'interès mitjançant un bon sistema de repressió / derepressió i de poder aconseguir uns bons nivells de biomassa abans no comenci la inducció del producte mitjançant la repressió per substrat, el metanol presenta dificultats a l'hora de monitorar-lo en línia i és un producte inflamable que pot ocasionar problemes d'emmagatzematge. Així mateix, l'ús d'aquest substrat per a l'obtenció de certs productes o additius alimentaris no seria desitjable.

El promotor constitutiu de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (*PGAP*) ha estat utilitzat per a l'expressió constitutiva de diverses proteïnes. Malgrat tot, la seva utilització ha estat restringida per la creença que l'expressió constitutiva de certes proteïnes heteròlogues podria ser causa de citotoxicitat a la cèl·lula (Menendez *et al.* 2004).

Un altre promotor que ha estat estudiat és el de la formaldehid deshidrogenasa (*PFLD*). Aquest enzim juga un paper important en el metabolisme del metanol i en el de les metilamines. Quan s'utilitzen aquestes últimes com a font de nitrogen es genera peròxid d'hidrogen, amoníac i formaldehid, intermediari comú amb el metabolisme del metanol. L'avantatge del gen *FLD* és que és induïble tant per metanol com per metilamina. En presència d'aquesta última per induir l'expressió de la proteïna recombinant, es poden utilitzar fonts de carboni alternatives al metanol. Resina i els seus col·laboradors (Resina *et al.* 2004) van trobar nivells similars d'inducció comparant el *PAOX* en presència de metanol i el *PFLD1* utilitzant sorbitol com a font de carboni i metilamina com a font de nitrogen i inductor.

El promotor alternatiu *ICL1* (isocitrat liasa) va ser reportat com a promotor alternatiu als *PAOX1* i *PGAP* (Menendez *et al.* 2003). Es va induir la producció de dextranasa de *Penicillium minioluteum* però malgrat els resultats presentats calen més estudis per avaluar la utilitat d'aquest promotor.

Altres promotors, com el *YPT1* i el *PEX8*, associats a una GTPasa involucrada en la secreció i a una proteïna peroxisomal respectivament, no han estat àmpliament utilitzats degut als baixos nivells d'expressió aconseguits (Macauley-Patrick *et al.* 2005).

## 1.4 Producció de proteïnes heteròlogues en *P. pastoris*.

### 1.4.1. El medi de fermentació i les condicions de cultiu.

La majoria de treballs publicats que utilitzen *P. pastoris* com a sistema d'expressió utilitzen els medis, tant complexes com definits, descrits als protocols d'Invitrogen (*Pichia* Fermentation Process Guidelines, Invitrogen Co., San Diego, CA). La producció de proteïnes heteròlogues a gran escala i la necessitat de poder millorar la reproductibilitat entre lots requereix la utilització de medis definits amb preferència respecte als medis complexes.

El medi basal definit per Invitrogen ha estat considerat com un medi estàndard per a *P.pastoris* i es complementa amb l'addició de sals traça i biotina (micronutrients), segons les especificacions d'Invitrogen. No obstant això, presenta diferents limitacions, entre elles la precipitació de sals i l'elevada càrrega iònica.

El medi especificat per D'Anjou i Daugulis (d'Anjou & Daugulis 2001) o el descrit per Brady i col·laboradors (Brady *et al.* 2001) són alternatives aparegudes per superar les limitacions del medi basal estàndard d'Invitrogen. En ambdós casos la concentració de sals presents al medi és inferior al medi estàndard. En el cas de Brady i col·laboradors (2001) la redefinició del medi va permetre millorar la viabilitat cel·lular i la posterior purificació de la proteïna d'interès.

Una altra variable important és la font de nitrogen. Normalment aquest element s'addiciona a partir d'hidròxid d'amoni, que s'utilitza paral·lelament per al control del pH del medi. Concentracions d'amoni per sobre del 0.6M poden inhibir el creixement cel·lular (Yang *et al.* 2004) mentre que baixes concentracions d'amoni provoquen la degradació de la proteïna heteròloga perquè afavoreixen la síntesi de proteases endògenes. Malgrat tot, la concentració límit d'amoni per no afectar la producció o el creixement és una variable que cal valorar en la optimització de cada

cas concret. Existeixen altres treballs que descriuen concentracions d'amoni de 0.1M com a límit per a la inhibició del creixement cel·lular i la producció. Es poden utilitzar altres fonts de nitrogen com extracte de llevat o casaminoàcids però representen afegir al medi un agent complex que pot no ser desitjable per a la producció a gran escala.

*P. pastoris* és capaç de créixer en un rang ampli de pH (entre 3.0 i 7.0). Aquest rang no afecta significativament el creixement així que es pot utilitzar la variació del pH per millorar alguns inconvenients, com els fenòmens de proteòlisi del producte d'interès (Cervers *et al.* 2001). El pH del cultiu s'ha optimitzat també per afavorir l'estabilitat de la ROL a pH=5.5 (Minning *et al.* 1998).

Pel que fa a la temperatura, els cultius reportats es duen a terme normalment a 30°C, malgrat que han sorgit treballs que descriuen que una reducció de la temperatura del cultiu pot millorar la viabilitat cel·lular i augmentar els nivells de producte obtinguts (Li *et al.* 2001; Jahic *et al.* 2003).

#### 1.4.2. L'estratègia de cultiu.

La productivitat d'un sistema depèn de molts factors genètics i fisiològics però també de l'optimització de l'estratègia de cultiu.

*Pichia* pot créixer fins a elevades concentracions cel·lulars (fins a 150 g·l<sup>-1</sup>) en les condicions controlades d'un bioreactor. El cultiu estàndard està definit per al promotor *AOX1* com a element regulador de l'expressió i inclou diferents fases de cultiu encaminades a aconseguir elevades densitats cel·lulars i una bona inducció de l'expressió.

El cultiu estàndard comença amb una **primera fase en discontinu de glicerol**. Els protocols d'Invitrogen recomanen una concentració de glicerol de 40 g·l<sup>-1</sup> ja que concentracions més elevades resulten en una inhibició del creixement (Chiruvolu *et al.* 1998). La velocitat específica màxima de creixement d'una soca salvatge es situa entorn 0.18 h<sup>-1</sup> i el rendiment biomassa/substrat ( $Y_{XS}$ ) a 0.5 gX·gS<sup>-1</sup>. Així doncs, aquest fase acaba amb concentracions cel·lulars d'uns 20 g·l<sup>-1</sup>. L'esgotament del glicerol ve acompanyat per un sobtat augment de la concentració d'oxigen dissolt.

En acabar aquesta primera fase de creixement cel·lular en glicerol les cèl·lules no han produït AOX ja que el glicerol actua de repressor del promotor (Jahic *et al.* 2006). Per aquest motiu, l'addició de metanol al cultiu s'ha de fer de manera molt suau durant aquesta fase per evitar la intoxicació cel·lular. S'han proposat diferents perfils



d'alimentació per aconseguir desreprimir el promotor *AOX1* durant aquesta **fase de transició** i aconseguir un cert augment de la biomassa. Alguns autors escullen una addició limitant de glicerol a cabal constant i d'altres una alimentació exponencial limitant. Aquesta fase va normalment acompanyada d'una alimentació de metanol en paral·lel a la del glicerol. La introducció del metanol s'ha de fer de forma lenta ja que l'*AOX1* no està fortament induït i els nivells d'*AOX* estan començant a augmentar (Jahic *et al.* 2006). Amb aquesta alimentació mesclada es potencia la inducció i s'escurça la durada de la fase de transició (Minning *et al.* 2001). Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2006b) fan un repàs a les diferents estratègies d'addició de metanol utilitzades durant la fase de transició.

Un cop transcorreguda aquesta fase de transició, s'inicia **la fase d'inducció** amb metanol. A la bibliografia s'han descrit diverses estratègies d'inducció. La millor estratègia, però, ha de ser ajustada en cada cas i és funció de la proteïna expressada. Se'n pot trobar un bon recull a les revisions presentades per Cos (2006b) o Jahic (2006) i els seus respectius col·laboradors.

Una de les estratègies d'inducció més comuna és aquella en què, una vegada transcorreguda la fase de transició, s'alimenta metanol com a única font de carboni. En cas que la densitat cel·lular sigui molt elevada no es pot mantenir durant prou temps, a velocitat específica màxima de consum de substrat, la consigna d'oxigen dissolt per sobre del 30%, tal i com recomana Invitrogen, i s'ha d'alimentar el metanol en condicions limitants. Aquesta estratègia es coneix comunament com a cultiu discontinu alimentant en condicions de metanol limitant (MLFB en sigles angleses).

El manual de fermentacions de l'empresa Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EEUU) recomana controlar l'addició de metanol si s'empra aquesta estratègia basant-se en el senyal d'oxigen dissolt (DOT) del medi. Aquest esquema de control presenta però diferents inconvenients. Si la concentració de metanol assolís valors elevats i inhibitoris, la DOT augmentaria i la resposta del sistema seria la d'alimentar més substrat. Aquesta situació portaria a valors encara més alts de DOT i a acumulacions indesitjades de substrat.

Altres estratègies estan basades en una alimentació exponencial de metanol per tal de mantenir una velocitat de creixement determinada en condicions limitants de substrat.

En cas que la densitat cel·lular no sigui massa elevada es pot induir el cultiu en condicions no limitants de metanol (MNLFB). En aquest cas cal fer un control de la

concentració de metanol residual al medi de cultiu durant la fase d'inducció o bé realitzar una alimentació preexponencial (Zhang *et al.* 2000).

Durant la fase d'inducció en metanol, i especialment en condicions d'excés de substrat, apareixen diferents limitacions que restringeixen la productivitat del procés, entre elles la transferència d'oxigen.

D'altra banda també s'ha estudiat l'addició mixta de substrats. Majoritàriament s'aplica a soques Mut<sup>s</sup> malgrat que també hi ha alguns exemples on s'ha aplicat a fases d'inducció de soques Mut<sup>t</sup>. Generalment es coalimenten metanol i glicerol, que és un substrat repressor del promotor AOX1. La naturalesa repressora del glicerol fa que s'hagin cercat altres substrats per coalimentar amb el metanol i evitar reprimir el promotor AOX. S'han reportat millores en la productivitat de cultius de soques Mut<sup>s</sup> amb alimentacions mixtes de sorbitol i metanol (Xie *et al.* 2005; Ramon *et al.* 2007).

## 1.5 El monitoratge del cultiu.

Un dels aspectes més importants en l'expressió amb el sistema de *P. pastoris* utilitzant el promotor AOX és la concentració de metanol. Monitorar i controlar aquesta variable és de gran importància degut al seu possible efecte inhibidor (Zhang *et al.* 2000) i també a la seva gran influència en la productivitat del sistema. D'altra banda, el monitoratge d'aquest substrat també pot ajudar a evitar perills durant la producció a gran escala (Jahic *et al.* 2006).

La concentració de substrat es pot controlar de manera relativament senzilla i indirecta mitjançant dos grans grups de mètodes: amb la mesura de la concentració d'oxigen dissolt o amb la implementació d'un esquema de control de metanol en llaç obert basat en un model de creixement. Ambdós metodologies tenen l'inconvenient que es poden donar grans desviacions de la consigna de substrat i per això sorgeix la necessitat de determinar directament la concentració de metanol del medi de cultiu. Han aparegut diferents tecnologies analítiques per fer-ho, que seran discutides al capítol 3.

Malgrat que la concentració de metanol és una variable clau en el control i la optimització dels processos de producció amb *P. pastoris*, hi ha altres variables, com la biomassa i la proteïna d'interès, a ser monitoritzades.

Una estratègia molt comuna amb *P. pastoris* i també en d'altres sistemes d'expressió és la obtenció d'una elevada densitat cel·lular prèvia a l'inici de la inducció. Gnoth i col·laboradors (Gnoth *et al.* 2007) mostren la dispersió obtinguda en els nivells

de biomassa abans i al final de la inducció en diferents repeticions d'un mateix cultiu d'*E. coli*. Aquesta variabilitat es tradueix també en una gran dispersió en els nivells finals de proteïna d'interès. Així doncs, la quantitat i també la qualitat de la proteïna d'interès produïda depenen en gran mesura de la qualitat del procés productiu i de l'evolució de les seves variables, entre elles la biomassa. La qualitat del procés és una variable molt lligada a la seva reproductibilitat.

En aquesta direcció, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha desenvolupat un programa adreçat a impulsar la Tecnologia Analítica del Procés (PAT, en sigles angleses). El PAT no només persegueix la implementació de nous instruments de mesura sinó que pretén ser un sistema de disseny, anàlisi i control de la producció a través de mesures en el temps de les variables crítiques per a la qualitat i el correcte desenvolupament del procés. No és només una anàlisi del procés de cultiu sinó que també va dirigit a la supervisió de les matèries primeres i als processos de purificació que influeixen en la qualitat final del producte. Així doncs, el que es pretén amb el PAT és guanyar coneixement sobre la influència de les diferents variables del procés sobre la qualitat del producte i utilitzar immediatament aquest coneixement per supervisar i controlar el procés. La qualitat no pot ser només testada als productes sinó que ha de ser construïda durant el procés o ser-hi per disseny.

El primer objectiu d'aquesta iniciativa és la de definir la "Qualitat per al disseny", és a dir, utilitzar el coneixement generat del procés per localitzar les variables crítiques i poder redissenyar-lo de manera que es faci més robust a les inherents variabilitats i distorsions d'aquestes variables. Un exemple específic seria el de redissenyar la primera fase de creixement cel·lular per tal de poder assegurar que els nivells de biomassa finals abans de començar la inducció seran iguals, independentment de la variabilitat en la quantitat i qualitat de l'inòcul utilitzat (Gnoth *et al.* 2007).

El segon objectiu que plantegen és el d'utilitzar tècniques matemàtiques per localitzar quines són les variables crítiques. Els enginyers de bioprocessos prefereixen models mecànics amb diferents variables que cal mesurar per tal de validar el model proposat. La consecució d'aquestes dades analítiques constitueix sovint un dels principals colls d'ampolla i d'aquí la importància del PAT per afavorir la recerca en aquesta línia. Per exemple, encara no està disponible una lectura directa en línia de la biomassa aplicable de manera universal, tot i que han aparegut diverses tècniques potencials. No obstant això, que no es pugui mesurar aquesta variable no vol dir que no es pugui obtenir informació del bioprocés. El PAT proposa també utilitzar tècniques d'anàlisi multivariables per estimar les variables clau del procés a partir de la informació que actualment ja se'n genera analíticament. Aquestes tècniques

multivariable es poden utilitzar també per visualitzar el transcurs d'un cultiu. El terme Control Estadístic i Multivariable de Processos (MSCP) va sorgir com a aplicació d'aquests mètodes matemàtics per a la supervisió, el control d'un bioprocés i l'estimació de la seva qualitat final.

Finalment, l'obtenció d'informació en línia d'un procés només té sentit si s'utilitza per corregir-lo en cas que s'observin desviacions del curs desitjat. Fins ara per assegurar la qualitat d'un producte s'intentava repetir exactament el mateix procés. Aquesta aproximació no tenia en compte la variabilitat que es pot donar durant l'operació, en les matèries primeres i els productes intermitjos i no constitueix una estratègia òptima des del punt de vista de control del procés (Känsäkoski *et al.* 2006). A partir de les mesures en línia es poden prendre decisions i portar a terme correccions, en forma de control retroalimentat automàtic, per tal de reaccionar ràpidament i evitar que el procés surti d'especificacions. Un exemple seria controlar directament l'evolució de la biomassa mitjançant la modulació de l'alimentació (Gnoth *et al.* 2007) enlloc de fer un control de la velocitat específica de creixement.

Malgrat les directrius del PAT, no s'han utilitzat de manera comuna mètodes de mesura sofisticats ja que la disponibilitat de sensors en línia per al monitoratge del processos és relativament baixa. Alguns requeriments específics dificulten el disseny de sensors aptes per als bioprocessos com serien: la necessitat de condicions asèptiques, la possibilitat de mesurar un elevat nombre d'anàlisis, la capacitat d'analitzar concentracions baixes de l'anàlit en una matriu complexa, la necessitat que l'analitzador no contamine el procés ni que cap dels seus components vessi dintre el procés, la disponibilitat d'una bona freqüència d'anàlisi amb un retard curt. A banda hi ha altres restriccions addicionals que tampoc faciliten aquesta tasca (Clementschi & Bayer 2006): no han de presentar problemes d'embrutiment per precipitació de components del medi damunt l'element sensor i així aconseguir que puguin funcionar durant setmanes sense necessitat de recalibrar-se o que es puguin recalibrar *in situ*. Per aquest motiu, i en sintonia amb les directrius de la FDA, s'han de desenvolupar o aplicar sistemes analítics que permetin mesurar i controlar variables significatives en els bioprocessos.

Addicionalment, Känsäkoski i col·laboradors (2006) fan un recull de les necessitats existents per a la millora del control i l'optimització dels bioprocessos que queden recollides en els següents punts:

- Modelitzar els bioprocessos i desenvolupar tècniques de simulació.

- Desenvolupar eines per modelitzar i/o analitzar els bioprocessos des d'un punt de vista de fluxos metabòlics.
- Incorporar noves mesures analítiques.
- Aplicar anàlisis *at-line* combinades amb modelització.
- Incorporar mesures analítiques *in situ*.
- Desenvolupar estratègies de control dinàmic.
- Desenvolupar eines informàtiques per al control supervisor.

Totes aquestes mesures no s'han d'aplicar, però, només a la fase de producció sinó també durant la purificació, que tradicionalment constitueix la fase més crítica des del punt de vista econòmic i de qualitat del producte. No obstant això, la recerca actual, especialment en l'àmbit de la fisiologia cel·lular, ha evidenciat la connexió entre la fase de producció i purificació. Així doncs treballar per augmentar el control i millorar la qualitat durant la producció ajudarà a reduir la variabilitat en la purificació i la posterior qualitat del producte final.

El PAT doncs va sorgir com una reacció per evidenciar les discrepàncies entre les possibilitats actuals de supervisió i control de processos i la seva aplicació en els processos industrials i es presenta com un marc de recerca i innovació molt important.

En els cultius de *P. pastoris* el metanol esdevindrà doncs una variable clau a mesurar per poder garantir la reproductibilitat del procés. Caldrà valorar quines altres mesures es poden incorporar que permetin el monitoratge d'altres variables igualment importants, com la biomassa i el producte heteròleg.

## 1.6 Treballs previs amb la ROL.

La ROL ha estat produïda en sistemes d'expressió procariotes, com ara *E. coli* (Beer *et al.* 1998; Di *et al.* 2005), i en eucariotes com *S. cerevisiae* (Takahashi *et al.* 2001). El principal inconvenient aparegut en aquests sistemes va ser aconseguir una proteïna correctament plegada i activa.

Minning i col·laboradors (Minning *et al.* 1998) van expressar per primera vegada la ROL en *P. pastoris* sota l'acció del promotor *AOX1*. La proteïna obtinguda tenia propietats similars a les reportades per l'enzim natiu i l'expressat en *E. coli*.

En treballs posteriors (Minning *et al.* 2001), es van millorar els nivells de productivitat en bioreactor a través d'una estratègia de control *off-line* de la concentració de metanol per cromatografia de gasos enlloc de controlar-la mitjançant el senyal d'oxigen dissolt. En aquest mateix treball s'observa que la introducció d'una fase de transició entre el discontinu de glicerol inicial i la inducció amb metanol permet escurçar el temps total del cultiu i millorar-ne la productivitat.

Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2005b) van avaluar l'efecte del fenotip (soca Mut<sup>+</sup> vs soca Mut<sup>s</sup>) i el nombre de còpies del gen en l'expressió de ROL sota el promotor AOX. Posteriorment també van demostrar (Cos *et al.* 2006a) que el control de la concentració de metanol mitjançant un analitzador en línia i una estratègia de control PI combinada amb un model de consum permetia optimitzar la fase d'inducció i millorar la productivitat respecte la utilització de les mesures *off-line* per cromatografia de gasos.

Alternativament s'ha expressat la ROL en *P. pastoris* sota l'acció del promotor *FLD* (Resina *et al.* 2004; Resina *et al.* 2005). S'han comparat els nivells obtinguts amb l'expressió sota el promotor *AOX1* (Cos *et al.* 2005a) i també se n'han analitzat els colls d'ampolla (Resina *et al.* 2006).

Recentment, s'ha publicat un estudi d'alimentació mixta de sorbitol/metanol en la soca Mut<sup>s</sup> per a la producció de ROL, que ha resultat en un augment de 2.2 vegades els nivells de proteïna obtinguda amb l'alimentació de metanol com a única font de carboni (Ramon *et al.* 2007).

## 1.7 Referències bibliogràfiques

Beer,H.D., McCarthy,J.E.G., Bornscheuer,U.T. & Schmid,R.D. 1998. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 1399, 173-180.

Boeer,E., Steinborn,G., Kunze,G. & Gellissen,G. 2007. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 513-523.

Brady,C.P., Shimp,R.L., Miles,A.P., Whitmore,M. & Stowers,A.W. 2001. High-Level production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23, 468-475.

Chiruvolu,V., Eskridge,K., Cregg,J. & Meagher,M. 1998. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 75, 163-173.

Clementsichitsch,F. & Bayer,K. 2006. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. *Microbial Cell Factories*, 5, 19.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006a. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006b. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 5, 17.

Cos,O., Resina,D., Ferrer,P., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2005a. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26, 86-94.

Cos,O., Serrano,A., Montesinos,J.L., Ferrer,P., Cregg,J.M. & Valero,F. 2005b. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321-335.

Cregg,J.M., Barringer,K.J., Hessler,A.Y. & Madden,K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 3376-3385.

Curvers,S., Brixius,P., Klauser,T., Thommes,J., Weuster-Botz,D., Takors,R. & Wandrey,C. 2001. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnology Progress*, 17, 495-502.

d'Anjou,M.C. & Daugulis,A.J. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 1-11.

Di,L.M., Hidalgo,A., Haas,M. & Bornscheuer,U.T. 2005. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8974-8977.

Douris,V., Swevers,L., Labropoulou,V., Andronopoulou,E., Georgoussi,Z. & Iatrou,K. 2006. Stably Transformed insect cell lines: Tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. *Advances in Virus Research*, 68,113-56.

Egli,T.,van Dijken,J.P., Veenhuis,M., Harder,W. and Fiechter,A. 1980. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Archives of Microbiology*, 124, 115-121.

Gasser,B. & Mattanovich,D. 2007. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnology Letters*, 29, 201-212.

Georgiou,G. & Segatori,L. 2005. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 538-545.

Giudice,E.L. & Campbell,J.D. 2006. Needle-free vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 68-89.

- Gnoth,S., Jenzsch,M., Simutis,R. & Lubbert,A. 2007. Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *Journal of Biotechnology*, 132, 180-186.
- Hamilton,S.R., Davidson,R.C., Sethuraman,N., Nett,J.H., Jiang,Y.W., Rios,S., Bobrowicz,P., Stadheim,T.A., Li,H.J., Choi,B.K., Hopkins,D., Wischniewski,H., Roser,J., Mitchell,T., Strawbridge,R.R., Hoopes,J., Wildt,S. & Gerngross,T.U. 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313, 1441-1443.
- Harder,W. & Veenhuis,M. 1989. Metabolism of one carbon compounds. In: *The Yeasts* (Ed. by Rose AH & Harrison JS), pp. 289-316. London: Academic Press.
- Houdebine,L.M. 2007. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, In Press, Corrected Proof.
- Jahic,M., Veide,A., Charoenrat,T., Teeri,T. & Enfors,S.O. 2006. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 22, 1465-1473.
- Jahic,M., Wallberg,F., Bollok,M., Garcia,P. & Enfors,S.O. 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories*, 2, 6.
- Jain,E. & Kumar,A. 2008. Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. *Biotechnology Advances*, 26, 46-72.
- Känsäkoski,M., Kurkinen,M., von Weymarn,N., Niemelä,P., Neubauer,P., Juuso,E., Eerikäinen,T., Turunen,S., Aho,S. & Suhonen,P. 2006. Process analytical technology (PAT) needs and applications in the bioprocess industry . VTT Working Papers, 60.
- Kim,M.W., Kim,E.J., Kim,J.Y., Park,J.S., Oh,D.B., Shimma,Y., Chiba,Y., Jigami,Y., Rhee,S.K. & Kang,H.A. 2006. Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 6261-6272.
- Ko,K. & Koprowski,H. 2005. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Research*, 111, 93-100.
- Kobayashi,K., Kuwae,S., Ohya,T., Ohda,T., Ohyama,M. & Tomomitsu,K. 2000. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 89, 479-484.
- Lecina,M., Soley,A., Gracia,J., Espunya,E., Lazaro,B., Cairo,J.J. & Godia,F. 2006. Application of *on-line* OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 125, 385-394.
- Li,Z., Xiong,F., Lin,Q., d'Anjou,M., Daugulis,A.J., Yang,D.S.C. & Hew,C.L. 2001. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21, 438-445.
- Macauley-Patrick,S., Fazenda,M.L., McNeil,B. & Harvey,L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249-270.



- Massoud,M., Attal,J., Thepot,D., Pointu,H., Stinnakre,M.G., Theron,M.C., Lopez,C. & Houdebine,L.M. 1996. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 555-563.
- Menendez,C., Hernandez,L., Banguela,A. & Pais,J. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 446-452.
- Menendez,J., Valdes,I. & Cabrera,N. 2003. The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 20, 1097-1108.
- Minning,S., Schmidt-Dannert,C. & Schmid,R.D. 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66, 147-156.
- Minning,S., Serrano,A., Ferrer,P., Sola,C., Schmid,R.D. & Valero,F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86, 59-70.
- Mochizuki,S., Hamato,N., Hirose,M., Miyano,K., Ohtani,W., Kameyama,S., Kuwae,S., Tokuyama,T. & Ohi,H. 2001. Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23, 55-65.
- Punt,P.J., van Biezen,N., Conesa,A., Albers,A., Mangnus,J. & van den Hondel,C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 20, 200-206.
- Ramon,R., Ferrer,P. & Valero,F. 2007. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 130, 39-46.
- Resina,D., Cos,O., Ferrer,P. & Valero,F. 2005. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 760-767.
- Resina,D., Serrano,A., Valero,F. & Ferrer,P. 2004. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *Journal of Biotechnology*, 109, 103-113.
- Resina,D., Cos,O., Gasser,B., Mauer,M., Marx,H., Sauer,M., Valero,F., Mattanovich,D. & Ferrer,P. 2006. Analysis of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter (*PFLD1*). *Microbial Cell Factories*, 5, 53.
- Sahdev,S., Khattar,S.K. & Saini,K.S. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307, 249-264.
- Takahashi,S., Ueda,M. & Tanaka,A. 2001. Function of the prosequence for *in vivo* folding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 454-462.

Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. & Gingeras, T.R. 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 15, 3859-3876.

Veenhuis, M., Van Dijken, J.P. & Harder, W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Advanced Microbial Physiology*, 24, 1-82.

Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R. & Ye, Q. 2005. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 210-216.

Yang, J., Zhou, X. & Zhang, Y. 2004. Improvement of recombinant hirudin production by controlling  $\text{NH}_4^+$  concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology Letters*, 26, 1013-1017.

Yin, J.C., Li, G.X., Ren, X.F. & Herrler, G. 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335-347.

Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A. & Meagher, M.M. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 1-8.

# 2

**Materials i mètodes generals**

2.1 Soques.....	33
2.2 Manteniment de soques. ....	33
2.3 Preparació de l'inòcul. ....	33
2.4 Medis de cultiu.....	34
2.4.1 Medi Invitrogen .....	34
2.5 Equipament emprat .....	34
2.5.1 Cultius discontinus.....	35
2.5.2 Cultius discontinus alimentats.....	36
2.5.2.1. Control de la sobrepressió .....	36
2.5.2.2. Mesura i control de la concentració de metanol al medi de cultiu .....	37
2.5.2.3. Addició de substrat .....	38
2.5.2.4. Monitoratge de les concentracions d'oxigen i CO <sub>2</sub> dels gasos de sortida .....	38
2.6 Estratègia de cultiu. ....	38
2.6.1 Cultius discontinus.....	38
2.6.2 Cultius discontinus alimentats.....	39
2.7 Mètodes analítics.....	41
2.7.1. Determinació de la concentració de biomassa total .....	41
2.7.2. Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular.....	41
2.7.3. Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular.....	43
2.7.4. Determinació de la proteïna total.....	43
2.7.5. Determinació de les concentracions de substrat.....	43
2.7.5.1. Glicerol.....	43
2.7.5.2. Metanol .....	44
2.8 Càlculs dels cultius i determinació de velocitats específiques.....	44
2.9 Referències bibliogràfiques .....	45

En aquest capítol es descriuen els materials i mètodes genèrics utilitzats al llarg d'aquest treball. En el cas d'utilitzar materials i mètodes específics, queden detallats al capítol corresponent.

## 2.1 Soques.

La major part d'aquest treball s'ha realitzat amb la soca salvatge X-33 de *P. pastoris* que contenia el vector pPICZ $\alpha$ A-ROL per a l'expressió heteròloga de la ROL sota el control del promotor *AOX1* (Minning *et al.* 2001). Aquesta és una soca de còpia única.

Les altres soques de *P. pastoris* utilitzades estan detallades en els capítols corresponents.

## 2.2 Manteniment de soques.

Els estocs de cèl·lules van ser preparats segons les recomanacions d'Invitrogen i mantinguts a -80°C.

En cas necessari, es van cultivar les cèl·lules en plaques d'YPD que contenien un 1% (w/v) d'extracte de llevat, un 2% (w/v) peptona, un 2% (w/v) dextrosa i un 2% (w/v) agar i es mantenien a 4°C.

## 2.3 Preparació de l'inòcul.

Per a la preparació dels inòculs s'han utilitzat dues metodologies. D'una banda inicialment es preparaven en medi BMGY que conté un 1% (w/v) d'extracte de llevat, un 2% (w/v) de peptona, 100 mM de tampó fosfat potàssic (pH 6.4), un 4·10<sup>-5</sup>% (w/v) de biotina i un 1% (w/v) de glicerol. Les cèl·lules es cultivaven en erlenmeyers amb deflectors durant una nit en aquest medi i posteriorment es centrifugaven a 5000×g a 4°C durant 5 min (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa) i es resuspenien en aigua destil·lada estèril. Abans d'inocular el bioreactor es duia a terme un segon pas d'inoculació en un reactor de 1l. El medi estava constituït per : extracte de llevat, 16 g·l<sup>-1</sup>; peptona, 32 g·l<sup>-1</sup>; glicerol, 60 g·l<sup>-1</sup> ; *yeast nitrogen base*, 11 g·l<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 23.6 g·l<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.6 g·l<sup>-1</sup> i antiescumejant J673 Struktol, 10 µl·l<sup>-1</sup>. Passades 24 h les cèl·lules es centrifugaven a 4°C i 5000×g durant 5 min (CentriKon H-401

ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa ) i eren resuspeses per inocular el bioreactor en aigua destil·lada estèril.

Posteriorment per inocular el bioreactor s'ha simplificat el protocol i les cèl·lules han estat cultivades en medi YPD (1% (w/v) d'extracte de llevat, 2% (w/v) de peptona, 2% (w/v) de dextrosa i  $10^{-5}$ % (w/v) biotin) durant 24 en erlenmeyers de 1l a 30°C i a 250 rpm. Abans d'inocular el bioreactor les cèl·lules es centrifuguen a 4°C i es resuspenen en aigua.

Durant el text es citarà si el protocol utilitzat és en base al medi YPD. Així mateix, si s'ha utilitzat un altre protocol es descriurà en el capítol corresponent.

## 2.4 Medis de cultiu.

### 2.4.1 Medi Invitrogen

Aquest és el medi descrit en la guia de fermentació d'Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) i és el medi generalment emprat durant aquest treball. En cas que s'hagi utilitzat un altre medi, es descriurà en el capítol corresponent.

El medi Invitrogen conté una solució basal composta per:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%),  $26.7 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{CaSO}_4$ ,  $0.93 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $18.2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$ ,  $14.2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{KOH}$ ,  $4.13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; antiescumant (Mazu DF 7960, Mazer Chemicals, PPG Industries Inc., IL, USA),  $0.1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ; biotin (0.02%),  $1.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  i solució PTM1,  $4.3 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ .

La solució PTM1 és una solució de sals traça que conté per litre:  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 6 g;  $\text{NaI}$ , 0.08 g;  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.02 g;  $\text{CoCl}_2$ , 0.5 g;  $\text{ZnCl}_2$ , 20 g;  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 65 g; biotin, 0.2 g;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc), 5ml.

Tant la biotina com la solució de sals traça s'afegeixen microfiltrades al medi un cop ha estat esterilitzat.

## 2.5 Equipament emprat

El treball exposat en aquest document ha estat realitzat en diferents centres i, per tant, l'equipament emprat ha estat variable. Malgrat les diferències en l'equipament s'han mantingut les mateixes condicions operacionals.

Els dos principals sistemes experimentals (Fig. 2.1) els constitueixen el Biostat ED i el Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya). Mentre que el primer bioreactor té un volum de treball únic de 5 L i és estabilitzable *in situ*, el Biostat B pot treballar amb

dos bioreactors amb un volum de treball de 2 L i de 5 L respectivament i s'esterilitza a l'autoclau.

Ambdós equips consten de tres mòduls: un de cultiu que inclou la cuba de fermentació, les sondes que monitoritzen el procés i el sistema d'agitació; el segon mòdul de control digital, la DCU, on s'adquireix la informació corresponent a les sondes i on es troben implementats els controladors de pH,  $pO_2$ , temperatura i agitació i, finalment, el mòdul de maniobra, que inclou tot l'equipament elèctric, pneumàtic i hidràulic que permet mantenir constants els paràmetres bàsics del cultiu i en el cas del Biostat ED, la seva esterilització *in situ*.



**Figura 2.1.** Els fermentadors Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya) – esquerra- i Biostat ED (B. Braun, Melsungen, Alemanya) – dreta.

### 2.5.1 Cultius discontinus

Per als cultius discontinus, una vegada preparat el medi i esterilitzat *in situ* o en autoclau per al Biostat ED o Biostat B, respectivament, s'inoculava el bioreactor i es fixaven les condicions d'operació en quant a pH i temperatura, que es controlaven amb els mateixos llaços de control incorporats a la DCU.

Pel que respecte el control de la consigna d'oxigen dissolt, funcionava de manera diferent en funció de l'equipament emprat. El Biostat B no disposa d'actuació al cabal d'aire d'entrada, de tal forma que el control de l'oxigen dissolt es realitza per actuació sobre la velocitat d'agitació a un cabal d'aire fixat manualment.

Per al Biostat ED es disposa d'un control de la consigna d'oxigen dissolta amb actuació al cabal d'aire d'entrada, de tal forma que en els cultius duts a terme amb aquest sistema experimental, es fixa la velocitat d'agitació a 1000 rpm i s'actua de manera automàtica al cabal d'aire per mantenir la consigna d'oxigen dissolt.

Per als cultius discontinus es realitza una anàlisi en discontinu de la concentració de substrat per al seguiment del cultiu, tant en el cas que el substrat sigui glicerol com metanol. De manera discontinua es mesuren també l'evolució de la biomassa i de l'activitat lipolítica.

### **2.5.2 Cultius discontinus alimentats**

Els cultius discontinus alimentats s'han dut a terme amb un volum de treball de 5 L per als dos sistemes experimentals.

A banda dels controladors ja descrits per als cultius discontinus, s'incorpora un sistema de control de la concentració de metanol format per un mòdul de mesura de la concentració de metanol, un mòdul de mesura i control de la sobrepressió al bioreactor, un mòdul per al control de l'addició de substrats al sistema i un equip de mesura dels gasos de sortida.

Totes aquestes variables estan monitoritzades i controlades per un sistema informàtic que fa de suport per poder implementar tot el programari necessari per poder dur a terme totes les estratègies de control proposades i recollir en forma de base de dades la informació vinculada a cada cultiu.

El programari comercial emprat per realitzar la implementació de les diferents estratègies és el programari Visual Basic 6.0 i el programari de càlcul MATLAB 6.5.0.1.80913a Release 13. Aquesta utilització del programari es troba descrita en treballs anteriors (Cos 2005; Cos *et al.* 2006).

#### **2.5.2.1. Control de la sobrepressió**

El llaç de control de pressió dels Biostat B i ED permet mantenir una petita sobrepressió constant de 0.1-0.2 bar a l'interior del fermentador que garanteix un equilibri líquid – gas estable i una solubilitat més elevada de l'oxigen, així com preservar el sistema de la seva possible contaminació per via aèria. És imprescindible mantenir una pressió estable a la línia de gasos de sortida/entrada per poder realitzar



mesures fiables de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> i metanol i per poder realitzar els balanços de matèria i càlculs de CER i OUR.

Aquest llaç de control funciona mitjançant una mesura de la pressió a la línia de sortida del fermentador realitzada amb un transmissor de pressió MCR- P/U/I-0-1000/DC (Phoneix Contact, Blomberg Alemanya). Aquesta mesura és enviada a un controlador Trovis 6496 (Samson, Rubí, Espanya) que mitjançant un algorisme de control PID envia un senyal elèctric a un conjunt d'actuació. Aquest està constituït per un transmissor – posicionador Samson 3760 (Samson, Rubí, Espanya) que permet convertir el senyal elèctric a pneumàtic, aquest és rebut per l'actuador Samson 3277 (Samson, Rubí, Espanya) que modifica l'obertura de la vàlvula Samson 3510 (Samson, Rubí, Espanya) i que fa possible mantenir la sobrepressió a l'interior del fermentador.

#### **2.5.2.2. Mesura i control de la concentració de metanol al medi de cultiu**

En els cultius realitzats en el Biostat B i ED, el llaç de control del metanol utilitza la concentració de substrat que li proporciona el sensor MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA). Aquest aparell conté un sensor, el TGS 822 (Figaro, Osaka, Japó) que requereix per al seu correcte funcionament un control de la pressió a capçalera del bioreactor. L'amoníac (font de nitrogen descrita per als cultius de *P. pastoris*) exerceix una interferència sobre la mesura de metanol emprat en aquest sistema. Ramon i col·laboradors (Ramon *et al.* 2004) van fer un estudi exhaustiu de les condicions d'operació òptimes per aquest mesurador.

L'aparell rep un cabal constant de gasos de sortida del fermentador mitjançant un mesurador / controlador de cabal que es mescla amb un corrent d'aire de xarxa a un cabal determinat per un altre mesurador / controlador de cabal. El corrent resultant permet obtenir una mesura de la concentració de metanol en el medi de cultiu, a través de l'analitzador de metanol. Aquesta mesura es recollida per un ordinador que aplica una llei de control determinada i que envia l'acció corresponent a una microbureta motoritzada model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya). Aquesta dispensa la quantitat corresponent per fer realitat l'objectiu de control.

Per al control de la concentració de metanol al medi de cultiu, s'han aplicat els algorismes de control desenvolupats pel grup d'investigació i exposats a la bibliografia (Cos 2005; Cos *et al.* 2006; Ramon 2007). Es centren bàsicament en l'aplicació d'un algorisme predictiu del consum de substrat acoblat a un control retroalimentat PI de la concentració de metanol mesurada al medi de cultiu.

Durant l'escalat del procés aquest analitzador va ser substituït per un altre aparell menys sensible a interferències, el Model 2.1 de l'empresa Raven (Raven Biotech Inc., Canadà). El funcionament d'aquest aparell es troba descrit l'apartat, apartat 8.2.3 d'aquest document.

### **2.5.2.3. Addició de substrat**

En els cultius realitzats en el Biostat B i ED, l'addició de metanol es realitza via una microbureta motoritzada model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya) que dispensa la quantitat corresponent estimada per al control de la concentració de metanol al medi de cultiu o segons un cabal fixat per l'usuari.

L'addició de glicerol al medi de cultiu, segons un cabal desitjat, es realitza també mitjançant la utilització d'una altra microbureta microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya) controlada automàticament.

### **2.5.2.4. Monitoratge de les concentracions d'oxigen i CO<sub>2</sub> dels gasos de sortida**

Per poder monitorar les concentracions d'oxigen i diòxid de carboni presents en els gasos de sortida del cultiu, s'utilitza un equip Multor 610 (Mahiak, Hamburg, Alemanya). Aquest equip permet la mesura de l'oxigen mitjançant una cel·la paramagnètica i la del diòxid de carboni mitjançant una mesura de l'absorció d'infraroig no dispers (NDIR).

Aquest analitzador rep un cabal constant de gasos de sortida del fermentador que s'aconsegueix mitjançant un mesurador / controlador de flux màssic.

## **2.6 Estratègia de cultiu.**

### **2.6.1 Cultius discontinus.**

En aquests cultius es prepara el medi i s'esterilitza. Posteriorment es fixen les condicions de treball desitjades i es procedeix a fixar la saturació d'oxigen dissolt a les condicions màximes d'agitació i aeració per calibrar la sonda d'oxigen.

Per als cultius discontinus amb metanol s'afegeix la quantitat de substrat necessària per assolir la concentració inicial desitjada, un cop el medi ja hagi estat esterilitzat. Posteriorment s'inocularà el bioreactor.

La temperatura del cultiu es fixa a 30°C i el pH a 5.5. Pel que fa a l'agitació i l'aeració aniran variant per mantenir la consigna d'oxigen dissolt per sobre del 30% de saturació fins arribar al seu màxim de 1000 rpm i 2 vvm, respectivament.

A l'inici d'aquest treball es mantenia el pH desitjat mitjançant l'addició de KOH 1M, posteriorment aquesta solució es va canviar a NH<sub>4</sub>OH 2M.

El final del cultiu vindrà fixat per l'esgotament del substrat al medi i un increment sobtat de la concentració d'oxigen dissolt.

### 2.6.2 Cultius discontinus alimentats

En aquest apartat es descriurà l'estratègia de cultiu discontinu alimentat desenvolupada pel grup d'investigació (Minning *et al.* 2001; Cos *et al.* 2005; Cos *et al.* 2006) i que ha estat aplicada en la majoria de cultius discontinus alimentats inclosos en aquest treball. En cas d'aplicació d'una altra estratègia de cultiu es descriurà en el capítol corresponent. La majoria dels cultius discontinus alimentats de metanol es porten a terme tant en el Biostat ED com en el Biostat B amb un volum de treball de 5l.

Aquesta estratègia de cultiu es divideix en tres fases:

#### 1. Fase de cultiu discontinu:

En aquesta fase es realitza un cultiu discontinu de 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol aplicant el mateix protocol que s'ha descrit en l'apartat 2.6.1 d'aquest capítol. Una vegada el medi ha estat esterilitzat i s'hi han afegit les sals traça i la biotina es procedeix a calibrar la sonda d'oxigen i a inocular el cultiu.

Durant aquesta fase la consigna d'oxigen dissolt es mantindrà per sobre del 30% de saturació, el pH es controlarà a pH = 5.5 amb addició d'amoni al 30% (v/v) i la temperatura es controlarà a 30°C.

La finalització d'aquesta fase es determina per l'esgotament del glicerol i un sobtat increment del senyal d'oxigen dissolt.

#### 2. Fase de transició:

En finalitzar la fase de cultiu discontinu de glicerol i abans d'iniciar la fase de discontinu alimentat amb metanol com a única font de carboni, es realitza una etapa de transició d'un substrat a l'altre.

Es va comprovar que l'inclusió d'una etapa d'adaptació al nou substrat permetia millorar la producció de ROL durant la posterior fase d'inducció (Minning *et al.* 2001). Durant aquesta fase el cultiu s'alimenta amb ambdós substrats per un període de 5h. L'alimentació de metanol es manté constant a  $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  des de la tercera hora fins al final de la inducció. L'alimentació de glicerol va decreixent en el temps. Durant les dues primeres hores de transició, el cabal d'alimentació de glicerol es manté a  $300 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , posteriorment decreix a  $160 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  durant la tercera hora, a  $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  durant la quarta hora i finalment, a l'última hora de la transició s'alimenten  $65 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  de glicerol.

L'alimentació dels substrats es fa a través de les microburetes automàtiques. Per a l'adició dels substrats, s'afegeixen 12 ml de solució de sals traça PTM1 a 1l de glicerol 50% (v/v) i a 1 l de metanol pur, respectivament.

### 3. Fase de cultiu discontinu alimentat amb metanol:

Un cop finalitzada la fase de transició, s'inicia la fase d'inducció amb l'alimentació de metanol com a única font de carboni.

L'alimentació de metanol va variant de forma automàtica per mantenir la concentració de metanol desitjada al medi de cultiu. Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2006) van desenvolupar un sistema de control de la concentració de metanol al medi de cultiu, tal i com s'ha exposat a l'apartat 2.5.2.2. El metanol addicionat és pur i conté 12 ml de solució PTM1 per litre.

Durant aquesta fase es mantindran les consignes de temperatura a  $30^{\circ}\text{C}$  i la d'oxigen dissolt per sobre del 30% de la saturació. El pH es mantindrà a 5.5 però amb l'addició de KOH 5 M. Aquest canvi en la solució per controlar el pH es realitza per evitar les interferències que l'amoniac produeix en l'anàlisi del metanol quan s'utilitza l'analitzador MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA).

Quan la biomassa està entorn els  $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  s'afegeixen al medi  $0.133 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{g biomassa}^{-1}$ . Aquesta addició es realitza per evitar possibles mancances de font de nitrogen (Cos 2005).

## 2.7 Mètodes analítics.

### 2.7.1. Determinació de la concentració de biomassa total

S'han utilitzat dos mètodes per aquest determinació. D'una banda s'ha realitzat una determinació del pes sec. S'han recollit 5 ml de mostra del fermentador que han estat centrifugats a 12.000 rpm durant 5 min (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa). Posteriorment es separa el pèl·let del medi, es renta amb una solució de NaCl (0.9% en pes) i es centrifuga de nou. Aquest procés es porta a terme dues vegades en total. Finalment es resuspèn el pèl·let en aigua destil·lada i es passa la solució per un filtre de microfibra de vidre (Whatman GF/F, Maidstone, Regne Unit), prèviament tarat en sec. Es renta el retingut amb 10 ml d'aigua destil·lada i s'asseca a 100°C fins a pes constant.

Abans de pesar el filtre es refreda en un dessecador amb sílica gel.

La desviació estàndard relativa (RSD) del mètode és entorn al 5% del rang de mesura.

L'altre mètode utilitzat es basa en una mesura de la densitat òptica a 600 nm. S'utilitza l'espectrofotòmetre Uvikon 941 Plus (Kontron Instruments Ltd., Watford, UK). La mostra fresca es dilueix amb la suficient quantitat de solució de NaCl (0.9 %) perquè la lectura de d'absorbància estigui dintre el rang de linealitat (0.1 – 0.8 unitat d'Absorbància).

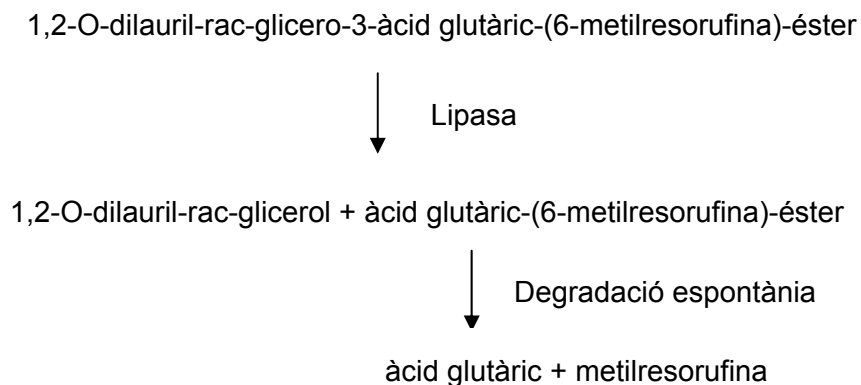
El valor resultant es correlaciona amb el pes sec mitjançant la següent corba de calibratge (Cos 2005):

$$\text{Biomassa (g}\cdot\text{l}^{-1}) = 0.212 \cdot \text{OD}_{600} \text{ (UAbs)} \quad (\text{Eq. 2.1})$$
$$r^2=0.992$$

### 2.7.2. Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular.

L'activitat lipolítica es va determinar modificant un assaig colorimètric de lipases comercial (Kit 1821792, Roche Diagnostics, Roche, Mannheim, Alemanya) (Cos 2005).

Las lipases es defineixen com triacilgliceridohidrolases que catalitzen la degradació dels triglicèrids a diglicèrids (alguns inestables) amb la posterior formació de monoglicèrids i àcids grassos, com a productes finals. El mètode utilitzat es basa en la degradació d'un substrat cromòfor específic per a la lipasa, el 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-àcid glutàric-(6-metilresorufina)-éster.



**Figura 2.1.** Reacció utilitzada per a la quantificació de l'activitat lipolítica.

En solució alcalina, l'èster es degrada sota l'acció catalítica de la lipasa formant-se el 1,2-O-dilauril-rac-glicerol i l'àcid glutàric-(6-metilresorufina)-èster, producte intermedi inestable. Aquest últim es degrada espontàniament en àcid glutàric i metilresorufina, compost de color vermell, el qual és directament proporcional a l'activitat lipolítica existent a la mostra. L'aparició del producte de color es mesura fotomètricament.

Les condicions de realització del test han estat optimitzades per a la ROL. L'anàlisi es realitza barrejant 0.3 ml de substrat comercial (1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-glutàric-(6-metilresorufina)-èster), 0.5 ml de tampó 400mM de Tris·HCl a pH=7.25 i 0.5 ml de mostra en una cubeta termostatitzada a 30°C. La mostra s'obté del sobrenedant de centrifugar una mostra del cultiu a 12.000 rpm durant un minut en una microcentrífuga (Thermo Heraeus Megafuge, Heraeus, Heraeus Holding, Alemanya).

Es mesura l'increment en l'absorbància a 580 nm durant 7 min utilitzant un espectrofotòmetre UV-Vis Varian Cary 3. L'increment d'absorbància per segon es calcula a partir del pendent de la corba i es correlaciona amb l'activitat lipolítica mesurada pel mètode de pH-stat (Minning *et al.* 2001). Per convertir el pendent en unitats d'activitat s'empra la correlació (Cos 2005):

$$\begin{aligned}
 \text{Act. Lipolítica (UA}\cdot\text{ml}^{-1}) &= 2.162 \cdot \text{pendent} - 0.0162 && \text{(Eq. 2.2)} \\
 r^2 &= 0.995
 \end{aligned}$$

La desviació estàndard relativa (RSD) del mètode és entorn al 3% del rang de mesura.

### **2.7.3. Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular.**

L'activitat lipolítica intracel·lular va ser mesurada a partir dels sobrenedants centrifugats de cèl·lules lisades. Les cèl·lules van ser disruptades mecànicament utilitzant un disruptor One Shot (Constant Systems Ltd, Daventry, UK). Inicialment es recullen mostres del cultiu i són centrifugades a 6000 rpm durant 10 min a 4°C (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa), es descarta el sobrenedant per altres anàlisis i es renten les cèl·lules amb tampó PBS (8 g·l<sup>-1</sup> de NaCl; 0.2 g·l<sup>-1</sup> KCl, 1.44 g·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0.24 g·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4) per duplicat.

Es mesura la densitat òptica de la mostra un cop ha estat resuspesa per segona vegada i abans de la disrupció cel·lular. Posteriorment es disrupten les cèl·lules seguint les instruccions del fabricant a una pressió de 2.85 KBar i amb un sol pas de disrupció. Es manté el sistema experimental a una temperatura d'aproximadament 4°C.

La suspensió que en resulta es centrifuga per tal de separar-ne la fracció insoluble a 6000 rpm durant 10 min i a 4°C (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa). La fracció soluble és la que s'utilitza per fer l'anàlisi d'activitat lipolítica intracel·lular i l'anàlisi de proteïna total.

### **2.7.4. Determinació de la proteïna total.**

Per a la quantificació de la proteïna total es va utilitzar l'assaig de Bradford (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA). L'absorbància es mesurava en plaques de 96 pous utilitzant l'espectrofotòmetre Microplate Reader 2001 (Whittaker Bioproducts Inc., Walkersville, MD, USA).

### **2.7.5. Determinació de les concentracions de substrat.**

#### **2.7.5.1. Glicerol**

El glicerol és determinat per HPLC amb l'equip HP 1050 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna de bescanvi iònic Aminex HPX-87H (Bio-rad). Com a fase mòbil s'utilitza una solució d'àcid sulfúric 15 mM amb un volum d'injecció de 20 µl.

Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millennium 2.15.10 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA).

La desviació estàndard relativa (RSD) d'aquest mètode és del 3 % .

### 2.7.5.2. Metanol

El metanol és analitzat per cromatografia de gasos amb l'equip HP 5890 Gas Chromatography (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna capil·lar Tracil TR-FFAP de 25mx0.53 mm X 1  $\mu\text{m}$  (Tracer-Teknokroma, St. Cugat del Vallès, Barcelona, Espanya) i equipat amb un injector automàtic (HP 7376) i un detector d'ionització de flama (FID). Les condicions d'operació són 200°C i 280°C per a l'injector i el detector, respectivament. La temperatura interior del forn segueix un perfil que comença a 40 °C (2 min), amb un increment constant de 20°C·min<sup>-1</sup> fins arribar a 200 °C, mantenint-se a aquesta temperatura final durant 5 minuts. El temps total de mesura és d'uns 15 minuts. S'utilitza un cabal gasós de 9 ml·min<sup>-1</sup> d'heli per arrossegar la mostra per l'interior de la columna. El gas combustible del detector és l'hidrogen.

La mesura es porta a terme amb un patró intern d'isopropanol de concentració coneguda (4 g·l<sup>-1</sup>) barrejat al 50 % (v/v) amb la mostra prèviament filtrada amb un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  (Durapore, Millipore, Bedford, USA). Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millennium 32 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA).

La desviació estàndard relativa (RSD) del mètode és entorn al 2%.

## 2.8 Càlculs dels cultius i determinació de velocitats específiques

Les velocitats específiques de creixement ( $\mu$ ) (h<sup>-1</sup>), de consum de substrat ( $q_s$ ) (g<sub>metanol</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) i de producció específica d'activitat lipolítica extracel·lular ( $q_p$ ) (U<sub>lipasa</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) es van estimar a partir de les dades experimentals del cultiu. Es suavitzen aquestes dades experimentals mitjançant rutines matemàtiques (Matlab 6.1 Curvefit Toolbox, The Mathworks Inc., Natick, USA).

Durant el cultiu la quantitat de biomassa augmenta de tal forma que el volum de la fase aquosa es redueix progressivament. Algunes dades experimentals, com l'activitat lipolítica extracel·lular i la concentració de metanol, es determinen únicament a partir dels sobrenedants. Així doncs cal tenir en compte el volum ocupat per la biomassa a l'hora d'expressar les concentracions determinades en la fase líquida en funció del volum total del bioreactor (Borzani 2003). Els valors expressats al llarg



d'aquest treball corresponen a les concentracions de substrat i activitat lipolítica determinades per unitat de volum de brou de cultiu.

Els cabals de substrat addicionats es determinen a partir de les alimentacions de les microburettes, així com també el cabal de base introduït al sistema. El volum del fermentador s'estima a partir del volum inicial i el còmput de les addicions successives de substrats i extraccions puntuals significatives. Es descompten els volums retirats del bioreactor, que es poden entrar informàticament per a la correcció del volum.

Les velocitats específiques es calculen a partir de les dades recollides i els balanços de matèria del cultiu mitjançant un programari desenvolupat anteriorment pel grup d'investigació (Cos *et al.* 2005; Cos 2005). Aquest programari ha estat modificat en alguns capítols d'aquest treball per adaptar-lo a diferents estratègies de cultiu o sistemes experimentals emprats.

## 2.9 Referències bibliogràfiques

Borzani, W. 2003. Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnology Letters*, 25, 1953-1956.

Cos, O. 2005. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia Pastoris*. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J.L. & Valero, F. 2006. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.

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. *Journal of Biotechnology*, 116, 321-335.

Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Sola, C., Schmid, R.D. & Valero, F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86, 59-70.

Ramon, R. 2007. Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia Pastoris*: Aplicació de tècniques de monitorització i control. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

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*. *Biotechnology Letters*, 26, 1447-1452.



# 3

**Monitoratge en línia de la concentració de metanol residual al medi de cultiu: aplicació d'un analitzador d'injecció seqüencial (SIA)**

3.1 Introducció .....	49
3.2 Materials i mètodes.....	52
3.2.1 Soca.....	52
3.2.2 Condicions de cultiu.....	52
3.2.3 Reactius i solucions emprades al SIA.....	53
3.2.4 Equipament i programari del SIA.....	53
3.2.5 Equip de presa de mostres.....	54
3.3 Resultats .....	55
3.3.1 Esquema de l'analitzador SI.....	55
3.3.2 Diagrama de flux de l'anàlisi.....	59
3.3.3 Calibratge de l'analitzador i factors que afecten l'anàlisi .....	60
3.3.4 Seguiment d'una fermentació de <i>P. pastoris</i> .....	61
3.4 Conclusions .....	64
3.5 Referències bibliogràfiques .....	65

### 3.1 Introducció

*P. pastoris* ha esdevingut un hoste idoni per a la producció de proteïnes heteròlogues (Cereghino & Cregg 2000). En combinació amb un ràpid creixement i amb una manipulació genètica senzilla, és capaç de realitzar modificacions post translacionals a les proteïnes.

En la majoria d'estratègies de producció, el metanol actua com a inductor en la fase de producció i com a única font de carboni. S'ha descrit la necessitat de disposar d'un bon monitoratge en temps real d'aquesta variable durant la inducció per evitar-ne acumulacions indesitjades i inhibicions del creixement (Zhang *et al.* 2000). Degut a aquest efecte inhibitori i, per tal d'optimitzar la producció de la proteïna d'interès, cal monitorar-lo i controlar-lo durant la seva fase d'alimentació en règim discontinu alimentat.

Les principals demandes als mètodes analítics aplicats al monitoratge de bioprocessos són la robustesa i la fiabilitat. Per contra, en moltes d'aquestes aplicacions no és necessària una sensibilitat tan elevada com en d'altres àrees de la Química Analítica, degut a que la majoria dels components a analitzar hi són presents en concentracions prou elevades. El medi de cultiu és una mescla de metabolits desconeguts que constitueix una matriu complexa de l'analit. Per aquest motiu es requereixen mètodes analítics d'alta selectivitat (Horstkotte *et al.* 2006).

S'utilitzen diferents mètodes d'instrumentació, com ara la cromatografia líquida d'altra resolució (HPLC) o detectors de gasos específics (Hanko & Rohrer 2000; Schügerl 2001). Però la presència d'un medi tèrbol dificulta aquest monitoratge quan es bloquegen les columnes o les membranes amb restes del cultiu o sals precipitades (Papaefstathiou *et al.* 1996). En aquests casos, s'utilitzen membranes de filtració amb flux creuat (Forman *et al.* 1991), sondes de presa de mostra per filtració del medi o elements de pervaporació (Papaefstathiou *et al.* 1996) per poder prendre mostres lliures de sòlids i també de manera estèril. Rigorosament s'hauria de definir una mesura *at line*, és a dir, la mostra és de procés però analitzada en condicions alterades degut a la filtració, que pot afectar el contingut d'alguns components.

En concret, per al monitoratge del metanol s'han aplicat diferents mètodes que es poden dividir en dos grups: aquelles tècniques en les quals és necessària la presa de mostra estèril del bioreactor lliure de biomassa i el seu posterior processat, com serien els mètodes basats en reaccions enzimàtiques, l' HPLC o la cromatografia de gasos, i altres metodologies en les quals no cal disposar d'una mostra del brou de cultiu ja que el metanol es mesura en els gasos de sortida de bioreactor o permea a

través d'una membrana submergida al brou de cultiu i és arrossegat en fase gas per un corrent d'aire portador. S'han referenciat també mètodes basats en la espectroscòpia de l'infraroig mig o pròxim (MIR, NIR) per al monitoratge del metanol sense necessitat d'extreure mostra (Crowley *et al.* 2005; Schenk *et al.* 2007).

Hi ha diferents exemples al primer grup d'analitzadors. Existeixen treballs en els quals es segueix de manera *off-line* el metanol d'un cultiu de *P. pastoris* per cromatografia de gasos i es milloren els nivells de producció de la proteïna d'interès (Minning *et al.* 2001). També s'ha descrit la utilització d'analitzadors per injecció de flux (FIA, en sigles angleses) per a la determinació del metanol en presència d'altres alcohols (de María *et al.* 1995). Respecte a l'equipament comercial, Yellow Spring Instruments (Ohio, USA) disposen d'un analitzador preparat per connectar al bioreactor i que pot determinar el metanol mitjançant reaccions enzimàtiques a partir d'una mostra extreta de manera estèril.

Dintre el segon grup d'analitzadors de metanol en fase gas hi ha la possibilitat de mesurar-lo en el corrent gasós de sortida mitjançant la utilització de diferents equips comercials (Jahic *et al.* 2003; Cos *et al.* 2006). També es pot mesurar el que permea a través d'un tub de silicona submergit al brou de cultiu (Hong *et al.* 2002) o a través d'una sonda inserida al medi (Mayson *et al.* 2003).

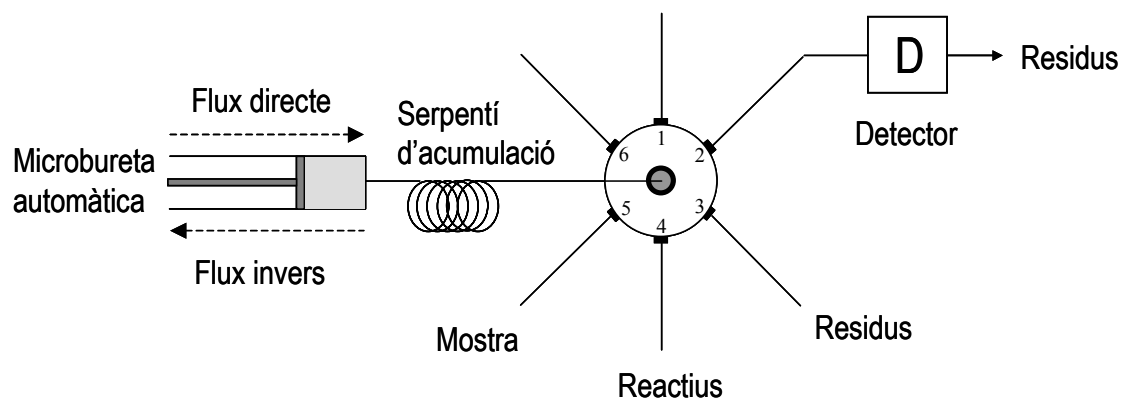
Anteriorment Almuzara i col·laboradors (Almuzara *et al.* 2002) van descriure l'aplicació d'un analitzador FIA per a la determinació del metanol del medi de cultius de *P. pastoris*. En aquest capítol es descriurà el desenvolupament i adaptació d'un analitzador SIA per a la mesura en línia del metanol en cultius de *P. pastoris* a partir dels primers resultats obtinguts per Almuzara i col·laboradors (Almuzara 2002) en l'experimentació d'aquesta tècnica per a la determinació del metanol.

Hi ha múltiples aplicacions de monitoratge en línia basades en analitzadors FIA i d'injecció seqüencial (SIA, en sigles angleses). Els SIA van ser proposats per Ruzicka i Marshall (Ruzicka & Marshall 1990) com una tècnica basada en els mateixos principis que el FIA però amb una considerable millora del sistema d'impulsió del flux. Mentre que els FIA utilitzaven bombes peristàltiques, els SIA empen microburetes per a la impulsió i això resulta en una major robustesa de l'analitzador ja que es poden dispensar volums de manera precisa i repetitiva.

El fonament bàsic dels SIA es basa en la mescla seqüencial de la mostra amb un o diferents reactius. La metodologia SIA integra un altre element bàsic: la vàlvula selectora de múltiples canals. Amb aquests dos elements es pot realitzar la mesura i dispensació de diferents reactius i mostra amb una única microbureta.

La tècnica SIA utilitza volums precisos de solució portadora, mostra i reactius que són aspirats per etapes en un tub d'acumulació. La microbureta permet disposar d'un control precís a l'hora d'aspirar o impulsar el flux.

Els elements bàsics d'un SIA es mostren a la Figura 3.1. i consten d'un serpentí d'acumulació i reacció de mostra i reactius, una microbureta automàtica, una vàlvula de selecció multicanal, el detector i un PC que controla les diferents accions dels elements. La microbureta desenvolupa la doble funció de mesurar volums precisos i impulsar el flux al llarg del sistema. Quant als elements detectors, poden ser múltiples, des de espectrofotòmetres fins a sensors químics.



**Figura 3.1.** Sistema bàsic d'un analitzador d'injecció seqüencial (SIA).

Una anàlisi bàsica per una tècnica SIA comprèn els següents passos:

- Aspiració de mostra i reactius amb flux revers al serpentí d'acumulació.
- Moviment de canvi de la vàlvula selectora i connexió cap al detector.
- Transcurs del temps necessari per a la reacció. Aquesta etapa pot donar-se tant perquè s'atura el moviment del flux durant un cert temps per facilitar la dispersió axial i la reacció abans de la mesura, com perquè el seqüenciat/mostra reactius són impulsats immediatament cap al detector i es fa una determinació de la cinètica de la reacció.
- Impulsió de la seqüència de mostra i reactius cap al detector.

El seqüenciat inicial de mostra i reactius cap al serpentí s'ha de dissenyar, si es desitja tenir un bon grau de reacció, de tal manera que s'optimitzi la interpenetració axial de les diferents zones. En aquesta línia cal, entre d'altres aspectes, un estudi i un bon control dels volums de mostra i reactius aspirats.

Així doncs, els SIA són més estables en el temps que els FIA, més fàcils de mantenir, molt versàtils i controlables via PC. Els muntatges SIA no han de ser

modificats físicament i la seva reconfiguració es pot fer via programari modificant els volums desitjats.

Atesa la versatilitat d'aquests analitzadors s'han aplicat al monitoratge de molts components del medi de cultiu. S'han publicat aplicacions per al seguiment de la proteïna d'interès produïda (Cos *et al.* 2000), de la font de carboni (Min *et al.* 1995; Wu *et al.* 2001; Horstkotte *et al.* 2007), dels subproductes del cultiu (Kansiz *et al.* 2001; Horstkotte *et al.* 2006), de la font de nitrogen (Wu *et al.* 2001), dels fosfats (Forman *et al.* 1991). També s'han descrit altres sistemes SIA utilitzats en el monitoratge de fermentacions d'acetona-butanol-etanol (Kansiz *et al.* 2005), on la tècnica SIA va unida a determinacions de infraroig mitjà i es realitza la quantificació per mètodes quimiomètrics (PLS). En aquesta cas es determinen simultàniament cinc analits acetona, acetat, butirat, n-butanol i glucosa. Altres aplicacions recents de la tècnica SIA inclouen la determinació de L-cisteïna en cultius de *S.cerevisiae* (Lee *et al.* 2005).

En aquest capítol, es descriu el desenvolupament i l'aplicació d'un SIA per al monitoratge en línia de metanol en cultius de *P. pastoris* durant la fase d'inducció amb aquest substrat amb un sistema automàtic de presa de mostra estèril del cultiu.

## 3.2 Materials i mètodes

### 3.2.1 Soca

Per als cultius amb aplicació del SIA com a mètode d'anàlisi del metanol residual es va utilitzar una soca derivada de la comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA) KM71(*arg4 his4 aox1Δ::SARG4 AOX2*), fenotípicament Mut<sup>s</sup> (Methanol utilization slow) i His<sup>-</sup>, que contenia el plàsmid pPICZ $\alpha$ A-ROL (Minning *et al.* 1998) insertat en el locus *AOX1*. L'auxotrofia a histidina va ser revertida amb el vector pPIC9 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La soca productora de ROL resultant va ser anomenada KM71R/pPICZ $\alpha$ A-ROL.

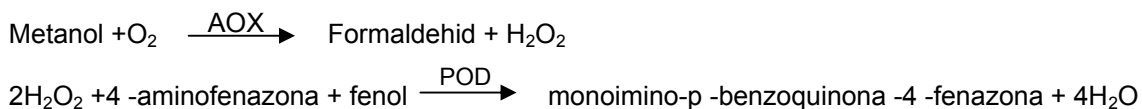
### 3.2.2 Condicions de cultiu

Els cultius es van dur a terme al bioreactor Biostat ED de 5 l de volum. El medi utilitzat va ser el descrit en l'apartat 2.4.1 de materials i mètodes generals. Les condicions d'operació van ser les anteriorment descrites (apartat 2.6.2) i es va utilitzar KOH 1M per al manteniment del pH.



### 3.2.3 Reactius i solucions emprades al SIA.

La determinació del metanol en aquest analitzador es basa en dues reaccions enzimàtiques seqüencials dels enzims alcohol oxidasa (AOX) i peroxidasa (POD):



El compost resultant, monoimino-p-benzoquinona-4-fenazona, dóna una coloració vermellosa i es pot detectar espectrofotomètricament a 470 nm.

Tots els reactius eren de grau analític. Es van preparar les següents solucions d'enzims-reactius: alcohol oxidasa (AOX) de *Pichia pastoris* (Sigma-Aldrich Co. de 1000 U, activitat específica de 10–40 U·mg proteïna<sup>-1</sup>), diluïda 125 vegades; peroxidasa (POD), type VI-A, de *Horseradish* (Sigma-Aldrich Co. de 1000 U·mg<sup>-1</sup>), 0.01 g·l<sup>-1</sup>; 4-aminofenazona, 0.73 g·l<sup>-1</sup> i fenol 2.1 g·l<sup>-1</sup>.

Les solucions d'enzims-reactius es preparaven en tampó fosfat 0.1 M (pH =8) a 20°C. Aquesta solució s'utilitzava també com a portadora en l'analitzador (Almuzara *et al.* 2002).

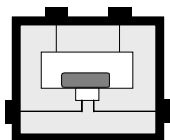
Per a la determinació dels temps de rentat necessaris, l'estudi de l'existència de contaminació creuada entre mostres i la reproductibilitat instrumental s'utilitzen injeccions de solució de colorant Duasyn Acid Ponceau 4RC (Hoechst GmbH, Frankfurt am Main, Alemanya).

### 3.2.4 Equipament i programari del SIA.

L'analitzador està compost per quatre mòduls (Easi Technologies, Cerdanyola del Vallès, Espanya) connectats via RS-485.

El sistema inclou una vàlvula d'injecció de 6 vies (Cheminert 4162510, Valco Instruments, Houston, USA), una bomba peristàltica de 5 canals i velocitat constant de gir de 6 rpm (Mod 1201/06-5-0), un colorímetre amb un LED de doble feix (Mod 1203/470/Z10) i un mòdul amb dues vàlvules rotatives de 3 vies (Mod 1202/3). Les connexions entre els diferents elements de l'analitzador es van fer amb tub de PTFE (0.8 mm DI) units amb juntes de PVC.

A banda del cos central de l'analitzador es va instal·lar una cambra de mescla de metacrilat per poder fer la dilució de les mostres. És una cambra cilíndrica (1 cm d'alt x 3 cm d.i.) amb quatre entrades/sortides i un agitador magnètic a l'interior (Figura 3.2). Per netejar-la i buidar-la s'utilitza la bomba peristàltica de l'equip.



**Figura 3.2.** Cambra de mescla per a la dilució de les mostres del SIA de metanol.

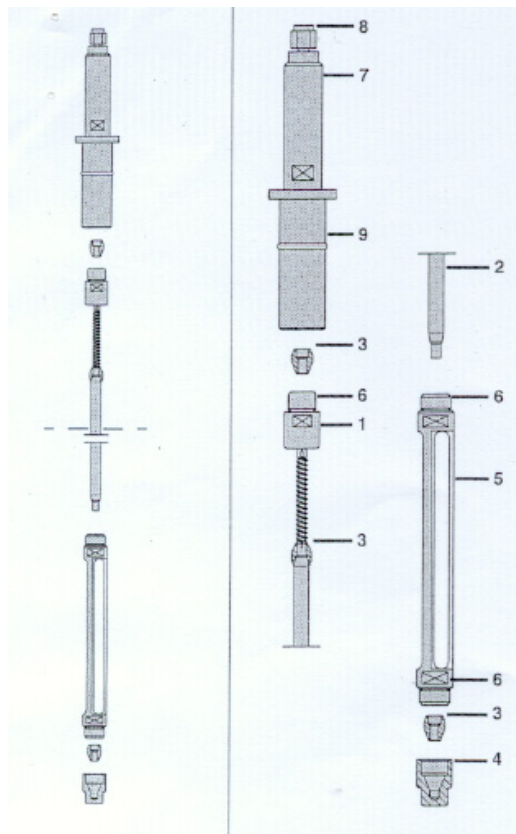
Les mostres i les solucions de reactius/enzims són aspirades i impulsades a través de la vàlvula rotativa de 6 vies amb dues microburetes automàtiques (Crison MicroBU 2031, Alella, Spain) equipades amb dues xeringues de 0.5 ml i 2.5 ml respectivament (Hamilton 1002 Teflon® Luer Lock, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland).

El serpentí d'acumulació on es porta a terme la reacció entre la mostra i els reactius està fet amb un tub de PTFE (0.8 mm d.i.), té una longitud d'1m i està enrotllat al voltant d'un suport plàstic.

L'operació dels elements de l'equip estava governada via ordinador per una aplicació informàtica desenvolupada en llenguatge de programació C (Cos *et al.* 2000). La comunicació es fa a través d'una interfase RS-485/RS-232.

### 3.2.5 Equip de presa de mostres.

Les mostres lliures de biomassa són extretes asèpticament del bioreactor a través d'una sonda *in situ* de presa de mostres (Eppendorf ESIP 5441, Hamburg, Alemanya) (Figura 3.3). Com a sistema d'impulsió s'utilitza una bomba peristàltica (Braun FE411, BBraun, Melsungen, Alemanya) amb un cabal d'extracció de 3 ml·min<sup>-1</sup>.



**Figura 3.3.** Esquema de la sonda de presa de mostres lliures de biomassa. (1) Suport de la membrana de filtració, (2) Membrana de filtració tubular, (3) Connexions de PTFE, segellen la unitat, (4) Caputxó final, (5) Coberta metàl·lica de protecció de la membrana, (6) Rosques de connexió, (7) Adaptador de la sonda al bioreactor, (8) Sortida de la sonda, (9) Junta tòrica.

Abans d'introduir la mostra a l'analitzador es va instal·lar un dipòsit d'acumulació de la mostra per retirar les possibles bombolles d'aire. Aquest dipòsit és un cilindre vertical de metacrilat (3.2 cm d'alt x 1.1 cm d.i.) amb tres entrades/sortides. La inferior està connectada a la presa de mostra, la central a l'analitzador i la superior, connectada al dipòsit d'acumulació de residus, actua de sobreeixidor per les possibles bombolles d'aire que arrossegui la mostra.

Tots els tubs de connexió entre la sonda de presa de mostra i el SIA són de silicona (2.5mm d.i.) i PTFE (0.8 mm d.i.).

### 3.3 Resultats

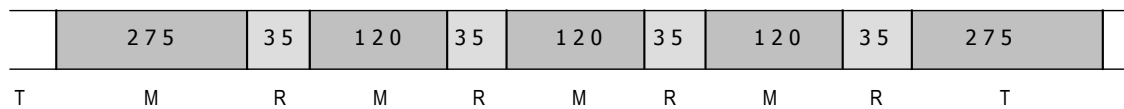
#### 3.3.1 Esquema de l'analitzador SI.

L'analitzador desenvolupat està basat en un analitzador FIA revers (r-FIA) prèviament dissenyat (Almuzara *et al.* 2002) i basat en les reaccions enzimàtiques descrites a l'apartat 3.2.3.

Amb aquest primer treball es podia determinar el metanol residual al medi de fermentació fins a una concentració de  $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Els autors (Almuzara *et al.* 2002)

apunten que aquests resultats poden ser deguts a una possible inhibició de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generada a la primera reacció sobre la POD. Aquesta concentració és inferior a la concentració de metanol òptima per a cultius discontinus alimentats de *P. pastoris* (Cos *et al.* 2006) amb el que s'haurien de realitzar dilucions importants de la mostra per entrar al rang de mesura.

Per intentar minimitzar aquest problema es va realitzar un estudi preliminar aplicant la tècnica d'injecció seqüencial (SIA) amb parada de flux. Els analitzadors SIA presenten una major simplicitat instrumental, més eficàcia a l'hora de controlar les diferents variables hidrodinàmiques i presenten un menor consum de reactius (Ruzicka & Marshall 1990). En el marc d'aquest treball, (Almuzara 2002) va optimitzar el seqüenciat de reactius/enzims i mostra al serpentí de reacció (Figura 3.4) i el temps de parada del flux per permetre la reacció. Aquest temps va quedar fixat a 90s com a compromís entre l'obtenció d'un bon senyal i un temps d'aturada raonable per un temps d'anàlisi no massa gran. Almuzara (2002) també va determinar la concentració de reactius i enzims (Apartat 3.2.3) i la longitud i diàmetre del tub de reacció que maximitzaven la resposta del sistema (Apartat 3.2.4) i minimitzaven els costos en reactius i enzims.



**Figura 3.4.** Seqüència de reactius/enzims i mostra.

Tot i aquestes modificacions no es va aconseguir millorar el rang lineal de l'anàlisi per adequar-lo a les necessitats dels cultius de *P.pastoris*. Era necessari doncs introduir un pas de dilució de la mostra del cultiu per tal de poder ampliar el rang d'anàlisi.

Es va pensar en dues opcions: la tècnica clàssica de mescla basada en gradient i la introducció d'una cambra de mescla.

La primera opció es va valorar com a més encertada en un analitzador tipus FIA ja que en un SIA seria difícil aconseguir una zona de dilució prou gran que es pogués utilitzar posteriorment per a la seqüenciació amb els reactius. Així doncs, es va escollir la utilització d'una cambra de mescla ja que la seva operació és molt predictable i reproducible (Tyson & Appleton 1984). Malgrat que alguns autors (Guzman & Compton 1993) citen les cambres de mescla per mesclar-hi els reactius, la mostra i el

diluent, en el present estudi es va descartar aquesta opció ja que caldria augmentar la concentració d'enzims i s'encariria l'anàlisi.

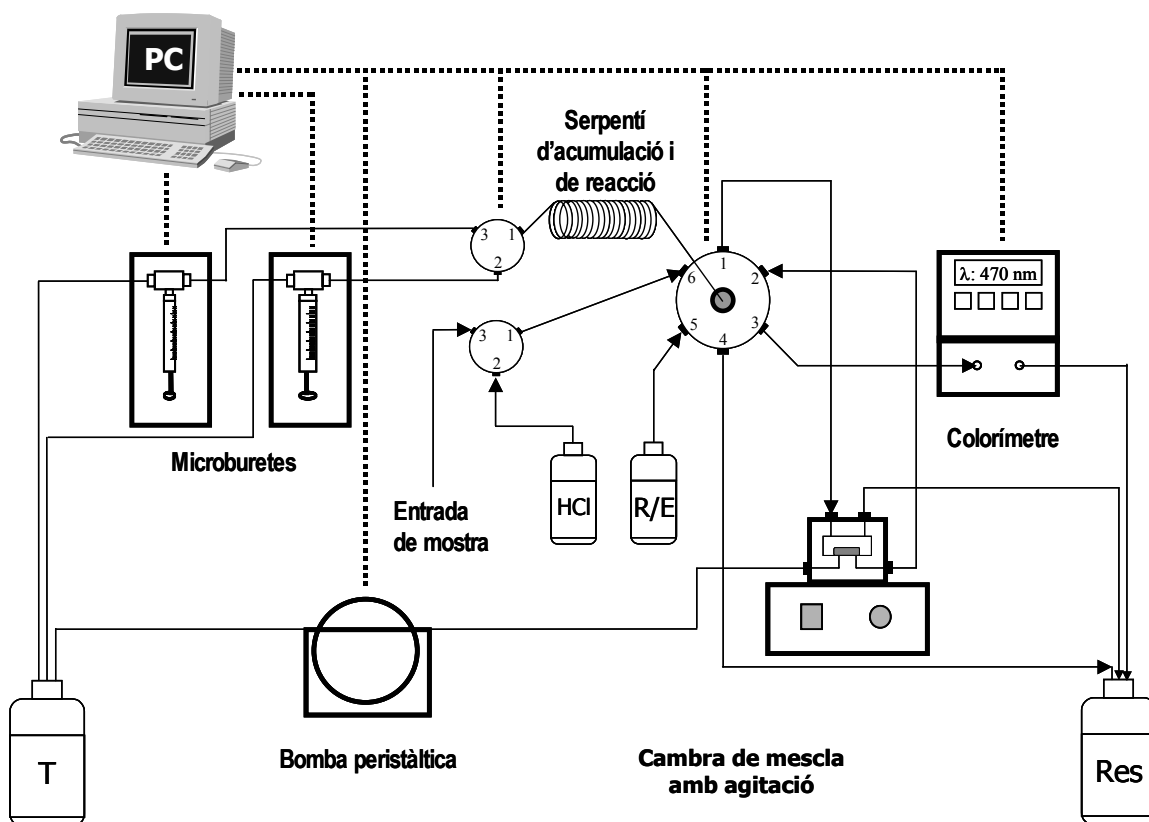
Es va col·locar la cambra de mescla com a un element dependent de la vàlvula de 6 vies de l'analitzador (Figura 3.5). La mostra i el tampó de dilució són introduïts per una de les dues entrades superiors de la cambra, mentre que les alíquotes de mostra diluïda que subtilitzen en l'anàlisi són extretes per una de les dues sortides inferiors de la cambra. La cambra de mescla disposa d'un agitador magnètic per assegurar la correcta mescla de mostra i diluent.

Per al seu rentat es va pensar en anar introduint volums de tampó de neteja i extraient-los per les mateixes vies per on es feia la introducció/extracció de la mostra a diluir i un cop diluïda. Evidentment aquesta configuració implicava la utilització del canal central de la vàlvula de 6 vies i, per tant, evitava la realització d'altres accions de l'anàlisi mentre es realitzés la neteja de la cambra. Aquesta opció hauria allargat molt el temps d'anàlisi i per això es va optar per una neteja en "flow-through" de la cambra de mescla. Amb aquesta configuració, un cop s'havien retirat les alíquotes de mostra diluïda necessàries per l'anàlisi, s'accionava la bomba peristàtica del mòdul SIA i s'introduïa un corrent de tampó de neteja a la cambra de mescla. Aquesta solució rentadora entrava per una de les vies inferiors de la cambra i sortia per una via de superior cap al punt de recollida de residus de l'analitzador. Un cop la cambra estava neta es buidava aprofitant la possibilitat de la bomba peristàtica de treballar en flux revers i es retornava el tampó net al punt d'origen. Per tal de realitzar una neteja correcta es va estimar el temps de residència de la cambra de mescla (25 s) al cabal màxim de tampó que podia proporcionar la bomba peristàtica. Un cop realitzada aquesta estimació es va programar un temps de rentat superior a  $5 \tau$ , per tal d'assegurar la completa neteja de la cambra i la minimització d'interferències entre anàlisis. Així doncs, el rentat de la cambra de mescla es podia fer simultàniament a altres accions i es podia reduir el temps total de l'anàlisi.

Durant la fermentació la consigna de metanol està entorn d' $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol i és convenient no sobrepassar els  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . En aquells moments es va escollir  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com a límit de concentració de metanol. Si els diluïm en una relació 1/20, s'arriba als  $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol que és el límit superior del rang lineal de l'analitzador sense dilució.

Finalment es va decidir addicionar  $100 \mu\text{l}$  de mostra en un total de  $2500 \mu\text{l}$  de mescla total. Això resulta en una dilució de 1/25 que permetia no treballar al límit del rang lineal de l'anàlisi.

El muntatge final de l'analitzador un cop incorporats els diferents elements necessaris per diluir la mostra és el que es mostra a la figura 3.5:



**Figura 3.5.** Esquema de l'analitzador de metanol per injecció seqüencial.

Periòdicament cal fer una neteja amb àcid clorhídric 0.2 M de la cel·la del colorímetre per evitar l'adsorció del producte colorat de les reaccions. Per permetre'n la dispensació s'introdueix una segona vàlvula de 3 vies (Figura 3.5.), anàloga a la que regula l'actuació de cada una de les microburetes. Aquestes vàlvules de tres vies es poden comandar via programari. Quan cal fer una neteja de la cel·la, la vàlvula de tres vies queda oberta pel canal del HCl, mentre que quan es realitzen les anàlisis, ho està pel canal d'entrada de mostra.

En l'analitzador s'utilitzen dues microburetes amb dues xeringues de volums diferents: una de 500  $\mu\text{l}$  i l'altra de 2500  $\mu\text{l}$  per poder dispensar els volums necessaris (Figura 3.5.) amb suficient garantia de reproductibilitat. L'actuació d'una o altra de les microburetes ve comandada via ordinador i a través del pas del flux per una vàlvula de tres vies que actua com a selectora.

### 3.3.2 Diagrama de flux de l'anàlisi

Quan es realitza un anàlisi inicialment es porta a terme un rentat del sistema. La mostra és aspirada i impulsada cap a la cambra de dilució on es procedeix a la dilució 1/25 de la mostra amb els volums anteriorment esmentats. Posteriorment s'aspiren pel canal central de la vàlvula de 6 vies els volums de mostra diluïda i solució de reactius/enzims necessaris (Figura 3.4.) per dur a terme la reacció al serpentí.

Un cop els volums necessaris de mostra han estat retirats de la cambra de dilució s'inicia la seva neteja en "flow-through". Aquest procés es pot donar simultàniament a la parada del flux de 90 s perquè es dugui a terme la reacció enzimàtica amb un senyal suficient. Un cop transcorreguts aquests 90 s s'impulsa la seqüència cap al detector i es quantifica l'alçada màxima del pic. Després de la mesura, s'inicia el buidat i neteja de tots els tubs i el buidat en flux revers de la cambra de dilució. La taula 3.1 mostra un seqüència cronològica de les operacions de l'analitzador.

**Taula 3.1.** Seqüència temporal d'operació del SIA proposat.

Temps transcorregut (s)	Acció
85	Neteja del sistema
50	Dilució de la mostra
128	Neteja i establiment de línia base
52	Aspiració de la seqüència de reactius/enzims i mostra
90	Temps de reacció i inici del rentat de la cambra de dilució
40	Impulsió
41	Neteja (tubs i cambra de mescla)

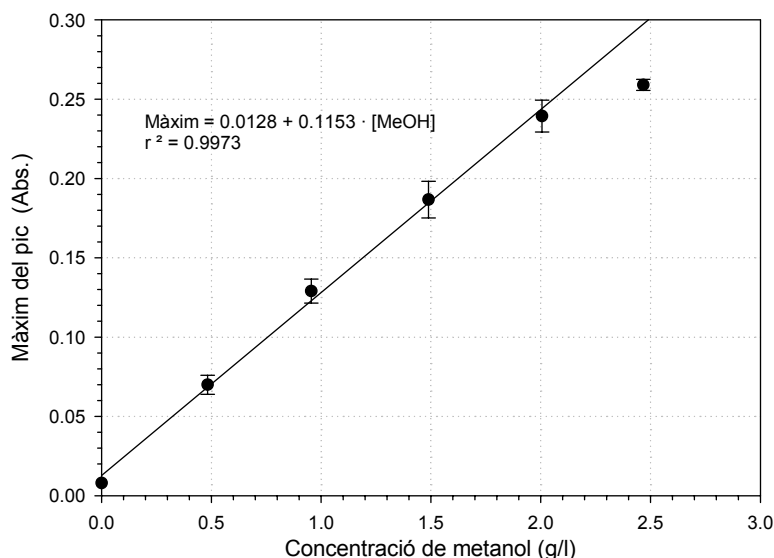
Amb aquesta configuració s'aconsegueix una freqüència d'anàlisi de 7 mostres per hora. Es va comprovar la no existència de contaminació creuada de mostres a partir de la determinació de l'alçada de pic de mostres de colorant conegudes. Es va mesurar per triplicat una mostra a una concentració de colorant de  $0.03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , seguida d'un triplicat d'una mostra de concentració de  $0.125 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i de nou una determinació per triplicat de la mostra de  $0.03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Amb aquest procediment es va comprovar la inexistència de contaminació creuada i la bona reproductibilitat de l'anàlisi ja que la

desviació estàndard relativa obtinguda amb injecció de solucions de colorant era com a màxim del 2.8%.

Les desviacions estàndards de l'anàlisi que s'obtenien si es mesurava l'alçada màxima o l'àrea del pic eren similars (dades no mostrades). Es va escollir mesurar l'alçada màxima ja que amb la xeringa de 2500  $\mu\text{l}$  no es podia impulsar tota la seqüència de reactius/enzims i mostra a través de la cambra de mescla amb un sol impuls i es consumia més temps si es volia determinar l'àrea del pic.

### 3.3.3 Calibratge de l'anàlitzador i factors que afecten l'anàlisi

Es van preparar 6 solucions de metanol des de 0 fins a a 2.5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Es va dur a terme la reacció a una temperatura de 20°C i es van obtenir els resultats que s'observen a la Figura 3.6.:



**Figura 3.6.** Calibratge de metanol amb el SIA amb dilució automàtica.

S'observa una resposta lineal fins a 2  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  i s'obté un % RSD inferior al 4%. El límit de detecció, calculat com tres vegades la desviació estàndard del soroll de la línia base, era de 0.12  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Posteriorment es van realitzar altres calibratges i es va observar que quan la temperatura del laboratori excedia els 20°C el rang de linealitat de l'anàlitzador disminuïa (dades no mostrades). Per aquets motiu es va decidir controlar la temperatura del laboratori entorn dels 20°C.



### 3.3.4 Seguiment d'una fermentació de *P. pastoris*.

Per poder monitorar en línia una fermentació de *P. pastoris* calia incorporar un sistema de presa de mostres estèril del bioreactor. Per aquest motiu es va implementar la sonda d'Eppendorf ESIP 5441 que es connecta a capçalera del bioreactor per un dels seus ports estàndards. Disposa d'uns mòduls que permeten ajustar la llargada de la sonda per tal d'assegurar la seva correcta immersió al medi des de l'inici del cultiu.

Aquest cabal de mostra lliure de biomassa no pot ser aspirat directament a l'analitzador ja que pot contenir bombolles d'aire que conduirien a errors de mesura. Per això entre la sonda de presa de mostra i l'entrada de mostra al SIA es va col·locar un petit desbombolejador. La mostra s'hi introdueix per la via inferior i s'aspira cap a l'analitzador per la sortida intermèdia.

Abans d'incorporar la sonda al sistema global d'anàlisi calia determinar el temps necessari per tal d'obtenir una mostra de concentració igual a la del medi de cultiu sense contaminació creuada entre mostres. Per això es va determinar el temps de resposta del sistema de presa de mostra (sonda + connexions + desbombolejador) mitjançant esglaons de colorant. Es va estimar aquest temps en aproximadament 7 min, el que reduïa la freqüència d'anàlisi del sistema complet a unes 4 mostres·h<sup>-1</sup>.

La membrana de microfiltració de la sonda de presa de mostres no va mostrar problemes d'obstrucció al llarg de cultius fins als valors de biomassa finals normalment assolits.

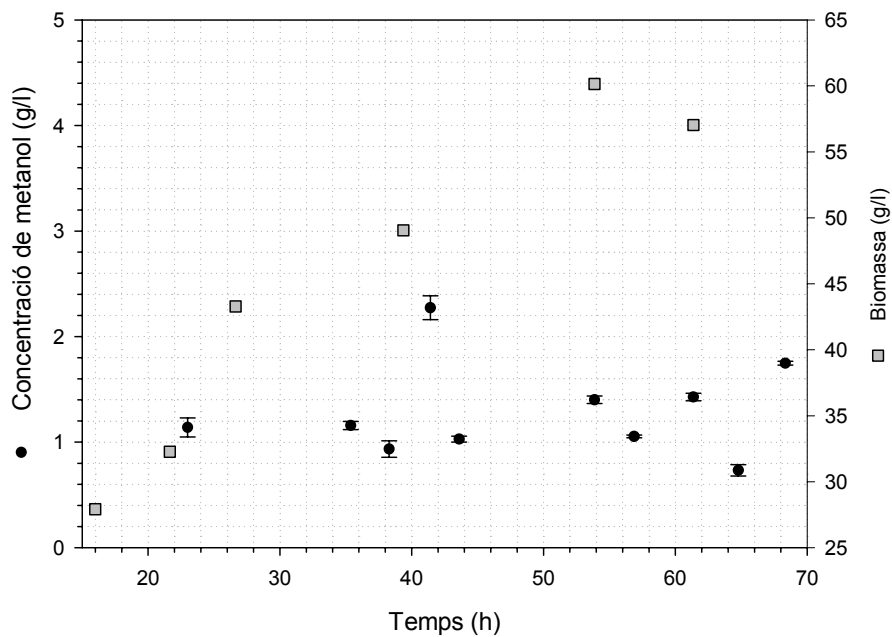
Es va monitorar un cultiu discontinu alimentat de 68 h de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup>. L'estratègia de cultiu va ser la que s'exposa en l'apartat 2.6.2. de materials i mètodes. El valor consigna de metanol residual al medi de cultiu es va fixar en 1 g·l<sup>-1</sup>.

Es va mostrejar únicament durant la fase del cultiu discontinu alimentat amb metanol (a partir de les 23 hores de cultiu) ja que durant la fase de transició l'adició de metanol es fa de manera preprogramada.

Durant el monitoratge va ser necessari preparar diferents solucions de reactius/enzims degut a la seva desactivació amb el temps. En concret es va treballar amb tres solucions amb el posterior recalibratge de l'analitzador (la solució inicial, un primer canvi entorn de les 34 h de cultiu i un segon canvi abans de les 54h de cultiu) .

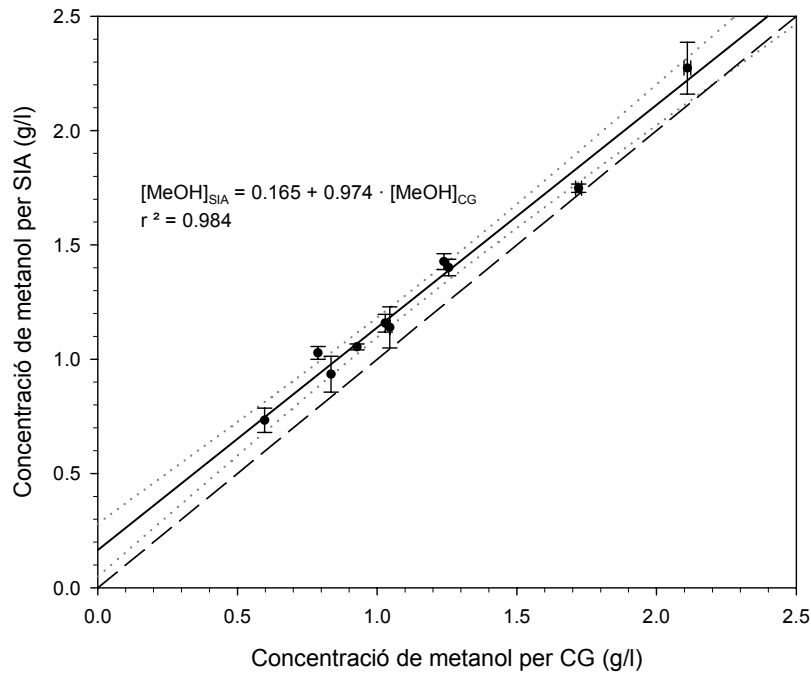
Malgrat que la freqüència d'anàlisi possible de l'analitzador és de  $4 \text{ mostres} \cdot \text{h}^{-1}$ , es va reduir la velocitat de mostreig a aproximadament una mostra cada 3 hores ja que en combinació amb l'estratègia de control implementada és suficient per mantenir la consigna de metanol entorn del valor desitjat en cultius de soques Mut<sup>s</sup>.

Les mesures de metanol que es van obtenir es mostren a la Figura 3.6., juntament amb l'evolució de la biomassa al llarg del cultiu. Es pot comprovar com durant el cultiu es va mantenir la concentració de metanol entorn del  $1 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  de valor consigna.



**Figura 3.6.** Evolució de la biomassa, (■), i de la concentració de metanol, (●), durant el cultiu de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> monitoritzat amb el SIA amb dilució automàtica.

Si es comparen les dades obtingudes per SIA i les mesurades per cromatografia de gasos s'obtenen els resultats de la figura 3.7.:



**Figura 3.7.** Comparació entre les mesures obtingudes mitjançant SIA i per CG de mostres de fermentació.

Es pot observar una desviació d'aproximadament el 10% entre els dos mètodes. Aquesta desviació també s'havia observat durant la mesura de mostres de cultiu de manera discontinua amb l'analitzador SIA. Probablement es tracti d'algun compost del medi que interfereixi amb l'anàlisi. Horstkotte i col·laboradors (Horstkotte *et al.* 2007) reporten la interferència del formaldehid en la determinació del glicerol mitjançant un SIA basat en la reacció de Hantzsch. Malgrat tot, atesa la reproductibilitat de l'anàlisi i l'actuació del sistema es demostra la fiabilitat del sistema d'anàlisi per al seguiment de la concentració de metanol en cultius de *P.pastoris*.

No obstant això, per als cultius amb la soca Mut<sup>+</sup> la freqüència possible d'anàlisi amb el SIA proposat seria inferior a la desitjada ja que en aquests cultius els canvis en la concentració de substrat residual es produeixen de manera molt més ràpida. Per aquest motiu, es va instal·lar un analitzador comercial de metanol al corrent dels gasos de sortida del bioreactor (Ramon *et al.* 2004; Cos 2005). Aquest tipus de sensors de compostos volàtils presenten l'avantatge de no requerir reactius ni enzims i de poder disposar de mesures contínues de l'analit amb uns temps de resposta molt inferiors al del SIA proposat.

Així mateix, els treballs presentats posteriorment al desenvolupament d'aquest analitzador per altres membres del grup (Cos *et al.* 2006) demostren que la

concentració òptima de metanol per als cultius de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> és d'1 g·l<sup>-1</sup>, mentre que per a la soca Mut<sup>+</sup> aquesta concentració augmenta fins als 2.5 g·l<sup>-1</sup> (Capítol 7 del present document). Això faria necessari optimitzar de nou la dilució de l'analitzador per ajustar-lo a aquests nous requeriments.

Totes aquestes condicions van fer que s'escollís treballar amb un sensor de volàtils al corrent de sortida enlloc d'utilitzar l'analitzador proposat. No obstant això, les tècniques de SIA i FIA han continuat aplicant-se al monitoratge de bioprocessos en aquells casos en que no es disposa d'altres analitzadors en línia. Recentment s'ha aplicat un analitzador per injecció seqüencial en la determinació de formaldehid (Horstkotte *et al.* 2006), glicerol (Horstkotte *et al.* 2007) i sorbitol (Horstkotte *et al.* 2008) en cultius de *P. pastoris*.

### 3.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha descrit el desenvolupament d'un analitzador per injecció seqüencial per al monitoratge de la concentració de metanol residual al medi en cultius de *P. pastoris* i s'han assolit les següents conclusions:

- S'ha desenvolupat un sistema d'anàlisi reproducible i fiable amb un rang d'anàlisi de fins a 2 g·l<sup>-1</sup> amb un RSD inferior al 4%.
- Amb la implementació d'un sistema en línia d'extracció de mostra lliure de biomassa, és possible monitorar en línia el substrat en cultius de *P. pastoris*.
- La freqüència final d'anàlisi de 4 mostres·h<sup>-1</sup> fa l'analitzador apte per al seguiment de cultius de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> però caldria augmentar la freqüència pel cas de soques Mut<sup>+</sup>.
- Estudis posteriors al desenvolupament d'aquest analitzador (Capítol 7 del present document) revelen que caldria augmentar la dilució de la mostra per adequar-la a la concentració òptima de metanol per a la soca Mut<sup>+</sup>. Pel que fa a la soca Mut<sup>s</sup> el rang d'anàlisi seria correcte ja que l'òptim de metanol es troba a 1 g·l<sup>-1</sup> (Cos *et al.* 2006).
- La disponibilitat d'un sensor de volàtils per a la determinació de metanol en línia va fer que es desestimés l'aplicació del SIA desenvolupat. No obstant això, aquest tipus de sensors també ofereixen algunes limitacions (Ramon *et al.* 2004). Els analitzadors SIA es continuen utilitzant actualment per a la

determinació de diversos compostos pels quals no es disposa de sensors en línia degut a la seva versatilitat i fàcil adaptació.

### 3.5 Referències bibliogràfiques

Almuzara,C. 2002. Optimització d'un sistema FIA i experimentació amb la tècnica SIA per l'anàlisi de metanol en mostres procedents d'una fermentació. Escola Universitària Politècnica del Medi Ambient. Projecte final de carrera.

Almuzara,C., Cos,O., Baeza,M., Gabriel,D. & Valero,F. 2002. Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnology Letters*, 24, 413-417.

Cereghino,J.L. & Cregg,J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45-66.

Cos,O. 2005. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia Pastoris*. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Cos,O., Montesinos,J.L., Lafuente,J., Sola,C. & Valero,F. 2000. On-line monitoring of lipolytic activity by sequential injection analysis. *Biotechnology Letters*, 22, 1783-1788.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.

Crowley,J., Arnold,S.A., Wood,N., Harvey,L.M. & McNeil,B. 2005. Monitoring a high cell density recombinant *Pichia pastoris* fed-batch bioprocess using transmission and reflectance near infrared spectroscopy. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 621-628.

de María,C.G., Manzano,T., Duarte,R. & Alonso,A. 1995. Selective flow-injection determination of methanol using immobilized enzyme reactors. *Analytica Chimica Acta*, 309, 241-250.

Forman,L.W., Thomas,B.D. & Jacobson,F.S. 1991. On-line monitoring and control of fermentation processes by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 249, 101-111.

Guzman,M. & Compton,B.J. 1993. Use of Sequential Injection technique and robotics for the automation of rhFXIII fluorometric activity assay. case study. *Talanta*, 40, 1943-1950.

Hanko,V.P. & Rohrer,J.S. 2000. Determination of carbohydrates, sugar alcohols and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, 283, 192-199.

Hong,F., Meinander,N.Q. & Jonsson,L.J. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 438-449.

- Horstkotte,B., Arnau,C., Valero,F., Elsholz,O. & Cerda,V. 2008. Monitoring of sorbitol in *Pichia pastoris* cultivation applying sequential injection analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 77-83.
- Horstkotte,B., Werner,E., Wiedemeier,S., Elsholz,O., Cerda,V. & Luttmann,R. 2006. At-line determination of formaldehyde in bioprocesses by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 559, 248-256.
- Horstkotte,B., Werner,E., Seresht,A.K., Cornelissen,G., Elsholz,O., Cerda Mart/En,V. & Luttmann,R. 2007. Sequential injection analyzer for glycerol monitoring in yeast cultivation medium. *Talanta*, 71, 941-947.
- Jahic,M., Wallberg,F., Bollok,M., Garcia,P. & Enfors,S.O. 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories*, 2, 6.
- Kansiz,M., Schuster,K.C., McNaughton,D. & Lendl,B. 2005. Sequential injection/mid-infrared spectroscopic analysis of an acetone-butanol-ethanol fermentation: Analyte cross-correlation effects. *Spectroscopy Letters*, 38, 677-702.
- Kansiz,M., Gapes,J.R., McNaughton,D., Lendl,B. & Schuster,K.C. 2001. Mid-infrared spectroscopy coupled to sequential injection analysis for the on-line monitoring of the acetone-butanol fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 438, 175-186.
- Lee,S.H., Sohn,O.J., Yim,Y.S., Han,K.A., Hyung,G.W., Chough,S.H. & Rhee,J.I. 2005. Sequential injection analysis system for on-line monitoring of l-cysteine concentration in biological processes. *Talanta*, 68, 187-192.
- 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*. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 291-298.
- Min,R.W., Nielsen,J. & Villadsen,J. 1995. Simultaneous monitoring of glucose, lactic acid and penicillin by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 312, 149-156.
- Minning,S., Schmidt-Dannert,C. & Schmid,R.D. 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66, 147-156.
- Minning,S., Serrano,A., Ferrer,P., Sola,C., Schmid,R.D. & Valero,F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86, 59-70.
- Papaefstathiou,I., Bilitewski,U. & de Castro,M.D.L. 1996. Pervaporation: an interface between fermentors and monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 330, 265-272.
- 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*. *Biotechnology Letters*, 26, 1447-1452.
- Ruzicka,J. & Marshall,G.D. 1990. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237, 329-343.

Schenk,J., Marison,I.W. & von,S.U. 2007. A simple method to monitor and control methanol feeding of *Pichia pastoris* fermentations using mid-IR spectroscopy. Journal of Biotechnology, 128, 344-353.

Schügerl,K. 2001. Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. Journal of Biotechnology, 85, 149-173.

Tyson,J.F. & Appleton,J.M.H. 1984. A continuous-dilution calibration technique for flame atomic-absorption spectrophotometry. Talanta, 31, 9-14.

Wu,C.H., Scampavia,L., Ruzicka,J. & Zamost,B. 2001. Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system. Analyst, 126, 291-297.

Zhang,W., Bevins,M.A., Plantz,B.A., Smith,L.A. & Meagher,M.M. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. Biotechnology and Bioengineering, 70, 1-8.





# 4

**Monitoratge de la biomassa en cultius discontinus de *P. pastoris* a partir d'anàlisis fluorimètriques *off-line***

4.1 Introducció .....	71
4.1.1 Mètodes per a la determinació de la biomassa. ....	71
4.1.2 La fluorescència com a tècnica per al monitoratge dels cultius de <i>P. pastoris</i> . .....	74
4.2 Materials i mètodes.....	75
4.2.1 Medis, reactius i solucions utilitzades.....	75
4.2.2 Equipament.....	76
4.3 Resultats .....	77
4.3.1 Determinació de les longituds d'ona òptima pels diferents fluoròfors cel·lulars.....	77
4.3.2 Estudis de fluorescència en mostres de fermentació. ....	79
4.3.3 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del triptòfan.....	81
4.3.4 Estimació de la biomassa a partir de mesures fluorimètriques <i>off-line</i> en cultius discontinus de 40 g·l <sup>-1</sup> de glicerol i 10 g·l <sup>-1</sup> de metanol . ....	84
4.3.5 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del NADH.....	89
4.4 Conclusions .....	90
4.5 Referències bibliogràfiques .....	91

## 4.1 Introducció

El ràpid desenvolupament de la biologia molecular i l'enginyeria genètica han permès un gran desenvolupament de la biotecnologia ens els últims 30 anys.

El control dels processos biotecnològics permet augmentar l'eficiència, la productivitat i la reproductibilitat dels processos. Aquests aspectes fan possible reduir els costos de producció i augmentar tant la qualitat del procés com del producte final que en resulta, un requisit perseguit en la iniciativa del PAT de la FDA.

Tal i com s'ha comentat al Capítol 1, per poder garantir un bon control dels processos biotecnològics cal un monitoratge adient del procés. En el cas concret dels cultius de *P. pastoris* la concentració de metanol s'ha descrit com una de les variables clau en l'optimització de la producció de proteïnes heteròlogues. Per aquest motiu s'han desenvolupat o implementat diferents mètodes per al seu seguiment. Però hi ha altres variables de cultiu (biomassa i producte) que cal monitorar en línia per tal d'obtenir una informació apropiada del procés (Schügerl 2001). La biomassa sorgeix com una de les variables centrals per al control dels bioprocessos i la seva reproductibilitat. S'han aplicat diferents tècniques per a la seva determinació, algunes de les quals es descriuen a continuació.

### 4.1.1 Mètodes per a la determinació de la biomassa.

L'interès més especial rau en obtenir una mesura fiable d'aquesta variable de procés de manera contínua i en temps real, seguint també les directrius del PAT. Idealment es busca una mesura no invasiva i per aconseguir-la s'ha utilitzat la mesura de diferents propietats del medi de cultiu. Addicionalment s'han utilitzat altres tècniques invasives que es descriuen a continuació.

Els mètodes discontinus més emprats són els de la densitat òptica (en el que es fa una mesura de l'absorbància del medi que conté les cèl·lules) i el gravimètric -o de pes sec- (en el qual es mesura el pes d'un determinat volum de mostra després de rentar-ne els sòlids en suspensió i assecat-lo fins a pes constant). Aquest últim és emprat moltes vegades com a mètode de referència en les mesures de biomassa. S'han aplicat també els principis de l'anàlisi FIA i SIA. Tots els aparells desenvolupats seguint aquests principis basen la seva mesura en la determinació de la densitat òptica en el rang del visible. En general són sistemes que cal millorar des del punt de vista de la robustesa durant el cultiu. D'altra banda, també presenten la necessitat d'extreure

una mostra del cultiu en condicions d'esterilitat i realitzar generalment una dilució de la mateixa per entrar dintre del rang lineal d'anàlisi.

En quant a mètodes no invasius per al seguiment de la biomassa n'hi ha de basats en les propietats elèctriques del brou de cultiu. Els instruments on es mesura la conductivitat del medi de cultiu són simples i treballen a altes densitats cel·lulars tot i que tenen poca sensibilitat i la seva operació és dependent de la fisiologia cel·lular. Existeixen també instruments basats en el principi de la capacítància del brou de cultiu. Tot i que també és una mesura sensible als canvis en l'estat fisiològic de la cèl·lula, és adequada per fer el seguiment de les cèl·lules viables. Es disposa d'aparells de mesura de capacítància comercials que han donat bons resultats en cultius microbians. La sonda comercial Biomass Monitor™ (model 214, Aber Instruments, Aberystwyth, UK) ha resultat apta per al seguiment de cultius de *Streptomyces clavuligerus* (Neves *et al.* 2001), en el monitoratge d'un discontinu de *Candida utilis* fins a uns 12 g·l<sup>-1</sup> (November & Van Impe 2000) i de *P. pastoris* fins a uns 89 g·l<sup>-1</sup> (Fehrenbach *et al.* 1992). No obstant això, són metodologies que impliquen inconvenients quan es volen seguir cultius de cèl·lules petites a baixes concentracions atesa la seva poca sensibilitat i que impliquen alteracions quan es varia l'agitació o l'aeració del medi de cultiu.

Marose i col·laboradors (Marose *et al.* 1998) fan una revisió d'un altre tipus de mètodes no invasius, els sensors òptics per al seguiment de bioprocessos. Entre ells es troben els sensors basats en la mesura de l'absorbància/dispersió de la llum (típicament d'entre 700-1000 nm) i la seva correlació amb la biomassa. Es poden citar algunes sondes comercials: la Inpro 8200 (Mettler Toledo, Greifensee, Suïssa) o les sondes AS i ADS (Optek-Danulat GmbH, Essen, Alemanya) basades en aquests principis. Tot i que aquests instruments presenten una bona sensibilitat al llarg d'un rang ampli de densitats cel·lulars, són esterilitzables, simples i robustos, presenten problemes d'incrustacions en aplicacions a llarg termini i tenen interferències tant per l'estat fisiològic cel·lular com per bombolles d'aire.

Un altre tipus de tècniques òptiques no invasives serien les basades en l'espectroscòpia d'infraroig tant proper (NIR, en anglès) com mitjà (MIR). Aquestes tècniques es basen en l'absorbància de molts enllaços biològicament importants (C-H alifàtics, aromàtics o alquens, N-H i O-H) en aquest rang de longituds d'ona. Un avantatge d'aquesta tècnica és que es pot utilitzar per al seguiment de més d'una variable de cultiu (substrat, amoni, CO<sub>2</sub>, biomassa, subproductes). Com a desavantatge cal citar que les bandes d'absorció són molt similars, el que fa necessària l'aplicació de tècniques d'anàlisi de dades avançades per extreure'n la

informació més rellevant. Es poden aplicar també preprocessaments de les dades basats en transformades de Fourier per millorar els resultats. Aquests punts fan que els processos de calibratge necessitin temps i recursos. Els sensors NIR són fàcils d'implementar per fibra òptica i s'han aplicat a la determinació de la biomassa (Arnold *et al.* 2002) i al seguiment de substrats i subproductes (Blanco *et al.* 2004; Crowley *et al.* 2005; Schenk *et al.* 2007).

La utilització de la fluorescència, basada en la mesura de la llum emesa pel cultiu després de ser excitat a una o diferents longituds d'ona, és un altre exponent de mètodes basats en mesures òptiques. Primigèniament aquests tipus de sensors estaven basats en la mesura de la fluorescència a una sola longitud d'ona ( $\lambda$ ) d'emissió / excitació i, en concret, a l'associada als dinucleòtids d'adenina nicotinamida [NAD(P)H]. Es seguia l'evolució del senyal de fluorescència que es va correlacionar amb l'estat metabòlic durant cultius continus (Scheper *et al.* 1987) o amb l'evolució del substrat durant un cultiu discontinu (Kwong *et al.* 1993). Posteriorment, es va desenvolupar l'espectrofluorimetria a diferents longitud d'ona (espectrofluorimetria 2D) que va permetre recollir dades en un rang més ampli de  $\lambda$  d'excitació i emissió. Aquesta nova configuració dels equips permet fer el seguiment d'altres fluoròfors (triptòfan, vitamines, proteïnes fluorescents) que poden correlacionar-se amb altres variables del procés (biomassa, producte). El fet de ser una tècnica no invasiva, altament específica i sensible ha permès la seva aplicació en el seguiment de bioprocessos (Skibsted *et al.* 2001).

De manera similar a com passava amb les dades obtingudes per NIR/MIR, no totes les dades mesurades són rellevants per a l'aplicació que es desitja, de tal manera que cal aplicar tècniques d'anàlisi de dades multivariable per correlacionar els senyals de fluorescència mesurades amb les variables de procés, el que requereix temps i recursos. També és una mesura que es pot veure afectada per altres paràmetres del cultiu (l'agitació, la DOT o la temperatura) que cal controlar per aplicar aquesta tècnica en condicions òptimes.

No obstant això, combinant aquest desenvolupament dels sensors de fluorescència i els mètodes de tractament de dades s'ha aplicat aquesta tècnica al seguiment de moltes variables de cultiu: el contingut d'oxigen i CO<sub>2</sub> en els corrents de sortida (Skibsted *et al.* 2001), el creixement cel·lular i el substrat (Tartakovsky *et al.* 1996; Marose *et al.* 1998; Skibsted *et al.* 2001; Hagedorn *et al.* 2003; Hisiger & Jolicoeur 2005) o la formació de producte (Hagedorn *et al.* 2004).

La microscopia *in situ* és una altra aproximació al monitoratge de bioprocessos i, en concret, al seguiment de la biomassa (Joeris *et al.* 2002). Permet obtenir comptatges cel·lulars i imatges de la seva morfologia. La seva aplicació és cara i té una operació complicada però s'estan desenvolupant programes informàtics que permetin simplificar-la.

En d'altres línies de treball s'han aplicat mètodes basats en sensors convencionals que utilitzen una velocitat metabòlica determinada per estimar la concentració cel·lular. Entre els més importants es poden destacar els mètodes basats en la velocitat de consum de oxigen (OUR) o els basats en la mesura de la velocitat de producció de diòxid de carboni (CER) (Montesinos *et al.* 1995; Gordillo *et al.* 1998). Entre els principals avantatges d'aquest tipus d'estimadors hi ha la simplicitat de concepte que impliquen i que, *a priori*, són de fàcil implementació. Pel que fa als desavantatges que presenten hi hauria la limitada validesa, la dependència de les velocitats de consum i producció d'aquests compostos amb l'estat fisiològic del microorganisme i la necessitat d'un model que permeti correlacionar aquesta mesura indirecta amb la biomassa.

També s'estan aplicant mètodes avançats d'anàlisi multivariable (xarxes neuronals) que treballant amb diferents senyals mesurats permeten predir els nivells de biomassa (Jenzsch *et al.* 2006).

Així doncs, encara no hi ha un sensor ideal de biomassa *in situ* o en línia. Cada tipus de sensor en particular pot aportar diferent informació per cada aplicació concreta (Schügerl 2001).

#### **4.1.2 La fluorescència com a tècnica per al monitoratge dels cultius de *P. pastoris*.**

En aquest treball s'ha escollit estudiar l'aplicabilitat de la fluorescència com a tècnica per al seguiment de cultius de *P. pastoris*. En paral·lel al seguiment del metanol, la determinació de la biomassa i la producció de la proteïna d'interès són peces clau per a l'optimització d'aquest bioprocés. Aquest capítol es centrarà bàsicament a la determinació de la concentració de biomassa a partir de mesures fluorimètriques. En el següent capítol, s'ampliarà l'espectre de variables a seguir a partir d'aquet tipus de senyal.

En aquest capítol, s'avaluarà quins senyals de fluorescència poden mesurar-se a partir de mostres de cultiu de *P. pastoris*. Aquesta valoració es realitzarà amb mesures *off-line* a partir de mostres de cultius discontinus de *P. pastoris*.

S'ha referenciat que el senyal de fluorescència del triptòfan es pot utilitzar per seguir l'evolució de la biomassa en cultius d'un altre llevat, *S. cerevisiae* (Horvath *et al.* 1993). Aquest senyal té diferents avantatges respecte a la del NAD(P)H ja que no és tant dependent de l'estat metabòlic de les cèl·lules i és més estable amb el temps.

En aquest capítol s'estudiarà quins senyals es poden utilitzar per al monitoratge de la biomassa. Conjuntament amb la mesura de la fluorescència, es provaran alguns models per predir aquesta variable d'estat a partir de mesures fluorimètriques.

Adicionalment es valorarà quins paràmetres fisico-químics poden afectar negativament les mesures fluorimètriques. Entre els més destacats hi ha la presència de substàncies paramagnètiques, com l'oxigen; l'existència d'interferències físiques, causades tant per partícules sòlides com per les bombolles d'aire en el medi i la temperatura, que té un efecte inversament proporcional sobre la intensitat del senyal. Així doncs serà d'importància mantenir aquestes condicions el més constants possibles al llarg del cultiu o durant la realització de mesures.

## 4.2 Materials i mètodes

### 4.2.1 Medis, reactius i solucions utilitzades.

Les solucions dels estàndards dels fluoròfors cel·lulars es van preparar en tampó fosfat 0.2 M a pH=6 (Horvath *et al.* 1993). Les concentracions utilitzades de cada fluoròfor van ser: triptòfan,  $5 \cdot 10^{-6}$  M; piridoxina,  $10^{-5}$  M; NADH,  $5 \cdot 10^{-5}$  M i riboflavina,  $10^{-5}$  M.

Per a la dilució de les mostres dels cultius es va utilitzar tampó fosfat sòdic 50 mM a pH=5.5.

Per als cultius discontinus de glicerol es va emprar el sistema experimental descrit a l'apartat 2.6.1. de materials i mètodes generals amb el Biostat ED, així com el procés d'inoculació exposat a l'apartat 2.3. Per als cultius discontinus amb  $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de glicerol es va usar tant el medi Invitrogen (apartat 2.4.1.) com un medi que minimitza els precipitats observats al medi Invitrogen. Aquest medi conté: EDTA,  $0.08 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $25.68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $13.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.36 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $4.7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Glicerol,  $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; antiescumejant (Mazu DF 7960, Mazer Chemicals, PPG Industries Inc., IL, USA),  $10 \text{ mm}^3$ ; sals traça,  $4.3 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ; biotina, 5 ml i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , a pH=5.5.

Per al discontinu amb metanol es va usar el mateix sistema experimental i protocol d'inoculació i el següent medi de cultiu, que conté per litre: YNB sense aminoàcids ni sulfat d'amoni,  $2.4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; metanol,  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i biotina, 2 ml.

Pel control de pH als discontinus de glicerol i metanol es va utilitzar  $\text{NH}_4\text{OH}$  2M i  $\text{KOH}$  1M, respectivament.

#### 4.2.2 Equipament.

Les mesures *off-line* de fluorescència van ser adquirides amb l'espectrofotòmetre de taula Perkin Elmer LS55 (Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, UK), on la font d'excitació és una làmpada de xenó.

La configuració geomètrica de mesura és en angle recte. El feix de llum d'excitació incideix perpendicularment a la cubeta d'1 cm de mostra i la llum emesa surt creant un angle de  $45^\circ\text{C}$  respecte del feix incident. Aquest tipus de configuració fa que a elevades concentracions d'analit no s'observi un efecte de saturació del senyal òptic mesurat sinó de disminució, el que s'anomena efecte de filtre intern. Per aconseguir mesures fiables caldran doncs, baixes concentracions d'analit.

Durant les anàlisis, la temperatura de la cel·la de mostra es va controlar a  $20^\circ\text{C}$  mitjançant un bany termostatitzat.

Es va enregistrar el senyal fluorimètric de diverses maneres:

- Es van recollir els espectres d'emissió en un rang de 300 a 600 nm una vegada la mostra havia estat excitada a una longitud d'ona determinada.
- Es va mesurar la intensitat de fluorescència a una longitud d'ona d'excitació i emissió fixes.
- Espectres fluorimètrics 2D en un rang de longituds d'ona d'excitació de 250 a 500 nm amb increments de 10 nm, mentre que l'emissió es recollia en el rang de 300 a 600 nm cada 0.5 nm.

Les mesures de fluorescència es donen en unitats arbitràries (AFU).

Els espectres 2D de fluorescència recollits a diferents longituds d'ona d'excitació i emissió es van graficar utilitzant una subrutina en MATLAB 6.5 (MathWorks, Natick, MA, USA). Aquest programa també es va utilitzar per fer tots els càlculs necessaris. Les equacions diferencials ordinàries utilitzades (ODEs) es van resoldre amb la subrutina *ode45* d'aquets programa, que utilitza l'algorisme Runge-Kutta (4,5).



## 4.3 Resultats

### 4.3.1 Determinació de les longituds d'ona òptima pels diferents fluoròfors cel·lulars

Els primers estudis que es van fer d'aplicació de tècniques fluorimètriques en el monitoratge de processos de fermentació es basaven en el seguiment de la fluorescència del NADH i NADPH (Harrison & Chance 1970; Zabriskie & Humphrey 1978). Posteriorment van aparèixer diferents treballs on s'intentava correlacionar la mesura d'altres fluoròfors cel·lulars amb diferents variables de fermentació (Li & Humphrey A.E. 1991). Aquests compostos cel·lulars són el triptòfan, la piridoxina i la riboflavina.

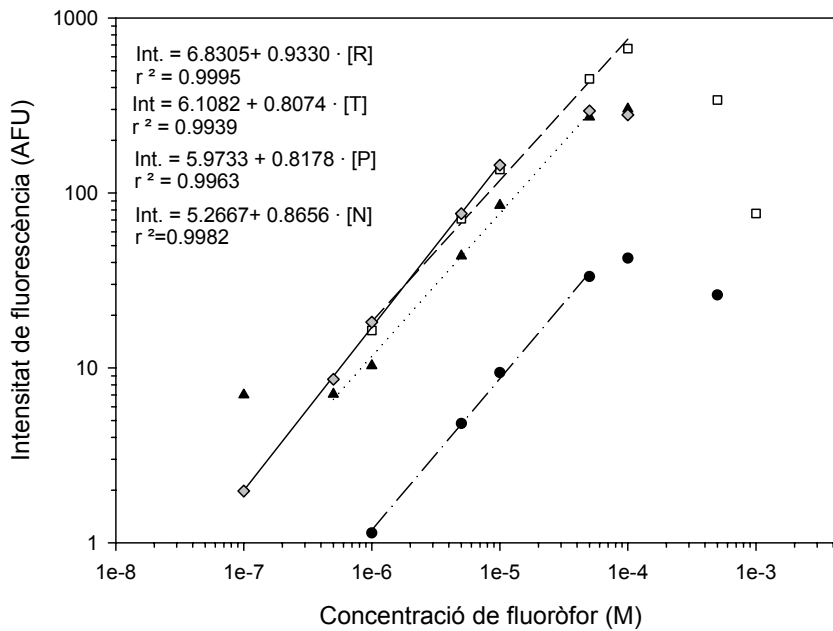
Es van realitzar mesures fluorimètriques amb solucions estàndard d'aquests fluoròfors principals per tal d'identificar quines eren les longituds d'ona d'excitació i d'emissió que maximitzaven el senyal mesurat. Aquesta determinació es va fer mesurant l'espectre d'emissió de cada estàndard després de ser excitat a diverses longituds d'ona d'excitació seguint recomanacions bibliogràfiques (Li *et al.* 1991; Horvath *et al.* 1993).

Les mesures es van realitzar a una temperatura de cel·la controlada de 20°C. En disminuir la temperatura el senyal obtingut és major, així que caldria treballar a temperatures baixes per augmentar la sensibilitat de l'anàlisi. La temperatura mínima recomanada per mesures en aquest equip és de 15°C però es va escollir treballar a 20°C perquè és més pròxima a la del cultiu i l'habitual de laboratori.

Es va observar la necessitat de fer una atenuació del senyal d'emissió per tal d'evitar obtenir espectres d'emissió saturats. Aquesta atenuació es feia mitjançant uns filtres instal·lats en el camí del feix de llum d'emissió que deixen passar únicament un cert percentatge de la llum emesa. Un filtre d'atenuació del senyal del 1%, implica que permet el pas d'un 1% de la senyal d'emissió que li arriba.

Un cop fixades aquestes condicions (atenuació amb el filtre de 1%) es van obtenir les següents longituds d'ona òptimes d'excitació per als quatre fluoròfors principals: triptòfan, 283 nm; piridoxina, 320 nm; NADH, 340 nm i riboflavina, 380 nm. El màxim del pic d'emissió es trobava entorn dels 360 nm pel triptòfan, 395 nm per la piridoxina, 460 nm pel NADH i 525 nm per la riboflavina.

Posteriorment es va realitzar un calibratge del senyal obtingut per cada un dels quatre fluoròfors i es van obtenir els següents resultats (Figura 4.1):



**Figura 4.1.** Calibratge dels quatre fluoròfors principals. (●) NADH, (▲) piridoxina, (□) triptòfan i (◊) riboflavina. Les mesures representades equivalen al màxim d'intensitat de l'espectre d'emissió de cada fluoròfor excitat a la seva longitud òptima. En les regressions presentades: (Int.), equival a la Intensitat de fluorescència (AFU); [R], concentració de riboflavina (M); [T], concentració de triptòfan (M); [P], concentració de piridoxina (M) i [N], concentració de NADH (M).

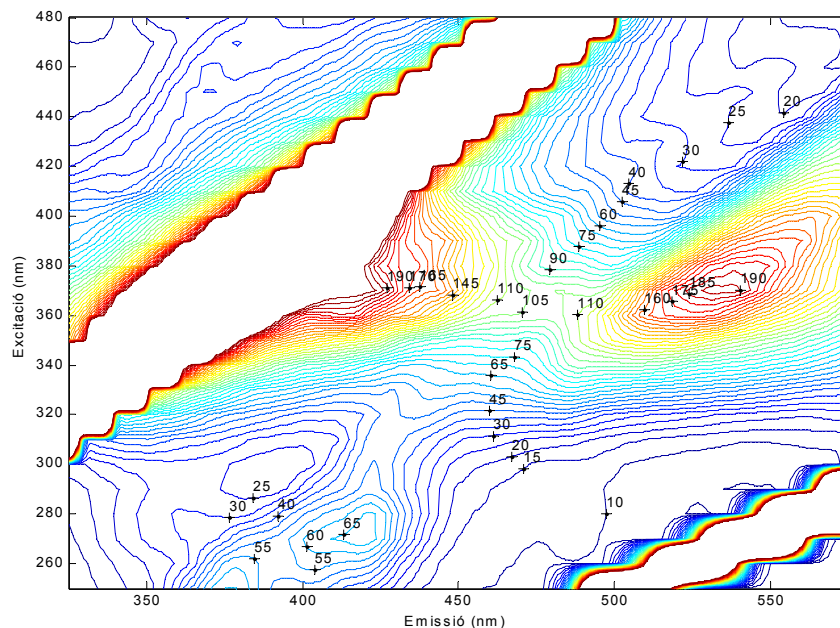
Com es pot observar a la Fig. 4.1., el senyal obtingut pel NADH és significativament menor que la que s'obté pels altres quatre components cel·lulars. Es pot veure també que a concentracions entorn de  $10^{-4}$  M de cada fluoròfor apareix l'anomenat efecte d'autoabsorció o de filtre intern. En aquest cas el senyal mesurat va disminuint a mesura que augmenta la concentració de l'espècie. S'observa aquest efecte ja que la configuració geomètrica de la cel·la de mesura és en angle recte, sinó s'observaria una saturació del senyal en assolir concentracions elevades del fluoròfor.

Segons la bibliografia (Li & Humphrey A.E. 1991),  $10^{-4}$  M és una concentració de fluoròfor superior a la de fermentació, però en els cultius descrits bibliogràficament no es sobrepassaven els  $3\text{-}4\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa (Li *et al.* 1991; Li & Humphrey A.E. 1991; Horvath *et al.* 1993; Tartakovsky *et al.* 1996). En l'estratègia de cultiu estàndard aplicada per a *P. pastoris* s'assoleixen  $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa un cop finalitzada la primera fase en discontinu de glicerol amb el que es poden sobrepassar concentracions de fluoròfors de  $10^{-4}$  M.

Caldrà avaluar, doncs, quins fluoròfors poden mesurar-se en mostres de cultiu de *P. pastoris* i quin és el comportament del seu senyal al llarg del cultiu.

#### 4.3.2 Estudis de fluorescència en mostres de fermentació.

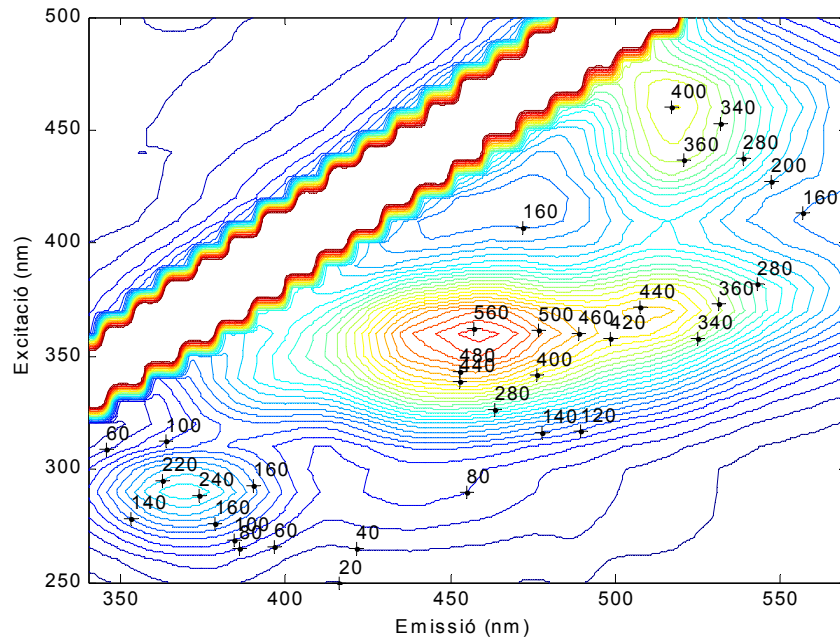
Un cop constatades les diferències amb les biomasses finals dels cultius de la bibliografia i del procés d'interès, es va analitzar el senyal obtingut en mostres de fermentació ja que no es disposava de referències bibliogràfiques del senyal de fluoròfors en cultius de *P. pastoris*. Es van registrar espectres 2D de fluorescència de mostres del medi de fermentació amb i sense biomassa. En les mostres sense biomassa es va corroborar que la fluorescència emesa pel medi amb biotina era negligible però que aquesta augmentava en afegir-hi les sals traça (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Espectre 2D del medi de cultiu Invitrogen amb la biotina i les sals traça.

Tal i com es pot observar en la Figura 4.2, les sals traça presenten dos pics de senyal en la zona dels 365 nm d'excitació i 425 nm i 530 nm d'emissió, que no coincideixen exactament amb les longituds d'ona òptimes de cap del quatre fluoròfors però estan pròxims als del NADH.

Un cop analitzada la matriu de les mostres de fermentació es va analitzar una mostra del bioreactor amb presència de biomassa i es va obtenir el següent espectre:



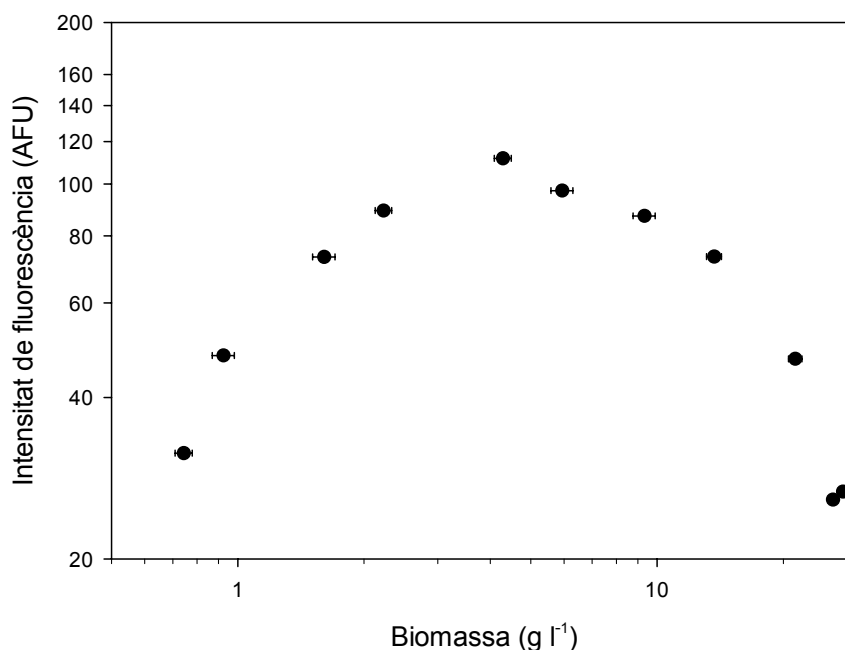
**Figura 4.3.** Espectre 2D d'una mostra de cultiu de *P. pastoris* presa durant la fase de discontinu alimentat amb metanol. Les dades damunt l'espectre representen la intensitat de fluorescència (AFU).

A les mostres de cultiu (Figura 4.3) s'observa la fluorescència del triptòfan i la del NADH a  $\lambda$  d'excitació de 290 i 365 nm respectivament. També s'observa un pic a 450 nm d'excitació que no correspondria a cap dels quatre fluoròfors. Està descrit (Marose *et al.* 1998; Skibsted *et al.* 2001) que tant la piridoxina com la riboflavina tenen un segon pic de fluorescència a 380-410 nm i 440-460 nm respectivament. Així doncs, el pic a 450 nm provinent de la mostra de cultiu correspondria al senyal de la riboflavina. La piridoxina és l'únic dels quatre principals fluoròfors que no seria mesurable en mostres de cultiu.

El triptòfan i el NADH serien les espècies més significatives de ser analitzades: el primer es podia utilitzar per mesurar la biomassa ja que és el principal fluoròfor en llevats (Konev S.V. 1967) i el NADH pel seu paper en l'estat REDOX de la cèl·lula i la seva relació amb l'estat metabòlic. Aquest últim metabolit presenta un problema addicional degut a la seva baixa estabilitat amb el temps. Per aquest motiu es va escollir el triptòfan com a fluoròfor pels estudis de monitoratge de la biomassa al llarg d'un cultiu: no és tant sensible amb el temps i permet fer una anàlisi discontinu sense necessitat de fixar les cèl·lules.

### 4.3.3 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del triptòfan.

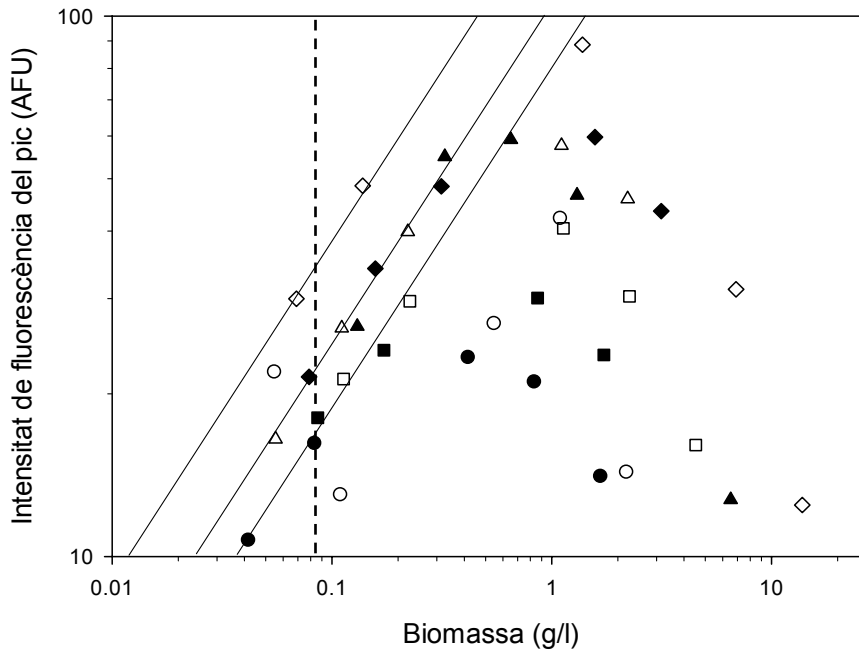
Es va realitzar un cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol i es va mesurar l'evolució del senyal de triptòfan amb el temps (Figura 4.4) sense cap dilució ni tractament de la mostra. El senyal correspon al valor del màxim del pic d'emissió quan la mostra és excitada a la  $\lambda$  de 290nm (Figura 4.3). Es va utilitzar un filtre d'atenuació del senyal del 15%.



**Figura 4.4.** Evolució del senyal del triptòfan en mostres sense diluir d'un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol.

Es pot observar que a una biomassa entorn dels  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  l'efecte de filtre intern esdevé considerable i es perd la linealitat en l'anàlisi. Aquest nivell de biomassa és massa baix per poder utilitzar les mesures directes de la fluorescència del triptòfan en cultius discontinus de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol que resulten en valors finals de biomassa de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Així doncs, cal fer una dilució de la mostra per poder utilitzar el senyal d'aquest aminoàcid com a mesura indirecta de la biomassa.

Es va realitzar un segon cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Cada mostra del cultiu es va diluir fins a observar que el senyal de triptòfan mesurat disminuïa en augmentar la dilució (Figura 4.5.). En aquest cas es va aplicar un filtre d'atenuació del 1% del senyal d'emissió.

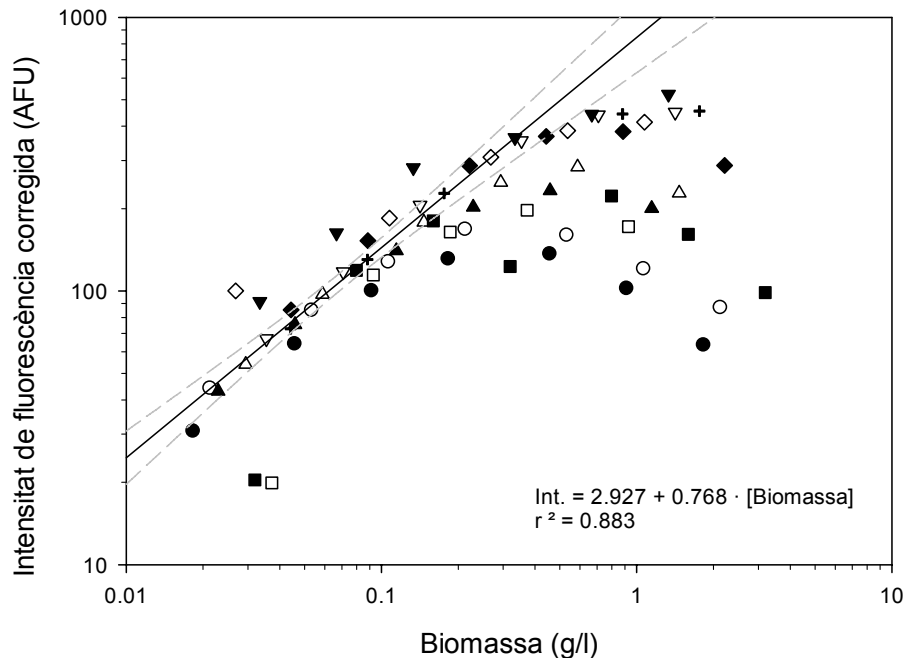


**Figura 4.5.** Correlació entre el senyal de fluorescència del triptòfan i la concentració de biomassa per a un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Els símbols es refereixen a les mostres de cultiu amb diferents factors de dilució. Les mostres inicials corresponen als següent temps de cultiu i nivells de biomassa: (●)  $t = 11.3\text{h}$ ,  $X = 1.66\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (○)  $t = 15.09\text{h}$ ,  $X = 2.18\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (■)  $t = 18.35\text{h}$ ,  $X = 3.45\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (□)  $t = 21.29\text{h}$ ,  $X = 4.52\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▲)  $t = 23.89\text{h}$ ,  $X = 6.52\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (△)  $t = 28\text{h}$ ,  $X = 11.08\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◆)  $t = 30\text{h}$ ,  $X = 15.75\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◇)  $t = 36.47\text{h}$ ,  $X = 27.6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Es pot observar (línies contínues a la Figura 4.5) que les mostres diluïdes s'agrupen entorn de tres rectes paral·leles. S'observa també que dilucions de diferents mostres de cultiu que resulten en la mateixa biomassa final (línia vertical discontinua a la Figura 4.5.) presenten senyals de fluorescència diferent.

Les interferències al senyal de fluorescència poden originar-se tant d'espècies químiques presents al medi com de partícules sòlides. Les partícules sòlides actuen com a agents dispersants de la llum d'excitació i emissió, el que resulta en una disminució del senyal de fluorescència mesurada. Els punts damunt la vertical discontinua corresponen a una dilució 1/20 de la mostra a les 11.3h de cultiu, a una dilució 1/20 de la mostra a les 18.35h de cultiu, a una dilució 1/200 de la mostra a les 30h i a una dilució 1/400 de la mostra a les 36.47h. Així doncs, com més gran és la dilució, més diluïdes resten les partícules en suspensió interferents i, per a una mateixa biomassa final, mesurem un major senyal.

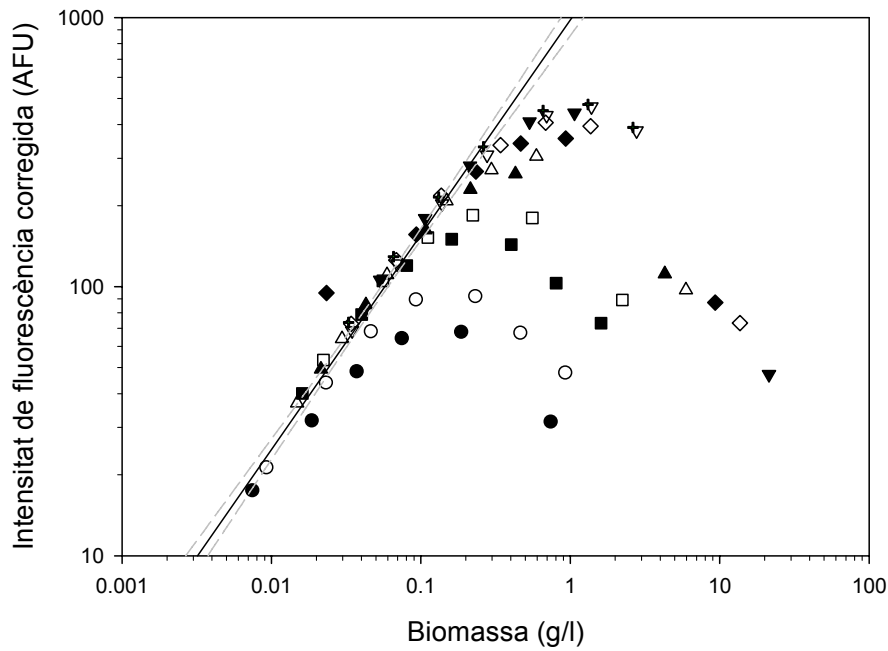
D'acord als resultats obtinguts, es va realitzar un tercer cultiu en el qual les mostres es van diluir totes aplicant els mateixos factors de dilució enlloc de diluir-les a igual nivell de densitat cel·lular després de la dilució. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4.6:



**Figura 4.6.** Correlació entre el senyal de fluorescència del triptòfan i la concentració de biomassa per a un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Els símbols es refereixen a les mostres de cultiu a les quals se'ls ha aplicat el mateix banc de factors de dilució. Les mostres inicials corresponen als següent temps de cultiu i nivells de biomassa: (●)  $t=0\text{h}$ ,  $X=1.82\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (○)  $t=2\text{h}$ ,  $X=2.12\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (■)  $t=4\text{h}$ ,  $X=3.19\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (□)  $t=6\text{h}$ ,  $X=3.72\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▲)  $t=8\text{h}$ ,  $X=4.58\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (Δ)  $t=10\text{h}$ ,  $X=5.87\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◆)  $t=12\text{h}$ ,  $X=8.85\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◇)  $t=14\text{h}$ ,  $X=10.74\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▼)  $t=16\text{h}$ ,  $X=13.34\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▽)  $t=18\text{h}$ ,  $X=14.16\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (+)  $t=20\text{h}$ ,  $X=17.62\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

S'observa que les dilucions en el tram lineal de cada mostra ja no s'ordenen en diverses línies paral·leles sinó que els punts es distribueixen entorn d'una sola recta. Per a la regressió lineal s'han utilitzat únicament les dilucions en el tram lineal de cada mostra. Així doncs, la dispersió dels punts entorn de la recta ve donada per una evolució dels sòlids en suspensió al llarg del cultiu.

Per aquest motiu es va dur a terme un quart cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol en el qual es va utilitzar un medi amb un menor contingut en sòlids en suspensió (descriu a l'apartat 4.1) on es va aplicar el mateix banc de dilucions a totes les mostres del cultiu. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4.7.



**Figura 4.7.** Correlació entre el senyal de fluorescència del triptòfan i la concentració de biomassa per a un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol amb un medi amb baix contingut de sals en suspensió. Els símbols es refereixen a les mostres de cultiu a les quals se'ls ha aplicat el mateix banc de factors de dilució. Les mostres inicials corresponen als següent temps de cultiu i nivells de biomassa: (●)  $t=0\text{h}$ ,  $X=0.74\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (○)  $t=1.5\text{h}$ ,  $X=0.925\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (■)  $t=4.5\text{h}$ ,  $X=1.61\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (□)  $t=6\text{h}$ ,  $X=2.23\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▲)  $t=8\text{h}$ ,  $X=4.29\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (△)  $t=10\text{h}$ ,  $X=5.94\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◆)  $t=12\text{h}$ ,  $X=9.33\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (◇)  $t=14\text{h}$ ,  $X=13.68\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▼)  $t=15\text{h}$ ,  $X=21.36\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (▽)  $t=15.9\text{h}$ ,  $X=27.76\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (+)  $t=17\text{h}$ ,  $X=26.28\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Es pot veure que el senyal de fluorescència de les dilucions en el tram lineal de cada mostra tendeix a agrupar-se entorn d'una única recta. De nou, quan no s'aplica prou dilució de la mostra apareix l'efecte de filtre intern.

La dispersió de les dilucions en el tram lineal és baixa i, com que el contingut de partícules sòlides en un discontinu variarà sempre al llarg del procés, es pot assegurar que aquest dispersió no podrà ser mai eliminada del tot.

#### 4.3.4 Estimació de la biomassa a partir de mesures fluorimètriques *off-line* en cultius discontinus de $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de glicerol i $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de metanol .

Una vegada establert el procés de mesura i reduït el soroll de l'anàlisi, les dades de fluorescència es van utilitzar per predir la biomassa al llarg d'un cultiu



discontínu. Es van utilitzar i comparar tres tipus de models. Per cada model, s'utilitzen dos dels cultius per al calibratge i un per a la validació.

En primer lloc, es va utilitzar un model lineal on es correlaciona la intensitat de fluorescència del màxim del triptòfan ( $F$  [AFU]) i la biomassa ( $X$  [ $g \cdot l^{-1}$ ]) segons l'Equació 4.1:

$$F = a \cdot X + b \quad [\text{AFU}] \quad (\text{Eq. 4.1.})$$

Els altres dos mètodes estan basats en l'aplicació de l'equació de Luedeking-Piret a les mesures de fluorescència. Aquesta equació relaciona linealment la velocitat específica d'evolució d'un producte ( $v_p$ ) amb la velocitat específica de creixement ( $\mu$ ). Des d'un punt de vista biològic, les cèl·lules que creixen a diferent  $\mu$  poden presentar diferències morfològiques que podrien produir diferents patrons de fluorescència cel·lular degut a diferents nivells de triptòfan intracel·lular. Es defineix la velocitat d'evolució de fluorescència (FER) en un cultiu discontínu com (Equació 4.2):

$$\frac{d(F \cdot V)}{dt} = \text{FER} \cdot V \quad [\text{AFU} \cdot l \cdot h^{-1}] \quad (\text{Eq. 4.2.})$$

On  $F$  representa la intensitat de fluorescència (AFU) i  $V$  és el volum de treball ( $l$ ). Es considera el volum del cultiu constant durant un discontínu i així obtenim que FER respon a (Equació 4.3.):

$$\text{FER} = \frac{d(F)}{dt} \quad [\text{AFU} \cdot h^{-1}] \quad (\text{Eq. 4.3.})$$

A partir d'aquí i aplicant balanços de matèria podem formular el model com es mostra a l'Equació 4.4., on  $Y_{F/X}$  representa la inversa del rendiment biomassa-fluorescència ( $\text{AFU} \cdot gX^{-1} \cdot l$ ) i  $m_{F/X}$  ( $\text{AFU} \cdot gX^{-1} \cdot l \cdot h^{-1}$ ) és el coeficient de manteniment fluorescència-biomassa.

$$\text{FER} = (Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X})X = Y_{F/X} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{F/X} \cdot X \quad [\text{AFU} \cdot h^{-1}] \quad (\text{Eq. 4.4.})$$

Tant el manteniment com el coeficient de manteniment poden ser calculats integrant l'Eq. 4.4. al llarg del temps segons l'Equació 4.5.:

$$\frac{\int_0^t \text{FER}(t) dt}{\int_0^t X(t) dt} = Y_{F/X} \cdot \frac{\int_{X_0}^X dX}{\int_0^t X(t) dt} + m_{F/X} \quad [\text{AFU} \cdot g^{-1} X \cdot l \cdot h^{-1}] \quad (\text{Eq. 4.5.})$$

Per poder estimar els valors de biomassa l'Eq. 4.4. es reordena i es soluciona o analíticament o numèrica utilitzant un algorisme de resolució d'ODEs, tal i com s'ha descrit a la secció 4.2.2. d'aquest capítol.

Finalment el tercer model deriva de l'Equació 4.4. si no es considera cap terme de manteniment i es planteja segons l'Equació 4.6.:

$$\text{FER} = (Y_{F/X} \cdot \mu)X = Y_{F/X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [\text{AFU} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (\text{Eq. 4.6.})$$

En aquest cas el rendiment s'obté de la integració de l'Eq. 4.6. en el temps, segons l'Equació 4.7.:

$$\int_0^t \text{FER} \cdot dt = Y_{F/X} \cdot \int_{X_0}^X dX \quad [\text{AFU}] \quad (\text{Eq. 4.7.})$$

De nou, per estimar la biomassa d'un discontinu s'integra l'Eq. 4.6. mitjançant un mètode de solució d'equacions diferencials.

A la Taula 4.1. hi ha resumits els paràmetres obtinguts dels models amb els cultius de calibració. Els errors de predicció de la biomassa es calculen segons l'Equació 4.8., que representa el valor mitjà de l'error relatiu absolut (MARE):

$$\text{MARE} = \frac{\sum \frac{|X_{i,\text{mesurada}} - X_{i,\text{predita}}|}{X_{i,\text{mesurada}}}}{N} \quad (\text{Eq. 4.8.})$$

On  $X_{i,\text{mesurada}}$  i  $X_{i,\text{predita}}$  representen els valors de densitat cel·lular mesurada i predita ( $\text{gX} \cdot \text{l}^{-1}$ ) de la mostra  $i$  i  $N$  representa el nombre de mostres.

**Taula 4.1.** Paràmetres estimats pels model d'estimació de biomassa de cultius discontinus de *P. pastoris* amb  $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de glicerol com a substrat.

Model de mesura	1er Paràmetre (a, $Y_{F/X}$ )	2on Paràmetre (b, $m_{F/X}$ )	Coefficient de regressió
$F = a \cdot X + b$	$1876 \pm 111 \text{ (AFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{X} \cdot \text{l)}$	$-424 \pm 1342 \text{ (AFU)}$	0.984
$\text{FER} = (Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X}) \cdot X$	$1848 \pm 342 \text{ (AFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{X} \cdot \text{l)}$	$14 \pm 63 \text{ (AFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{X} \cdot \text{l} \cdot \text{h}^{-1})$	0.913
$\text{FER} = Y_{F/X} \cdot \mu \cdot X$	$1892 \pm 74 \text{ (AFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{X} \cdot \text{l)}$	-	0.985

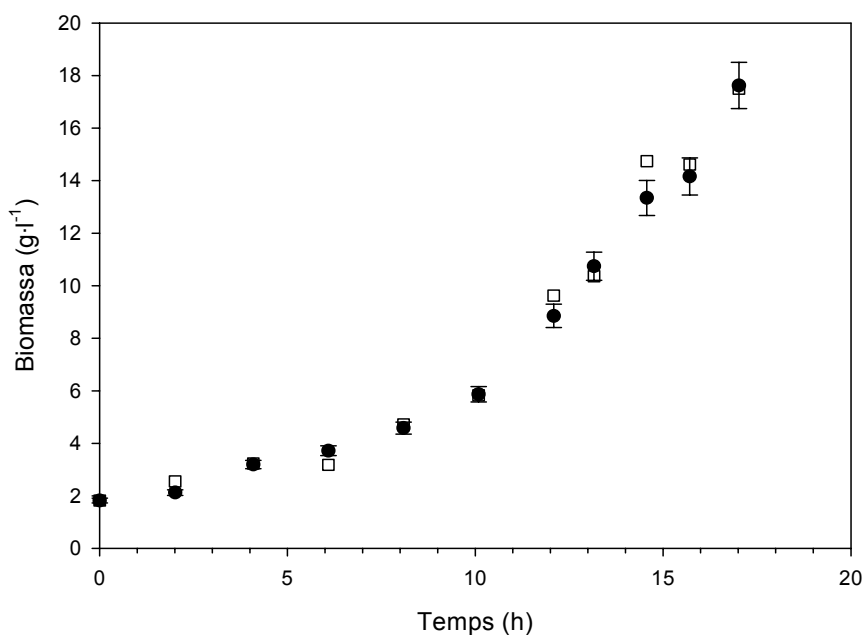
Tal i com es pot observar a la Taula 4.2., els dos models basats en la velocitat de generació de fluorescència tenen un poder predictiu similar, malgrat que el model

que inclou el terme de manteniment dóna errors de predicció lleugerament millors. Durant un cultiu discontinu la velocitat específica de creixement es manté constant i propera al seu valor màxim la major part del procés. Per això la correlació lineal entre el senyal de fluorescència i la biomassa descrita a l'Eq. 4.1. dóna bons resultats de predicció. Però si es considera una operació en mode discontinu alimentat, on la  $\mu$  pot variar amb el temps, els models que inclouen una dependència amb la velocitat específica de creixement (Eq. 4.4. i Eq. 4.6.) serien més correctes. I d'entre ells el que inclou un terme de manteniment proporciona resultats lleugerament millors (Taula 4.2.).

**Taula 4.2.** Valor mitjà de l'error de predicció relatiu absolut (MARE) per als tres models proposats utilitzant un cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol de validació.

Model de mesura	MARE
$F = a \cdot X + b$	0.12
$\text{FER} = (Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X}) \cdot X$	0.06
$\text{FER} = Y_{F/X} \cdot \mu \cdot X$	0.07

La biomassa estimada utilitzant el model descrit en l'Eq. 4.4. per al cultiu de validació és la que es mostra en la Figura 4.8. Com es pot observar els valors de biomassa predits estan en concordança amb els valors mesurats.



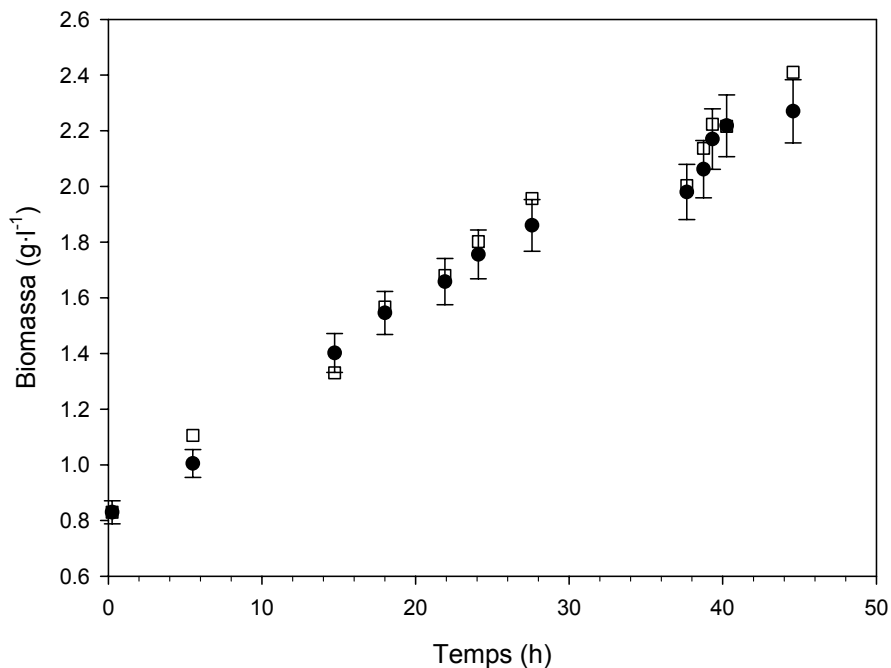
**Figura 4.8.** Predicció de biomassa per al cultiu de validació de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol considerant el model de mesura:  $\text{FER} = (Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X}) \cdot X$ . (●) Biomassa mesurada ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ); (□) Biomassa estimada ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Finalment, i tenint en compte que el metanol és el substrat inductor en els cultius discontinus alimentats, s'ha aplicat la mateixa metodologia de mesura de fluorescència i estimació de biomassa (Eq. 4.4.) a cultius discontinus de 10 g·l<sup>-1</sup> de metanol com a única font de carboni. A la taula 4.3. podem veure que malgrat que el terme de manteniment és similar als valors obtinguts en els cultius de glicerol, el rendiment  $Y_{F/X}$  assoleix un valor de pràcticament el doble. Els valors de biomassa mesurada i predita es mostren a la Figura 4.9.. Es pot observar que hi ha una bona concordança entre ells, com demostra també el valor obtingut del MARE de 0.05.

**Taula 4.3.** Paràmetres estimats pels model d'estimació de biomassa de cultius discontinus de *P. pastoris* amb 10 g·l<sup>-1</sup> de metanol com a substrat.

Model de mesura	1er Paràmetre (a, $Y_{F/X}$ )	2on Paràmetre (b, $m_{F/X}$ )	Coefficient de regressió
FER= ( $Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X}$ ) · X	2241 ± 583 (AFU·g <sup>-1</sup> X·l)	8 ± 16 (AFU·g <sup>-1</sup> X·l·h <sup>-1</sup> )	0.908

Es van utilitzar els valors estimats de biomassa per intentar predir la  $\mu$  del cultiu però degut al reduït nombre de mostres els resultats obtinguts no van ser satisfactoris (dades no mostrades). Aquest fet indica que per assolir una bona predicció de la velocitat específica de creixement faria falta una velocitat de mostreig superior.

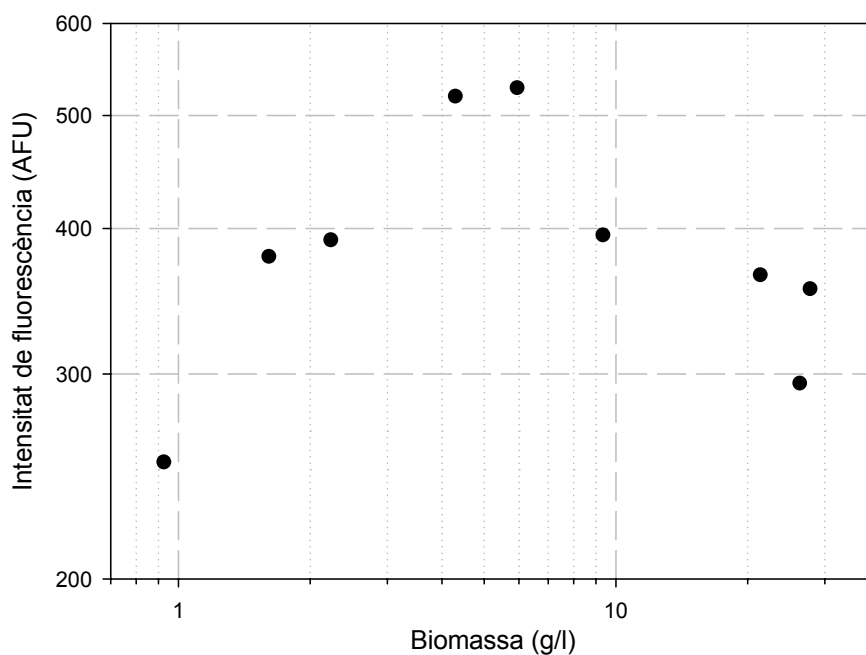


**Figura 4.9.** Predicció de biomassa per al cultiu de validació de 10 g·l<sup>-1</sup> de metanol considerant el model de mesura: FER= ( $Y_{F/X} \cdot \mu + m_{F/X}$ ) · X. (●) Biomassa mesurada (g·l<sup>-1</sup>); (□) Biomassa estimada (g·l<sup>-1</sup>).

#### 4.3.5 Monitoratge de cultius en discontinu: mesura de la intensitat de fluorescència del NADH.

Es va aplicar la metodologia d'anàlisi descrita a l'apartat 4.3.3 per mesurar la fluorescència del NADH present en mostres de cultius discontinus. Aquest metabolit és especialment important degut al seu paper en l'estat metabòlic de la cèl·lula i la seva potencial aplicació al seguiment del substrat al medi de cultiu.

Es va realitzar un cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol i es mesurar l'evolució del senyal del NADH al llarg del procés (Figura 4.10.) sense aplicar cap dilució ni tractament de la mostra. El senyal correspon al valor del màxim del pic d'emissió quan la mostra és excitada a la  $\lambda$  de 365nm (Figura 4.3). En aquest cas no es va aplicar cap tipus d'atenuació perquè el NADH dona una intensitat menor que el triptòfan (Figura 4.1.).



**Figura 4.10.** Evolució del senyal del NADH en mostres sense diluir d'un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol.

A la figura 4.10 es pot observar com de nou apareix l'efecte de filtre intern a valors de densitat cel·lular entorn dels  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Aquest efecte fa necessària la dilució de les mostres, anàlogament al tractament descrit pel triptòfan. El NADH presenta un inconvenient afegit degut a la inestabilitat de l'espècie i la seva baixa estabilitat amb el temps.

Per tal de poder diluir la mostra amb garanties de conservar la quantitat inicial de NADH cel·lular, es van aplicar diferents tractaments de fixació del metabolisme

cel·lular immediatament després de la presa de mostra (de Konig & van Dam 1992; Nissen *et al.* 2001). En ells, un cop extreta la mostra es fixava el metabolisme cel·lular utilitzant metanol al 60% i a  $-40^{\circ}\text{C}$  i transcorreguts 5 min a aquesta temperatura es centrifugava el pèl·let per mesurar-lo posteriorment redissolt amb tampó PBS.

Els resultats que es van obtenir aplicant aquest protocol de fixació del metabolisme no van ser satisfactoris. Es perdia el senyal del NADH al llarg del tractament i no s'aconseguia una quantitat estable que permetés una posterior anàlisi quantitativa. Per aquest motiu es va descartar aquesta metodologia per al seguiment del NADH cel·lular al llarg dels cultius de *P. pastoris*.

## 4.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha aplicat la fluorimetria com a tècnica de monitoratge de cultius de *P. pastoris* i s'han obtingut els següents resultats:

- S'ha validat la intensitat de fluorescència del triptòfan com a mesura indirecta per al monitoratge de l'evolució de la biomassa al llarg de cultius discontinus de *P. pastoris*, tant amb substrat inductor com no inductor.
- Durant el seguiment de cultius discontinus s'ha observat l'aparició de l'efecte de filtre intern a densitats cel·lulars entorn els  $3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , valors massa baixos per utilitzar la fluorescència de mostres directes del cultiu.
- S'ha desenvolupat un protocol de dilució de les mostres que permet mesurar acuradament el senyal del triptòfan i minimitzar els efectes de dispersió que causen els sòlids en suspensió al senyal obtingut. Aquest protocol es podria aplicar en mesures fluorimètriques off-line de mostres de cultiu d'altres microorganismes.
- Les mesures obtingudes han permès utilitzar la intensitat de fluorescència del triptòfan per estimar l'evolució de la biomassa al llarg de cultius discontinus tant induïts com no induïts. Per fer-ho s'ha validat un model on la velocitat específica d'evolució de la fluorescència depèn de la velocitat específica de creixement.
- Finalment s'ha implementat la mateixa metodologia per al seguiment del NADH on s'ha observat també l'aparició de l'efecte de filtre intern i la necessitat de dilució de la mostra. S'ha aplicat un protocol de fixació

cel·lular per aconseguir un seguiment quantitatiu del senyal del NADH sense resultats satisfactoris.

#### 4.5 Referències bibliogràfiques

Arnold,S.A., Gaensakoo,R., Harvey,L.M. & McNeil,B. 2002. Use of at-line and *in-situ* near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *Escherichia coli* process. *Biotechnology and Bioengineering.*, 80, 405-413.

Blanco,M., Peinado,A.C. & Mas,J. 2004. Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 536-542.

Crowley,J., Arnold,S.A., Wood,N., Harvey,L.M. & McNeil,B. 2005. Monitoring a high cell density recombinant *Pichia pastoris* fed-batch bioprocess using transmission and reflectance near infrared spectroscopy. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 621-628.

De Konig .W. & van Dam K. 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204, 118-123.

Fehrenbach,R., Comberbach,M. & PWtre,J.O. 1992. On-line biomass monitoring by capacitance measurement. *Journal of Biotechnology*, 23, 303-314.

Gordillo,M.A., Sanz,A., Sanchez,A., Valero,F., Montesinos,J.L., Lafuente,J. & Sola,C. 1998. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotechnology and Bioengineering* 60, 156-168.

Hagedorn,A., Legge,R.L. & Budman,H. 2003. Evaluation of spectrofluorometry as a tool for estimation in fed-batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 104-111.

Hagedorn,A., Levadoux,W., Groleau,D. & Tartakovsky,B. 2004. Evaluation of multiwavelength culture fluorescence for monitoring the aroma compound 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) production. *Biotechnology Progress*, 20, 361-367.

Harrison,D.E. & Chance,B. 1970. Fluorimetric technique for monitoring changes in the level of reduced nicotinamide nucleotides in continuous cultures of microorganisms. *Applied Microbiology*, 19, 446-450.

Hisiger,S. & Jolicoeur,M. 2005. A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of Biotechnology*, 117, 325-336.

Horvath,J.J., Glazier,S.A. & Spangler,C.J. 1993. *In situ* fluorescence cell mass measurements of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular tryptophan. *Biotechnology Progress*, 9, 666-670.

Jenzsch,M., Simutis,R., Eisbrenner,G.+, Stückrath,I. & Lübbert,A. 2006. Estimation of biomass concentrations in fermentation processes for recombinant protein production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29, 19-27.

- Joeris,K., Frerichs,J.G., Konstantinov,K. & Scheper,T. 2002. *In-situ* microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Cytotechnology*, 38, 129-134.
- Konev S.V. 1967. Fluorescence and Phosphorescence of proteins and nucleic acids. Plenum Press. New York.
- Kwong,S.C., Randers,L. & Rao,G. 1993. On-Line detection of substrate exhaustion by using NAD(P)H fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 604-606.
- Li,J.K., Asali,E.C., Humphrey,A.E. & Horvath,J.J. 1991. Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry. *Biotechnology Progress*, 7, 21-27.
- Li,J.K. & Humphrey A.E. 1991. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 37[11], 1043-1049.
- Marose,S., Lindemann,C. & Scheper,T. 1998. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnology Progress*, 14, 63-74.
- Montesinos,J.L., Lafuente,J., Gordillo,M.A., Valero,F., Sola,C., Charbonnier,S. & Cheruy,A. 1995. Structured modeling and state estimation in a fermentation process: Lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 573-584.
- Neves,A.A., Pereira,D.A., Vieira,L.M. & Menezes,J.C. 2001. Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *Journal of Biotechnology*, 84, 45-52.
- Nissen,T.L., Anderlund,M., Nielsen,J., Villadsen,J. & Kielland-Brandt,M.C. 2001. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast*, 18, 19-32.
- November,E.J. & Van Impe,J.F. 2000. Evaluation of on-line viable biomass measurements during fermentations of *Candida utilis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 23, 473-477.
- Schenk,J., Marison,I.W. & von,S.U. 2007. A simple method to monitor and control methanol feeding of *Pichia pastoris* fermentations using mid-IR spectroscopy. *Journal of Biotechnology*, 128, 344-353.
- Scheper,T., Lorenz,T., Schmidt,W. & Schugerl,K. 1987. On-line measurement of culture fluorescence for process monitoring and control of biotechnological processes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506, 431-445.
- Schügerl,K. 2001. Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. *Journal of Biotechnology*, 85, 149-173.
- Skibsted,E., Lindemann,C., Roca,C. & Olsson,L. 2001. On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration. *Journal of Biotechnology*, 88, 47-57.
- Tartakovsky,B., Sheintuch,M., Hilmer,J.M. & Scheper,T. 1996. Application of scanning fluorometry for monitoring of a fermentation process. *Biotechnology Progress*, 12, 126-131.



Zabriskie, D.W. & Humphrey, A.E. 1978. Estimation of fermentation biomass concentration by measuring culture fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 337-343.



# 5

Aplicació de la fluorimetria *in situ* en el monitoratge de cultius discontinus de *P. pastoris*

5.1 Introducció .....	97
5.2 Materials i mètodes.....	102
5.2.1 Medis i condicions de cultiu .....	102
5.2.2 Anàlisi del glicerol i del metanol.....	103
5.2.3 Mesures de fluorescència del cultiu.....	103
5.2.4 Mètodes quimiomètrics .....	105
5.3 Resultats .....	107
5.3.1 Cultius no induïts .....	107
5.3.2 Cultius induïts .....	111
5.3.3 Aplicació del <i>Parallel Factor Analysis</i> (PARAFAC) combinat amb regressions PLS per al monitoratge de cultius no induïts de <i>P. pastoris</i> mitjançant fluorimetria <i>in situ</i> .....	115
5.4 Conclusions .....	120
5.5 Referències bibliogràfiques .....	122

## 5.1 Introducció

Una mesura en discontinu de les variables del procés permet obtenir dades més precises però presenta l'inconvenient del temps de retard en l'obtenció de la informació. Per a un millor coneixement del procés durant el seu transcurs, l'estratègia de la monitoratge en temps real és més encertada ja que dóna informació en directe de les variables mesurades i permet tant detectar possibles desviacions de la trajectòria del procés com emprendre accions per corregir-les.

En el capítol anterior s'ha comprovat com la fluorescència és una tècnica apta per al seguiment de la biomassa d'un cultiu de *P. pastoris* tant en condicions no induïdes com durant la producció de ROL. S'han evidenciat algunes limitacions degudes principalment a la realització de mesures *off-line* com serien la necessitat d'extracció i processat de la mostra i la mesura de fluoròfors amb un curt temps de vida mitja. Per aquest motiu es va decidir estudiar l'aplicació d'una sonda de fluorescència *in situ* que permeti el seguiment del senyal de tots els fluoròfors.

El desenvolupament de les sondes de fluorescència *in situ* permet superar algun dels inconvenients de les mesures *off line* i obtenir informació d'altres fluoròfors amb importància biogènica, com el NAD(P)H i la riboflavina. L'obtenció de més informació sobre l'estat del cultiu pot permetre estimar de manera més òptima altres variables del cultiu, com ara el substrat i el producte recombinant, en el nostre cas, la lipasa.

No obstant això, la possibilitat de recollir més informació del cultiu no implica que tota sigui rellevant des del punt de vista de monitoratge del cultiu. La utilització d'aquesta tècnica no invasiva produeix dades amb una estructura tridimensional, ja que per a cada mostra es recullen espectre d'emissió del cultiu a diferents longituds d'ona d'excitació. Aquesta operació es repeteix tantes vegades com mesures es realitzin al llarg de tot el temps de cultiu.

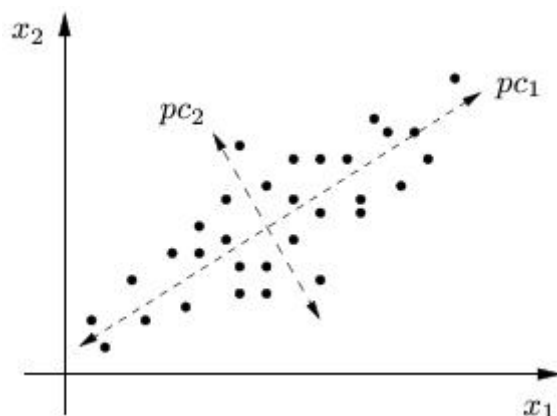
Per tal de processar aquestes dades i correlacionar-les amb les variables de procés s'utilitzen mètodes quimiomètrics (Boehl *et al.* 2003). Una de les tècniques més usuals és el mètode dels mínims quadrats parcials (PLS) (Hagedorn *et al.* 2003), tot i que també s'han utilitzat regressions en components principals (Solle *et al.* 2003) i xarxes neuronals (Wolf *et al.* 2001).

El PLS va néixer com una alternativa a la metodologia d'anàlisi per components principals (PCA en sigles angleses) que intenta concentrar el màxim poder predictiu en els primers components principals.

L'anàlisi PCA és una tècnica utilitzada per reduir la dimensió d'un conjunt de dades.

Per un conjunt de mostres amb una determinada concentració d'un analít on s'han mesurat dues variables (Figura 5.1), el PCA busca la projecció segons la qual les dades quedin millor representades en termes de mínims quadrats i en termes de variabilitat buscant eliminar la informació redundant o deguda al soroll.

En realitat, el PCA busca les noves direccions (sistema de coordenades) que expliquin la màxima variabilitat de les mostres i es defineixen uns nous eixos que descriuen el volum on es troben aquestes mostres. Aquests nous eixos són els components principals. El primer component captura la major variància del conjunt de mostres. El segon s'escull ortogonal al primer i que expliqui la màxima variabilitat una vegada restada la que ja explica el primer component, i així successivament (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Representació de dos components principals en un conjunt de mostres.

Per poder definir aquests nous eixos, els *loadings*, matemàticament s'utilitzen els cosinus dels angles que formen els nous eixos amb els antics i les coordenades de les mostres sobre aquests nous eixos són els *scores*.

El principal problema del PCA, és que els components principals que millor descriuen la matriu de dades  $X$ , poden no ser els òptims per predir les concentracions de les mostres. És relativament freqüent que els primers components principals expliquin variacions en els senyals analítics ( $x_1$  i  $x_2$ ) no relacionades amb els analítics. S'obtenen unes direccions amb molta informació de la matriu de dades que no tenen perquè estar associades a les concentracions a predir.

L'anàlisi PLS es pot presentar com una alternativa al PCA que intenta concentrar el màxim poder predictiu en els primers components principals. Durant l'etapa de calibratge, el mètode PLS utilitza conjuntament la informació continguda en la matriu de dades analítiques (X) com la de les concentracions (Y). L'èmfasi es posa en predir les respostes i no necessàriament en entendre la relació entre variables x. Quan l'objectiu és predir el PLS és una tècnica molt útil.

La relació entre la matriu Y i X s'estableix a través d'unes variable auxiliars, les variables latents, que són combinació lineal de les variables x i que s'assemblen als components principals utilitzats al PCA. La diferència és que en PLS el calibratge es fa de tal forma que es busquen les direccions en la matriu X que al mateix temps expliquen la màxima variança en la matriu Y.

Així doncs, d'acord amb l'objectiu de validar la fluorescència multivariable com a tècnica per a la predicció de diferents variables de cultiu, s'analitzaran les dades obtingudes per fluorimetria *in situ* amb un mètode per PLS.

Per poder tractar-les cal desplegar el senyal tridimensional i convertir-lo en un sistema bidimensional. En els espectres de fluorescència recollits, es va tractar cada parella de longituds d'ona d'excitació/emissió com a una variable independent i es va construir una matriu 2D on per cada variable (parella de longituds d'ona) hi corresponia un vector columna amb la intensitat de fluorescència mesurada a aquella parella de  $\lambda$  per cada temps de mesura durant el cultiu. Així es va construir una matriu de dimensions  $m \times n$ , on  $m$  correspon a un nombre enter igual al número de parelles de longituds d'ona d'excitació/emissió en les quals s'ha pres mesura i  $n$ , al nombre de mesures preses al llarg del cultiu.

Els procediments de desplegament de matrius tridimensionals presenten dos grans desavantatges: d'una banda dificulten l'obtenció de bona informació qualitativa en tant que compliquen la interpretació dels loading plots i de l'altra, aquest desplegament de la informació pot introduir correlacions inexistents entre els espectres desplegats (Amigo *et al.* 2005).

Per aquest motiu, i en col·laboració amb el grup de Quimiometria del Departament de Química de la UAB, es va aplicar el mètode de PARAFAC al senyal obtingut. Aquest algoritme es pot considerar com l'aplicació de l'anàlisi de components principals (PCA, en sigles angleses) a sistemes de dades tridimensionals (Bro 1997). Addicionalment presenta l'avantatge de facilitar la interpretació qualitativa de les dades sense la necessitat de desplegar la matriu de senyals obtinguda. Un cop extreta la

informació important amb PARAFAC s'utilitza per correlacionar-la amb les variables del procés utilitzant un mètode PLS (Haack *et al.* 2004; Nahorniak *et al.* 2005).

PARAFAC descompon la matriu de fluorescència tridimensional en el producte de tres subelements: dos loading vectors  $a$  i  $b$  (assimilables als espectres d'emissió i excitació) i un vector  $c$  que correspon als *scores* (assimilable als perfils de concentració per cada fluoròfor  $f$ ). Com a resultat es crearan tres submatrius 2D (Figura 5.2): A, de dimensions  $i \times f$ , B de dimensions  $j \times f$  i C de dimensions  $k \times f$ . En aquest cas  $i$  correspon al nombre de longituds d'ona d'excitació,  $j$  al nombre de longituds d'ona d'emissió,  $f$  al nombre de components fluorescents i  $k$  al nombre de mostres. PARAFAC busca minimitzar la suma dels quadrats dels residuals,  $r_{ijk}$ , segons:

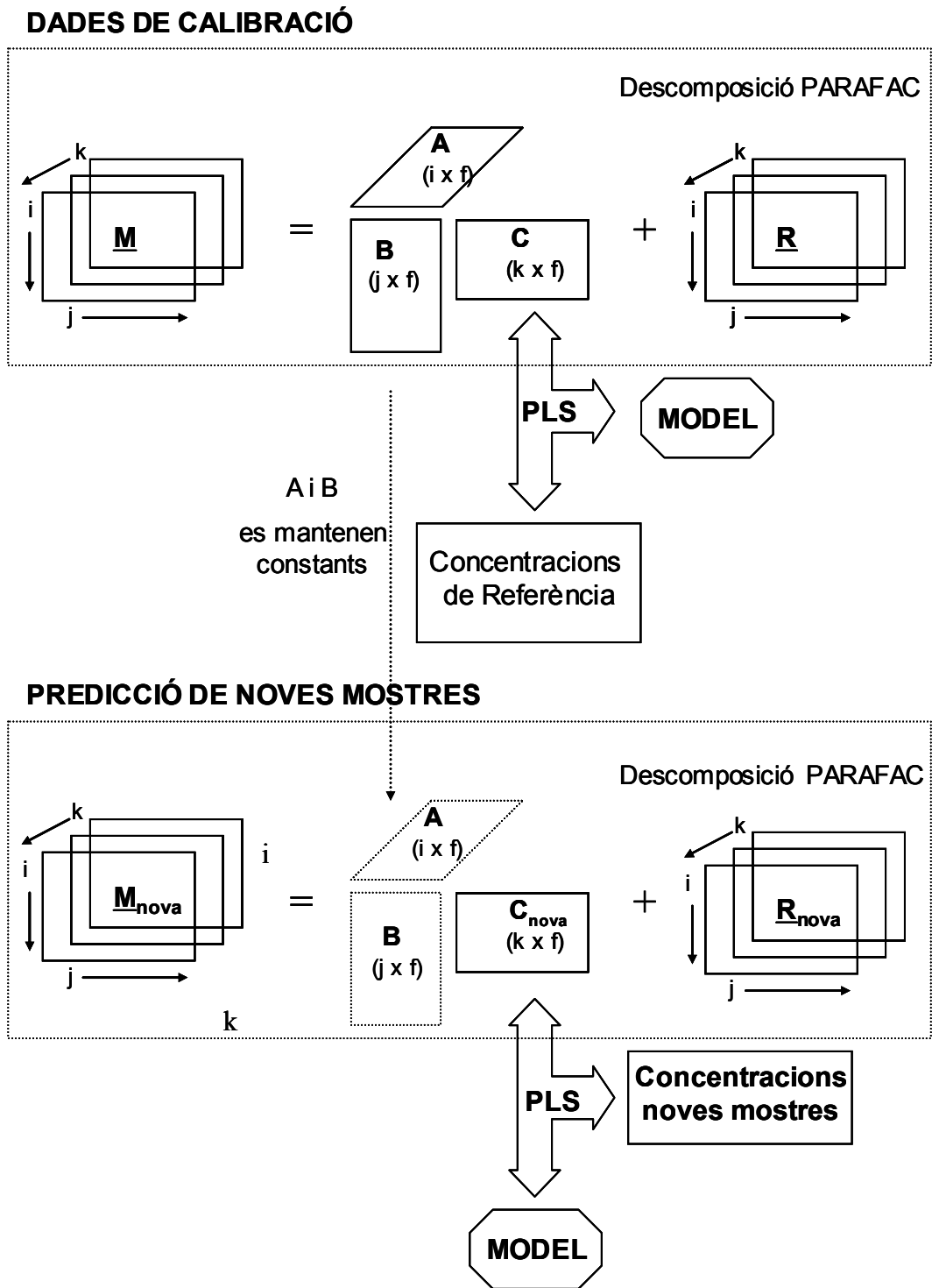
$$m_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + r_{ijk} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

En el cas del sistema trilinear de dades PARAFAC resol els espectres d'emissió i excitació (submatrius A i B) i la seva evolució al llarg del temps (submatriu C) per cada fluoròfor rellevant, sempre i quan s'utilitzen els  $f$  nombre de components correctes. Així doncs, les dimensions  $i$ ,  $j$  i  $k$  poden associar-se a les longituds d'ona d'excitació, emissió i al temps respectivament.

Les evolucions en el temps del senyal dels fluoròfors rellevants es poden relacionar posteriorment amb les variables del cultiu utilitzant els *scores* (senyal dels fluoròfors en la submatriu C) i utilitzant un mètode PLS per correlacionar-les.

Per a la predicció de nous cultius es mantenen les submatrius A i B constants i es cerca la nova submatriu C a partir de les noves dades de fluorescència. Aquesta submatriu C s'utilitza després per predir les variables de cultiu a partir del model PLS calculat prèviament (Figura 5.2). Amb aquesta metodologia només s'utilitza el senyal rellevant del sistema trilinear de dades de fluorescència per predir les variables.





**Figura 5.2.** Aplicació del PARAFAC combinat amb una regressió per PLS amb finalitats quantitatives.

L'objectiu del treball descrit en aquest capítol és el d'avaluar la fluorimetria *in situ* 2D, combinada amb diferents mètodes quimiomètrics, com a eina per a l'estimació de diferents variables d'estat durant cultiu induïts i no de *P. pastoris*. Aquesta tècnica s'aplicarà per evitar les limitacions observades en les mesures *off line*. Els analitzadors en temps real poden aportar dades que permetin estimar l'evolució i la qualitat d'un procés i esdevenir eines molt potents per a l'optimització de la producció de molts productes d'interès. Perquè aquest objectiu es pugui complir cal treballar no només en l'estudi de diferents mesures analítiques sinó també en l'aplicació de diferents tècniques d'anàlisi multivariable que permetin monitorar els bioprocessos en temps real. Aquest capítol se centra en la primera part d'aquest objectiu però servirà per avaluar tècniques (Anàlisi Estadística Multivariable per al control de processos, MSPC) que posteriorment seran aplicades al seguiment en temps real del cultiu i permetran fer un seguiment de la seva bondat (Amigo *et al.* 2008). En aquest sentit, la combinació entre la fluorimetria i la quimiometria permet obtenir una tècnica de monitoratge en línia amb les directrius de la iniciativa del PAT per al seguiment de la qualitat del procés de producció.

Les mesures de fluorescència *in situ* utilitzades en aquest capítol va ser obtingudes durant una estada a l'Institut de Química Tècnica de la Universitat de Hannover al grup de treball de Bioanalítica, sota la supervisió del Prof. Dr. Thomas Scheper.

Es treballarà amb cultius discontinus, tant induïts com no, per tal de comprovar l'aplicabilitat de la tècnica en el sistema d'expressió de *P. pastoris*.

## 5.2 Materials i mètodes

### 5.2.1 Medis i condicions de cultiu

El medi utilitzat per als cultius va ser el medi Invitrogen (apartat 2.4.1). Com a font de carboni es van utilitzar respectivament  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol o  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Els medi utilitzat per als inòculs al bioreactor va ser el medi YPD (apartat 2.3).

El cultiu va tenir lloc en un bioreactor de 2 litres acoblat a una unitat Biostat B (BBraun, Sartorius Biotech, Alemanya) per al control de diferents paràmetres de procés. Els cultius van transcórrer a  $30^\circ\text{C}$  i  $\text{pH}=5.5$ . El pH es va mantenir mitjançant l'addició de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2M. El bioreactor està construït en acer inoxidable per prevenir la intrusió de la llum i evitar el seu possible efecte sobre les mesures de fluorescència (Figura 5.4.).

L'agitació i l'aeració es van mantenir a 1000 rpm i 2.5 l·min<sup>-1</sup>, respectivament, pels discontinus de glicerol. En el cas dels cultius amb metanol aquestes variables es van mantenir a 950 rpm i 2 l·min<sup>-1</sup>. En tots els casos, es va mantenir sempre l'oxigen dissolt per sobre del 30% de saturació.

### 5.2.2 Anàlisi del glicerol i del metanol

Es va determinar el glicerol per HPLC amb un cromatògraf Merck LaChrom 7000 Series (VWR GmbH, Darmstadt, Alemanya) amb una columna Inertsil ODS-2 (GL Sciences Inc., Japan). La fase mòbil era 0.1 M (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5). El volum d'injecció de mostra era de 10 µl. Les dades es van quantificar amb el programa D7000-HSM (VWR GmbH, Darmstadt, Alemanya). La desviació estàndard relativa (RSD) era del 4%.

El metanol es va analitzar amb un cromatògraf de gasos Shimadzu GC-14B amb un detector FID (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Alemanya). La columna que es va utilitzar era una columna empacada Carbograph amb un 5 % de Carbowax 20 M, AT "acer inoxidable 1/8" o.d., i de 6 ft de llargada (Alltech GmbH, Unterhaching, Alemanya). Les condicions d'operació eren de 180°C i 220°C per a l'injector i el detector respectivament. El perfil de temperatures del forn era de 70°C a 170°C a 10°C·min<sup>-1</sup>. El temps d'anàlisi era de 7 min. Com a gas portador es va utilitzar el nitrogen amb un cabal d'aire de 30 ml·min<sup>-1</sup>. Com a patró intern s'utilitzava isopropanol (4 g·l<sup>-1</sup>) al 50% (v/v) amb la mostra. Les dades es van quantificar amb el programa Shimadzu Class VP (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Alemanya). El RSD era del 3.5%.

### 5.2.3 Mesures de fluorescència del cultiu

Les mesures de fluorescència del cultiu es van prendre *in situ* amb el sensor BioView® (DELTA Light and Optics, Lyngby, Dinamarca) (Lindemann *et al.* 1998). Aquesta sonda (Figura 5.3) va connectada al bioreactor per una finestra de quars via un port lateral de 25 mm (Figura 5.4).



**Figura 5.3.** Sensor BioView® i el PC amb el programari específic per a la lectura de les mesures del sensor.

La font de llum del sensor és una làmpada de xenó de llum polzada d'alta estabilitat. Hi ha dues rodes de filtres independents per a l'emissió i l'excitació amb 15 filtres cadascuna (de 270 a 550 nm en augments de 20 nm per l'excitació i de 310 a 590 nm en augments de 20 nm per a l'emissió). Per a la mesura d'un espectre 2D de fluorescència la roda de filtres d'excitació es situa al primer filtre. La llum d'excitació és transportada via fibra òptica fins al bioreactor. La fluorescència emesa és mesurada a través del filtre d'emissió que roda filtre a filtre fins que ha completat un cicle. Llavors el filtre d'excitació es situa al filtre següent i l'espectre d'emissió es torna a mesurar per aquesta nova longitud d'ona d'excitació. Es repeteix el procediment fins que s'ha completat un cicle de la roda de filtres d'excitació. El programari del sensor permet seleccionar el rang de longituds d'ona d'excitació i emissió convenients per cada aplicació. Un espectre 2D complet triga aproximadament 1 min a enregistrar-se.

A banda, es van utilitzar filtres neutres (nd) amb transmitància en totes les longituds d'ona d'excitació i emissió, que serveixen per mesurar la dispersió de la llum.

Durant els cultius es va mesurar un espectre 2D cada 3 min de temps de procés.



**Figura 5.4.** Bioreactor de 2 l amb la sonda BioView® connectada via un port lateral especial de 25 mm. A la part frontal de bioreactor hi ha una finestra vertical de quars que permet la visualització del medi de cultiu. La unitat Biostat B es va utilitzar per al control de diferents paràmetres del procés (al fons).

#### 5.2.4 Mètodes quimiomètrics

En un primer estudi, les dades es van tractar mitjançant models quimiomètrics utilitzant el programari comercial Unscrambler® (Camo, Noruega). És un programari complet per a l'anàlisi multivariable i el disseny d'experiments. Inclou els mètodes PCA, Resolució de Corbes Multivariable (MCR) i PLS, entre d'altres. És senzill d'utilitzar, admet diversos formats per a les dades crues i permet realitzar-los diferents pretractaments abans de tractar les dades amb el mètode quimiomètric desitjat .

Les dades de fluorescència es van centrar i es van utilitzar com a les variables independents del model. Les mesures *off-line* de les variables d'estat (biomassa, substrat i activitat lipolítica extracel·lular) es van utilitzar com les variables dependents.

A la zona de l'espectre on no hi ha fluorescència (longitud d'ona d'emissió inferiors a les longituds d'ona d'excitació) es van assignar valors de fluorescència iguals a zero. Pel que fa a la diagonal de fluorescència (longituds d'ona d'emissió iguals o molt pròximes a la longitud d'ona d'excitació), s'hi van assignar valors de fluorescència de *NaN* (Not a Number). Es va realitzar d'aquella manera perquè el senyal

recollit en aquesta diagonal pertany a la mateixa llum d'excitació i, per altra banda, assignar massa valors com a *NaN* pot dificultar la convergència de l'algorisme.

Per cada variable del procés es va calcular un model PLS-1. Tant pels cultius amb glicerol com en metanol, es van utilitzar dos discontinus per calibrar el model quimiomètric. Es va realitzar una primera validació interna per validació creuada. Per a la validació externa es van predir les variables d'estat d'un tercer cultiu que no havia estat utilitzat en el calibratge del model. Per avaluar els resultats es va calcular el RMSEP (Root Mean Squared Error of Prediction) entre els valors estimats ( $y_{\text{predicció}}$ ) i els mesurats ( $y_{\text{experimental}}$ ) per a les variables de procés, on  $M_{\text{pr}}$  equival al nombre de mostres a predir (Equació 5.2).

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{I_{\text{pr}}} (y_{\text{predicció}} - y_{\text{experimental}})^2}{M_{\text{pr}}}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Posteriorment, es va realitzar un segon tractament de les dades utilitzant un algorisme PARAFAC i PLS. Aquests models es van implementar utilitzant el PLS-Toolbox 3.5 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA) amb la versió 7.0 de MatLab (MathWorks, Natick, MA, USA).

En aquest cas es va avaluar (Equació 5.3) el PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) per obtenir els factors del PLS. El PRESS és el sumatori dels quadrats dels residuals de manera que la seva interpretació no és senzilla. Quan interessa facilitar la interpretació d'aquest valor, per exemple a l'hora d'avaluar la capacitat predictiva d'un model, se sol avaluar el RMSEP, que és l'arrel quadrada del seu valor mig.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^{I_{\text{pr}}} (y_{\text{predicció}} - y_{\text{experimental}})^2 \quad (\text{Eq. 5.3})$$

El model PLS es va validar per validació creuada i es van avaluar el RMSEC/CVIP (*Root Mean Squared Error de Calibratge/ Validació Creuada/Predicció*). No es va validar el model PLS fins que els valors del RMSEC/CVIP van ser consistents entre ells. Si el RMSEC és molt menor que el RMSECV vol dir que el model és erroni. Si el valor del RMSECV és molt menor que el del RMSEP vol dir que la predicció no és bona i, per contra, si el RMSEP és molt menor que el RMSECV vol dir que el model està sobreajustat.

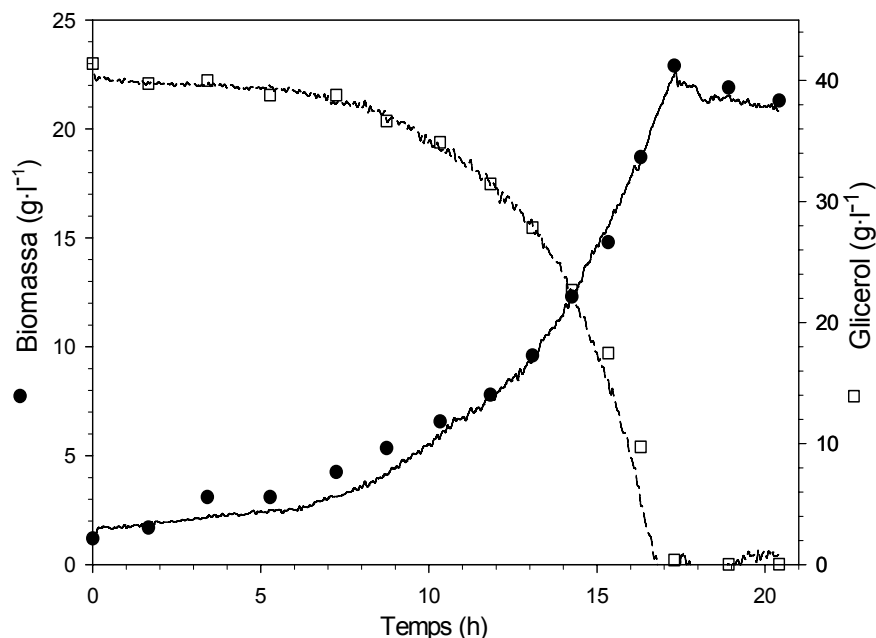
## 5.3 Resultats

### 5.3.1 Cultius no induïts

Una estratègia comuna en els cultius de *P. pastoris* és una primera fase de creixement no induït amb glicerol. En la utilització de la fluorimetria *off line* en aquesta fase, s'ha observat que la intensitat es satura a partir dels 3 o 4 g·l<sup>-1</sup> de biomassa. Per aquest motiu, es va plantejar el seguiment del senyal de fluorescència en línia durant aquesta primera fase de creixement no induït amb glicerol.

Es van realitzar tres rèpliques de cultius discontinus de *P. pastoris* creixent en 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol. L'evolució de les variables d'estat del cultiu utilitzat per a la validació del model es mostra a la Figura 5.5.

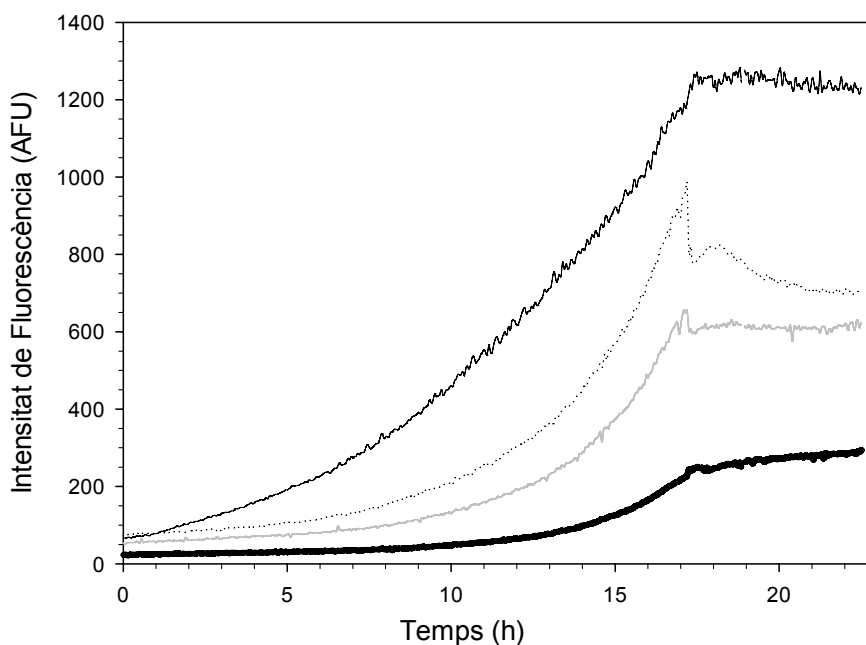
Durant els cultius es van enregistrar els espectres de fluorescència 2D. El triptòfan s'havia validat com a fluoròfor per realitzar la predicció de la biomassa en un cultiu d'aquestes característiques (Surribas *et al.* 2006). No obstant això, s'havia valorat realitzar la mesura d'altres fluoròfors, com el NADH per fer el seguiment d'altres variables del cultiu. Altres autors (Hisiger & Jolicoeur 2005) demostren que els senyals de l'NAD(P)H i la riboflavina es correlacionen linealment amb la densitat òptica de cultius de glicerol de *P. pastoris*. En aquest treball, però, no s'utilitza el senyal dels fluoròfors per predir la biomassa sinó que només se'n mostra la seva potencialitat.



**Figura 5.5.** Evolució de les variables d'estat en un cultiu en discontinu de *P. pastoris* de 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol i la seva predicció amb un model PLS-1 basat en els espectres 2D de fluorescència del cultiu. (●) Mesures de biomassa *off-line*; (—) Predicció de l'evolució de la biomassa; (□) mesures de glicerol *off-line*; (--) Predicció de l'evolució del glicerol.

Mitjançant la utilització de la sonda BioView® durant un cultiu discontinu de glicerol, s'obtenen els següents perfils de fluorescència per als principals fluoròfors biogènics de *P. pastoris* (Figura 5.6.). Es pot observar que durant la fase exponencial del discontinu el senyal dels tres fluoròfors es podria utilitzar per monitorar l'evolució de la biomassa. A diferència de les mesures realitzades *off-line*, en aquest cas no s'observa l'efecte de filtre intern, degut a la geometria d'aquesta sonda en angle de 180°. Tampoc s'aprecia saturació del senyal en el rang de biomassa estudiat.

L'esgotament del glicerol s'observa com una davallada sobtada en la fluorescència del NAD(P)H i en una pertorbació en el senyal de la riboflavina en les seves dues longituds d'ona d'excitació. El triptòfan, no obstant, roman invariant. Aquests comportaments demostren que tant el NAD(P)H com la riboflavina estan relacionat amb l'estat metabòlic de les cèl·lules mentre que el triptòfan és menys sensible a aquests canvis. L'evolució dels fluoròfors al llarg d'un cultiu mostra que utilitzar només el senyal d'un d'ells podria proporcionar una informació parcial i que cal un mètode que permeti utilitzar la informació provinent de cada un d'ells. Per aquest motiu es van provar l'adequació de models quimiomètrics (PLS-1) per a la predicció de les variables d'estat d'aquests cultius a partir del senyal de fluorescència provinent de l'espectre complet.

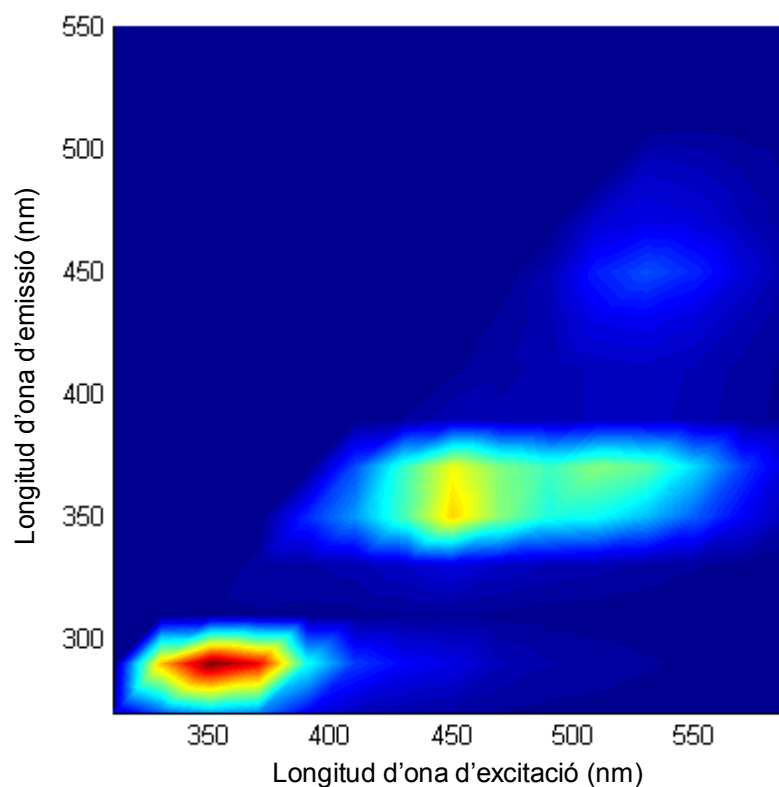


**Figura 5.6.** Evolució del senyal de fluorescència dels principals fluoròfors biogènics de *P. pastoris* durant un cultiu discontinu de 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol. Les línies corresponen als senyals dels següents fluoròfors: (—) Triptòfan, (····) NAD(P)H, (—) Riboflavina (ex/em 370/530), (—) Riboflavina (ex/em 450/530).



Per al calibratge del model PLS-1 es van utilitzar les dades de dues rèpliques de cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Les mesures *off-line* de biomassa es van prendre com a les variables dependents i els espectres de fluorescència com a les variables independents. El model quimiomètric utilitzat per la biomassa està basat només en un sol component principal. La validació interna no millorava significativament utilitzant més components. Així es va decidir mantenir el model el màxim de simple possible.

Per analitzar les parelles de longituds d'ona rellevants en la predicció de la biomassa, es va analitzar l'espectre de sensibilitat del model de biomassa (Figura 5.7). Aquest espectre mostra els coeficients de regressió escalats per cada parella de longituds d'ona. Aquests valors de sensibilitat de l'espectre poden ser interpretats com una mesura de la rellevància de la parella de longituds d'ona d'excitació/emissió per a la predicció de les variable del procés. D'aquesta manera, les parelles rellevants (en colors calents a la Figura 5.7) poden ser identificades de manera visual i simple.



**Figura 5.7.** Espectre de sensibilitat del model de biomassa per a un cultiu discontinu de *P. pastoris* de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol.

A la Figura 5.7. es pot observar que les zones relacionades amb la fluorescència del triptòfan (ex/em 290/350 nm), NAD(P)H (ex/em 350/450 nm) i riboflavina (ex/em 350/530 nm i 450/530 nm) són rellevants quan es prediu la biomassa d'un cultiu discontinu de glicerol, especialment el senyal associat al triptòfan

i al NAD(P)H. Amb la utilització d'un mètode quimiomètric multivariable, com el PLS, es pot utilitzar simultàniament la informació pertanyent a més d'un fluoròfor per realitzar la predicció de la variable del procés. El model utilitzat amb un sol component principal explica un 96.9% de la variança de la matriu de variables independents X.

La validació del model es va fer mitjançant la predicció de la biomassa d'un tercer cultiu que no havia estat considerat en la construcció del model (Figura 5.5., línia contínua). El valor del RMSEP entre la biomassa predita i mesurada *off-line* mostra que el model presenta un bon poder predictiu (Taula 5.1.).

**Taula 5.1.** *Root Mean Squared Error of Prediction (RMSEP) per a la biomassa, substrat i producte en cultius discontinus no induïts de glicerol i cultius discontinus induïts de metanol en *P. pastoris*.*

	RMSEP	
	Cultiu discontinu de 40 g·l <sup>-1</sup> de glicerol	Cultiu discontinu de 10 g·l <sup>-1</sup> de metanol
Biomassa	0.67 (g·l <sup>-1</sup> )	0.09 (g·l <sup>-1</sup> )
Substrat	1.52 (g·l <sup>-1</sup> )	0.45 (g·l <sup>-1</sup> )
Activitat lipolítica	-	0.49 (UA·ml <sup>-1</sup> )

Malgrat que el glicerol no és un substrat fluorescent, un segon objectiu era poder demostrar que la predicció de l'evolució del glicerol en un cultiu discontinu de *P. pastoris* és possible degut a la dependència d'aquest variable del procés amb la biomassa.

El calibratge del model PLS-1 per al substrat es va dur a terme de la mateixa forma com s'ha descrit per la biomassa. Els espectres 2D de fluorescència de 2 cultius discontinus es van utilitzar com a variables independents i les mesures *off-line* de substrat es van prendre com les variables dependents. Per la predicció del substrat van ser necessaris més components principals que per la predicció de la biomassa. Es va escollir utilitzar-ne dos. El model resultant recull un 97.5% de la variança en el senyal de fluorescència.

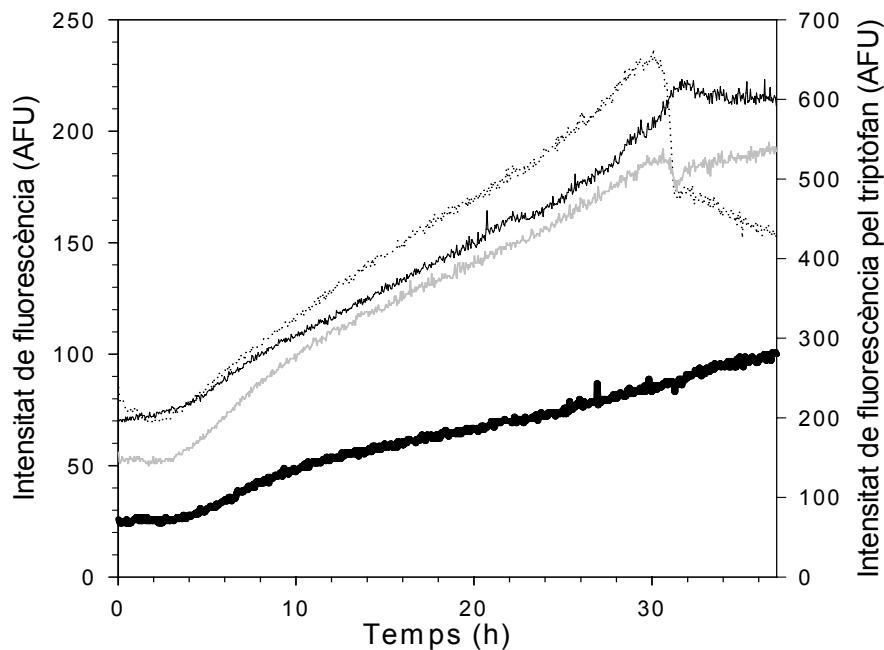
La validació del model va estar basada en la predicció d'un tercer cultiu discontinu. El valor resultant de l'error de predicció RMSEP es mostra a la Taula 5.1., mentre que la predicció de la concentració del glicerol es pot observar a la Figura 5.5.

A la vista dels resultats obtinguts, es pot concloure que la utilització de l'espectroscòpia de fluorescència multidimensional unida a mètodes quimiomètrics és una tècnica vàlida per a la predicció de la biomassa i el substrat durant cultius discontinus de *P. pastoris* creixent en glicerol.

### 5.3.2 Cultius induïts

Per tal de provar l'aplicació d'aquesta metodologia en cultius induïts de *P. pastoris*, es van portar a terme tres rèpliques de cultius discontinus del llevat creixent en metanol. Durant aquests cultius, la font de carboni induïx l'expressió de la proteïna heteròloga ROL.

A la Figura 5.8 es mostra l'evolució del senyal de fluorescència dels principals fluoròfors durant un d'aquests cultius.



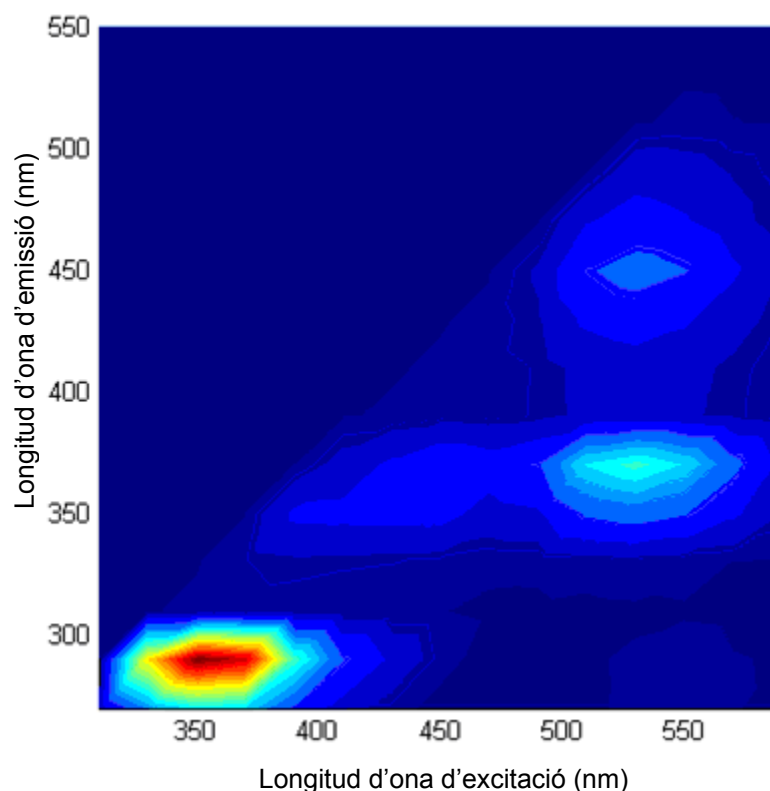
**Figura 5.8.** Evolució del senyal de fluorescència dels principals fluoròfors biogènics de *P. pastoris* durant un cultiu discontinu de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol. Les línies corresponen als senyals dels següents fluoròfors: (—) Triptòfan, (····) NAD(P)H, (—) Riboflavina (ex/em 370/530), (—) Riboflavina (ex/em 450/530).

De nou es pot observar una disminució sobtada del senyal de fluorescència del NAD(P)H i una pertorbació en el senyal de riboflavina quan s'exhaureix el metanol, mentre que el senyal de triptòfan es manté constant.

Es va calibrar un model PLS-1 per a la predicció de biomassa utilitzant dos cultius discontinus de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol per al calibratge del model. Les mesures *off-*

*line* de biomassa es van utilitzar com a variables dependents i els espectres 2D de fluorescència com a variables independents.

De manera similar als cultius no induïts, un component principal és suficient per predir biomassa. La variança explicada amb aquest model és del 82.6%. L'espectre de sensibilitat del model PLS-1 desenvolupat es mostra a la Figura 5.9.



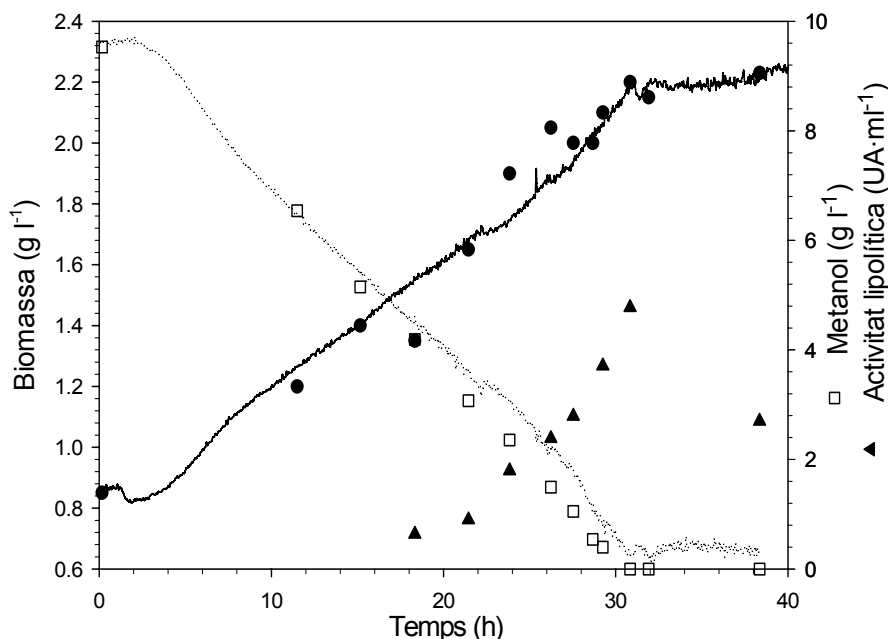
**Figura 5.9.** Espectre de sensibilitat del model de biomassa per un cultiu discontinu induït de *P. pastoris* de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol.

En aquest cas, el rol més important en la predicció de la biomassa correspon a la fluorescència del triptòfan. El senyal del NAD(P)H i la riboflavina no tenen la mateixa rellevància en la predicció que durant els cultius no induïts. Una explicació possible seria que durant la producció de proteïna heteròloga, la concentració cel·lular d'aquest fluoròfors no roman tant constant com durant els cultius amb glicerol com a font de carboni.

De manera semblant a com s'havia fet per al glicerol, la predicció de la biomassa es va realitzar a partir dels espectres de fluorescència 2D d'un tercer cultiu discontinu no inclòs durant el calibratge del model (Figura 5.10.). El valor de l'error de predicció de biomassa (RMSEP) es mostra a la Taula 5.1.

Quant a la predicció del metanol, es van seleccionar dos components principals amb el que es recull un 95.9% de la variança de la matriu de fluorescència. La validació del model es va centrar en la predicció del metanol d'un tercer cultiu discontinu no inclòs en el calibratge. El RMSEP per a la predicció del metanol es mostra a la Taula 5.1., i l'evolució del senyal del metanol es mostra a la Figura 5.10.

Així doncs el comportament de la predicció de biomassa i substrat en cultius induïts i no induïts és similar.



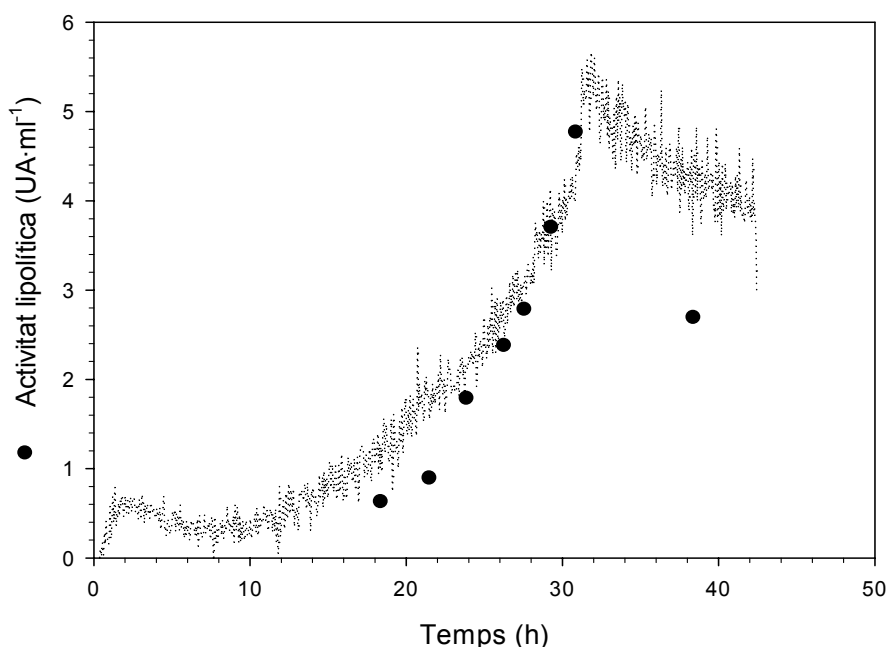
**Figura 5.10.** Evolució de les variables d'estat en un cultiu en discontinu de *P. pastoris* de  $10 \text{ g l}^{-1}$  de metanol i la seva predicció amb un model PLS-1 basat en els espectres 2D de fluorescència del cultiu. (●) Mesures de biomassa *off-line*; (—) Predicció de l'evolució de la biomassa; (□) Mesures de metanol *off-line*; (---) Predicció de l'evolució del metanol, (▲) Mesures *off-line* d'activitat lipolítica extracel·lular.

El monitoratge de la producció de la proteïna heteròloga és generalment un problema associat als bioprocessos degut a la manca de sensors específics. En els cultius discontinus de *P. pastoris* creixent en metanol, s'indueix la producció de la proteïna heteròloga, tal i com es pot observar a la Figura 5.10. Basat en el fet que la proteïna heteròloga pot presentar certa fluorescència a la zona del triptòfan es va considerar el calibratge d'un model per monitorar l'activitat extracel·lular de ROL en cultius induïts.

Es van construir dos models considerant tot l'espectre 2D de fluorescència enregistrat o només les parelles d'excitació/emissió relacionades amb la fluorescència del triptòfan. El poder predictiu era similar en ambdós casos però es van obtenir

resultats lleugerament millors quan només s'utilitzava la zona de l'espectre de fluorescència associada al triptòfan. Es va calibrar un model PLS-1 basat en el senyal d'aquesta zona per a dos cultius discontinus induïts. El nombre de components principals necessaris per a la predicció de la ROL es va fixar en dos, ja que augmentar el nombre de components no millorava la variança explicada. El model PLS construït explica un 99.8% de la variança del senyal de fluorescència.

El model es va validar amb la predicció de l'activitat lipolítica extracel·lular d'un tercer cultiu discontinu no inclòs en el calibratge. Tal i com es pot observar en la Figura 5.11., malgrat que el perfil de l'activitat lipolítica segueix el comportament de les mesures realitzades en la fase exponencial, s'observen discrepàncies entre els valors mesurats i predits a la fase final del cultiu. Una possible explicació a aquest fet seria que, contràriament al que succeeix amb la correlació entre biomassa i substrat on el rendiment biomassa/substrat es manté relativament constant, la producció de proteïna heteròloga no és tant repetitiva d'un cultiu a un altre malgrat està relacionada amb l'evolució de la biomassa. En aquest sentit, el model no prediu quantitativament la davallada final de l'activitat, deguda a possibles processos proteolítics que poden variar significativament d'un cultiu a un altre. D'altra banda el model plantejat resulta en una estimació amb molt soroll de l'activitat lipàsica degut al fet que la ROL no està tant correlacionada amb el senyal de fluorescència com la biomassa, per exemple.



**Figura 5.11.** Mesures d'activitat lipolítica extracel·lulars mesurades off-line (◆) i predites (⋯). La predicció es va obtenir mitjançant un model PLS-1 basat en la fluorescència associada al triptòfan durant un cultiu discontinu de 10 g·l<sup>-1</sup> de metanol.

### 5.3.3 Aplicació del *Parallel Factor Analysis* (PARAFAC) combinat amb regressions PLS per al monitoratge de cultius no induïts de *P. pastoris* mitjançant fluorimetria *in situ*.

En els apartats 5.3.1. i 5.3.2. s'ha mostrat l'aplicació dels models de regressió per PLS a espectres 2D de fluorescència de cultius induïts i no induïts de *P. pastoris*. El senyal resultant d'enregistrar espectres 2D de fluorescència al llarg d'un cultiu és una matriu. Per poder tractar aquest senyal mitjançant un mètode PLS, cal desplegar-la i convertir-la en un sistema bidimensional. Tal i com s'ha exposat a l'apartat 5.1 aquest procediment implica una sèrie de desavantatges.

Per aquest motiu i en col·laboració amb el grup de Quimiometria del Departament de Química de la UAB, es va aplicar el mètode de PARAFAC al senyal obtingut. Aquesta metodologia permet tractar directament sistemes trilineals sense necessitat de desplegar les dades. Es va aplicar l'anàlisi per PARAFAC a cultius discontinus no induïts de *P. pastoris* creixent en glicerol com a cultiu model per valorar l'aplicació d'aquesta combinació de metodologies. Les dades de fluorescència i mesures *off-line* són les mateixes que les utilitzades en l'apartat 5.3.1. d'aquest mateix capítol.

El primer pas per a la correcta utilització de l'algorisme PARAFAC és la decisió del nombre òptim de components principals. Amb el coneixement previ del sistema es podrien esperar tres components principals (Li *et al.* 1991) però cal recórrer a una anàlisi dels valors obtinguts en quant a varianza explicada (Taula 5.2).

**Taula 5.2.** Variança explicada i *core consistency* (ambdós donats en percentatges) *versus* el nombre components principals utilitzats en el model PARAFAC sobre les dades de calibratge.

	Nombre de components				
	1	2	3	4	5
Variança explicada (%)	94.9	98.4	98.9	99.6	99.7
Core consistency (%)	100	99	75	68	-12

Es podria assumir que 3 és el nombre correcte de components però el quart recull un percentatge significatiu de varianza explicada. Per aquest motiu, es va analitzar el *core consistency* (valor que explica quan bé el sistema es pot descriure

com a trilinear o si el nombre de components escollits és el correcte per explicar un sistema trilinear). Si el sistema de dades es descriu correctament amb un mètode com PARAFAC, a mesura que augmenti el nombre de components el *core consistency* o superidentitat ha d'anar disminuint monotònicament en augmentar el nombre de components. Un cop superat el nombre idoni de components, el *core consistency* disminuirà dramàticament i de manera clara.

L'anàlisi dels valors del *core consistency* (Taula 5.2.) revela, amb consonància amb el % de variances explicada, que el quart component és rellevant en el model.

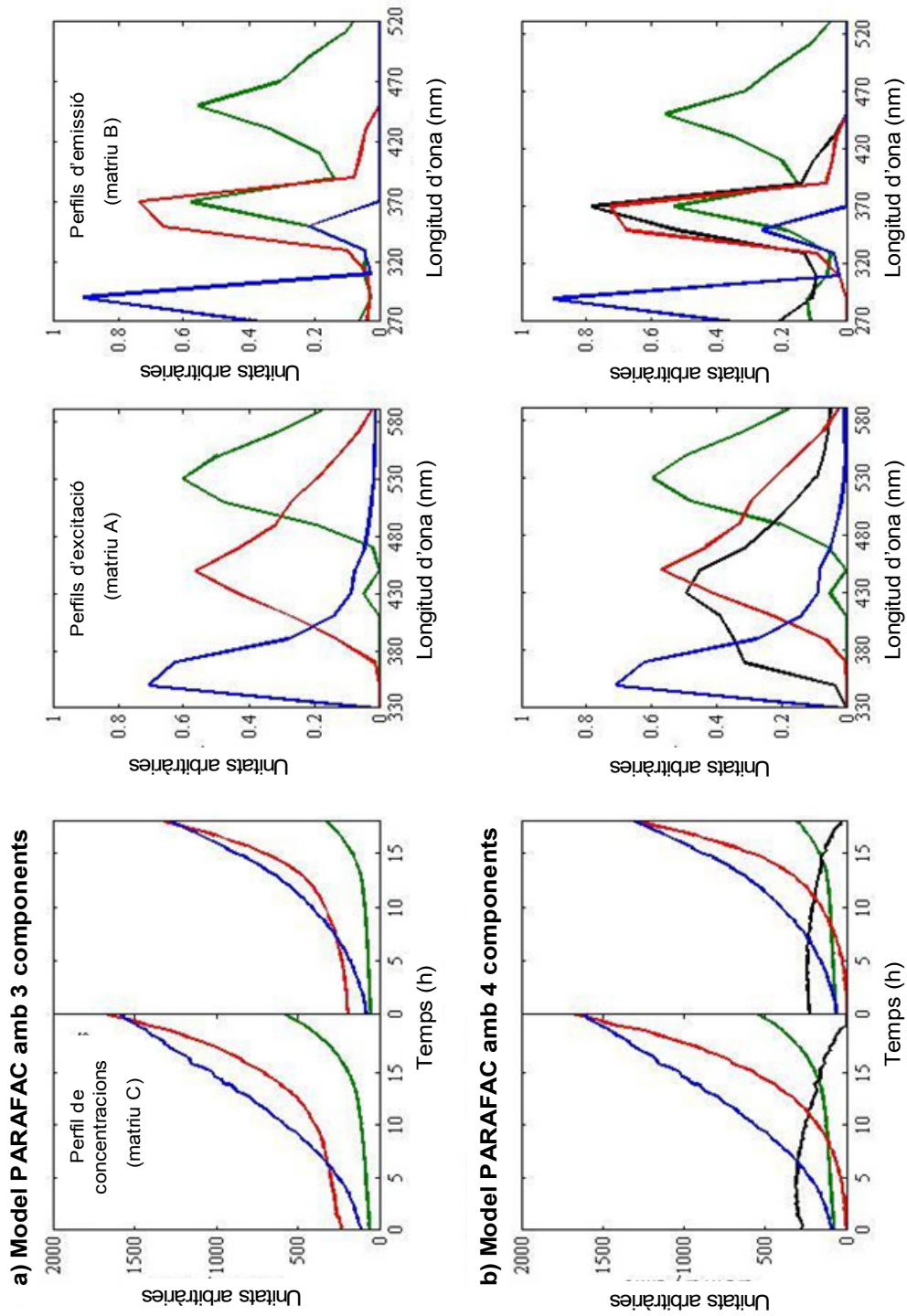
Es van realitzar models de calibratge PARAFAC amb tres i quatre components per analitzar els resultats que se n'obtenien. Les dues matrius de *loadings* (corresponents als perfils d'excitació i emissió) per al model amb tres components mostraven els perfils esperats pels tres fluoròfors principals: triptòfan, NAD(P)H i riboflavina (dades no mostrades). Cada *loading* pot ser associat a un score de concentracions que mostra l'evolució del senyal de cada un dels tres analits al llarg del cultiu (dades no mostrades).

Pel que fa a les matrius de *loadings* i *scores* que s'obtenen amb un model amb quatre components principals (Figura 5.12.), s'hi poden observar els perfils esperats per als tres principals fluoròfors (Figura 5.12.a) i el perfil del quart component. Aquest perfil és molt similar al del NAD(H)P. Els *loadings* obtinguts per als tres principals fluoròfors no varien del model de tres a quatre components, amb el que el quart component no està relacionat amb cap dels tres fluoròfors.

L'anàlisi dels *loadings* obtinguts és molt similar als resultats presentats pel sistema d'expressió de *S. cerevisiae* (Haack *et al.* 2004). Aquest fet fa pensar que la combinació de la fluorimetria i la quimiometria podria ser un mètode vàlid per els sistemes d'expressió amb llevats. En el treball amb *S. cerevisiae*, però, no s'observa la presència d'un quart component i el nombre de components es fixa a tres en base al coneixement previ del sistema biològic.

Si s'avaluen els *scores* corresponents al triptòfan i a la riboflavina (Figura 5.12b) no varien significativament respecte els obtinguts pel model de tres components (dades no mostrades). Contràriament, el perfil del NAD(H)P varia del model de tres a quatre components. El score del quart component indica que aquest disminueix a mesura que progressa el procés. Totes aquestes observacions suggereixen que aquest quart component no és una espècie química sinó un component físic.

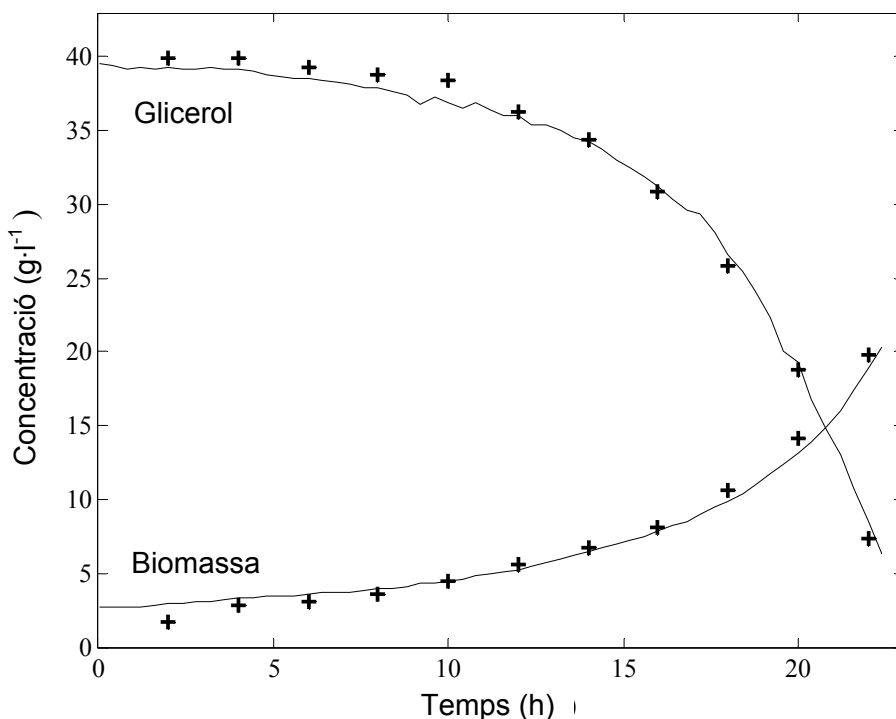




**Figura 5.12.** Els scores i les matrius de *loadings* de la descomposició PARAFAC basada en a) tres i b) quatre components dels espectres 2D de fluorescència al llarg d'un cultiu discontinu de 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol de *P. pastoris*: (—), Triptòfan; (—), NAD(P)H; (—), riboflavina i (—), el quart component.

La baixa solubilitat de l'ortofosfat ( $HPO_4^{2-}$ ) amb el  $Mg^{2+}$ , el  $Ca^{2+}$  i altres cations polivalentes presents a la solució de sals traça que s'addiciona al medi de cultiu provoca la presència de precipitats (Zhang *et al.* 2000) que absorbeixen a la zona pròxima al NAD(H)P. Aquests resultats coincideixen amb els pics de fluorescència observats per a les sals traça en mostres de medi de cultiu sense cèl·lules (Capítol 4.; Figura 4.2.). La presència d'aquests precipitats disminueix a mesura que augmenta la biomassa, el que és consistent amb l'evolució del quart component al llarg del cultiu.

En aquesta anàlisi es fa palesa l'avantatge associat a la utilització d'un mètode quimiomètric per sistemes tridimensionals. La interpretació qualitativa dels senyals rellevants a partir dels *loadings* obtinguts amb la descomposició PARAFAC és més senzilla que la corresponent anàlisi a partir dels senyals obtingudes en el PLS. En aquell cas, s'ha d'estudiar la matriu de coeficients de regressió (Figures 5.5 i 5.7), fet que dificulta l'observació de components del model que no corresponguin als fluoròfors principals esperats. D'acord amb aquests resultats per a la predicció de la biomassa i el substrat es van utilitzar els *scores* resultants de l'anàlisi PARAFAC de les dades de fluorescència utilitzant quatre components. Els *scores* es van relacionar amb les dades de biomassa i substrat utilitzant un mètode de PLS (Figura 5.13.).



**Figura 5.13.** Comparació entre els valors predits i mesurats de biomassa i glicerol durant un cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol de *P. pastoris*. (+), valors experimentals i la línia sòlida, valors predits per PARAFAC-PLS.

De nou es va recórrer a l'estratègia d'utilitzar dos cultius discontinus no induïts per al calibratge del model i un tercer cultiu discontinu per valorar el poder predictiu del model construït.

Els valors del PRESS resultant (dades no mostrades) indiquen, en aquest cas, que són necessaris dos factors PLS. La Taula 5.3 mostra els principals resultats obtinguts durant el calibratge del model i la seva utilització en la predicció d'un cultiu independent.

**Taula 5.3.** Valors obtinguts del calibratge i validació dels models PLS per predicció de biomassa i substrat en cultius discontinus no induïts de *P. pastoris* de 40 g·l<sup>-1</sup> de glicerol. Aquests models PLS es van construir a partir dels scores obtinguts de la descomposició PARAFAC amb quatre components dels espectres 2D de fluorescència al llarg del cultiu.

		Biomassa	Glicerol
Calibratge	$r^2$	0.948	0.978
	RMSEC (g·l <sup>-1</sup> )	0.842	1.076
	RMSECV (g·l <sup>-1</sup> )	0.882	1.127
Predicció	$r^2$	0.992	0.996
	RMSEP (g·l <sup>-1</sup> )	0.729	0.911

La validació del model PLS construït es va fer emprant el procediment de "leave-one-out" de validació creuada. Tant el valor del RMSEC com el del RMSECV eren similars i baixos, fet que indica que els models eren correctes.

Els valors obtinguts de la predicció de la biomassa i el substrat d'un tercer cultiu independent mostren resultats satisfactoris en quant al valor de  $r^2$  però el RMSEP és inferior al RMSECV en tots dos casos. Malgrat tot no hi ha indicacions clares que el model estigui sobreajustat, tal i com s'explica en l'apartat 5.2.4.

Els resultats obtinguts de la predicció de les variables del cultiu es mostren a la Figura 5.13. S'hi pot observar una bona correlació entre els valors predits i els mesurats experimentalment. Pel que fa als valors del RMSEP en la predicció de la biomassa (0.729 g·l<sup>-1</sup>) emprant aquesta metodologia (Taula 5.3.) són comparables als obtinguts emprant una metodologia de PLS (0.67 g·l<sup>-1</sup>) sobre una matriu de dades desplegadas (Taula 5.1.). En canvi, els valors predits per al glicerol són millors utilitzant una metodologia PARAFAC-PLS ja que el RMSEP és de 0.911 g·l<sup>-1</sup> enfront dels 1.52 g·l<sup>-1</sup> s'hi s'utilitza una matriu desplegada (Taula 5.1). Aquest fet confirma la

importància de realitzar una bona anàlisi qualitativa de les dades abans d'aplicar qualsevol metodologia quantitativa.

Aquesta metodologia es va aplicar també als cultius induïts. En aquest cas es va aplicar el PARAFAC acoblat al Control Estadístic Multivariable del Procés (MSPC) no només com a tècnica per al monitoratge dels cultius sinó també com a eina de control en temps real de l'evolució del procés en temps real (Amigo *et al.* 2008) en línia amb les directrius presentades al PAT. Es demostra que fent una estimació de sumatori dels residuals en temps real es pot predir quan un cultiu està fora de les condicions normals d'operació (NOC).

## 5.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha descrit la utilització d'una sonda fluorimètrica *in situ* per al seguiment on-line del senyal de fluorescència associat a cultius discontinus de *P. pastoris* i l'aplicació de diferents metodologies quimiomètriques per al tractament de les dades obtingudes. S'ha arribat a les següents conclusions:

- La fluorimetria 2D *in situ* combinada amb tècniques de tractament de dades basades en mètodes PLS-1, s'ha mostrat com una tècnica vàlida per al monitoratge de la biomassa i el substrat en cultius discontinus induïts i no induïts de *P. pastoris*.
- S'han pogut seguir al llarg de tots els cultius els senyals associats als tres principals fluoròfors biogènics (triptòfan, NAD(P)H i riboflavina) sense observar-se saturació del senyal en els rangs de biomassa i substrat estudiats. Així doncs, mitjançant l'aplicació d'aquesta sonda *in situ* es superen les problemàtiques associades a la mesura off-line de fluorescència descrites al Capítol 4.
- L'esgotament del substrat (ja sigui metanol com glicerol) resulta en una davallada sobtada del senyal de fluorescència del NAD(P)H i en una pertorbació del senyal associat a la riboflavina. El triptòfan, en canvi, es manté invariant.
- Per a la predicció de les variables de procés es va recórrer a una metodologia PLS-1 per al tractament dels espectres de fluorescència recollits al llarg dels cultius. El model quimiomètric construït per a la predicció de la biomassa estava basat en un sol component mentre que els utilitzats per a la predicció dels substrats (tant inductor com no) estava

basat en dos components. Això era així perquè la validació interna del model de biomassa no millorava considerablement en augmentar el nombre de components.

- La predicció de la biomassa durant els cultius no induïts està associada al senyal de triptòfan i NAD(P)H i, en menor mesura, al senyal de la riboflavina. Contràriament, per a la predicció d'aquesta variable durant els cultius induïts el senyal del NAD(P)H perd importància enfront del senyal del triptòfan. Amb la mesura *in situ* de la fluorescència 2D i el tractament de les dades mitjançant mètodes quimiomètrics és possible considerar el senyal provinent de més d'un fluoròfor.
- La biomassa i el substrat van ser correctament predits amb errors de predicció no superiors al 7% i al 10% respectivament.
- La predicció de la proteïna heteròloga no va donar resultats tan satisfactoris. Tot i que l'evolució de l'activitat lipàsica s'estima correctament, s'observen discrepàncies entre els valors predits i mesurats experimentalment, especialment al principi del cultiu i durant la fase estacionària quan poden aparèixer fenòmens de proteòlisis poc reproduïbles entre experiments. També pot ser degut a la menor reproducibilitat de la producció de proteïna d'un cultiu a un altre.
- El seguiment dels espectres de fluorescència al llarg d'aquests cultius resulta en un sistema de dades trilineal. Per tractar aquest tipus de dades mitjançant un mètode PLS cal desplegar les dades. Aquest tipus de tractament pot incorporar correlacions inexistents entre els espectres enregistrats. Per aquest motiu, es van tractar les dades obtingudes mitjançant un mètode PARAFAC. El tractament de les dades amb aquest mètode va permetre visualitzar un quart component, associat possiblement a l'efecte de la precipitació de les sals traça sobre el senyal de fluorescència.
- Les dades resultants de la descomposició PARAFAC dels espectres de fluorescència es van correlacionar mitjançant un model PLS amb les dades de biomassa i glicerol. Van ser necessaris dos components per a aquests models.
- Els resultats de predicció obtinguts amb l'aplicació de la metodologia PARAFAC-PLS als cultius no induïts van ser comparables als dels models PLS-1 sobre dades desplegades. Aquest fet confirma l'aplicabilitat

d'aquesta metodologia sobre les dades estudiades i demostra ser millor per a la interpretació qualitativa de la informació continguda al senyal de fluorescència 2D del cultiu.

- La metodologia PARAFAC s'ha aplicat també a dades de fluorescència in situ en cultius induïts i no induïts acoblada a tècniques de Control Estadístic i Multivariable del Procés demostrant l'aplicabilitat d'aquesta combinació de tècniques a l'hora de diagnosticar possible desviacions d'un cultiu de les condicions normals d'operació (NOC).

## 5.5 Referències bibliogràfiques

Amigo, J.M., Coello, J. & MasPOCH, S. 2005. Three-way partial least-squares regression for the simultaneous kinetic-enzymatic determination of xanthine and hypoxanthine in human urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1380-1388.

Amigo, J.M., Surribas, A., Coello, J., Montesinos, J.L., MasPOCH, S. & Valero, F. 2008. On-line parallel factor analysis. A step forward in the monitoring of bioprocesses in real time. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 92, 44-52.

Boehl, D., Solle, D., Hitzmann, B. & Scheper, T. 2003. Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization. *Journal of Biotechnology*, 105, 179-188.

Bro, R. 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38, 149-171.

Haack, M.B., Eliasson, A. & Olsson, L. 2004. On-line cell mass monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* cultivations by multi-wavelength fluorescence. *Journal of Biotechnology*, 114, 199-208.

Hagedorn, A., Legge, R.L. & Budman, H. 2003. Evaluation of spectrofluorometry as a tool for estimation in fed-batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 104-111.

Hisiger, S. & Jolicoeur, M. 2005. A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of Biotechnology*, 117, 325-336.

Li, J.K., Asali, E.C., Humphrey, A.E. & Horvath, J.J. 1991. Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry. *Biotechnology Progress*, 7, 21-27.

Lindemann, C., Marose, S., Nielsen, H.O. & Scheper, T. 1998. 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 51, 273-277.

Nahorniak, M.L., Cooper, G.A., Kim, Y.C. & Booksh, K.S. 2005. Three- and four-way parallel factor (PARAFAC) analysis of photochemically induced excitation-emission kinetic fluorescence spectra. *Analyst*, 130, 85-93.

Solle,D., Geissler,D., Stark,E., Scheper,T. & Hitzmann,B. 2003. Chemometric modelling based on 2D-fluorescence spectra without a calibration measurement. *Bioinformatics*, 19, 173-177.

Surribas,A., Montesinos,J.L. & Valero,F.F. 2006. Biomass estimation using fluorescence measurements in *Pichia pastoris* bioprocess. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 23-28.

Wolf,G., Almeida,J.S., Pinheiro,C., Correia,V., Rodrigues,C., Reis,M.A. & Crespo,J.G. 2001. Two-dimensional fluorometry coupled with artificial neural networks: a novel method for on-line monitoring of complex biological processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 297-306.

Zhang,W., Inan,M. & Meagher,M.M. 2000. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 5, 275-287.





# 6

Monitoratge de l'expressió extracel·lular de la ROL en *Pichia pastoris* mitjançant la seva fusió a la *Green Fluorescence Protein* com a proteïna indicadora

6.1 Introducció .....	127
6.2 Materials i mètodes.....	129
6.2.1 Soques.....	129
6.2.2 Construcció del plàsmid i la soca.....	129
6.2.3 Medis i condicions de cultiu .....	131
6.2.4 Anàlisi del sorbitol.....	131
6.2.5 Mesures fluorimètriques.....	132
6.2.6 Anàlisi SDS-Page i Western Blot .....	132
6.3 Resultats .....	133
6.3.1 Construcció, aïllament de transformants i estudis d'expressió .....	133
6.3.2 Monitoratge dels nivells de fluorescència extracel·lular de la GFP en cultius en bioreactor .....	134
6.4 Conclusions .....	140
6.5 Referències bibliogràfiques .....	142

## 6.1 Introducció

La fluorimetria s'ha aplicat al monitoratge de la biomassa i el substrat en cultius discontinus de *P. pastoris* però s'han comprovat les mancances de la tècnica per al seguiment de la producció de la proteïna d'interès. Per aquest motiu va sorgir l'interès de buscar una tècnica que també permetés el seguiment per fluorimetria de la ROL.

En aquest context, la proteïna verda fluorescent d' *Aequorea victoria* (GFP, en sigles angleses) ha atret un enorme interès com a marcador molecular.

La GFP és una proteïna relativament petita (27 kDa). És autofluorescent i no requereix cofactors per ser luminiscent. A diferència d'altres marcadors fluorescents, com la luciferasa, la  $\beta$ -galactosidasa o els anticossos marcats amb fluorescència, no necessita tècniques de fixació que poden ser nocives per les cèl·lules permetent una visualització de la fluorescència *in vivo*. La proteïna nativa té un pic màxim d'absorció entorn dels 395 nm i un de menor als 470 nm, amb un únic pic d'emissió luminiscent a 509 nm i és altament estable. Han aparegut diverses mutacions de la proteïna amb una brillantor millorada i/o amb característiques espectrals diferents (Zimmer 2002).

La fluorescència de la GFP depèn de la seqüència d'aminoàcids Ser-Tyr-Gly (posicions 65-67 de la cadena). Aquesta seqüència experimenta una oxidació espontània i forma un cromòfor cíclic. La GFP millorada (*enhanced* GFP, EGFP) conté dos canvis a nivell d'aminoàcids. La posició 65 s'ha canviat la Ser per un Thr i a la posició 64 un Phe per un Leu. Estudis cristal·logràfics revelen que tant la GFP nativa com les mutants presenten una estructura terciària en forma de cilindre, on hi ha contingut el cromòfor. Gràcies a la protecció que li ofereix la pròpia estructura terciària, la GFP és una proteïna altament estable sota diferents tipus de condicions, inclosos els tractaments amb proteases.

La fluorescència del cromòfor apareix després d'una reacció de ciclació post-translacional i la consegüent oxidació d'aquests tres aminoàcids de les posicions 65-67. La formació d'aquest cromòfor és un procés de primer ordre que segueix diferents passos i que provoca l'existència d'un temps mort abans no es fa aparent la fluorescència de la proteïna. Albano i col·laboradors (Albano *et al.* 1996) van mesurar que el temps transcorregut entre l'expressió de la proteïna determinada per *Western blot* i l'emissió de fluorescència era de 1.5 h per a la forma "cicle 3" de la GFP.

Aquesta estabilitat és una avantatge en algunes aplicacions (on hi hagi condicions adverses per a les proteïnes) però un inconvenient, per exemple, si es volen fer estudis d'inducció transcripcional o d'expressió i repressió gènica en temps real (Lu *et al.* 2002). Per aquest motiu han aparegut mutacions de la GFP on es

disminueix l'estabilitat amb temps de vida mitja entre els 40 minuts i les 2 hores (Zimmer 2002) i també mutants que milloren el seu plegament (Lu *et al.* 2002).

La GFP ha estat expressada amb èxit en diferents sistemes d'expressió: *E. coli* (Jones *et al.* 2004), llevats (Hisiger & Jolicoeur 2005), fongs (Ganzlin *et al.* 2007), cèl·lules de mamífers (Querido & Chartrand 2008), cèl·lules d'insecte (Sf-9) (Reilander *et al.* 1996) i cèl·lules vegetals (Peckham *et al.* 2006).

S'ha utilitzat en diverses aplicacions. Una d'elles és com a proteïna de fusió marcador d'una altra proteïna d'interès per facilitar-ne el seguiment. També es pot utilitzar en estudis de localització cel·lular de proteïnes a les quals ha estat fusionada. La GFP ha estat reportada també com a marcador de gens ja que l'expressió d'un determinat gen es podia seguir mitjançant la mesura de la fluorescència de la GFP clonada sota el mateix promotor. Altres aplicacions (Zimmer 2002) inclourien la seva utilització per mesurar interaccions proteïna-proteïna, el pH de diferents orgànuls, com a indicadora de presència de calci o com a biosensor de genotoxicitat (Bartolome *et al.* 2003).

En els bioprocessos per a l'obtenció de proteïnes heteròlogues, un dels majors interessos està en el seguiment en línia de la producció de la proteïna d'interès. En aquest treball s'ha validat la fluorimetria com a tècnica per al monitoratge de biomassa i substrat. Per això es presentarà la utilització de la GFP com a proteïna de fusió per al seguiment de la producció de ROL. En alguns casos aquesta estratègia ha permès el seguiment *in situ* de la producció de la proteïna (Jones *et al.* 2004; Reischer *et al.* 2004; Hisiger & Jolicoeur 2005; Ganzlin *et al.* 2007).

L'interès majoritari rau en el seguiment de la producció de ROL extracel·lular. Fins al moment s'han reportat pocs exemples d'expressió extracel·lular de proteïnes de fusió amb la GFP en el llevat *P. pastoris* i han tingut lloc utilitzant els pèptids senyal de l' $\alpha$ -factor de *S. cerevisiae* (Passolunghi *et al.* 2003; Cha *et al.* 2005) o alguns factors de secreció alternatius com ara el senyal de secreció viral derivat de la preprotoxina del virus K28 (Eiden-Plach *et al.* 2004) o el senyal de secreció de l'aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (Raemaekers *et al.*, 1999).

En aquest treball, la ROL ha estat fusionada a la GFP S65T per investigar la seva utilitat com a indicadora de la producció intra- i extracel·lular en *P. pastoris* i valorar d'aquesta manera la seva aplicabilitat com a mètode de monitoratge basat en el senyal de fluorescència.

Aquest treball es va desenvolupar en col·laboració amb el Dr. David Resina. Conformava una part de la seva tesi doctoral basada en l'estudi de la localització intracel·lular i la secreció de la ROL en el sistema de *P. pastoris*.

## 6.2 Materials i mètodes

### 6.2.1 Soques

Es va utilitzar la soca *E. coli* DH5 $\alpha$  per a la construcció del plàsmid i la seva amplificació. La soca salvatge *P. pastoris* X-33 (Invitrogen Co., CA, USA) es va utilitzar com a soca hoste del gen de la lipasa de *R. oryzae* fusionada a la variant S65T de la GFP de *A. victoria* sota el control transcripcional del promotor *PFLD1*. Com a soca control es va utilitzar la X-33/pPICZFLD $\alpha$  ROL (Resina *et al.* 2004). Es va escollir la variant S65T de la GFP degut a la seva major fluorescència i estabilitat en comparació amb la forma salvatge (Zimmer 2002).

### 6.2.2 Construcció del plàsmid i la soca

Es van construir dues fusions de la ROL amb la GFP: d'una banda es va fusionar la GFP a l'extrem N-terminal de la ROL i de l'altra, a l'extrem C-terminal. Les fusions ROL-GFP i GFP-ROL es van obtenir per SOE-PCR (Horton *et al.* 1989). Els encebadors utilitzats per a cada reacció d'amplificació es mostren a la Taula 6.1. La construcció de les fusions es va fer en dos passos: primer es van amplificar els dos gens separadament introduint un *linker* de 12 aminoàcids entre les dues seqüències (Waldo *et al.* 1999; Passolunghi *et al.* 2003). El gen de la GFP es va amplificar del plàsmid pPICZ-GFP (Passolunghi *et al.* 2003)).

Per a la construcció GFP-ROL es van utilitzar els plàsmids DR9 i DR3 per amplificar la GFP. El primer DR9 contenia un punt de restricció *Xho*I a la seqüència 5' per permetre la inserció de la fusió al plàsmid d'expressió. El primer DR3 contenia el linker de 12 aminoàcids (en cursiva a la Taula 6.1.). Per amplificar la ROL es va utilitzar el plàsmid pPICZFLD $\alpha$ ROL (Resina *et al.* 2005). Per a la PCR es van utilitzar els encebadors DR4 i DR2 que contenien la seqüència del *linker* (en cursiva a la Taula 6.1.) i un punt de restricció *Not*I, respectivament.

Per a la fusió ROL-GFP, es van utilitzar primer els encebadors DR12 i DR6 per amplificar la ROL. El primer DR12 contenia el punt de restricció *Xho*I i el DR6 introduïa la seqüència corresponent al *linker* entre els dos gens. La GFP es va amplificar amb els encebadors DR7 i DR13, que contenien la seqüència del *linker* i del punt de restricció *Not*I.

En un segon pas els productes de la PCR que contenien els gens de la GFP i a ROL es van fusionar utilitzant com a encebadors les regions complementàries del *linker*.

En un tercer pas, es van addicionar els encebadors DR14 i DR15 per amplificar el producte de la fusió de la ROL-GFP i els encebadors DR10 i DR11 per a la reacció de la GFP-ROL.

**Taula 6.1.** Encebadors utilitzats per a la construcció de les fusions dels gens de la ROL i la GFP per SOE-PCR.

Nom	Seqüència	Tm (°C)
DR2	gtagagcggccgccaacagcttcctcgttgatcaaaagtaactca	55.8
DR3	aaattcaccagaaccagcagaaccagcagaaccttgatagttcatccatgccatgtgtaatccc	55.8
DR4	ccaagacgaccaagacgaccaagaccacttaaatctgatgggtaagggtgtgctgctactactg	59.3
DR6	aaattcaccagaaccagcagaaccagcagaaccgaacagcttcctcgttgatca	56.5
DR7	ggttctgctggttctgctggttctggtagaatttagtaaaggagaagaactttcactggagt	53.0
DR9	ctctcgagaaaagagaggctgaagctgaattcatgagtaaaggagaagaactttca	55.5
DR10	gtatctctcgagaaaagagaggctgaagctagtaaaggagaagaact	55.5
DR11	gcggccgcttattacaacagcttcctcgttgatca	56.5
DR12	gtatctctcgagaaaagagaggctgaagctctgatgggtaagggt	56.5
DR13	gcggccgcttattattgtatagttcatccatgccatgtg	56.8
DR14	gtatctctcgagaaaagagaggctgaagct	61.3
DR15	gcggccgcttattattgtatagttcatc	61.2

Els fragments de DNA resultants, GFP-ROL i ROL-GFP, es van tallar utilitzant els punts de restricció del *XhoI* i el *NotI* i es van lligar al plàsmid pPICZFLD $\alpha$  digerit amb aquests enzims.

Una vegada lligats els plàsmids amb cada una de les fusions es van transformar a *E. coli* i els transformants es van seleccionar en plaques de LB amb zeocina (Invitrogen Co., CA, USA). El medi LB contenia: un 1% (p/v) d'extracte de llevat, un 0.5% (p/v) de peptona i un 1% (p/v) de NaCl. Es va extreure el DNA plasmídic de diverses colònies i es va seqüenciar per assegurar la correcta construcció. Els vectors d'expressió que es van obtenir es van linealitzar i es van utilitzar per transformar cèl·lules competents de *P. pastoris* X-33 per electroporació (Cregg & Russell 1989). Els transformants de *P. pastoris* es van seleccionar en plaques d'YPD que contenien zeocina. Per a cada construcció es van seleccionar quatre clons que van ser reinoculats en plaques fresques per assegurar el correcte aïllament de colònies de transformants purs.

### 6.2.3 Medis i condicions de cultiu

Les soques d'*E. coli* es van cultivar en medi LB baix en sals amb  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de zeocina (Invitrogen Co., CA, USA) quan era necessari. Les soques de *P. pastoris* van ser cultivades en medi YPD amb  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de zeocina (Invitrogen Co., CA, USA) quan era necessari.

Els cultius en erlenmeyer es van fer utilitzant medi BMS (*Buffered Minimal Sorbitol medium*) que contenia un 1% (p/v) de sorbitol, 1.34 % (p/v) de YNB sense aminoàcids ni sulfat d'amoni i un 0.4% (p/v) de metilamina hidrocloreada, un  $4\cdot 10^{-5}$  % (p/v) de biotina i també fosfat potàssic 100mM, pH=6.0.

Els cultius en bioreactor es van dur a terme utilitzant un medi mínim de sals amb la següent composició (d'Anjou & Daugulis 2001) per litre de medi:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.8 g;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.88 g;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.144 g; sorbitol, 20 g; metilamina hidrocloreada, 6 g; antiescumejant Mazu DF 7960, 0.1ml; solució de biotina ( $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 1ml i 1 ml de solució de sals traça. La solució de sals traça contenia les següents concentracions:  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mM; KI, 1.25 mM;  $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4.5 mM;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.75 mM;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 17.5 mM i  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 44.5 mM.

La biotina i les sals traça van ser esterilitzades per microfiltració i addicionades al medi un cop ja havia estat esterilitzat tèrmicament. Els inòculs dels cultius en bioreactor van créixer en medi YPD.

Els cultius en erlenmeyer es van realitzar en volums de treball de 50 ml en erlenmeyers de 500 ml. Les condicions de cultiu es van fixar a  $30^\circ\text{C}$  i 200 rpm.

Per a l'inòcul del bioreactor es va utilitzar un volum de 200 ml de cultiu crescut en YPD. La suspensió de cèl·lules es va centrifugar i resuspendre en aigua estèril prèviament a la inoculació.

Els cultius en bioreactor es van dur a terme amb un volum de treball de 1.5 l en un reactor Biostat B (Braun Biotech, Melsungen, Alemanya) de 2 litres i a unes condicions de temperatura i agitació de  $30^\circ\text{C}$  i 800 rpm, respectivament. El pH es va mantenir a 5.5 amb addició de KOH, 5M. L'aeració es va mantenir a  $2 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$  i es va assegurar una concentració mínima d'oxigen dissolt del 30% de la de saturació.

### 6.2.4 Anàlisi del sorbitol

El sorbitol es va mesurar amb un cromatògraf líquid HP 1050 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipat amb una columna d'intercanvi iònic Aminex HPX-87H (BioRad, , CA, USA). La fase mòbil era àcid sulfúric 15mM. Les dades resultants es van quantificar mitjançant el programari Millennium 2.15.10 (Waters Corporation, , Mildford, MA, USA). La desviació estàndard relativa (RSD) de l'anàlisi era del 3%.

### 6.2.5 Mesures fluorimètriques

La fluorescència de la proteïna de fusió de ROL amb la GFP de mostres de sobrenedant i cèl·lules es va mesurar mitjançant l'espectrofluorímetre Perkin Elmer LS55 (PerkinElmer Ltd., Beaconsfield, UK) equipat amb un làmpada de xenó.

La fluorescència de la GFP intracel·lular i l'autofluorescència cel·lular es van mesurar després de centrifugar les cèl·lules a 12000 rpm utilitzant una centrifuga refrigerada (Biofuge Fresco Refrigerated Microcentrifuge, Heraeus, Langenselbold, Alemanya). El sobrenedant es va separar per posteriors anàlisis i les cèl·lules es van resuspendre en tampó fosfat 50mM, pH=7.0, per assegurar les condicions òptimes per a l'anàlisi de la GFP (Patterson *et al.* 1997).

Les cèl·lules es van excitar a una longitud d'ona de 460 nm mentre que els sobrenedants a 489 nm. Per a les cèl·lules es va utilitzar la  $\lambda$  de 460 nm per permetre una millor visualització de la fluorescència de la GFP, que quedava parcialment solapada per la llum d'excitació quan s'utilitzava la longitud d'ona òptima per a la variant de la GFP. L'emissió es va enregistrar des de 480 fins a 600 nm. Es va mesurar la intensitat del màxim del pic de fluorescència i es va utilitzar aquesta dada per a càlculs posteriors. Els màxims de fluorescència estaven situats a 510 nm i 520 nm per a la GFP i l'aparent senyal de riboflavina, respectivament.

Durant les anàlisis la temperatura de la mostra es va mantenir a 20°C. Es va utilitzar tampó fosfat 50 mM si era necessari diluir la mostra.

Es van utilitzar unitats d'ultrafiltració per centrifuga (Amicon Ultra-15, Millipore, MA, USA) amb una membrana amb un tall de 10KDa per separar la proteïna de fusió dels components de baix pes molecular del sobrenedant.

### 6.2.6 Anàlisis SDS-Page i Western Blot

Els gels de proteïnes de poliacrilamida sodi dodecil sulfat (SDS) al 12% es van dur a terme en un unitat Mini-Protean II (BioRad, CA, USA). Els Western Blots es van portar a terme després de la transferència de la proteïna des del gel SDS-Page a una membrana de nitrocel·lulosa utilitzant una cèl·lula de transferència electroforètica Mini Trans-Blot (BioRad, CA, USA). Per a la detecció de la ROL es va utilitzar un anticòs de rata anti-ROL (Resina *et al.* 2005) a una dilució de 1:1000. Per a la detecció de la GFP es va utilitzar un anticòs de conill anti-GFP (Sigma, St. Louis, USA) a una dilució 1:500. Com a anticossos secundaris per a la detecció de ROL i GFP es van utilitzar respectivament anticossos anti-rata i anti-conill conjugats a peroxidasa (Sigma, St. Louis, USA). La detecció es va dur a terme utilitzant el substrat quimioluminiscent *SuperSignal West Pico* (Pierce, IL, USA) i es va recollir el senyal sobre film fotogràfic.



Per a la realització de les determinacions per Western Blot es van concentrar les mostres 10 vegades mitjançant filtres de centrifuga Amicon Ultra-15 (Millipore, MA, USA).

## 6.3 Resultats

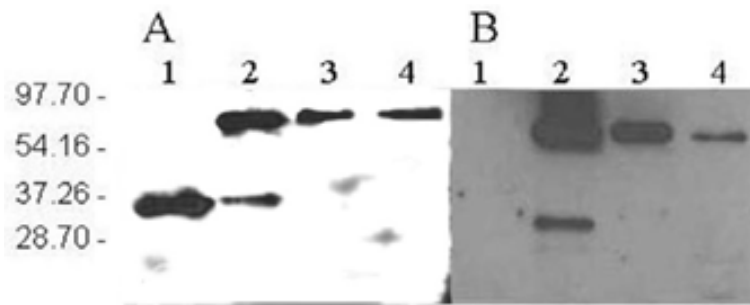
### 6.3.1 Construcció, aïllament de transformants i estudis d'expressió

Es disposava d'estudis previs d'expressió de la variant de GFP escollida fusionada a la lipasa 1 de *C. rugosa* (Passolunghi *et al.* 2003). Aquells resultats mostraven que la fusió de la GFP a l'extrem N-terminal donava millors nivells d'expressió que quan estava fusionada a l'extrem C-terminal. No obstant, aquest resultat són dependents de cada proteïna de fusió expressada i, per aquest motiu, es van construir les dues fusions GFP-ROL (N-terminal) i ROL-GFP (C-terminal). La GFP va ser fusionada a l'extrem N- i C-terminal de la ROL per SOE-PCR, tal i com es detalla a l'apartat 6.2.2. Un cop obtingudes les seqüències correctes es van insertar al vector d'expressió pPICZFLD $\alpha$ . Es van transformar els vectors que contenien cada una de les construccions a cèl·lules competents de *P. pastoris* X-33. Els transformants es van seleccionar en plaques de YPD amb zeocina.

Es van seleccionar cinc clons de X-33+pPICZFLD $\alpha$ GFP-ROL i cinc de X-33+pPICZFLD $\alpha$ ROL-GFP, que es van cultivar en erlenmeyers amb medi BMS amb metilamina com a substrat inductor. Es va estudiar l'expressió extracel·lular de la proteïna de fusió en comparació amb la soca control X33-pPICZFLD $\alpha$ ROL (Resina *et al.* 2004).

Els transformants que expressaven la fusió ROL-GFP van mostrar uns nivells d'activitat lipolítica extracel·lular 4 vegades inferiors als dels clons expressant la GFP-ROL ( $0.006 \pm 0.005 \text{ AU} \cdot \text{OD}^{-1}$  versus  $0.023 \pm 0.012 \text{ AU} \cdot \text{OD}^{-1}$ ). D'altra banda en tots els clons testats, els nivells d'expressió de la proteïna de fusió, en unitats d'activitat lipolítica extracel·lular, eren almenys 10 vegades inferiors als nivells mesurats per la soca control ( $0.284 \pm 0.053 \text{ AU} \cdot \text{OD}^{-1}$ ). Aquestes diferències en els nivells d'expressió es van confirmar també en anàlisis SDS-PAGE (dades no mostrades).

Es van realitzar anàlisis Western Blot per avaluar la qualitat de la proteïna de fusió secretada. Els sobrenedants analitzats provenien de mostres a les 66h de cultiu en erlenmeyer de clons expressant tant la fusió GFP-ROL com la ROL-GFP (Figura 6.1.). Per a cada construcció es va cultivar el clon que havia donat els valors més alts en les estudis dels nivells d'expressió.



**Figura 6.1.** Anàlisi Western Blot de sobrenedants de cultius en bioreactor i erlenmeyer de les soques que expressen les construccions GFP-ROL i ROL-GFP. Com a control s'ha utilitzat la soca que expressa la ROL sota l'acció del promotor FLD. Western Blots utilitzant els anticossos anti-ROL (A) i anti-GFP (B). Carril1: Control positiu de ROL; carril 2: sobrenedant del clon GFP-ROL 1.5.5; carril 3: sobrenedant del clon ROL-GFP 2.15.2; carril 4: sobrenedant d'una mostra de cultiu en bioreactor del clon GFP-ROL.

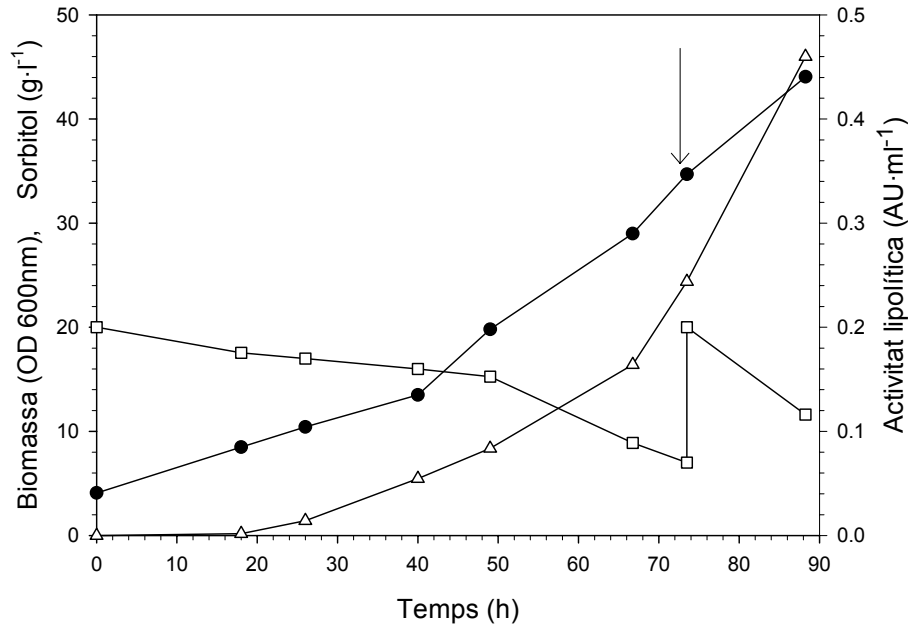
En els sobrenedants de les mostres que expressen les dues construccions de la proteïna de fusió s'hi pot observar una proteïna de 60 KDa, que correspon a la fusió. No obstant això, en els sobrenedants de la soca que expressa la construcció GFP-ROL, s'hi observa una banda a uns 30KDa, que correspon probablement a la degradació proteolítica de la proteïna de fusió en les seves dues unitats, la GFP i la ROL tenen pesos moleculars similars d'aproximadament 30 kDa. Per contra, no es va observar degradació en les mostres de la construcció ROL-GFP.

Un cop avaluats tots aquests resultats es va escollir el transformant de X-33+pPICZFLDαGFP-ROL amb un nivell d'expressió més alt per a posteriors estudis. Aquests resultats concorden amb els estudis publicats per Passolunghi i col·laboradors (Passolunghi *et al.* 2003) en què la fusió de la GFP a l'extrem N-terminal de la lipasa resultava en uns nivells d'expressió millors que quan estava fusionada a l'extrem C-terminal. A diferència d'aquest treball, els nivells obtinguts amb la fusió GFP-ROL no són comparables als de la lipasa sense fusionar.

### 6.3.2 Monitoratge dels nivells de fluorescència extracel·lular de la GFP en cultius en bioreactor

Es va realitzar un cultiu discontinu en bioreactor amb el clon de X-33+pPICZFLDαGFP-ROL seleccionat. Paral·lelament, es va realitzar un cultiu discontinu amb la soca control X-33+pPICZFLDαROL en erlenmeyers. La Figura 6.2. mostra l'evolució de les principals variables del procés durant el cultiu discontinu amb

la soca que expressa la fusió GFP-ROL. La fletxa indica el moment en què es va addicionar  $13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sorbitol addicional per allargar el cultiu i la producció de la proteïna de fusió fins a nivells superiors.



**Figura 6.2.** Evolució de les principals variables durant un cultiu discontinu de *P. pastoris* expressant la proteïna de fusió GFP-ROL sota el control del promotor FLD1. Com a font de carboni es va utilitzar sorbitol i la metilamina va ser emprada com a agent inductor de l'expressió de la proteïna heteròloga i com a font de nitrogen. La fletxa indica l'addició de  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sorbitol. (●) Biomassa, concentració de sorbitol (□) i activitat lipolítica extracel·lular (Δ).

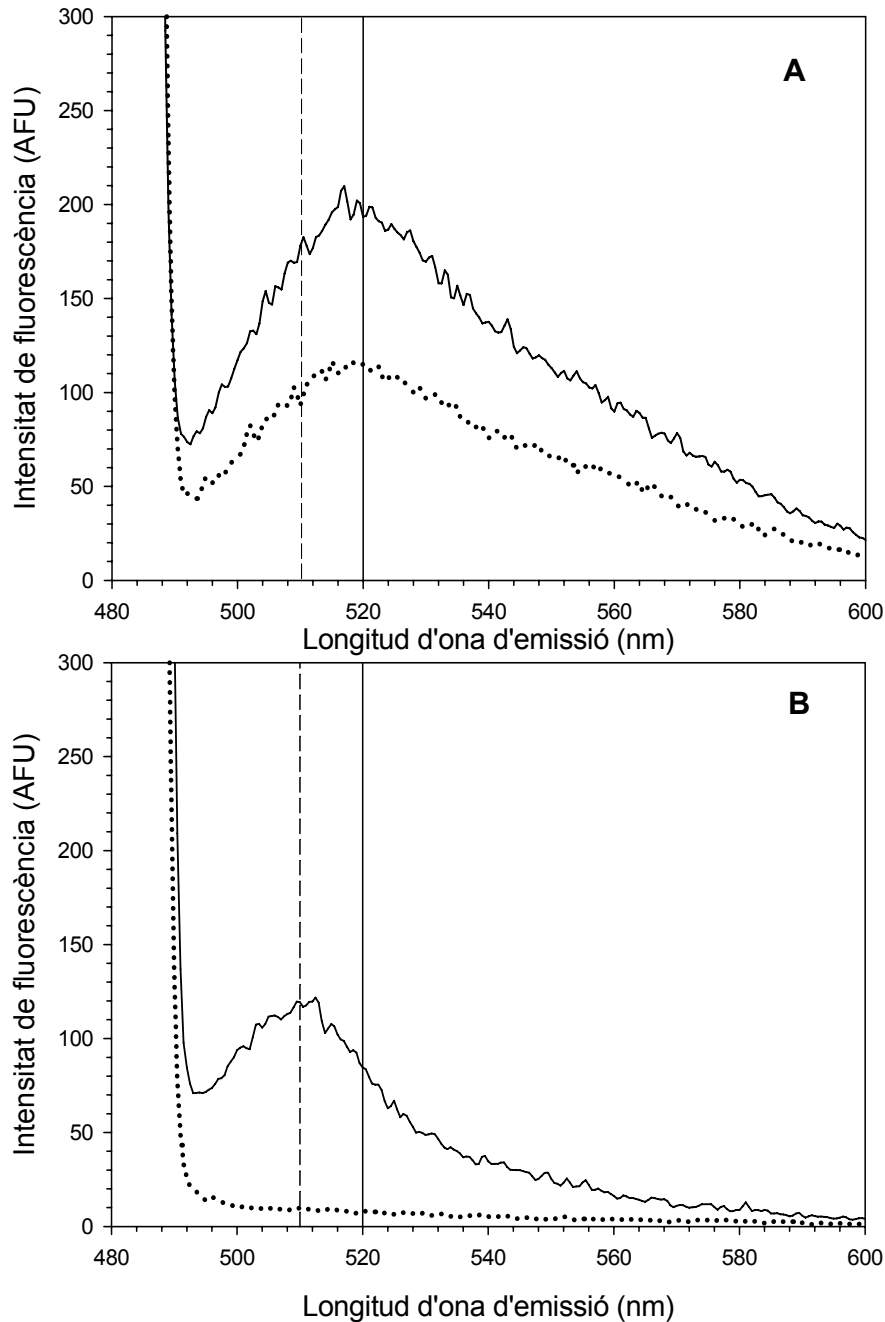
Contràriament al que havia succeït en els cultius en erlenmeyer, no es va observar degradació proteolítica de la proteïna de fusió (Figura 6.1, carril 4). Aquest fet pot ser degut a l'existència d'unes condicions de cultiu més controlades en el creixement en bioreactor (pH, aeració i substrat).

L'activitat lipolítica extracel·lular observada era inferior a l'obtinguda en cultius en discontinu de sorbitol/metilamina d'aquesta soca expressant la ROL sense estar fusionada (Resina *et al.* 2004). Malgrat aquest fet, les fusions de la GFP es van avaluar com a eines potencials per al monitoratge *on-line* de l'expressió extracel·lular de la proteïna. En el Capítol 5 del present document s'havia evidenciat la necessitat de disposar d'un senyal específic per a la proteïna expressada, ja que la que provenia del triptòfan no permetia una bona estimació dels nivells de producció de ROL obtinguts. Per aquest motiu es va mesurar la fluorescència de la GFP en sobrenedants de

mostres del cultiu, a partir de l'espectre d'emissió recollit quan s'excitava la mostra a 489 nm. En aquests espectres apareixia un pic a 520 nm però ho feia tant en les mostres de cultiu on s'expressava la fusió GFP-ROL com en els sobrenedants de les mostres control (on només s'expressava la ROL sota l'efecte del promotor FLD). En tots dos cultius la intensitat màxima del pic a 520 nm augmentava amb el temps de cultiu. Es va comprovar que la ROL no presentava cap fluorescència a la longitud d'ona d'excitació utilitzada (dades no mostrades). Aquestes dades apuntaven que *P. pastoris* secretava un producte fluorescent associat a creixement amb un espectre d'excitació i emissió molt semblant al de la GFP S65T.

Les dades presentades als Capítols 4 i 5 del present document, mostren que la riboflavina (la vitamina B2) té un màxim de fluorescència entorn dels 450/530 nm d'excitació/emissió (Figura 4.3). Així mateix, el seu senyal s'ha utilitzat per a la predicció de la biomassa, ja que l'evolució del seu senyal està associat al creixement (Figures 5.4 i 5.6 del Capítol 5). La riboflavina és un precursor per a la síntesi de coenzims com el dinucleòtid d'adenina i de flavina (FAD) i el mononucleòtid de flavina (FMN), que s'utilitzen com a acceptors d'electrons per les oxidoreductases. Alguns llevats, com la *Candida famata*, són utilitzats industrialment per a la producció de riboflavina (més de 20 g·l<sup>-1</sup>) (Stahmann *et al.* 2000). Els resultats obtinguts suggereixen que el senyal de la riboflavina podria solapar-se amb la de la GFP en mostres de sobrenedants. Sorprenentment, no es va detectar un senyal de riboflavina significatiu en mostres de cèl·lules resuspeses en solució tampó. Hisiger i Jolicoeur (Hisiger & Jolicoeur 2005) van observar aquest mateix inconvenient en la utilització de la GFP com a marcador de l'expressió intracel·lular de proteïnes en *P. pastoris*. Recentment, Ganzlin i els seus col·laboradors (Ganzlin *et al.* 2007) han reportat la interferència d'un fluoròfor de característiques espectrals semblants a les flavines en el seguiment de la producció de GFP S65T durant cultius discontinus alimentants amb el fong *Aspergillus niger*.

Per confirmar aquesta hipòtesi i separar la riboflavina dels sobrenedants, aquests es van filtrar utilitzant una membrana de 10 KDa de tall. Les fraccions ultrafiltrades i retingudes es van analitzar per espectrofluorimetria. La Figura 6.3A mostra la fracció permeada a 10 KDa mentre que la Figura 6.3B mostra la fracció retinguda.



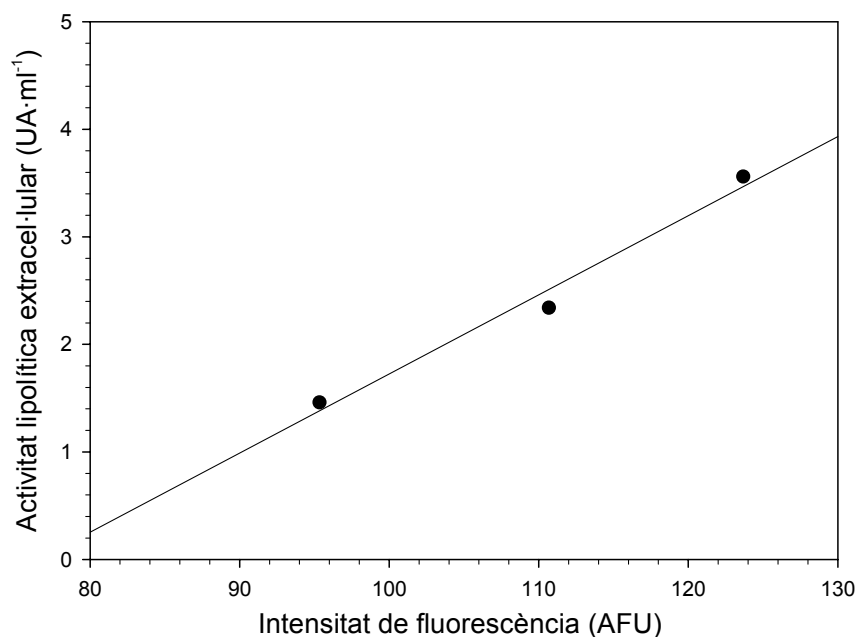
**Figura 6.3.** Espectre d'emissió de les fraccions filtrades (A) i retingudes (B) de mostres de sobrenedants filtrats a 10KDa. (····) correspon al senyal obtingut d'una mostra de la soca control i (—) correspon a una mostra de cultiu de la soca expressant la fusió GFP-ROL. Les mostres van ser excitées a una longitud d'ona de 489 nm.

Tal i com s'esperava les fraccions filtrades (tant de la soca control com de la soca expressant la fusió amb la GFP) mostraven un pic d'emissió a 520 nm, quan s'excitaven a 489 nm. Aquest pic és el que probablement correspon a la riboflavina. Per contra, en la fracció retinguda del sobrenedant de la soca GFP-ROL, apareix un nou pic amb un màxim a 510 nm. Aquesta longitud d'ona correspon a l'esperada per

l'espectre d'emissió de la GFP S65T. Aquestes dades demostren que es pot mesurar la fluorescència extracel·lular de la GFP en sobrenedants clarificats després d'un procés d'ultrafiltració.

També es va provar l'efecte del medi de cultiu sobre el senyal de fluorescència de la GFP. Es va resuspendre la fracció retinguda a 10KDa amb medi de cultiu fresc i tampó fosfat 50 mM, pH=7.0. L'emissió de les dues mostres va revelar que el senyal de la GFP és menor quan està resuspesa en medi de cultiu (dades no mostrades) degut al menor pH del medi (pH=5.5). Aquest aspecte ja havia estat descrit anteriorment (Patterson *et al.* 1997).

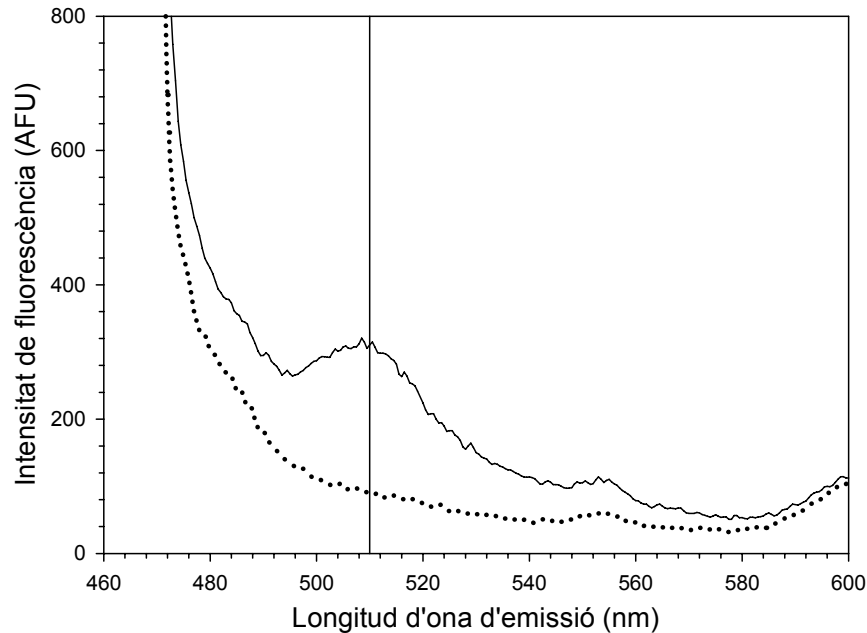
La fluorescència de la GFP i l'activitat lipolítica extracel·lulars es correlacionen linealment (Figura 6.4), fet que demostra el potencial de les fusions amb GFP per monitorar de manera *on-line* la secreció de proteïnes heteròlogues en cultius de *P.pastoris*, fins i tot quan els nivells de secreció són baixos.



**Figura 6.4.** Correlació entre l'activitat lipolítica i la intensitat màxima de fluorescència de la GFP en mostres de sobrenedants ultrafiltrats. L'excitació de les mostres es va realitzar a 489 nm i la intensitat màxima de l'espectre d'emissió a 510 nm.

Paral·lelament a les anàlisis de fluorescència extracel·lular es van realitzar mesures de fluorescència intracel·lular. Les mostres de cultiu van ser centrifugades i resuspeses en tampó fosfat (Apartat 6.2.5). En l'anàlisi del senyal intracel·lular no es van detectar interferències amb la riboflavina, ja que no s'observava senyal d'aquest fluoròfor intracel·lular en les mostres control. No obstant això, la longitud d'ona

d'excitació es va desplaçar dels 489 nm òptims a 460 nm, per evitar la interferència de la mateixa llum d'excitació en l'espectre d'emissió de la GFP. La Figura 6.5 mostra el senyal obtingut en l'anàlisi de cèl·lules control i expressant la proteïna de fusió.

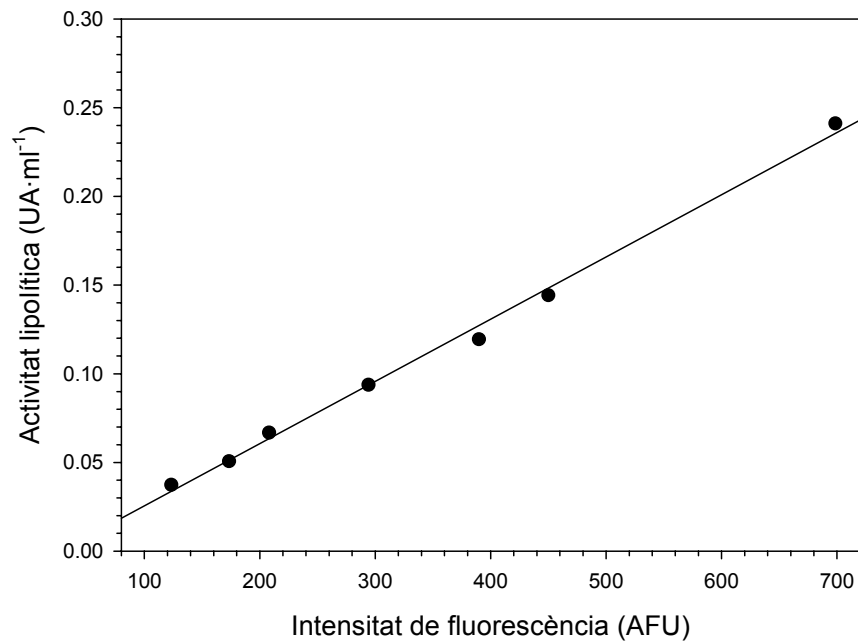


**Figura 6.5.** Espectre d'emissió de les cèl·lules resuspeses en tampó. (---) correspon al senyal obtingut de cèl·lules de la soca control i (—) correspon a les cèl·lules de la soca expressant la fusió GFP-ROL. Les mostres van ser excitées a una longitud d'ona de 460 nm.

Tal i com es pot observar el senyal de la GFP es podria utilitzar per a la detecció de l'expressió intracel·lular de proteïna.

Així mateix es va analitzar l'activitat lipolítica intracel·lular i es va correlacionar amb la intensitat màxima d'emissió obtinguda en els sobrenedants obtinguts després de la disrupció cel·lular (Figura 6.6). De manera similar a les condicions extracel·lulars els resultats indiquen que es podria utilitzar el senyal de la GFP per correlacionar-lo amb l'activitat lipolítica.

D'altra banda es va estudiar la localització de la GFP intracel·lular mitjançant tècniques de citometria de flux i microscòpia confocal. Els resultats obtinguts (Resina 2006) mostren l'acumulació de la fluorescència en orgànuls subcel·lulars, indicant que la secreció podria ser un dels principals colls d'ampolla en l'expressió de la proteïna de fusió. Aquests resultats estan en concordança amb altres dades aparegudes anteriorment (Li *et al.* 2002; Zupan *et al.* 2004).



**Figura 6.6.** Correlació entre l'activitat lipolítica i la intensitat màxima de fluorescència de la GFP en sobrenedants centrifugats de cèl·lules trencades per disrupció cel·lular. L'excitació de les mostres es va realitzar a 489 nm i la intensitat màxima de l'espectre d'emissió a 510 nm.

## 6.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha estudiat la idoneïtat d'utilitzar les fusions de la ROL amb la GFP per al monitoratge *on-line* de l'expressió de la proteïna mitjançant tècniques de fluorimetria multivariable. D'acord amb els resultats es conclou que:

- La fusió de la ROL amb la GFP ha resultat en uns nivells d'expressió extracel·lulars 10 vegades inferiors que la soca control. Aquesta disminució dels nivells d'expressió també ha estat observada en d'altres casos en *P. pastoris* (Passolunghi *et al.* 2003) i en *S. cerevisiae* (Li *et al.* 2002).
- De les dues construccions obtingudes, la que presentava uns millors nivells d'expressió era aquella on s'havia fusionat la GFP per l'extrem N-terminal de la ROL.
- En mesurar la fluorescència de la GFP en sobrenedants s'ha descobert una espècie interferent, possiblement la riboflavina. El senyal d'aquest fluoròfor cel·lular es solapa amb la de la GFP dificultant una mesura directa del senyal d'interès.



- La interferència al medi extracel·lular es pot eliminar ultrafiltrant el sobrenedant. La fluorescència mesurada en aquestes condicions està en correlació amb l'activitat lipolítica extracel·lular. No obstant això, la necessitat d'aquesta separació impossibilita utilitzar aquesta tècnica per al monitoratge in situ de la fluorescència de la GFP com a reporter de l'expressió de la proteïna heteròloga.
- La variant de GFP emprada en aquest estudi introdueix una sèrie de limitacions a la tècnica que podrien ser evitades utilitzant un altre mutant de GFP. Els mutants amb fluorescència desplaçada a la zona del vermell o aquells, com la GFPuv, amb una longitud d'ona d'excitació entorn dels 395 nm (Cha *et al.* 2005) poden representar una millor opció per prevenir la interferència de la riboflavina.
- La disminució dels nivells d'expressió en expressar aquest tipus de proteïnes de fusió pot representar un inconvenient a l'hora d'utilitzar aquesta tècnica per al monitoratge de la producció de proteïna heteròloga. No obstant això, no cal oblidar que aquest comportament és molt dependent de cada aplicació (Passolunghi *et al.* 2003).
- La fusió de la proteïna d'interès amb la GFP permet el seguiment de la proteïna intracel·lular i la detecció de possibles colls d'ampolla en la secreció del producte.
- El treball desenvolupat en aquest capítol s'ha realitzat en una soca de *P. pastoris* que expressava la ROL sota l'acció del promotor FLD. Els resultats obtinguts són extrapolables a qualsevol soca de *P. pastoris*.
- Tots aquests aspectes, en conjunció amb els resultats presentats en el capítol 5 fan que, amb la introducció d'algunes millores, es pogués disposar d'una tècnica que permetés monitorar en línia les principals variables del procés mitjançant fluorimetria multivariable acoblada a mètodes quimiomètrics.

## 6.5 Referències bibliogràfiques

- Albano,C.R., Randers-Eichhon,L., Chang,Q., Bentley,W.E. & Rao,G. 1996. Quantitative measurement of green fluorescent protein expression. *Biotechnology Techniques*, 10, 953-958.
- Bartolome,A.J., Ulber,R., Scheper,T., Sagi,E. & Belkin,S. 2003. Genotoxicity monitoring using a 2D-spectroscopic GFP whole cell biosensing system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 89, 27-32.
- Cha,H.J., Shin,H.S., Lim,H.J., Cho,H.S., Dalal,N.N., Pham,M.Q. & Bentley,W.E. 2005. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. *Biochemical Engineering Journal*, 24, 225-233.
- Cregg,J.M. & Russell,K.A. 1989. Transformation. In: *Pichia* Protocols (Ed. by D.R.Higgins & J.M.Cregg) London: Humana Press.
- d'Anjou,M.C. & Daugulis,A.J. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 1-11.
- Eiden-Plach,A., Zagorc,T., Heintel,T., Carius,Y., Breinig,F. & Schmitt,M.J. 2004. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 961-966.
- Ganzlin,M., Marose,S., Lu,X., Hitzmann,B., Scheper,T. & Rinas,U. 2007. *In situ* multi-wavelength fluorescence spectroscopy as effective tool to simultaneously monitor spore germination, metabolic activity and quantitative protein production in recombinant *Aspergillus niger* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 132, 461-468.
- Hisiger,S. & Jolicoeur,M. 2005. A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of Biotechnology*, 117, 325-336.
- Horton,R.M., Hunt,H.D., Ho,S.N., Pullen,J.K. & Pease,L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes - Gene-splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-68.
- Jones,J.J., Bridges,A.M., Fosberry,A.P., Gardner,S., Lowers,R.R., Newby,R.R., James,P.J., Hall,R.M. & Jenkins,O. 2004. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *Journal of Biotechnology*, 109, 201-211.
- Li,J.C., Xu,H.X., Bentley,W.E. & Rao,G. 2002. Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 18, 831-838.
- Lu,C., Albano,C.R., Bentley,W.E. & Rao,G. 2002. Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 429-437.
- Passolunghi,S., Brocca,S., Cannizzaro,L., Porro,D. & Lotti,M. 2003. Monitoring the transport of recombinant *Candida rugosa* lipase by a green fluorescent protein-lipase fusion. *Biotechnology Letters*, 25, 1945-1948.

- Patterson,G.H., Knobel,S.M., Sharif,W.D., Kain,S.R. & Piston,D.W. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 73, 2782-2790.
- Peckham,G.D., Bugos,R.C. & Su,W.W. 2006. Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures. *Protein Expression and Purification*, 49, 183-189.
- Querido,E. & Chartrand,P. 2008. Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. In: *Methods in Cell Biology Fluorescent Proteins* (Ed. by F.S.Kevin), pp. 273-292. Academic Press.
- Reischer,H., Schotola,I., Striedner,G., Potschacher,F. & Bayer,K. 2004. Evaluation of the GFP signal and its aptitude for novel on-line monitoring strategies of recombinant fermentation processes. *Journal of Biotechnology*, 108, 115-125.
- Resina,D. 2006. Expression of the *Rhizopus Oryzae* lipase in *Pichia Pastoris* under the control of the *FLD1* Promoter. Tesi doctoral.
- Resina,D., Cos,O., Ferrer,P. & Valero,F. 2005. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 760-767.
- Resina,D., Serrano,A., Valero,F. & Ferrer,P. 2004. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *Journal of Biotechnology*, 109, 103-113.
- Stahmann,K.P., Revuelta,J.L. & Seulberger,H. 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 509-516.
- Waldo,G.S., Standish,B.M., Berendzen,J. & Terwilliger,T.C. 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 17, 691-695.
- Zimmer,M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102, 759-781.
- Zupan,A.L., Trobec,S., Gaberc-Porekar,V. & Menart,V. 2004. High expression of green fluorescent protein in *Pichia pastoris* leads to formation of fluorescent particles. *Journal of Biotechnology*, 109, 115-122.



# 7

**Estudi de l'efecte de la concentració de metanol sobre la producció de ROL en cultius discontinus alimentats i avaluació d'estratègies de producció alternatives en soques de fenotip Mut<sup>+</sup>**

7.1 Introducció .....	147
7.2 Materials i mètodes.....	153
7.2.1 Inòcul .....	153
7.2.2 Medi de cultiu per al discontinu i condicions d'operació. ....	153
7.2.3 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants (MNLFB, en sigles angleses) .....	154
7.2.4 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions limitants (MLFB, en sigles angleses) .....	154
7.2.5 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions de temperatura limitant (TLFB, en sigles angleses) .....	155
7.2.6 Determinació del metanol .....	155
7.2.7 Mesures per citometria de flux.....	156
7.2.8 Assaig d'activitat d' AOX.....	156
7.3 Resultats .....	157
7.3.1 Estudi de la producció de ROL en cultius discontinus alimentats a diferents concentracions de metanol residual .....	157
7.3.2 Efecte de la inducció amb metanol sobre la viabilitat cel·lular.....	167
7.3.3 Evolució de l'activitat intracel·lular d'alcohol oxidasa durant la fase d'inducció amb metanol. ....	171
7.3.4 Avaluació de tècniques de producció alternatives: La limitació per temperatura i la utilització d'un medi de cultiu de menor osmolaritat. ....	172
7.3.4.1 Anàlisi dels nivells d'activitat intracel·lulars d'AOX aplicant les diferents estratègies de cultiu. ....	180
7.3.5 Avaluació de la puresa del producte quan s'utilitzen estratègies alternatives d'operació. ....	181
7.4 Conclusions .....	182
7.5 Referències bibliogràfiques .....	184

## 7.1 Introducció

Un dels objectius d'aquest treball és el de millorar la producció de la ROL en el sistema de *P. pastoris*. Fins al moment s'han avaluat algunes tècniques per fer el seguiment en línia de diferents variables de cultiu.

Tot i que l'aplicació de la fluorimetria 2D en cultius discontinus s'ha mostrat com una eina adient de monitoratge, la seva aplicació en cultius discontinus alimentats s'ha de desenvolupar. Per aquest motiu, per a la millora de l'estratègia de cultiu es va aplicar un seguiment en línia del metanol i es van realitzar determinacions *off line* de la resta de variables.

Avui en dia, un nombre creixent de proteïnes estan sent produïdes en el sistema d'expressió de *P. pastoris*. Per aquest motiu és necessari estudiar, comparar i millorar les diferents estratègies de producció amb aquest sistema (Zhang *et al.* 2005). Aquesta optimització pot portar-se a terme des de dues perspectives diferents: la genètica i l'operacional.

D'una banda hi ha molts factors genètics i fisiològics que poden afectar la productivitat d'un sistema recombinant (Hohenblum *et al.* 2004). Alguns possibles colls d'ampolla són: els codons del gen d'expressió, el nombre de còpies del gen, una transcripció eficient utilitzant promotors forts, la translocació determinada pel pèptid senyal, el processament i plegament al reticle endoplasmàtic (ER, en sigles angleses) i al Golgi, la secreció i la possible proteòlisi de la proteïna. Tal i com s'ha exposat a la introducció general, per al cas concret de *P. pastoris* poden estudiar-se diversos d'aquests aspectes com serien l'efecte de diferents promotors, diferents fenotips, nombre de còpies del gen d'interès i soques amb diferents delecions.

Pel que fa a la vessant operacional, es poden aplicar també diferents estratègies. Se n'han aplicat moltes de diferents però és difícil fer-ne una comparació ja que difícilment s'apliquen diverses estratègies per a la producció d'una mateixa proteïna (Cos *et al.* 2006b). L'estudi presentat en aquest capítol es centrarà en les estratègies definides per a soques amb el promotor *pAOX* de fenotip Mut<sup>+</sup>, on l'addició de metanol és clau per a la resposta del sistema, i compararà l'eficàcia d'algunes d'elles per a la producció de ROL.

Les primeres estratègies de cultiu per al sistema de *P. pastoris* van ser les indicades al manual de fermentacions de l'empresa Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EEUU) on es recomana una estratègia basada en el senyal d'oxigen dissolt (DOT) del medi. Si el metanol està limitant, l'oxigen dissolt augmenta considerablement de manera que es pot incrementar l'alimentació fins que el senyal baixa a la consigna

desitjada. D'aquesta manera es manté una concentració de metanol al medi per sota dels límits de detecció i el cultiu està en condicions limitants de font de carboni (Jahic *et al.* 2003a). Aquest esquema de control però presenta inconvenients: si la concentració de metanol assolís valors elevats i inhibitoris, la DOT augmentaria i la resposta del sistema seria la d'alimentar més substrat, amb el probable assoliment de concentracions de substrat inhibidores.

Altres estratègies de cultiu utilitzen esquemes de control en llaç obert amb alimentació exponencial de metanol. D'aquesta manera es pretén mantenir una velocitat específica de creixement determinada durant la fase d'inducció en condicions limitants de metanol. Amb aquesta estratègia en llaç obert poden donar-se desviacions importants dels valors finals esperats de biomassa i producte, en tractar-se d'alimentacions preprogramades d'acord a paràmetres prefixats teòrics del cultiu (Gnoth *et al.* 2007). A la bibliografia hi ha alguns exemples d'estudis on es combinen cultius realitzats amb alimentació exponencial de metanol a  $\mu$  constants i d'altres cultius en condicions de metanol en excés. És notable destacar que en alguns d'aquests treballs s'observa un efecte d'inhibició per substrat (Zhang *et al.* 2000; Kobayashi *et al.* 2000), i en d'altres casos no (Curvers *et al.* 2001). En aquest últim treball, però, només s'arriba a concentracions de metanol residual de fins a 4 g·l<sup>-1</sup> i aquest fet pot impossibilitar la visualització de l'efecte inhibitor del substrat.

També han estat estudiades altres opcions d'alimentació basades en l'addició mixta de substrats. Majoritàriament s'aplica a soques Mut<sup>s</sup>, malgrat que també hi ha alguns exemples on s'ha aplicat a fases d'inducció de soques Mut<sup>t</sup>. Generalment es coalimenten metanol i glicerol (d'Anjou & Daugulis 2001), tot i que han aparegut resultats prometedors amb alimentacions mixtes de sorbitol i metanol (Ramon 2007). Es poden trobar diversos exemples d'aquest tipus d'estratègies a les revisions presentades per Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2006b) i Jahic i col·laboradors (Jahic *et al.* 2006b).

Si ens centrem en la fase d'inducció en metanol amb el fenotip Mut<sup>t</sup> apareixen diferents limitacions que restringeixen la productivitat del procés. D'una banda, la transferència d'oxigen apareix com un dels punts clau a la fase final de la inducció a partir de nivells de biomassa al voltant de 60 g·l<sup>-1</sup> en bioreactors de laboratori utilitzant aire. Aquesta limitació és especialment important en el cas de fases d'inducció en condicions de metanol no limitant ja que la demanda metabòlica d'oxigen no pot ser sostinguda per la transferència d'oxigen del sistema d'aeració del bioreactor (Cos *et al.* 2006a). Cal recordar que l'oxigen és essencial en la primera reacció d'assimilació del metanol.



S'han aplicat diferents aproximacions per tal de solucionar aquesta situació. Des de la perspectiva biològica, es poden utilitzar soques amb menor utilització de metanol i que, per tant, redueixen les necessitats d'oxigen (les soques Mut<sup>s</sup> o les basades en promotors alteratius com el *pFLD1*). Des del punt de vista operacional, s'han ideat estratègies alternatives. Jahic *et al.* (Jahic *et al.* 2003b) van aplicar una estratègia de discontinu alimentat amb limitació de temperatura (TLFB, en sigles angleses) que els va permetre millorar la producció i obtenir beneficis complementaris: un increment de la viabilitat cel·lular durant la inducció que els va ajudar a reduir els fenòmens de proteòlisi de la proteïna d'interès. A la bibliografia també s'hi troben diferents exemples de cultius de *P. pastoris* on es cultiva en condicions d'oxigen limitant (Charoenrat *et al.* 2005; Khatri & Hoffmann 2006). D'altra banda, es pot aplicar l'estratègia de metanol limitant (MLFB en sigles angleses) per tal de mantenir la consigna d'oxigen dissolt a un valor predeterminat (Jahic *et al.* 2003a).

En d'altres sistemes d'expressió, es pot millorar la transferència d'oxigen enriquint l'aire amb oxigen pur. En el cas de *P. pastoris* això pot ser crític per qüestions de seguretat degut al caràcter comburent de l'oxigen i la presència d'un substrat altament inflamable, el metanol. Malgrat aquests desavantatges han aparegut alguns exemples a la bibliografia (Curvers *et al.* 2001).

D'altra banda, s'han desenvolupant tècniques d'anàlisi que permeten avaluar l'efecte de la inducció per metanol sobre les cèl·lules. Aquests estudis se centren en l'anàlisi de variables complementàries a les tradicionals com serien la proteòlisi del producte d'interès (Jahic *et al.* 2003a) o la viabilitat del cultiu.

Pel que fa a la proteòlisi del producte d'interès, pot solucionar-se de nou des del punt de vista biològic (amb soques proteases deficientes) o des del punt de vista operacional: amb l'addició de suplementos rics en aminoàcids (Clare *et al.* 1991) o l'aplicació d'estratègies de cultiu alternatives com el TLFB descrit anteriorment. L'addició de complements rics en aminoàcids o peptones pot resultar molt car o dificultar l'eficàcia del procés de recuperació i purificació del producte d'interès.

Quant a la viabilitat del cultiu, és un paràmetre important ja que si es presenten alts valors de mortalitat cel·lular poden presentar-se disminucions de la productivitat i problemes de lisi cel·lular. Aquest fenomen de lisi pot portar a la contaminació del producte extracel·lular d'interès per proteases i a la conseqüent davallada de l'eficiència de la purificació del producte. Així doncs, la viabilitat cel·lular i la proteòlisi del producte d'interès són dos efectes que van molt lligats.

La viabilitat del cultiu s'ha relacionat amb les situacions d'estrès a què poden estar sotmeses les cèl·lules. Mattanovich i col·laboradors (Mattanovich *et al.* 2004) van revisar aquest tema en processos de producció utilitzant llevats i van dividir les situacions d'estrès en dues categories: estrès metabòlic, que es dona quan la maquinària cel·lular es veu saturada durant la sobreexpressió del producte d'interès; i l'estrès ambiental, imposat per les condicions o l'estratègia del cultiu. Aquestes situacions d'estrès poden comportar una reducció de la viabilitat del cultiu amb possibles disminucions de la productivitat. Per aquest motiu és clau avaluar l'evolució de la viabilitat cel·lular durant el procés, especialment si està causat per l'estratègia de cultiu.

A la bibliografia s'han descrit valors elevats de mortalitat cel·lular en cultius de soques Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* durant la fase d'inducció amb metanol (Hohenblum *et al.* 2003; Xiao *et al.* 2006). En ambdós treballs es mesura la viabilitat cel·lular basant-se en una determinació de les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi (PI, en sigles angleses). Aquest reactiu ha estat emprat tradicionalment perquè no pot travessar les membranes citoplasmàtiques intactes. En aquest capítol, addicionalment a les mesures amb PI de viabilitat cel·lular, es presentaran resultats de tincions cel·lulars complementàries utilitzant el *Bis-(1,3-dibutilbarbituric acid) trimethine oxonol* (BOX). El BOX és un reactiu lipofílic, aniònic que s'acumula intracel·lularment quan la membrana citoplasmàtica està despolaritzada i només entra a la cèl·lula quan el transport actiu ha cessat. Per això, si s'utilitza simultàniament una tinció per PI i BOX es poden distingir diferents estats cel·lulars: les cèl·lules sanes (no estan tenyides ni per PI ni per BOX), les cèl·lules mortes (estan tenyides per PI i per BOX) i les cèl·lules malaltes, que només tenen despolaritzada la membrana citoplasmàtica, només es tenyeixen per BOX.

Pel que fa a situacions d'estrès ambiental poden estar motivades per diverses causes. S'ha observat que l'elevada pressió osmòtica del medi estàndard utilitzat per *P. pastoris* (Pichia Fermentation Guidelines, Invitrogen Co., Palo Alto, CA, EEUU) pot incrementar la lisi cel·lular i provocar l'alliberament d'un compost de tipus lipídic al medi de cultiu que evita l'eficaç purificació de la proteïna heteròloga (Brady *et al.* 2001). El medi Invitrogen, que s'utilitza de manera estàndard en cultius discontinus alimentats de *P. pastoris*, conté moltes sals i una conductivitat molt elevada que pot induir aquest tipus de situacions d'estrès. En aquest treball, s'estudiarà quin és l'efecte d'aquesta condició sobre la viabilitat cel·lular i quin efecte té utilitzar medis alternatius amb menys càrrega de sals.

El grup d'investigació ha realitzat fins al moment diferents estudis sobre la producció de la ROL en *P. pastoris* que han tingut en compte les diferents perspectives exposades: la genètica i l'operacional.

Des del punt de vista genètic i en l'àmbit de l'estudi dels promotors s'ha treballat amb dos de diferents: el *pAOX* i el *pFLD1* (Cos *et al.* 2005a), que difereixen entre sí perquè el primer és induïble únicament per font de carboni i el segon tant per la font de carboni com per la font de nitrogen. L'interès d'utilitzar el promotor *pFLD1* rau en poder substituir el metanol com a inductor per amines metilades i així cercar altres fonts de carboni alternatives, com ara el sorbitol. De les conclusions d'aquest treball se'n desprèn que la producció utilitzant el promotor alternatiu és prometedora i que en termes de productivitat i de productivitat específica és tant eficient com el promotor *pAOX*. Malgrat tot, des del punt de vista operacional caldria millorar el monitoratge del sorbitol, substrat utilitzat com a font de carboni en els cultius amb el sistema *pFLD1*. Això permetria poder implementar un esquema de control més òptim i possiblement millorar la producció del sistema.

Quant a la utilització del promotor *pAOX* s'ha treballat també amb la comparació entre diferents fenotips: les soques *Mut<sup>+</sup>* i *Mut<sup>s</sup>*, que difereixen entre sí per la capacitat d'assimilació de metanol que presenten. Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2005b) van presentar un treball on estudiaven l'efecte del fenotip en la producció de la ROL. Van demostrar que malgrat que la soca *Mut<sup>+</sup>* presentava millors valors de productivitat, treballar amb la soca *Mut<sup>s</sup>* presenta més avantatges operacionals ja que simplifica el control de l'operació. El consum de metanol per part de la soca *Mut<sup>s</sup>* és menor i presenta tendències més suaus, d'aquesta manera el control de la consigna de metanol al medi de cultiu a través del cabal d'alimentació de metanol es simplifica. La soca *Mut<sup>+</sup>* presenta valors de velocitat de consum de metanol més grans i controlar la consigna de metanol al medi requereix mètodes en línia de mesura de metanol i una resposta ràpida del sistema de control.

En aquest mateix treball, Cos i col·laboradors (Cos *et al.* 2005b) van estudiar l'efecte que augmentar el nombre de còpies del gen d'interès té sobre la productivitat del procés. En ambdós fenotips estudiats augmentar el nombre de còpies tenia un efecte negatiu en la producció de ROL amb el sistema de *P. pastoris*. Aquest resultat concorden amb d'altres presentats per a la producció de tripsinogen humà en *Pichia* (Hohenblum *et al.* 2004).

Des del punt de vista operacional també s'ha treballat en diferents aspectes. Minning i col·laboradors (Minning *et al.* 2001) van demostrar que una estratègia on el

cabal de metanol s'ajustava per mantenir una concentració de metanol constant era millor que l'estratègia basada en el senyal d'oxigen dissolt per a la producció de la ROL en la soca Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*. Cal considerar que aquest treball s'havia realitzat amb un control manual de la concentració de metanol durant la fase d'inducció. El metanol era determinat *off line* per cromatografia de gasos. Un cop es coneixia la concentració al medi es prenia la decisió de control. El temps de resposta del sistema era, doncs, elevat i es produïen oscil·lacions en la concentració de metanol al medi de cultiu, sobretot en les soques de fenotip Mut<sup>+</sup>. S'ha comentat que una de les variables més estudiades per a l'optimització de la producció de proteïnes recombinants en *P. pastoris* ha estat la concentració de metanol residual al medi de cultiu. D'aquí l'interès en cercar un sistema de monitoratge que permeti mesurar i controlar posteriorment aquesta variable. D'alta banda, en millorar una estratègia de cultiu s'ha de buscar també millorar la productivitat específica i la productivitat del sistema, i d'aquí la importància de poder seguir altres variables del procés com ara la biomassa i la proteïna heteròloga. Un cop estudiades en aquest treball les possibilitats de monitorar aquestes variables de procés mitjançant diferents tècniques cal veure quin paper juguen en l'optimització del sistema de producció.

Els canvis bruscos en la concentració de substrat poden afectar negativament la productivitat (Katakura *et al.* 1998). Un dels objectius fixats era avaluar l'efecte de la concentració de substrat sobre el sistema. Per dur-lo a terme correctament cal una comparació basada en cultius amb un millor control de la concentració de metanol. Per aquest motiu es va implementar un control retroalimentat on es combinava un algorisme de control predictiu amb un controlador proporcional integral associat a una mesura del metanol als gasos de sortida (Cos *et al.* 2006a). Aquesta estratègia es va aplicar a cultius amb la soca Mut<sup>s</sup> i va permetre un control robust de la concentració de metanol en aquests casos. L'estudi de l'efecte de la concentració residual de substrat sobre la producció de la ROL amb aquesta soca suggerien una concentració de metanol residual entorn del 1 g·l<sup>-1</sup> com a la més eficient per aquest fenotip.

Els treballs comparatius realitzats anteriorment amb ambdós fenotips (Cos *et al.* 2005b) indiquen que la producció de ROL no és comparable entre les soques Mut<sup>+</sup> i Mut<sup>s</sup>, encara que s'emprin estratègies de cultiu similars. Aquestes conclusions propicien la necessitat de realitzar un estudi més exhaustiu de l'efecte de la concentració de metanol residual en la producció de ROL amb la soca Mut<sup>+</sup>, en combinació a l'aplicació d'un control predictiu/ retroalimentat (Ramon 2007) que va permetre mantenir la consigna de metanol sense grans fluctuacions.

Adicionalment, s'estudiaran diverses problemàtiques associades a l'operació del procés com són la limitació per transferència d'oxigen i l'efecte en la viabilitat cel·lular. Per tal de solucionar-ho s'aplicaran estratègies de fermentació alternatives i s'estudiarà el seu impacte tant en la producció com en la viabilitat cel·lular. Els resultats s'avaluaran des del punt de vista productiu i de qualitat del producte obtingut. Part d'aquest estudi va ser realitzat en el marc d'una estada de recerca a l'Escola de Biotecnologia del Royal Institute of Technology (Estocolm), sota la supervisió del Prof. Sven-Olof Enfors i el Dr. Mehmedalija Jahic.

## 7.2 Materials i mètodes

### 7.2.1 Inòcul

L'inòcul per als cultius exposats en l'apartat 7.3.4, realitzat en el marc d'una estada d'investigació a l'Escola de Biotecnologia del Royal Institute of Technology, es va realitzar segons s'exposa a continuació.

L'inòcul va créixer en un medi mínim tamponat amb glicerol (BMG, en sigles angleses) que contenia: base nitrogenada de llevat sense aminoàcids,  $13,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ mM}$  de tampó fosfat  $\text{pH}= 6.0$ ,  $100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ; biotina,  $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  i glicerol;  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Les cèl·lules es van fer créixer en  $100 \text{ ml}$  de BMG en un erlenmeyer d' $1 \text{ L}$  a  $200 \text{ rpm}$  i  $30^\circ\text{C}$  fins que la densitat òptica a  $600 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{600}$ , en sigles angleses) va ser equivalent a  $4 \text{ UAbs}$ . Llavors es van utilitzar  $200 \text{ ml}$  d'aquest cultiu per inocular el bioreactor.

La resta de cultius van ser inoculats seguint el protocol descrit a l'apartat 2.3 amb medi YPD.

### 7.2.2 Medi de cultiu per al discontinu i condicions d'operació.

Els cultius exposats a l'apartat 7.3.1. es van realitzar tal i com s'exposa per als cultius discontinus alimentats als apartats 2.4, 2.5 i 2.6 de material i mètodes generals.

Els discontinus alimentats exposats a l'apartat 7.3.4. van ser realitzats en un bioreactor de  $20 \text{ L}$  (Belak Biotech AB, Stockholm). El  $\text{pH}$  va ser controlat a  $5.5$ , amb addició d'amoníac al  $30\%$ . També es va realitzar l'addició de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  per prevenir possible limitacions de font de nitrogen, en la mateixa proporció descrita a l'apartat 2.6.2 de Materials i mètodes generals. Es va mantenir l'agitació a  $1000 \text{ rpm}$  i el cabal d'aire es va anar incrementant fins a un valor límit de  $2 \text{ vvm}$ . La temperatura es va fixar a  $30^\circ\text{C}$  excepte en els cultius en els quals es va aplicar l'estratègia de temperatura

limitant. En aquest cas l'evolució de la temperatura apareix a la gràfica corresponent. Les escumes es van controlar amb l'addició d'antiescumejant A (A5758, Sigma-Aldrich, Stockholm).

Pels cultius exposats a l'apartat 7.3.4, s'han utilitzat dos medis de cultiu diferents. D'una banda el medi estàndard de Invitrogen per *P. pastoris* exposat a l'apartat 2.4.1 de materials i mètodes generals. Aquest medi té una conductivitat inicial de  $40 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . En segon lloc, s'ha utilitzat un medi amb un contingut baix en sals (LSM, en sigles angleses) (Brady *et al.* 2001). Aquest medi conté per litre:  $(\text{NaPO}_3)_6$ , 6.5 g;  $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.23 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 4.55 g;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.73 g; KOH, 1.03 g; glicerol, 40 g i 4.35 ml de solució de sals traça PTM1. L'hexametfosfat de sodi i les sals traça van ser addicionades posteriorment a l'esterilització per temperatura del medi de cultiu mitjançant microfiltració en condicions estèrils. Aquest medi de cultiu alternatiu té una conductivitat inicial de  $12 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Per tal de prevenir una possible deficiència en sals s'addiciona al llarg del cultiu un cabal concentrat de sals per mantenir la conductivitat entorn dels  $8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Aquesta solució concentrada de sals conté per litre: àcid fosfòric 85%, 10 mL;  $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.63 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 45.5 g;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 37.3 g; KOH, 10.3 g; i  $(\text{NaPO}_3)_6$ , 65 g.

La utilització d'aquest medi amb baix contingut de sals està indicada a l'apartat corresponent.

### **7.2.3 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants (MNLFB, en sigles angleses)**

Aquesta estratègia de cultiu està descrita a l'apartat 2.6.2. de materials i mètodes generals. L'addició de metanol es realitza fins que no es pot mantenir l'oxigen dissolt per sobre del 25%.

### **7.2.4 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions limitants (MLFB, en sigles angleses)**

Durant el cultiu en condicions limitants de metanol, el cabal de metanol addicionat al cultiu es regula per mantenir el nivell d'oxigen dissolt per sobre del 25% del valor de saturació. El metanol es manté en condicions limitants, amb concentracions per sota del límit de detecció de l'aparell mesurador de metanol ( $< 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

### 7.2.5 Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions de temperatura limitant (TLFB, en sigles angleses)

L'estratègia de cultiu per temperatura limitant va ser descrita per Jahic i col·laboradors (Jahic *et al.* 2003b). Comença amb un cultiu discontinu de  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol. Un cop esgotada aquest font de carboni s'inicia una fase de transició que consisteix en una addició exponencial de glicerol durant 6h amb una velocitat de creixement fixada a un valor de  $0.16 \text{ h}^{-1}$ . L'anàlisi dels valors d'alcohol oxidasa (AOX) de mostres durant la transició (dades no mostrades) suggereixen que co-alimentar metanol a les últimes hores de la transició millora els nivells d'alcohol oxidasa intracel·lular. Per això, s'alimenta metanol al cultiu progressivament des de la tercera hora de transició. La consigna de metanol s'augmenta en  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  cada mitja hora fins a assolir un valor aproximat de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  al final de la sisena hora de transició. La durada d'aquest fase intermèdia es va fixar per assolir un valor de biomassa al final d'uns  $54 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , valor pel qual s'observa l'aparició de limitacions d'oxigen creixent en metanol pur. L'aeració es fixa al final de la transició a 2 vvm i el cabal d'aire no es modifica durant la resta de la inducció. Al final d'aquest fase, s'inicia la inducció i el metanol s'addiciona al medi de cultiu com a única font de carboni. Durant la inducció el controlador de temperatura està programat per mantenir un nivell d'oxigen dissolt entorn al 25 % del de saturació. Si el nivell d'oxigen dissolt disminueix, la temperatura baixa mentre que puja quan el senyal d'oxigen dissolt està per sobre del valor de consigna. La concentració de metanol al medi de cultiu va ser igualment controlada via anàlisi de gasos de sortida a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

En l'apartat 7.3.4 s'exposa la utilització de l'estratègia TLFB després d'una fase d'inducció MNLFB. En aquest cas totes les condicions es van mantenir de la mateixa manera, excepte la fase de transició, que no es va portar a terme perquè les cèl·lules ja havien estat induïdes durant la fase de MNLFB.

### 7.2.6 Determinació del metanol

En els cultius de l'apartat 7.3.1 el metanol es va determinar tal i com s'exposa a l'apartat 2.5.2.2. de materials i mètodes.

En els cultius de l'apartat 7.3.4, la concentració de metanol del cultiu es va determinar mitjançant anàlisis del gas de sortida (Industrial Emissions Monitor, Type 1311, Brüel & Kjær, Innova, Dinamarca). El mesurador de metanol va ser calibrat amb l'addició de diferents quantitats de metanol al bioreactor que contenia una solució d'1

g·l<sup>-1</sup> de NaCl i que estava a les condicions d'agitació i aeració de treball i a diferents temperatures. El senyal de l'analitzador de gasos és linealment dependent a la concentració de metanol amb un pendent que depèn de la temperatura. Es va realitzar una corba de calibratge per obtenir la concentració de metanol durant els cultius, que es mantenia a la consigna desitjada per mitjà de la regulació de la velocitat d'addició de la bomba del dipòsit de metanol amb un controlador proporcional integral.

### 7.2.7 Mesures per citometria de flux

Per a la quantificació de la viabilitat cel·lular per citometria de flux s'utilitza un citòmetre de flux Partec PAS (Partec GmbH, Münster, Alemanya) equipat amb un làser d'argó de 488-nm. Les mostres del cultiu es dilueixen amb tampó DBS (0.16 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.001 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3). Per a les tincions amb PI i BOX es barregen 25 µl d'una solució estoc de PI (200 µg·ml<sup>-1</sup>) i 10 µl d'una solució de treball de BOX (1 µl d'una solució 10 mg·l<sup>-1</sup> de BOX en dimetilsulfòxid (DMSO); 24 µl d'EDTA 160 mM i 975µl de DBS) a 965 µl de mostra de cultiu diluïda. Després d'agitar generosament la barreja al vòrtex, les cèl·lules s'incuben durant 10 minuts a temperatura ambient.

Les mostres es van analitzar a una velocitat d'uns 1.500 comptatges·s<sup>-1</sup>. Es van considerar uns 50.000 comptatges per mostra. Es calibra el citòmetre amb boles de vidre fluorescents de 3 µm de diàmetre (Standard 05–4008, Partec GmbH, Münster, Alemanya). Les cèl·lules que es tenyeixen amb PI es consideren mortes mentre que les que no estan tenyides es compten com a viables. Així mateix les cèl·lules positives per tinció amb BOX es consideren "malaltes" i les negatives per BOX sanes.

### 7.2.8 Assaig d'activitat d' AOX.

Els assajos de alcohol oxidasa es porten a terme en base al consum d'oxigen en un medi que conté metanol. El protocol està descrit a la bibliografia (Jahic *et al.* 2003b).



## 7.3 Resultats

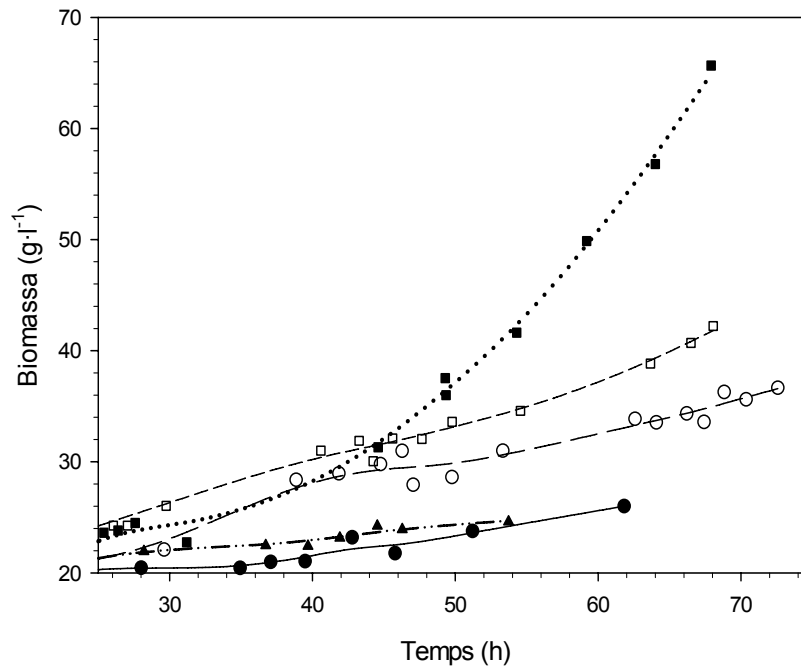
### 7.3.1 Estudi de la producció de ROL en cultius discontinus alimentats a diferents concentracions de metanol residual

Seguint els objectius d'aquest capítol, es van dur a terme cultius discontinus alimentats a diverses concentracions de metanol residual utilitzant la soca Mut<sup>+</sup>.

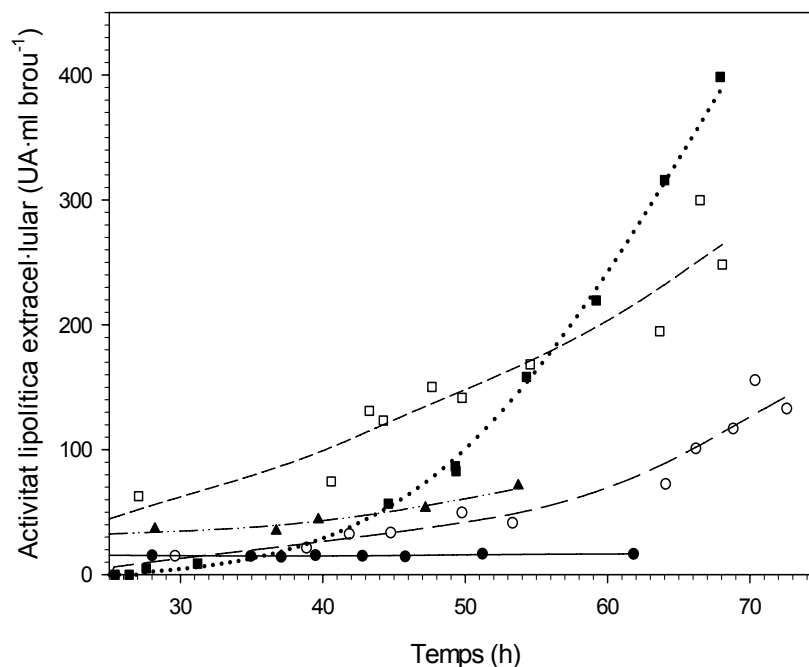
Tal i com s'ha comentat, en alguns treballs publicats s'ha vist que el creixement de *P.pastoris* en metanol segueix una cinètica amb inhibició de substrat. Això implica que la velocitat específica de creixement ( $\mu$ ) augmenta en augmentar la concentració de metanol residual al medi fins a un valor límit de concentració, anomenat concentració crítica, a partir del qual un increment en el substrat residual té un efecte negatiu sobre el creixement i provoca una disminució de  $\mu$ . A la bibliografia han aparegut diversos treballs on s'avalua l'efecte de la concentració de metanol en la producció de diferents proteïnes. La concentració crítica de metanol no és igual en tots els casos: per a la producció del Fragment C de la neurotoxina botulinum Zhang i col·laboradors (Zhang *et al.* 2000) descriuen un valor de  $3.2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com a concentració òptima per al creixement en condicions no inhibides, en canvi en la producció d'albumina de sèrum humà en condicions de metanol no limitant es poden assolir concentracions de fins a  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i la inhibició per substrat encara no s'evidencia (Kobayashi *et al.* 2000).

Degut a aquesta casuística, es fa necessària una avaluació de l'efecte de la concentració de metanol per a cada proteïna heteròloga que es vulgui produir. Així doncs, es van realitzar diversos cultius discontinus alimentats a diferents concentracions de metanol residual. Les gràfiques corresponents a les principals variables d'aquest cultius es troben a l'Apèndix. A continuació es presenta la comparació entre les variables que es consideren importants per tal d'avaluar l'efecte de la concentració de metanol residual a la producció de ROL.

A les figures 7.1 i 7.2 es mostren, respectivament, l'evolució de la biomassa i de l'activitat lipolítica extracel·lular per a cada un d'aquest cultius. Cal esmentar que les representacions gràfiques es faran només durant la fase d'inducció, generalment a partir de les 25 hores de cultiu i fins al final de cada procés. Durant les primeres 25 hores té lloc el creixement discontinu en glicerol i les cinc hores corresponents a la transició d'un substrat a l'altre.



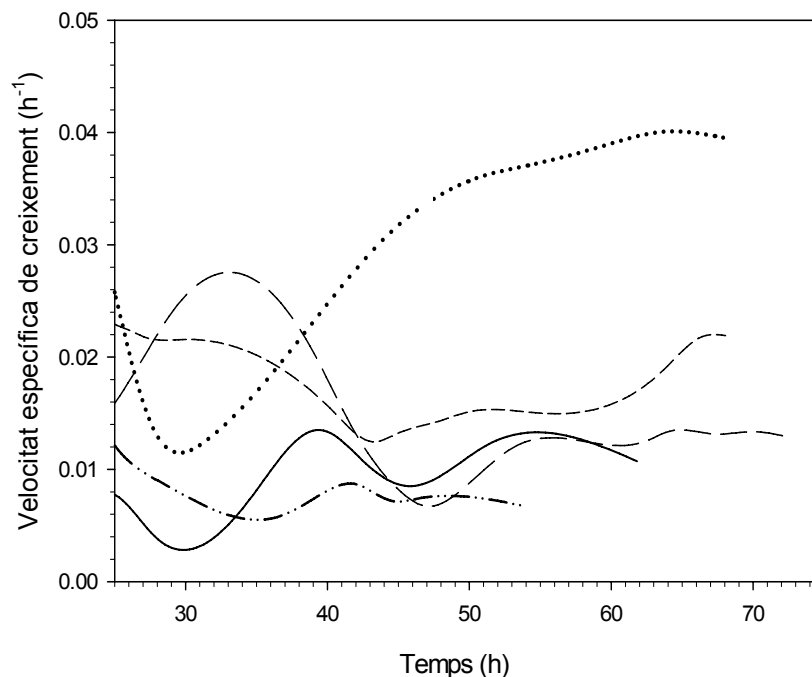
**Figura 7.1.** Evolució de la biomassa al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (●)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (○)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (■)  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (□)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (▲)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .



**Figura 7.2.** Evolució de l'activitat lipàsica extracel·lular al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (●)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (○)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (■)  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (□)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (▲)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Es pot observar que augmentar la concentració de metanol al medi té un efecte positiu sobre el creixement de la biomassa i també sobre la producció extracel·lular fins a una concentració de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Un increment de la concentració de metanol per sobre d'aquest nivell no aporta millors resultats. Un cop començada la fase d'inducció, s'observen unes 15-20 hores en les quals l'evolució dels nivells de la lipasa extracel·lular no augmenten significativament mentre que passades aquestes hores en alguns cultius s'observa un millor comportament de la producció extracel·lular. Existeix un temps de latència, previ a l'inici del creixement i la producció, necessari per adaptar la maquinària metabòlica a la degradació del substrat i a la producció de la proteïna heteròloga.

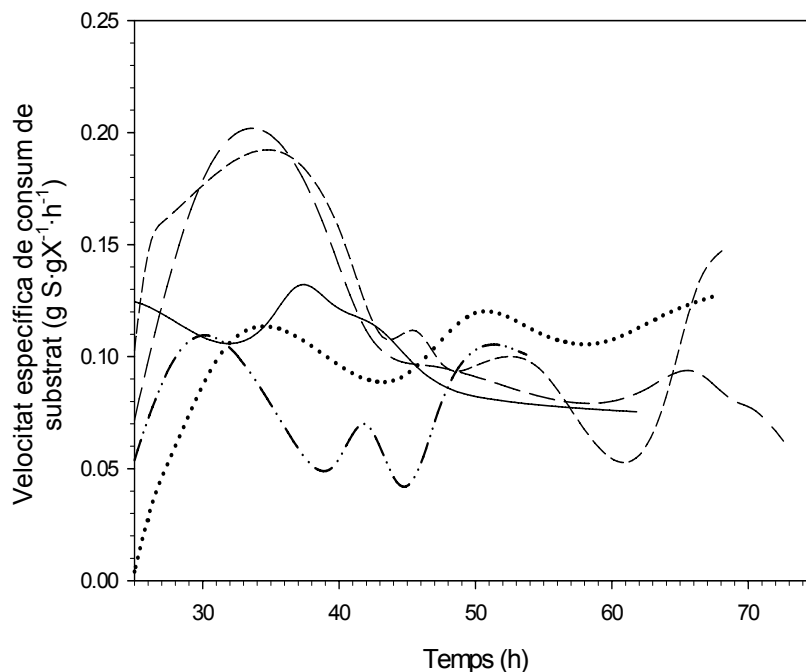
Així doncs, sembla evident que la concentració de metanol té un impacte considerable tant en els nivells de biomassa assolida com en la producció de lipasa extracel·lular però convé també avaluar quin és l'efecte que produeix sobre les velocitats específiques de creixement ( $\mu$ ) (Figura 7.3), consum de substrat ( $q_s$ ) (Figura 7.4) i producció extracel·lular ( $q_p$ ) (Figura 7.5) durant la fase d'inducció.



**Figura 7.3.** Evolució de la velocitat específica de creixement al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (—)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (·)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (·)  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (---)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (—)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Si en el cas dels nivells de biomassa l'efecte del metanol era evident, aquest efecte és més difícil de deduir a partir de la corba de la velocitat específica de creixement amb el temps. Durant les primeres hores d'inducció s'observen importants fluctuacions coincidint amb el període de latència i una vegada superat aquest període, els valors es mantenen constants, com si s'assolís un pseudo estat estacionari. El cultiu a una concentració de metanol residual de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  presenta les millors taxes de creixement mentre que pel cas de les concentracions baixes de  $0.5$  i  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol la  $\mu$  és molt inferior. Esmentar també que la concentració de  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  presenta unes taxes de creixement intermèdies. El cultiu a la màxima concentració de metanol estudiada és el que presenta valors de  $\mu$  més baixos, fet que corrobora que l'augment de la concentració de metanol per sobre del valor crític no millora el creixement en una cinètica d'inhibició per substrat.

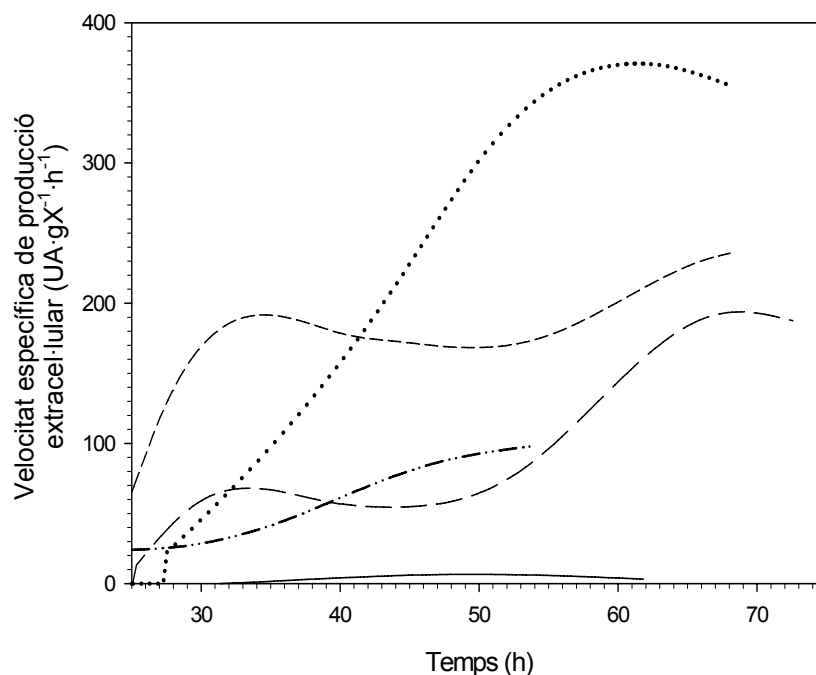
Aquest patró de comportament de la velocitat específica de creixement amb la concentració de metanol no s'observa, però, quan es quantifica la velocitat específica de consum de metanol (Figura 7.4).



**Figura 7.4.** Evolució de la velocitat específica de consum de metanol al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (—)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (---)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (.....)  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (-·-·-)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (-·-·-)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

En el cas de l'estudi de la influència del metanol residual sobre la  $q_S$  s'observa que a qualsevol de les concentracions estudiades, una vegada superat el període de latència, la  $q_S$  pren valors similars. Només en el cas de la concentració de  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  la  $q_S$  es manté per sota dels valors observats per a les altres concentracions.

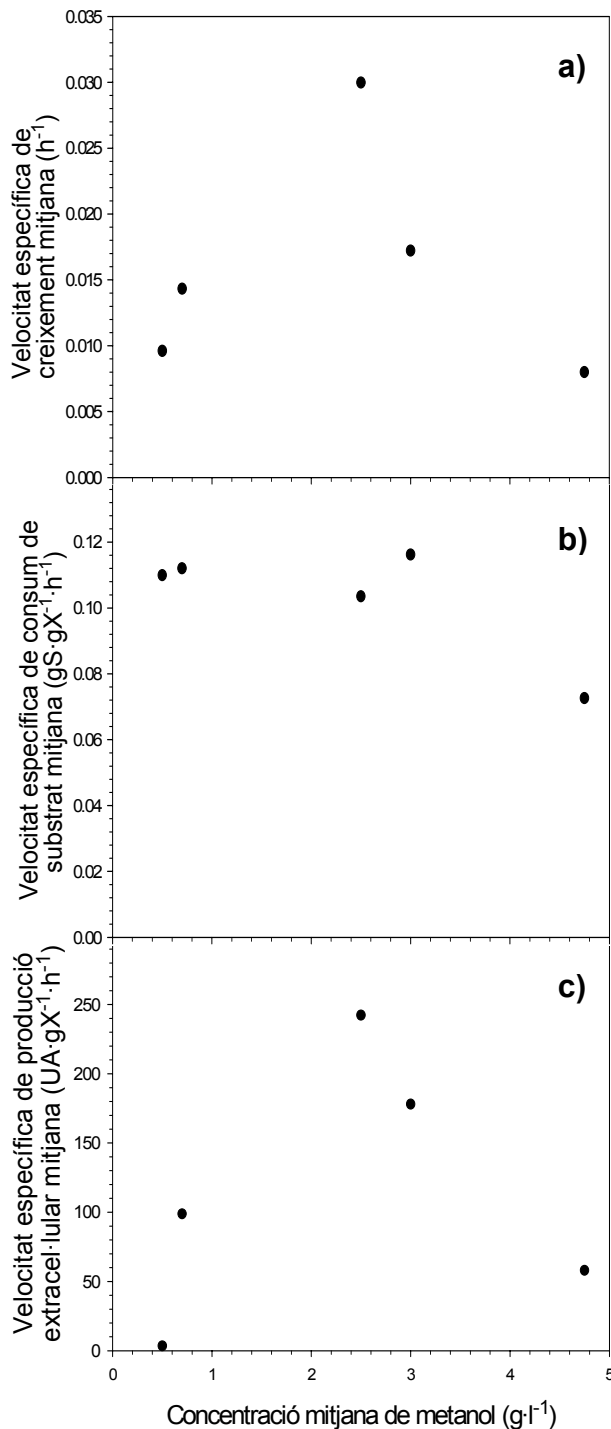
Quan s'avalua la tercera de les velocitats específiques d'interès,  $q_P$ , s'observa de nou l'efecte de la concentració de metanol residual. Els valors de  $q_P$  són mínims en la més baixa de les concentracions de metanol estudiades, augmenten progressivament fins arribar als valors màxims a la concentració de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i, finalment, tornen a disminuir fins a valors molt similars als obtinguts per a la concentració de  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  quan s'augmenta la concentració de metanol a  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .



**Figura 7.5.** Evolució de la velocitat específica de producció extracel·lular de lipasa al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (—)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (---)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (.....)  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (----)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (-·-·-)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Els estudis en cultiu discontinu alimentat a una concentració de metanol al medi constant publicats a la bibliografia (Zhang *et al.* 2000) pressuposen un estat pseudoestacionari durant la fase d'inducció que no es presenta en els experiments presentats anteriorment, sobretot en la fase inicial de la inducció. Per aquest motiu, per avaluar l'efecte de la concentració de metanol sobre les velocitats específiques, es calculen les velocitats específiques mitjanes durant la fase d'inducció (Figura 7.6).

Aquest càlcul es farà per integració al llarg del temps dels valors presentats de  $\mu$ ,  $q_P$  i  $q_S$ .



**Figura 7.6.** Efecte de la concentració de metanol residual sobre les velocitats específiques mitjanes de creixement, consum de substrat i producció extracel·lular durant la fase d'inducció amb metanol.

Les velocitats específiques mitjanes al llarg del cultiu permeten veure amb més claredat el comportament de la soca durant la producció a diferents concentracions de metanol residual.

La corba de la velocitat específica de creixement mostra un comportament típicament d'inhibició per substrat. Als treballs apareguts a la bibliografia l'efecte a concentracions inhibidores de metanol no tenia un impacte tan dràstic en la  $\mu$  com el que s'observa pel cultiu a  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  però cal considerar que aquest cultiu es va aturar a una fase intermèdia de la inducció.

S'ha ajustat als punts experimentals de velocitat específica de creixement una corba d'inhibició de tipus Haldane. Els valors dels paràmetres de  $\mu_{\text{màx}}$ ,  $K_S$  i  $K_i$  que s'obtenen no es consideren suficientment representatius atès que es disposa de pocs punts experimentals. La gràfica de l'efecte de la concentració de metanol sobre la velocitat específica de producció de ROL extracel·lular té un comportament similar a l'efecte de la concentració de substrat sobre  $\mu$ .

Pel que fa a la velocitat específica de consum de substrat, els valors mitjans reflecteixen el que ja s'observa en la figura 7.4. La concentració de metanol no sembla tenir un efecte clar en la velocitat de consum de substrat, excepte per a concentracions inhibidores de  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

El comportament d'inhibició per substrat s'observa de nou si es comparen les productivitats assolides als cultius a diferents concentracions de metanol residual al medi (Taula 7.1).

**Taula 7.1.** Comparació de la productivitat dels cultius a diferents nivells de metanol residual.

Consigna de metanol ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Productivitat ( $\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
0.5	326
0.7	2212
2.5	5869
3	4509
4.75	1325

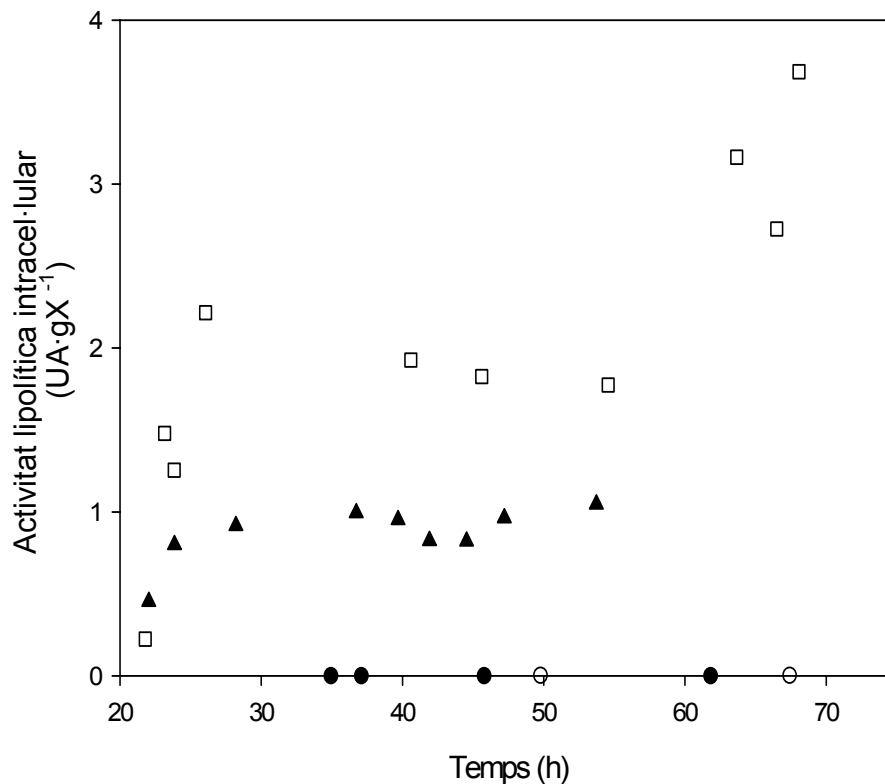
Dels resultats presentats anteriorment en podem extreure tres conclusions:

- A les concentracions de metanol residual estudiades es conclou que hi ha una concentració de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  que s'observa com a la més adient per a la producció de ROL extracel·lular i creixement del microorganisme. Quan es treballa a concentracions majors apareixen efectes inhibitoris i, si la

concentració és menor, la producció no arriba als valors descrits per a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

- Existeix una relació pràcticament lineal entre les velocitats específiques de creixement i producció extracel·lular de ROL que ve a demostrar la directa relació entre creixement i producció (Figures 7.6.a i 7.6.c).
- És necessari un correcte monitoratge i control de la concentració de metanol residual entorn de les condicions més favorables per poder garantir una fase d'inducció reproducible.

Donat que el consum de metanol durant la fase de latència no es tradueix clarament ni en creixement cel·lular ni en producció extracel·lular, es va realitzar un estudi del nivell d'activitat intracel·lular en els diferents cultius (Figura 7.7). Cal indicar que no es disposa d'aquests valors per al cultiu a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual.



**Figura 7.7.** Efecte del nivell de metanol residual sobre l'activitat lipolítica específica intracel·lular al llarg de la fase d'inducció de cultius discontinus alimentats amb diferent concentració de metanol residual. Concentració de metanol residual: (●)  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (○)  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , (□)  $3.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i (▲)  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

A la figura s'observa com per a les concentracions de metanol baixes ( $0.5\text{--}0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) no hi ha activitat lipolítica intracel·lular mesurable. Mentre que els nivells són



màxims per al cultiu a una concentració de metanol de  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . De manera anàloga a altres variables i velocitats específiques del procés, els valors d'activitat intracel·lular tornen a decréixer a concentracions de metanol superiors ( $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Per a concentracions de metanol baixes ( $0.5 - 0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) no s'observa activitat lipolítica intracel·lular. Però mentre que per al cultiu a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol tampoc es mesura activitat extracel·lular, per al cultiu a una concentració de  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  apareix activitat lipolítica al medi de cultiu.

D'acord a aquests resultats hi ha una concentració de metanol llindar per sota de la qual no es mesura activitat lipolítica ( $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  en les concentracions de metanol estudiades). Per aquestes concentracions també s'observen velocitats de creixement molt baixes.

En estudis de la inducció de l'operó *lac* en *Escherichia coli* s'ha observat un comportament semblant ja que per tal que la lactosa indueixi l'operó en un medi en absència de glucosa cal una concentració mínima del disacàrid per sota de la qual no s'observa producció extracel·lular (Santillan & Mackey 2004). Amb els resultats obtinguts per a la soca Mut<sup>+</sup> no és possible discernir amb exactitud si no es dona una suficient inducció del promotor AOX o simplement la manca de recursos energètics impossibilita algun dels passos posteriors a la inducció que conduirien fins a la obtenció de la proteïna intracel·lular. Per llevats, Mattanovich i col·laboradors (Mattanovich *et al.* 2004) argumenten que és poc plausible que la traducció esdevingui limitant degut a les moderades productivitats específiques. En canvi existeixen més evidències de limitacions en la translocació de membrana, el processat del pèptid senyal i el plegament de la proteïna dintre el reticle endoplasmàtic.

Per a concentracions superiors ( $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual al medi) no s'observa proteïna intracel·lular però sí al medi de cultiu. Pakula i els seus col·laboradors (Pakula *et al.* 2005) van publicar un estudi en el qual estudiaven l'efecte de la velocitat de creixement en la síntesi i secreció de la proteïna celobiohidrolasa I en el fong *Trichoderma reesei*. En el seu cas d'estudi ressalten que les proteïnes secretades eren produïdes més eficientment a velocitats específiques de creixement moderadament baixes. A  $\mu$  altes el percentatge de proteïnes extracel·lulars enfront del total de proteïna sintetitzada era del 6-8% mentre que a baixes velocitats de creixement el percentatge extracel·lular arriba al 29 %.

En el cas d'estudi de la ROL, es pot realitzar una anàlisi com la que apliquen Pakula i col·laboradors (Pakula *et al.* 2005) però l'estudi del diferent comportament intra i extracel·lular no es pot limitar a una comparació basada exclusivament en les

velocitats de creixement ja que segons les figures 7.6a i 7.7, cultius amb velocitats de creixement similars presenten comportaments diferents en quant a la secreció de la proteïna produïda.

A concentracions de metanol per sota d'un llindar (cas del cultiu a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), l'activitat lipolítica resultant no és mesurable en cap de les fraccions del cultiu. Sembla plausible la hipòtesi que per sota d'un valor llindar de substrat o bé la inducció del promotor AOX no és prou efectiva o els recursos energètics de la cèl·lula són limitats i la producció de proteïna s'atura en un dels posteriors passos a la inducció. Un cop la concentració de metanol ha superat aquest valor llindar (cultiu a  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s'aprecia activitat extracel·lular (figura 7.2) però no intracel·lular (figura 7.7). Una possible hipòtesi per explicar aquest fet seria que els recursos energètics cel·lulars han augmentat, atesa la major disponibilitat de font de carboni, i la proteïna pot ser sintetitzada i secretada, encara que a nivells baixos. La velocitat de secreció no limita el procés de producció ja que en cap moment l'activitat lipolítica intracel·lular arriba a nivells detectables.

En referència al cultiu a  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , la velocitat específica de creixement i de producció són lleugerament superiors a la del cultiu anterior (figura 7.6) i els nivells de ROL extracel·lular també. Així mateix l'activitat lipolítica intracel·lular és mesurable i elevada. En aquest cas, l'augment de concentració de metanol residual dotaria les cèl·lules amb més recursos energètics i la producció de proteïna es veuria més afavorida. Però en augmentar la  $q_p$  i la  $\mu$ , la velocitat de secreció esdevé un pas limitant enfront de la velocitat de síntesi ja que s'acumula proteïna intracel·lular, en especial en les primeres hores de la inducció. En augmentar la concentració de metanol a valors inhibitoris s'observen nivells de proteïna extracel·lular similars als obtinguts al cultiu de  $0.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , però es produeix un comportament d'acumulació intracel·lular diferent.

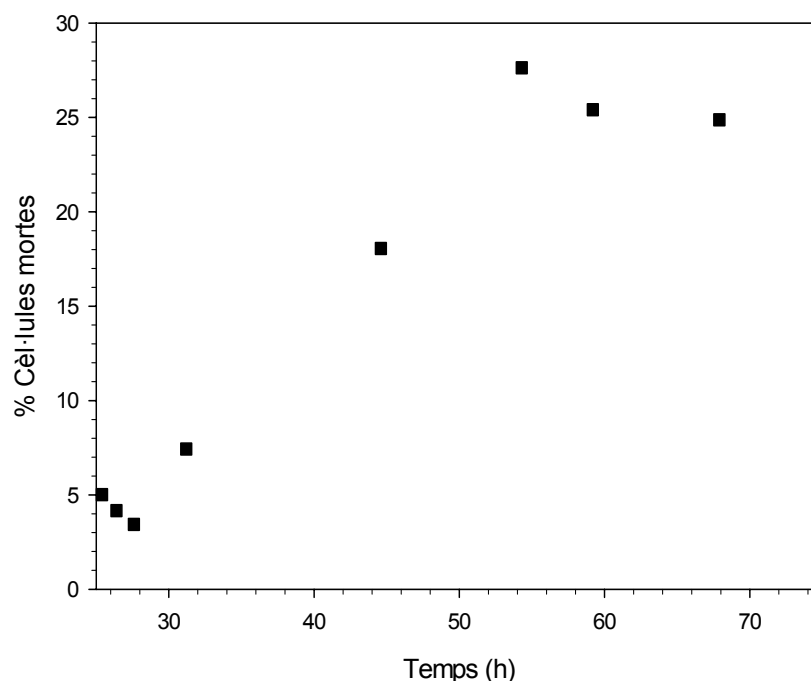
A la figura 7.7 s'observa un altre aspecte interessant, l'acumulació intracel·lular és més ràpida durant les primeres hores post-inducció, mentre que passades unes 15-20 hores en discontinu alimentat de metanol els nivells intracel·lulars tendeixen a estabilitzar-se. Transcorregudes unes hores sembla que la velocitat de secreció i la de síntesi assoleixen valors comparables.

L'efecte de la concentració de metanol no es limita als paràmetres extracel·lulars sinó que també produeix una diferent acumulació intracel·lular que podria ser la responsable de la fase inicial de latència durant la inducció.

### 7.3.2 Efecte de la inducció amb metanol sobre la viabilitat cel·lular

Durant l'estada realitzada al l'Escola de Biotecnologia del KTH d'Estocolm es van poder realitzar algunes anàlisis complementàries: en concret es va mesurar la viabilitat cel·lular i els nivells intracel·lulars de l'enzim alcohol oxidasa per al cultiu a una concentració de metanol de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

A la figura 7.8 es presenta l'evolució del percentatge de cèl·lules mortes al llarg del cultiu, s'hi pot observar com la viabilitat del cultiu es veu afectada durant la fase d'inducció.



**Figura 7.8.** Evolució de la mortalitat cel·lular en un cultiu discontinu alimentat de metanol a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual al medi.

Les cèl·lules viables disminueixen considerablement durant les primeres hores d'inducció (en aquest cas durant unes 25h post inducció) per establir-se més tard en un valor entorn del 75%. Malgrat que d'aquest cultiu no es disposa de dades de proteïna intracel·lular el comportament mesurat en la viabilitat del cultiu és semblant al mesurat per a l'acumulació de proteïna intracel·lular (Figura 7.7), on també cal un període de temps postinducció abans no s'estabilitzen els valors mesurats.

Hohenblum i col·laboradors (Hohenblum *et al.* 2003) van presentar uns resultats similars per a la producció de tripsinogen humà. En el seu cas la viabilitat

cel·lular disminuïa considerablement al principi de la fase d'inducció per establitzar-se en torn del 65% al final de la fermentació. Notablement aquest increment de la mortalitat cel·lular anava lligat a una acumulació intracel·lular de la proteïna heteròloga que començava a ser excretada unes 20 h després de l'inici de la inducció. La similitud amb els nostres resultats és evident i per això, malgrat que les dades de proteïna intracel·lular i viabilitat per a la producció de la ROL estan obtingudes en cultius a diferents concentracions de metanol, és plausible pensar en una teoria que expliqui totes les dades obtingudes. Hohenblum i col·laboradors van publicar posteriorment la continuació del seu treball (Hohenblum *et al.* 2004) on demostraven que el tripsinogen està retingut parcialment a la fracció no soluble de les cèl·lules i, concretament, al reticle endoplasmàtic (ER, en sigles angleses) entre d'altres membranes. Aquesta acumulació intracel·lular quan se sobreexpressa el tripsinogen desregula la xaperona d'unió a proteïna (BiP, en sigles angleses) i indueix la resposta cel·lular a proteïnes no plegades (UPR, en sigles angleses). Així mateix, exposen que l'acumulació de proteïnes al ER pot ser deguda a limitacions en el plegament de la proteïna o en la formació del ponts disulfur (el tripsinogen presenta 5 unions d'aquesta naturalesa). Cal recordar que la ROL presenta 3 ponts disulfur i quatre llocs de N-glicosilació.

En el nostre cas, però, la proteïna intracel·lular acumulada és activa i per tant ha hagut de passar la formació de ponts disulfur i el conseqüent plegament i glicosilació. Així doncs, tal i com se suggeria en el treball de Resina i els seus col·laboradors (Resina *et al.* 2005) per al promotor *pFLD1* la ROL intracel·lular pot quedar retinguda a l'espai periplasmàtic o a les vacuoles de secreció.

Així doncs perquè morrien les cèl·lules en els estadis inicials de la inducció? Mattanovich i col·laboradors (Mattanovich *et al.* 2004) esmenten que la connexió entre l'UPR i la mort cel·lular encara resta per ser clarificada en llevats però suggereixen que podria haver-hi diferents analogies amb les cèl·lules animals. En la formació del ponts disulfur és necessària l'oxidació de dos grups tiols de dues cisteïnes de la cadena peptídica. En eucariotes això es dona al lumen del ER. Els electrons generats en aquest procés oxidatiu no són utilitzats per reduir compostos al citosol i mantenir el balanç del poder reductor cel·lular sinó que són enviats a les mitocòndries (Harding *et al.* 2003). Aquest orgànuls són productors coneguts d'espècies reactives d'oxigen (ROS, en sigles angleses). Així doncs els ROS serien produïts com a subproducte de la formació de ponts disulfur (Haynes *et al.* 2004). Per tal d'alleujar aquest estrès oxidatiu les cèl·lules utilitzen un mecanisme per activar la concentració de glutatiónina reduïda (GSH), que actua com un reductor dels peròxids endògens (Hayes & McLellan 1999). Així doncs semblaria que les cèl·lules tenen un mecanisme per autoprotegir-se

en cas que un accentuat funcionament del ER provoqués un augment d'espècies oxidants intracel·lulars. Malgrat tot sembla que el paper de la glutacionina és el de reduir els ponts disulfur mal formats durant el plegament de la proteïna per tal que es puguin tornar a oxidar posteriorment de manera correcta. En aquest procés de reoxidació i posterior plegament es perd GSH que s'oxida i els electrons que s'alliberen en la posterior reformació dels nous ponts disulfur correctes són de nou enviats a les mitocòndries on generen peròxids endògens. D'aquesta manera la producció de ponts disulfur incorrectes conduiria a un esgotament de GSH i a la formació de nous ROS que, en reduir-se la glutacionina reduïda no podrien ser oxidats, conduint a la mort cel·lular per estrès oxidatiu induït pel funcionament forçat del ER (Haynes *et al.* 2004). D'altra banda, existeix un altre mecanisme pel qual la glutacionina oxidada pot ser reduïda de nou al citosol però en aquest cas es consumeix poder reductor del NADPH, resultant de nou en una pèrdua d'equivalents de reducció. Cal recordar, també, que en el primer pas d'assimilació del metanol, aquest és oxidat a formaldehid amb producció d'aigua oxigenada, una de les formes parcialment reduïdes de l'oxigen, exposant de nou el llevat a estrès oxidatiu.

La majoria d'aquests efectes es veuen només en cèl·lules que són capaces d'activar l'UPR, ja que en aquest procés s'activen els gens responsables de la generació dels enzims necessaris per a la formació de ponts disulfur. Així doncs semblaria que l'UPR enlloc d'ajudar a les cèl·lules les porta irreversiblement a un procés de mort cel·lular. Evidentment el que fa que algunes cèl·lules morin en activar l'UPR és la quantitat de proteïna mal formada que es genera, el nombre d'errors que es cometen en la col·locació dels ponts disulfur i l'eficiència amb que es degraden les proteïnes mal plegades. Aquests factors contribueixen a l'activació perllongada i intensa de l'UPR i als possibles processos de mort cel·lular subsegüents. També hi ha estudis que indiquen que algunes cèl·lules eucariotes que expressen grans quantitats de proteïnes de secreció ben plegades però amb un elevat nombre de ponts disulfur poden estar en risc de patir els efectes d'una acumulació de ROS per un estrès del ER perllongat (Harding *et al.* 2003). Així doncs, aquestes evidències concordarien també amb els nostres resultats, on la proteïna acumulada intracel·lular està correctament plegada ja que la seva activitat pot ser mesurada. La manca de dades de *Western Blot* de proteïna intracel·lular acumulada no activa impedeix assegurar que aquests efectes es vegin empitjorats també per una acumulació de ROS mal plegada al ER.

Els ROS d'altra banda participen en el procés de dany de la membrana per peroxidació dels lípids i oxidació de les seves proteïnes que condueixen a la mort cel·lular. De totes maneres, les cèl·lules disposen d'uns mecanismes restauradors de

la integritat de la membrana a través del trànsit de proteïnes reparadores mitjançant vesícules (Levine *et al.* 2001). En cèl·lules exposades a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'observa però que pràcticament s'atura el procés d'incorporació de proteïnes a la membrana aturant-se, per tant un dels últims passos reparadors en el procés de mort cel·lular. Així mateix, uns altres investigadors (Ligr *et al.* 2001) van trobar un gen, el *Stm1*, involucrat en el procés d'apoptosi que és requerit pel transport vesicular des del ER fins al Golgi. Així doncs, sembla ser que el procés de mort cel·lular induït per estrès al ER degut a mal plegament de la proteïna heteròloga o a un sobrefuncionament del reticle pot conduir a una sèrie d'efectes que condueixin a la mort cel·lular observada i a l'acumulació de la proteïna, fins i tot madura, a l'interior de les cèl·lules degut a un bloqueig del trànsit vesicular que concordaria amb els resultats presentats d'acumulació intracel·lular de proteïna activa que ja ha passat pel ER.

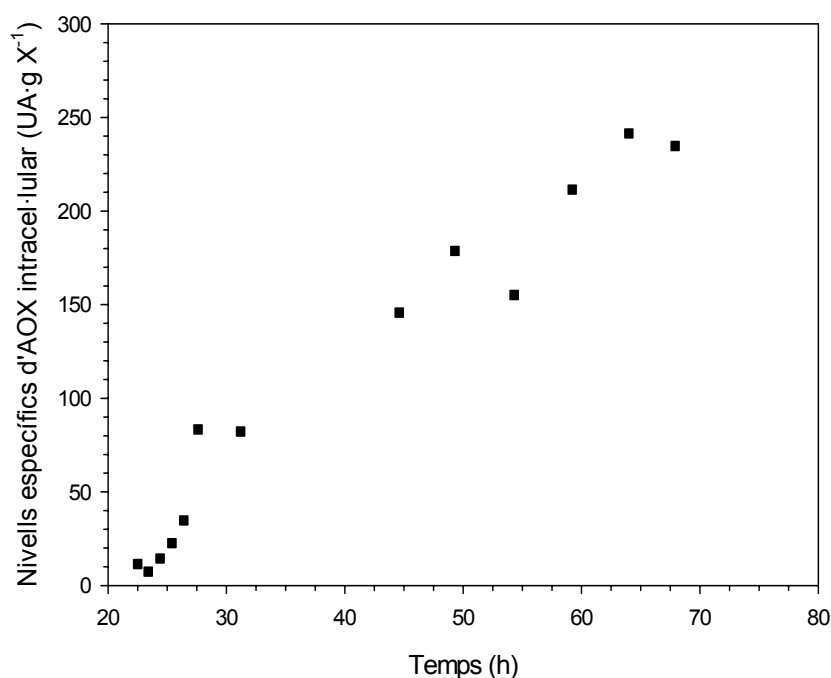
De totes maneres, tal i com apunten Mattanovich i els seus col·laboradors (Mattanovich *et al.* 2004) fa falta molta més recerca per explicar la relació de tots aquest efectes en els processos de producció. Recentment, ha aparegut un treball (Xiao *et al.* 2006), on la viabilitat cel·lular del cultiu de *P. pastoris* es veia millorada per la introducció d'un agent antioxidant, l'àcid ascòrbic. En aquest treball es mostra com la viabilitat cel·lular no es veu compromesa a la fase inicial d'inducció, com succeeix en el nostre cas o durant la producció de tripsinogen (Hohenblum *et al.* 2003) sinó que comença a disminuir progressivament passades unes 15 hores des de l'inici de la producció. L'augment de mortalitat en el cultiu, mesurat per la tinció de les cèl·lules amb PI, va acompanyat per una acumulació intracel·lular de ROS, mesurats també mitjançant tècniques de citometria de flux. L'addició d'antioxidant en una concentració més o menys estable ajuda a millorar la supervivència cel·lular i resulta en una millora de la producció extracel·lular d'hirudina intacta, malgrat que no augmenta la concentració total d'hirudina. Així doncs, en aquest cas la millora de la viabilitat disminueix els efectes negatius de la proteòlisi.

Malgrat que els resultats presentats per a la producció de la ROL deixen lloc només a una teoria especulativa, sembla interessant estudiar en el futur el paper que juga l'estrès oxidatiu, ja sigui com a resultat del consum directe de metanol o com a resultat d'un estrès en el ER, sobre els processos de producció utilitzant un llevat com *P. pastoris*. Així mateix, en relació amb la resta de resultats publicats, caldria estudiar l'impacte de la sobreexpressió de proteïnes amb ponts disulfur utilitzant aquest llevat i com es podria reduir l'estrès cel·lular que implica per obtenir millors rendiments productius.

### 7.3.3 Evolució de l'activitat intracel·lular d'alcohol oxidasa durant la fase d'inducció amb metanol.

Adicionalment es va mesurar el contingut intracel·lular de l'enzim alcohol oxidasa (AOX) en el cultiu a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. Aquest enzim és el responsable del primer pas en l'assimilació del metanol ja que amb l'ajuda d'aquest enzim el metanol en presència d'oxigen és oxidat a formaldehid amb generació d'aigua oxigenada. La transcripció del gen necessari per a la síntesi de l'enzim alcohol oxidasa està sota el control del promotor AOX, el mateix que regula la transcripció del gen de la ROL quan està en condicions inductores.

Les mesures de l'activitat intracel·lular de l'AOX es mostren a la figura 7.9.



**Figura 7.9.** Evolució dels nivells intracel·lulars d'activitat alcohol oxidasa en un cultiu discontinu alimentat de metanol a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual al medi.

D'acord amb les dades que es mostren a la figura anterior, els nivells intracel·lulars d'AOX augmenten durant tota la fase d'inducció. Aquestes dades indiquen que durant la fase de producció a concentracions de metanol òptimes el  $pAOX$  es manté induït. De nou sembla que el pas limitant indicaria cap a passos posteriors en el processament de la proteïna més que a la inducció del promotor.

Les cèl·lules tenen la capacitat d'adaptar-se a les noves situacions ja que transcorregudes unes hores post inducció tant la lipasa intracel·lular com el percentatge de cèl·lules viables assolixen valors estables encara que la inducció augmenti.

### **7.3.4 Avaluació de tècniques de producció alternatives: La limitació per temperatura i la utilització d'un medi de cultiu de menor osmolaritat.**

Un cop analitzat l'efecte de la concentració de metanol residual al medi sobre la producció de la ROL s'observa que hi ha una concentració de metanol més favorable. Malgrat tot, un estudi més exhaustiu de la fase de producció ha evidenciat que hi pot haver certes limitacions metabòliques a considerar, com poden ser el possible coll d'ampolla de la secreció de la proteïna i la reducció de la viabilitat cel·lular.

D'altra banda, hi ha un altre aspecte operacional important i és el constituït per la transferència d'oxigen. Així doncs, els cultius corresponents a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  i  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol de la secció 7.3.1 es van aturar per limitacions de transferència d'oxigen, el que constitueix un dels principals problemes dels cultius de *P. pastoris* Mut<sup>+</sup> en bioreactors convencionals<sup>1</sup>. Per tal d'arribar als valors de biomassa finals indicats a la figura 7.1 sense limitacions d'oxigen cal treballar en condicions d'aeració i agitació extremes (1000 rpm i 2 vvm d'aire) el que implica un alt cost energètic i pot conduir a la formació d'escumes que provoquen una disminució de la productivitat (Cos *et al.* 2005a). Per tant, es fa necessari explorar altres estratègies d'operació alternatives que permetin superar aquests inconvenients.

La primera estratègia alternativa que es va seleccionar va ser la de perllongar el cultiu a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol (MNLFB en sigles angleses) mostrat a la secció 7.1 amb una fase de metanol limitant (MLFB) després que a les 68 hores apareguessin els problemes de limitació d'oxigen. Malgrat que la inducció a concentració de metanol limitant s'ha mostrat poc efectiva aplicada des dels estadis inicials de la fase d'inducció, cal avaluar-la com a estratègia per perllongar el cultiu en situació de limitació de subministrament d'oxigen atesa la seva facilitat d'implementació. Per aquest motiu, aproximadament a les 68 hores quan el senyal d'oxigen dissolt estava per sota del 25%, es va connectar la fase de metanol limitant (Figura 7.10). En la transició de la fase de MNLFB a la fase de MLFB la concentració de metanol va ser

<sup>1</sup> La diferència entre els valors finals de biomassa corresponents a aquests dos cultius en condicions de limitacions d'oxigen és deguda al fet que aquests experiments es van realitzar en dos bioreactors diferents tal i com queda explicat a la secció de materials i mètodes pertinents.



reduïda progressivament des de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  fins a condicions limitants. Un cop finalitzada aquesta transició, el cabal de metanol al sistema va ser controlat per tal de mantenir la consigna d'oxigen dissolt entorn del 25%.

A la figura 7.10b podem observar que durant el MLFB les velocitats específiques de creixement, consum de substrat i producció extracel·lular decreixen gradualment però la producció no s'atura.

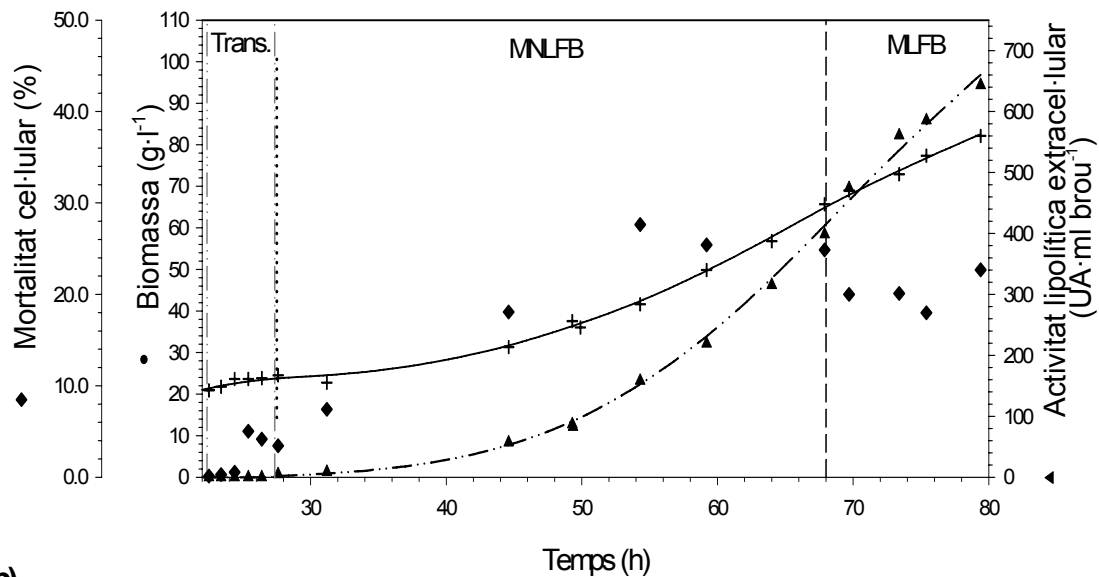
Pel que fa a la viabilitat cel·lular, durant el MLFB aquest valor augmenta lleugerament probablement degut a la lisi cel·lular igual que en d'altres treballs publicats (Jahic *et al.* 2003b) i el percentatge de cèl·lules mortes s'estabilitza entorn del 20%. En aquest cultiu el percentatge de cèl·lules tenyides amb el BOX, és a dir, el percentatge de cèl·lules no sanes però tampoc mortes tenia valors i tendències similars a les cèl·lules tenyides amb PI. Això indica que les cèl·lules malaltes moren.

Així doncs amb l'aplicació d'una estratègia de MLFB al final del cultiu, quan apareixen les limitacions per oxigen, podria perllongar-se el procés productiu millorant-ne la productivitat (Taula 7.2) sense necessitat d'introducció d'altres mesures operatives, com ara el subministrament d'oxigen, que ha estat valorat com un procediment poc segur (Curvers *et al.* 2001).

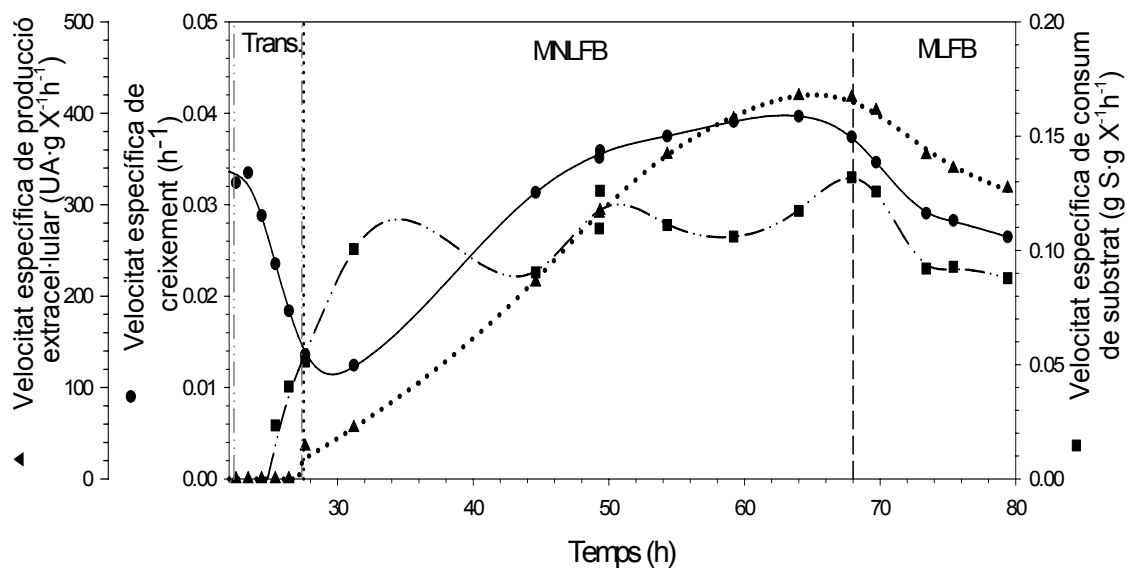
**Taula 7.2.** Comparació de la productivitat dels cultius amb tres estratègies diferents.

Estratègia	Productivitat ( $\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
MNLFB	5869
MNLFB + MLFB	8106
TLFB	5200
MNLFB + TLFB (Nou medi)	5978

a)



b)



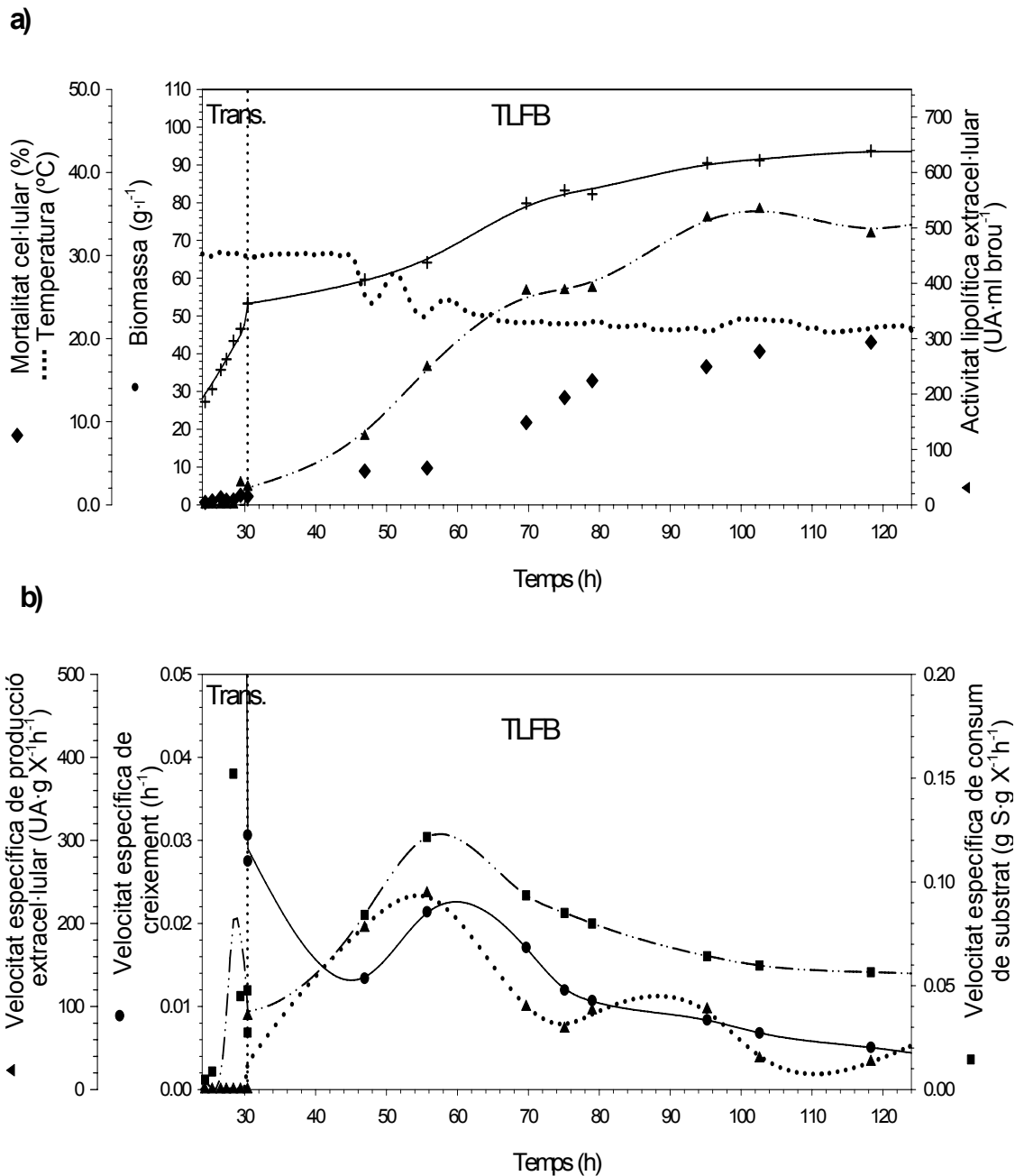
**Figura 7.10.** a) Evolució de diferents variables del procés durant el creixement discontinu alimentat de metanol en condicions de metanol no limitant (MNLFB) seguit d'una fase de metanol limitant (MLFB). Biomassa (+), en g·l<sup>-1</sup>; activitat lipolítica (▲), en (UA·ml brou<sup>-1</sup>); % cel·lules mortes (◆). b) Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu. Les línies corresponen als valors suavitzats.

Malgrat tot, com ja s'havia comentat a la secció 7.1, l'aplicació del MNLFB a la concentració de metanol més favorable estudiada implica certes limitacions, com ara

l'elevat percentatge de mortalitat cel·lular a l'inici de la fase d'inducció (Figura 7.8.). Aquesta tendència també ha estat observada en d'altres cultius creixent sobre metanol (Hohenblum *et al.* 2003; Jahic *et al.* 2003b). En aquest últim treball els valors de mortalitat cel·lular van decreixer dràsticament en aplicar una estratègia de temperatura limitant durant la fase d'inducció en metanol (TLFB en sigles angleses). Per aquest motiu es va aplicar una estratègia en TLFB per a la producció de ROL (Figura 7.11). Un cop acabada la primera etapa de cultiu discontinu en glicerol, s'inicia la fase de transició tal i com s'ha descrit en l'apartat 7.2.5. S'aplica aquesta transició per tal de millorar els nivells intracel·lulars d'AOX abans del canvi al TLFB i també per assolir uns nivells de biomassa suficients i pròxims als  $54 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , valor pel qual van aparèixer les limitacions d'oxigen en el cultiu MNLFB a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. Després de la transició es va començar amb l'estratègia de TLFB a una concentració de metanol de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . A la figura 7.11 es mostra l'evolució de les diferents variables del procés així com de les diferents velocitats específiques. No es mostra la concentració de metanol perquè es va mantenir constant entorn del valor de la consigna desitjada.

Malgrat que a les 80h de cultiu hi ha valors de biomassa similars als aconseguits amb l'estratègia de MNLFB + MLFB, ni els valors de lipasa ni els de les velocitats específiques assoleixen valors comparables. La màxima activitat lipolítica aconseguida fou de  $534 \text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Baixar la temperatura va afectar negativament el creixement i la velocitat específica de consum de metanol però cal comentar que la fase de latència observada just després de la transició en els cultius exposats a la secció 7.3.1 a metanol no limitant, es va reduir significativament aplicant aquesta estratègia. En aquest sentit, la viabilitat cel·lular va millorar considerablement, fins aproximadament a les 70h el percentatge de mortalitat cel·lular va romandre per sota del 10%. La tinció de cèl·lules amb BOX (cèl·lules malaltes) va donar valors similars a la tinció amb PI. De nou, totes les cèl·lules malaltes moren.

Tot i mantenir la concentració de metanol residual en les condicions més favorables estudiades, disminuir la temperatura té un efecte de disminució sobre les variables específiques d'interès i no millora la productivitat respecte l'estratègia de MNLFB+MLFB (Taula 7.2). En aquest sentit, es podria interpretar la reducció en la viabilitat cel·lular en conjunt amb la disminució en la velocitat de producció extracel·lular i l'efecte amortidor de la limitació per temperatura. Malgrat tot, no es millora en producció extracel·lular.



**Figura 7.11. a)** Evolució de diferents variables del procés durant el creixement discontinu alimentat de metanol en condicions de temperatura limitant (TLFB). Biomassa (+), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica ( $\blacktriangle$ ), en  $(\text{UA}\cdot\text{ml brou}^{-1})$ ; % cèl·lules mortes ( $\blacklozenge$ ) i temperatura ( $\cdots$ ). Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement ( $\bullet$ ), de consum de metanol ( $\blacksquare$ ) i de producció extracel·lular ( $\blacktriangle$ ) durant el cultiu.

D'acord amb els resultats presentats, aplicar una estratègia de TLFB directament després de la fase de transició no és adient per a la producció de la ROL en la soca  $\text{Mut}^+$ , però treballar amb una estratègia de MNLFB continua tenint dos

problemes per solucionar: d'una banda l'alta mortalitat cel·lular i de l'altra les limitacions d'oxigen quan s'assoleixen valors de biomassa relativament alts al final del procés.

Brady i col·laboradors (Brady *et al.* 2001) van descriure un medi de cultiu amb baix contingut de sals per tal d'evitar els problemes de precipitació que es donen en els cultius de *P. pastoris* utilitzant el medi estàndard descrit per Invitrogen. Aquest medi, d'altra banda, va millorar la viabilitat cel·lular del seu cultiu i va permetre millorar l'eficàcia del procés de purificació del producte d'interès. Per aquest motiu, es va decidir realitzar una nova estratègia combinada utilitzant una primera fase de MNLFB seguida d'una fase de TLFB i amb el medi descrit per Brady *et al.* (Brady *et al.* 2001).

Mattanovich i col·laboradors (Mattanovich *et al.* 2004) classifiquen les situacions d'estrès que poden conduir a la disminució de la viabilitat cel·lular en dues categories: estrès metabòlic i estrès ambiental. A la secció 7.3.1 s'ha discutit sobre l'impacte metabòlic que pot tenir la sobreproducció d'una proteïna heteròloga en un microorganisme però s'ha obviat l'estrès ambiental que pot suposar créixer en un medi de cultiu amb tanta conductivitat com l'Invitrogen (entorn del  $40 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Per aquest motiu és interessant avaluar l'efecte que pot tenir sobre diferents variables del procés una reducció de la pressió osmòtica. Jahic i col·laboradors (Jahic *et al.* 2006a) van tenir resultats satisfactoris amb aquest medi de baixa conductivitat però per evitar deficiències de sals els fou necessari introduir un corrent concentrat de sals al medi. El cabal d'aquesta solució salina es regulava per tal de mantenir una conductivitat al brou de cultiu entorn els  $8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Atès els resultats positius d'aquesta estratègia en la producció de la lipasa B de *Candida antarctica* fusionada al mòdul d'unió a cel·lulosa de la cel·lulasa 6A de *Neocallimastix patriciarum* (CBM-CALB) es va aplicar aquest manteniment de la conductivitat a  $8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  per a la producció de la ROL en la soca Mut<sup>+</sup> d'estudi.

Durant la fase de metanol no limitant amb la utilització d'aquest medi amb baix contingut de sals (LSM en sigles angleses) es va mantenir la consigna de metanol residual al medi a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . La fase de discontinu amb glicerol i la fase de transició van ser idèntiques a les utilitzades durant l'estratègia de MNLFB+MLFB. L'única diferència fou que en aparèixer les limitacions per oxigen al final de la fase inducció es va aplicar una fase de TLFB mantenint la consigna de metanol a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  enlloc d'optar per una estratègia de metanol limitant. Cal recordar que durant el TLFB la temperatura va anar decreixent progressivament per tal de mantenir el senyal d'oxigen dissolt al 25%.

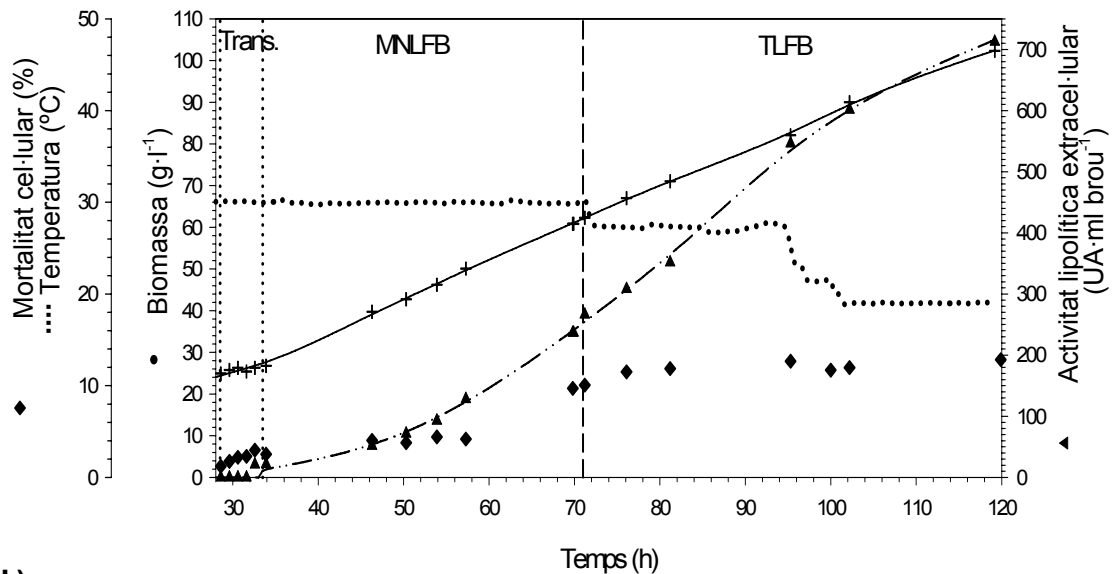
L'efecte del LSM es pot observar comparant la figura 7.10 amb la figura 7.12 fins que no s'acaba la fase de MNLF. De l'anàlisi es desprèn que reduir la pressió osmòtica redueix la fase de latència a una fase inicial de la inducció. Pràcticament des del principi del MNLF amb el LSM s'observen velocitats de creixement relativament altes entorn de les  $0.03\text{h}^{-1}$ . Malgrat tot els valors finals d'activitat lipolítica extracel·lular utilitzant el LSM van ser menors ( $280\text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) que quan es creix sobre el medi estàndard d'Invitrogen ( $400\text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Per contra la utilització del nou medi produeix una millora en els valors del percentatge de cèl·lules mortes. Però en aquest cas, les cèl·lules que es tenyeixen amb el BOX supera en un 4% les tenyides amb PI, el que significa que hi ha un percentatge de cèl·lules malaltes que no estan mortes. Probablement el que indica aquesta situació és que les cèl·lules es troben en condicions hipotòniques.

La velocitat específica de producció extracel·lular es va mantenir constant cap a les  $200\text{ UA}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , la meitat del valor màxim aconseguits al final del MNLF amb el medi estàndard d'Invitrogen.

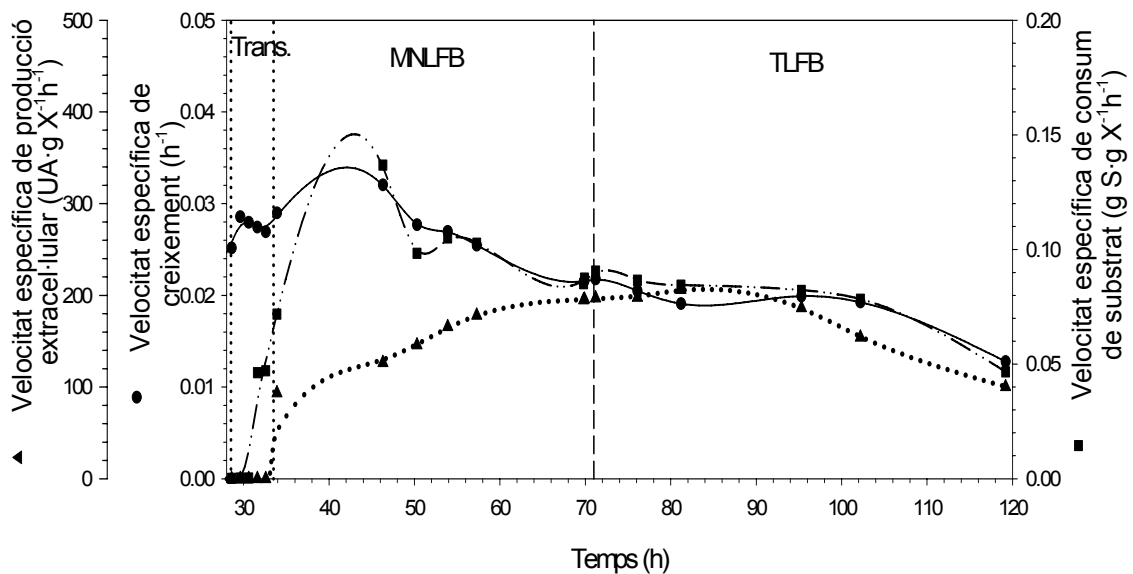
La realització del cultiu ens unes condicions de menor conductivitat ha aportat de nou un efecte positiu en la viabilitat cel·lular que s'ha vist contrarestat per una disminució en l'eficàcia de la producció.

El canvi a condicions de temperatura limitant després d'observar els problemes de limitació per oxigen té un efecte positiu en les velocitats específiques del procés (Figura 7.12b), que es mantenen inalterades aproximadament durant 30h, mentre la temperatura baixa només lleugerament a  $28^{\circ}\text{C}$ . Si es compara amb les tendències mostrades a la figura 7.10b, es pot concloure que un canvi a condicions de metanol limitants provoca una disminució més ràpida de les velocitats específiques del procés. Així doncs, si s'aplica una estratègia de TLFB després de la fase de metanol no limitant permet perllongar més el cultiu que si s'hi apliquen condicions limitants de font de carboni. De manera similar a com passava amb el cultiu aplicant una estratègia de temperatura limitant, la reducció del contingut de sals al medi de cultiu va provocar una disminució de la productivitat del cultiu (Taula 7.2).

a)



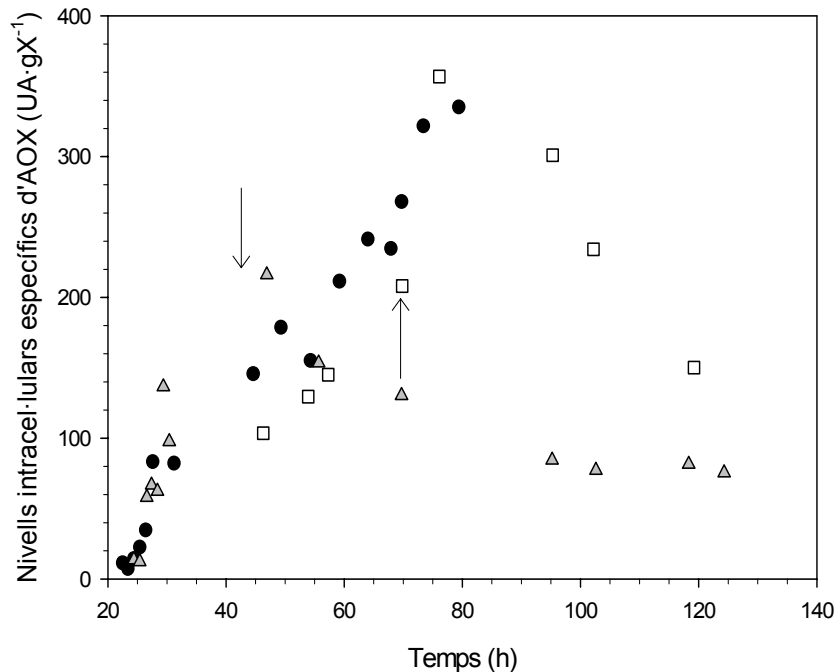
b)



**Figura 7.12. a)** Evolució de diferents variables del procés durant el creixement discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants de metanol (MNLFB) seguides d'una fase de temperatura limitant (TLFB) en un medi de baix contingut de sals. Biomassa (+), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica (▲), en  $\text{UA}\cdot\text{ml brou}^{-1}$ ; % cel·lules mortes (◆) i temperatura (····). Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu.

### 7.3.4.1 Anàlisi dels nivells d'activitat intracel·lulars d'AOX aplicant les diferents estratègies de cultiu.

Es van analitzar els nivells d'activitat intracel·lular d'aquest enzim en mostres dels diferents cultius presentats a la secció 7.3.4. Els resultats queden recollits a la figura 7.13:



**Figura 7.13.** Evolució de l'activitat específica intracel·lular d'AOX en tres estratègies de cultiu diferents. (●) MNLFB+MLFB amb el medi estàndard d'Invitrogen; (▲) TLFB i (□) MNLFB + TLFB van ser aplicats utilitzant un medi amb baixa concentració de sals. Les fletxes indiquen el temps de cultiu al qual es va connectar el TLFB.

Els dos cultius en els quals s'ha aplicat una fase de metanol no limitant, presenten un perfil similar dels nivells d'AOX intracel·lulars, que augmenten durant tota la fase d'inducció en condicions no limitants de font de carboni. No obstant això, quan s'utilitza el medi amb baix contingut de sals, els nivells mesurats són, en general, inferiors.

Quan s'analitzen els resultats obtinguts amb l'estratègia de TLFB, es pot observar com al principi de la inducció els nivells d'AOX van incrementar mentre que en iniciar-se la limitació per temperatura aquests nivells van decreixer. Aquest comportament no concorda amb els presentats per Jahic i col·laboradors (Jahic *et al.* 2003b) ja que en limitar per temperatura aquest treball mostra un increment dels nivells intracel·lulars d'AOX. Els valors d'AOX mostrats a la figura 7.13 per al cultiu amb TLFB són notablement inferiors als nivells mesurats amb les altres dues



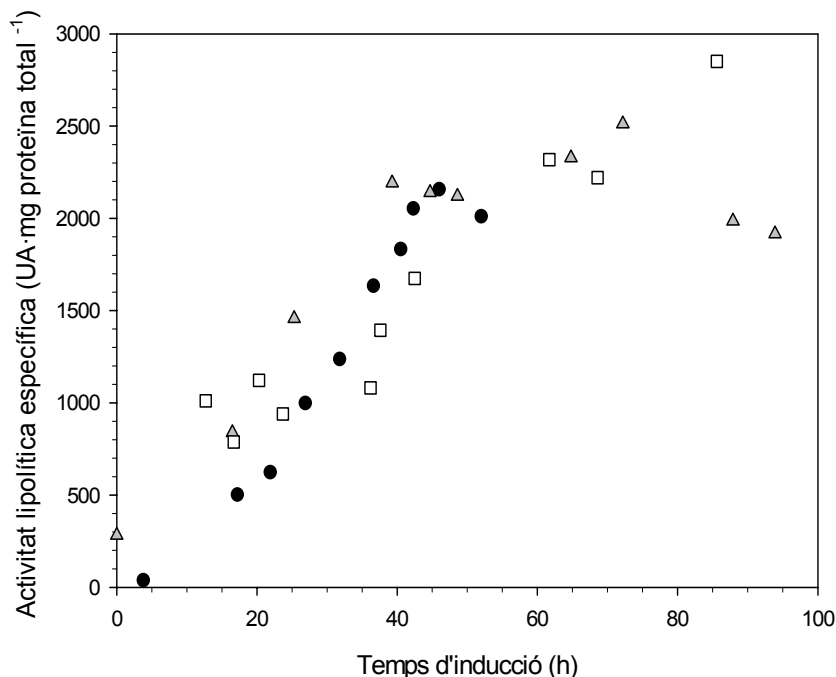
estratègies. De nou podem observar que limitar per temperatura just després de la fase d'inducció no aporta els resultats positius demostrats en altres soques.

Cal analitzar el paral·lisme que hi ha entre els nivells específics intracel·lulars d'AOX i les corbes de velocitat específica d'activitat lipolítica. Mentre els nivells d'AOX augmenten, ho fa també la corba de  $q_p$  i, per contra, aquest velocitat específica disminueix quan baixen els nivells d'AOX intracel·lular. Aquesta correlació també fou observada en la producció de la  $\beta$ -glucosidasa del pal de rosa tailandès en *P. pastoris* (Charoenrat *et al.* 2005).

### 7.3.5 Avaluació de la puresa del producte quan s'utilitzen estratègies alternatives d'operació.

En molts processos productius el cost de la recuperació i posterior purificació del producte d'interès marca la viabilitat del procés. En aquest sentit es dediquen molts esforços a desenvolupar processos de recuperació efectius ja que el cost d'aquesta etapa pot arribar a constituir el 50% del cost total de manufactura (Shuler & Kargi 2002).

Es va analitzar la puresa del producte obtingut al llarg de les tres estratègies de cultiu (Figura 7.14).



**Figura 7.14.** Activitat lipolítica específica en tres estratègies de cultiu diferents. (●)MNLFB + MLFB en el medi estàndard de *P. pastoris*; (▲) TLFB en l'etapa d'inducció i (□) MNLFB + TLFB amb un medi de fermentació amb un baix contingut de sals.

Des d'un punt de vista productiu, l'estratègia de MNLFB + MLFB amb un medi amb elevat contingut de sals aporta millors resultats. Malgrat això, la velocitat específica de producció extracel·lular i el creixement disminueixen ràpidament durant l'etapa de limitació per substrat. Tot i aquesta tendència els valors es mantenen alts. D'altra banda, aquest estratègia produeix un elevat percentatge de mortalitat cel·lular, que disminueix durant la fase de limitació per metanol probablement degut a lisi cel·lular (Jahic *et al.* 2003b). Tot i que només una petita fracció de les cèl·lules lisen, això implica un alliberament considerable de proteïnes intracel·lulars al sobrenedant. Aquesta contaminació augmenta en augmentar la mortalitat cel·lular però pot ser considerada com a insignificant des del punt de vista de contribució a l'alliberament del producte d'interès al medi (Hohenblum *et al.* 2003).

Contràriament a aquest fet, en l'estratègia utilitzant un medi de fermentació baix en sals redueix la productivitat però també el percentatge de mortalitat cel·lular en un 50%. Per aquest motiu, s'obté un producte final més pur en termes d'activitat enfront de proteïna total, probablement degut a la disminució de la lisi cel·lular i l'alliberament de proteïnes contaminants. En aquest sentit, si es té en compte la puresa del producte treballar amb un medi amb menys conductivitat, és a dir, reduir l'efecte de l'estrès ambiental, ha estat la millor opció.

## 7.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha estudiat l'efecte de la concentració de substrat en la producció de la ROL en un cultiu discontinu alimentat de metanol i s'ha estudiat l'efecte de la utilització d'estratègies de cultiu alternatives sobre la producció de l'enzim. S'han obtingut diferents conclusions:

- Hi ha una concentració òptima de metanol residual de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  que condueix a l'obtenció dels millors resultats de producció de ROL extracel·lular.
- S'ha detectat un possible coll d'ampolla en la secreció de la proteïna, tal i com ja s'havia referenciat per aquest proteïna utilitzant un promotor alternatiu al pAOX per a l'expressió de la ROL, el pFLD1 (Resina 2006). Aquest coll d'ampolla és major durant les primeres hores post inducció. L'adaptació al nou substrat i el processament de la proteïna sintetitzada, incloent la seva secreció poden provocar la latència de 15-20h post inducció observada per la producció de ROL extracel·lular.

- S'han detectat dos inconvenients addicionals al mode d'operació proposat: la limitació per oxigen que evita la prolongació del cultiu i l'elevat percentatge de mortalitat cel·lular.
- S'ha aplicat una estratègia de limitació de la temperatura per prevenir la mortalitat cel·lular i evitar la limitació d'oxigen. Tot i que aquesta estratègia aportava millors resultats en altres processos productius (Jahic *et al.* 2003b) en la producció de la ROL no ha millorat la productivitat del cultiu, malgrat que ha millorat la supervivència de les cèl·lules.
- D'altra banda, un cop observades les limitacions d'oxigen s'han comparat dues estratègies operacionals sense introducció d'oxigen pur o mesclades d'oxigen: aplicar una fase de metanol limitant o una fase de temperatura limitant mantenint la concentració de metanol residual. Una observació de la progressió de les velocitats específiques del procés (Figura 7.10b i Figura 7.12b) indica que l'aplicació d'una estratègia per limitació de temperatura permet mantenir els valors de les velocitats específiques per un període més llarg del temps.
- S'ha reduït la pressió osmòtica sobre les cèl·lules emprant un medi de cultiu amb una concentració de sals inferior. S'ha utilitzat la mateixa estratègia d'inducció en un cultiu discontinu alimentat en condicions de metanol no limitant a 2.5 g·l<sup>-1</sup>. Amb aquesta estratègia s'ha millorat la mortalitat cel·lular però s'ha reduït la velocitat específica de producció extracel·lular. S'ha reduït la fase de latència post inducció.
- S'ha observat que reduir la pressió osmòtica i la mortalitat cel·lular ha permès obtenir un producte final més pur en termes d'activitat específica per mg de proteïna.

## 7.5 Referències bibliogràfiques

Brady,C.P., Shimp,R.L., Miles,A.P., Whitmore,M. & Stowers,A.W. 2001. High-level production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for Malaria, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 23, 468-475.

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. Bioprocess and Biosystems Engineering, 27, 399-406.

Clare,J.J., Romanos,M.A., Rayment,F.B., Rowedder,J.E., Smith,M.A., Payne,M.M., Sreekrishna,K. & Henwood,C.A. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene, 105, 205-212.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006a. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. Biotechnology and Bioengineering, 95, 145-154.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006b. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. Microbial Cell Factories, 5, 17.

Cos,O., Resina,D., Ferrer,P., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2005a. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. Biochemical Engineering Journal, 26, 86-94.

Cos,O., Serrano,A., Montesinos,J.L., Ferrer,P., Cregg,J.M. & Valero,F. 2005b. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. Journal of Biotechnology, 116, 321-335.

Curvers,S., Brixius,P., Klauser,T., Thommes,J., Weuster-Botz,D., Takors,R. & Wandrey,C. 2001. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. Biotechnology Progress, 17, 495-502.

d'Anjou,M.C. & Daugulis,A.J. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 72, 1-11.

Gnoth,S., Jenzsch,M., Simutis,R. & Lubbert,A. 2007. Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. Journal of Biotechnology, 132, 180-186.

Harding,H.P., Zhang,Y., Zeng,H., Novoa,I., Lu,P.D., Calfon,M., Sadri,N., Yun,C., Popko,B., Paules,R., Stojdl,D.F., Bell,J.C., Hettmann,T., Leiden,J.M. & Ron,D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Molecular Cell, 11, 619-633.

- Hayes, J.D. & McLellan, L.I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31, 273-300.
- Haynes, C.M., Titus, E.A. & Cooper, A.A. 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Molecular Cell*, 15, 767-776.
- Hohenblum, H., Borth, N. & Mattanovich, D. 2003. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *Journal of Biotechnology*, 102, 281-290.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. & Mattanovich, D. 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 367-375.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.K., Martinelle, M. & Enfors, S.O. 2003a. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102, 45-53.
- Jahic, M., Knoblechner, J., Charoenrat, T., Enfors, S.O. & Veide, A. 2006a. Interfacing *Pichia pastoris* cultivation with expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 1040-1049.
- Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T. & Enfors, S.O. 2006b. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 22, 1465-1473.
- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. & Enfors, S.O. 2003b. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories*, 2, 6.
- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y. & Suga, K.I. 1998. Effect of methanol concentration on the production of human [beta]2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 482-487.
- Khatri, N.K. & Hoffmann, F. 2006. Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 492-498.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M. & Tomomitsu, K. 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 90, 280-288.
- Levine, A., Belenghi, B., Mari-Weisler, H. & Granot, D. 2001. Vesicle-associated membrane protein of Arabidopsis suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 46284-46289.
- Ligr, M., Velten, I., Frohlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Frohlich, K.U., Wolf, D.H. & Hilt, W. 2001. The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 2422-2432.
- Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. & Sauer, M. 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*, 113, 121-135.

Minning,S., Serrano,A., Ferrer,P., Sola,C., Schmid,R.D. & Valero,F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology, 86, 59-70.

Pakula,T.M., Salonen,K., Uusitalo,J. & Penttila,M. 2005. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Microbiology, 151, 135-143.

Ramon,R. 2007. Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia Pastoris*: Aplicació de tècniques de monitorització i control. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Resina,D. 2006. Expression of the *Rhizopus Oryzae* lipase in *Pichia Pastoris* under the control of the *FLD1* Promoter. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Resina,D., Cos,O., Ferrer,P. & Valero,F. 2005. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. Biotechnology and Bioengineering, 91, 760-767.

Santillan,M. & Mackey,M.C. 2004. Influence of catabolite repression and inducer exclusion on the bistable behavior of the *lac* operon. Biophysical Journal, 86, 1282-1292.

Shuler,M. & Kargi,F. 2002. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2nd edn. Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Xiao,A., Zhou,X., Zhou,L. & Zhang,Y. 2006. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 837-844.

Zhang,W., Bevins,M.A., Plantz,B.A., Smith,L.A. & Meagher,M.M. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. Biotechnology and Bioengineering, 70, 1-8.

Zhang,W., Sinha,J., Smith,L.A., Inan,M. & Meagher,M.M. 2005. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. Biotechnology Progress, 21, 386-393.

# 8

Estudi del canvi d'escala del procés de producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en el sistema d'expressió de *Pichia pastoris*

8.1 Introducció .....	189
8.2 Materials i mètodes.....	191
8.2.1 Inòcul .....	191
8.2.2 Sistema de cultiu experimental.....	192
8.2.3 Sistema de monitoratge i addició de metanol.....	193
8.3 Resultats.....	194
8.3.1 Implementació del sensor de metanol Model 2.1 al sistema experimental. Calibratge. ....	194
8.3.2 Cultius a escala pilot.....	196
8.4 Conclusions .....	205
8.5 Referències bibliogràfiques .....	206



## 8.1 Introducció

Una vegada determinades les condicions més favorables d'un procés a escala laboratori, es pot procedir a l'escalat de l'operació. Aquest procés es realitza amb l'objectiu de mantenir un bon rendiment i qualitat del producte augmentant la producció pel factor d'escala del bioreactor.

En processos químics convencionals es troben factors de canvi d'escala de l'ordre de 50.000 o 80.000, mentre que per a processos biotecnològics és típic utilitzar un factor de 1 a 10.

Existeixen diferents factors que es poden veure afectats pel canvi d'escala. D'una banda hi ha factors biològics com ara el nombre de generacions de l'inòcul, probabilitat de més mutacions, augment de la vulnerabilitat a les contaminacions o variació de la pressió selectiva. Entre els factors químics influenciats per l'escala es troben la qualitat del medi (puresa dels reactius emprats), la qualitat de l'aigua, les concentracions de substrat i els possibles gradients al bioreactor, etc. D'altra banda hi ha una sèrie de factors físics que afecten com podrien ser la configuració del bioreactor, la diferent agitació (i l'esforç tallant), l'aeració, la formació d'escumes, la pressió hidrostàtica, l'increment del temps per a l'esterilització del cultiu, la diferent transferència de calor, matèria i la mescla (Junker 2004).

Generalment en augmentar les dimensions del bioreactor s'empitjora la mescla, apareixen volums morts, augmenta l'esforç tallant i la concentració de diòxid de carboni dissolt incrementa degut a la pressió. Paral·lelament, sol augmentar la relació alçada *versus* diàmetre, de tal forma que el gas es mou ascensionalment amb una pitjor retromescla, el que fa aparèixer gradients en la concentració d'oxigen dissolt si la velocitat de mescla és inferior a la velocitat de transferència de matèria.

L'objectiu del canvi d'escala és la determinació de les condicions de disseny i operacionals que permetin assegurar que l'efecte de les diferents variables és el mateix independentment de la dimensió de cultiu. El resultat final depèn en gran mesura de la interrelació entre la cinètica o cinètiques químiques del procés biològic i la hidrodinàmica del bioreactor.

L'escalat es pot basar en la teoria de la semblança, que proposa que si dos sistemes estan descrits per les mateixes equacions diferencials amb les mateixes condicions de contorn el seu comportament ha de ser similar. Aquesta semblança se sol expressar matemàticament com:

$$m' = k \cdot m \quad (\text{Eq. 8.1})$$

on  $m'$  i  $m$  representen una variable a gran escala i a escala laboratori, respectivament. La semblança es pot dividir en diferents classes:

- Semblança geomètrica
- Semblança dinàmica
- Semblança tèrmica
- Semblança màssica
- Semblança bioquímica

Cada una de les semblances és un requisit de la següent (Solà & Gòdia 1994).

Han aparegut diferents aproximacions per al canvi d'escala d'un procés biotecnològic basades en diferents mètodes:

- Mètode fonamental: es basa en la descripció quantitativa dels processos biològics i implica descriure les equacions del procés i solucionar-les.
- Mètode dimensional: es basa en la relació de diferents variables (mòduls adimensionals).
- Mètodes heurístics i els mètodes de prova i error: es basen en l'experiència.
- Mètodes d'anàlisi del règim de flux: es basen en la comparació de les velocitats que juguen un paper important en el procés.

Tradicionalment per al canvi d'escala es busca la semblança geomètrica i també es seleccionen un o dos paràmetres amb influència sobre el cultiu i es busca la manera de mantenir-los constats. Entre aquests paràmetres cal destacar: la potència per unitat de volum ( $P/V$ ), el coeficient volumètric de transferència d'oxigen ( $k_L a$ ), l'esforç tallant màxim i el temps de mescla. Un dels paràmetres més utilitzats és la transferència d'oxigen, atesa la baixa solubilitat d'aquest gas en el medi de cultiu i la seva importància en els cultius aeròbics.

A la bibliografia s'han descrit diferents exemples d'escalat de processos de producció amb el sistema d'expressió de *P. pastoris* però la majoria estaven centrats en l'escalat de la purificació del producte obtingut (Johnson *et al.* 2003; Dux *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2008). Recentment ha aparegut publicat un treball d'escalat fins a 800 l de la producció d'una lipasa de *Candida Rugosa* en una soca de *P. pastoris* que utilitza el promotor *pGAP* per a la regulació de l'expressió (Zhao *et al.* 2008).

L'objectiu del treball descrit en aquest capítol és el canvi d'escala de la producció de la ROL en *P. pastoris* d'escala laboratori a escala pilot, al mateix temps que s'identifiquin els possibles colls d'ampolla per a posteriors fases d'escalat. En aquest cas concret, el canvi d'escala es restringeix a la selecció de condicions d'operació ja que s'utilitzen bioreactors comercials amb configuració i disseny predeterminats.

Aquest treball es va realitzar a la Planta Pilot de Fermentacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb la col·laboració del Dr. Antoni Casablanca i l'Oscar Fernàndez.

## 8.2 Materials i mètodes

### 8.2.1 Inòcul

Per als cultius a escala de planta pilot es va utilitzar el bioreactor Braun Biostat UD50 (BBraun, Sartorius Biotech, Alemanya), de 50 litres de volum de treball disponible a la Planta Pilot de Fermentacions (PPF) del Departament d'Enginyeria Química.

L'inòcul per al bioreactor Biostat UD50 es va realitzar en tres passos: un primer creixement a partir de cèl·lules congelades a  $-80^{\circ}\text{C}$  en erlenmeyers de 100 ml amb medi YPD. Quan les cèl·lules estaven en fase exponencial eren traspassades a erlenmeyers d'1 litre amb un 15% de volum de medi YPD. S'hi mantenien 24 h a 200 rpm i  $30^{\circ}\text{C}$  fins que assolien una densitat òptica equivalent d'entre 6 i 8. Posteriorment, les cèl·lules crescudes en YPD eren traspassades a un fermentador Braun Biostat B (BBraun, Sartorius Biotech, Alemanya) de 5 litres de volum útil (3.5 litres de volum de treball). En aquest bioreactor les cèl·lules van créixer en medi Invitrogen per escurçar al màxim el temps de latència en inocular el Biostat UD50. El creixement en el Biostat B es va dur a terme a 1000 rpm i  $30^{\circ}\text{C}$  durant unes 20-22h.

Posteriorment les cèl·lules van ser directament inoculades al Biostat UD50 a una densitat òptica equivalent inicial de 3.5-4. D'aquesta manera s'assegurava que la fase discontinua en  $40\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicerol durava unes 16 -17 h.

### 8.2.2 Sistema de cultiu experimental.

Els cultius realitzats a la PPF van seguir l'estratègia de cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants de substrat descrit a l'apartat 2.6.2 de materials i mètodes generals. En aquest cas el volum inicial escollit va ser de 35 l. Els cabals de glicerol i metanol en aquests cultius van ser directament escalats dels especificats per a cultius de 5 litres. Durant les dues primeres hores de transició, es va introduir al bioreactor un cabal de  $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  de glicerol (50 % v/v), aquest cabal es va reduir durant les tres següents hores a  $1.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  i  $0.65 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivament. Pel que fa a l'addició de metanol es va mantenir a  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  des de l'inici de la tercera hora d'inducció fins al final d'aquesta fase. El glicerol va ser introduït al fermentador per capçalera amb l'ajuda d'una bomba peristàltica prèviament calibrada. El metanol va ser introduït per capçalera del bioreactor amb l'ajuda de microburetes, tal i com es descriu a l'apartat 8.2.3 d'aquest mateix capítol.

Els cultius, a diferència dels realitzats a escala laboratori, es van dur a terme a pressió atmosfèrica sense la presència de sobrepressió. Per tal de controlar l'oxigen dissolt (DOT) per sobre del 30% es va utilitzar un control de l'agitació, que augmentava quan el percentatge de DOT baixava per sota d'aquest límit. L'agitació es va anar incrementant fins al valor màxim permès pel correcte funcionament del sistema pilot (600-800 rpm). El cabal d'aire introduït va oscil·lar entre 1 i 2 vvm en funció de les necessitats d'aeració. En el Biostat UD50 el control de l'aire introduït es realitza de forma manual perquè no disposa d'un control automàtic del cabal d'aire.

El medi utilitzat va ser el medi Invitrogen descrit al capítol 2.4.1 de materials i mètodes. El pH va ser controlat a 5.5, amb addició d'amoniac al 30% durant totes les fases del cultiu. Es va realitzar una addició de clorur d'amoni quan la biomassa estimada estava entorn dels  $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  per prevenir possibles limitacions de nitrogen (Cos 2005).

Amb el volum inicial de medi, a l'inici del cultiu hi havia 2 turbines de disc de pales planes submergides al medi i, quan el cultiu es trobava amb uns requeriments d'oxigen màxim a la fase d'inducció, es disposava de les tres turbines submergides dins el brou de cultiu.

Un cop acabada la fase de transició es va iniciar la fase d'inducció amb la introducció de metanol com a única font de carboni. La concentració residual de metanol al medi durant la fase d'inducció es va fixar en  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  per tal de reproduir les millors condicions observades amb anterioritat a escala laboratori amb l'estratègia de MNLFB.

### 8.2.3 Sistema de monitoratge i addició de metanol

Tal i com s'ha exposat a l'apartat 3.3.4 referent al monitoratge del metanol, per a la determinació del metanol residual s'utilitzava un mesurador al corrent gasós de sortida del bioreactor, el MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA). Aquest aparell utilitza com a sensor el TGS 822 (Figaro, Osaka, Japó). El mesurador MC-168 requereix per al seu correcte funcionament un control de pressió a capçalera del bioreactor i la utilització de dos mesuradors/controladors del cabal d'aire introduït al sistema de mesura. D'altra banda, l'amoníac (font de nitrogen descrita per als cultius de *P. pastoris*) exerceix una interferència sobre la mesura de metanol quan s'emptra aquest sistema (Ramon *et al.* 2004). Per tots aquests motius es va decidir cercar un altre mesurador de metanol que no fos tan sensible a aquests paràmetres, no requerís un control precís de la pressió al bioreactor i permetés la introducció d'amoníac com a font de nitrogen durant la fase d'inducció.

Per aquest motiu es va implementar al sistema el sensor comercial de metanol Model 2.1 (Raven Biotech Inc., Canadà). La diferència més important respecte el sistema previ és la introducció d'una sonda recoberta amb una membrana de silicona que es submergeix directament al brou de cultiu. A través seu difon el metanol que serà detectat posteriorment a la unitat de mesura (Figura 8.1). La sonda del mesurador va ser acoblada al Biostat UD50 mitjançant l'adaptació i mecanització d'un port estàndard del bioreactor. Aquesta sonda pot estar acoblada al sistema tant si l'esterilització és "steam in place" com si el bioreactor és introduït en una autoclau.



**Figura 8.1.** Detall del sensor de metanol de Raven Model 2.1 i de la sonda que s'utilitza per a la mesura del metanol al brou de cultiu.

El funcionament de l'aparell és molt senzill ja que únicament requereix la circulació d'un petit cabal d'aire sec portador que circula a través de la sonda i permet la mesura de metanol a l'aparell. El sistema pot funcionar sense l'ajuda de cap PC ja que el senyal de sortida pot anar directament connectat a una bomba. Així es permet la regulació del cabal de metanol d'entrada per tal de mantenir la consigna desitjada.

El sensor de l'aparell mesurador és també el TGS 822 (Figaro, Osaka, Japó). En presència de metanol (gas reductor) al corrent d'aire portador, disminueix la concentració d'oxigen que es pot absorbir a la superfície del sensor. Aquest fet fa disminuir la resistència elèctrica al pas dels electrons i aquest comportament es pot correlacionar amb la concentració de metanol al brou de cultiu.

En aquest estudi, es va instal·lar una adaptació del programari desenvolupat pel grup (Cos 2005) que permet el control de la consigna de metanol residual. Aquest programari utilitza el senyal rebut del mesurador de metanol i l'utilitza per controlar el cabal de metanol addicionat al sistema. Inicialment es va implementar només un controlador PI i, posteriorment, es va canviar a un controlador que també utilitzés la informació d'un model de consum de metanol (Cos *et al.* 2006).

Respecte al sistema a escala laboratori, es va modificar també el sistema d'introducció de metanol, que a la PPF es feia a través de dues microburetets de 10 ml cada una. Aquest muntatge permet una addició màxima de  $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , valor superior a l'addició màxima estimada per aquest volum de treball a partir de dades prèvies recollides a escala laboratori. Es va modificar el programa informàtic disponible per tal d'adaptar-lo a les condicions necessàries per a la realització del cultiu a la planta pilot.

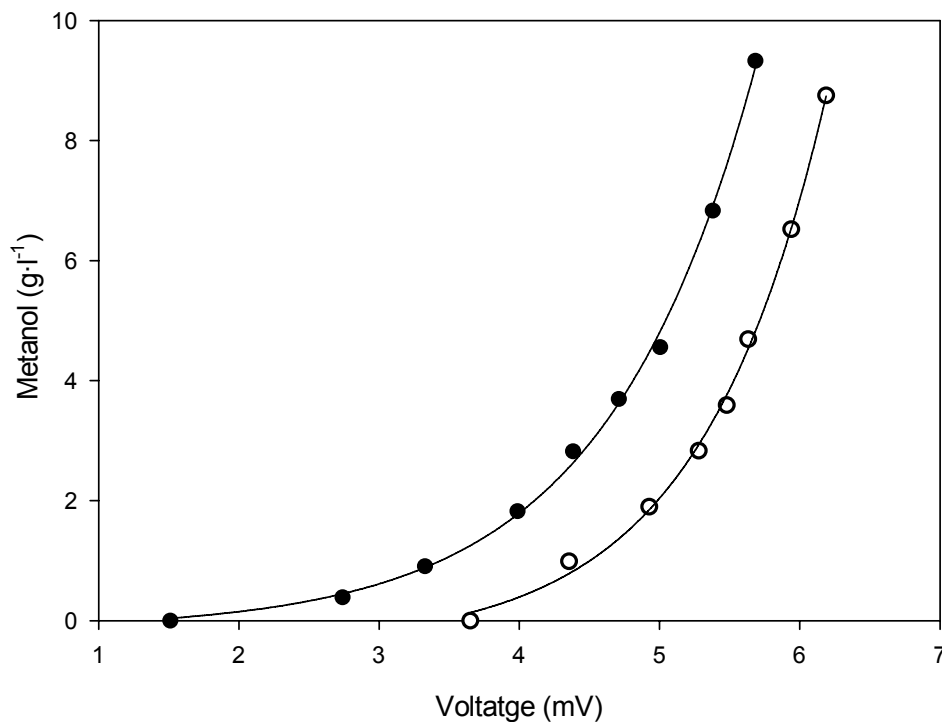
## 8.3 Resultats

### 8.3.1 Implementació del sensor de metanol Model 2.1 al sistema experimental. Calibratge.

La instal·lació del mesurador de metanol al bioreactor Biostat UD 50 es feia a través d'un dels ports estàndard a cues del bioreactor. Per realitzar aquesta connexió de manera estanca es van dissenyar i mecanitzar uns taps adaptables als ports estàndard del bioreactor.

El calibratge del sensor es va realitzar a 30°C, 600 rpm i 1 vvm d'aeració. Es va comprovar que variar l'agitació i l'aeració no ocasionava variacions sobre el senyal del mesurador.

De manera similar a d'altres treballs efectuats amb el sensor anterior de PTI Instruments Inc. (Ramon *et al.* 2004), es va comprovar que el calibratge que s'obtenia utilitzant medi de cultiu fresc o amb cèl·lules inactivades no era el mateix. A continuació es mostren les dues corbes de calibratge obtingudes i els paràmetres corresponents.



**Figura 8.2.** Calibratge del sensor del mesurador de metanol Raven Biotech Model 2.1 amb medi Invitrogen (●) i medi Invitrogen amb cèl·lules inactivades (○).

El calibratge s'ha fet utilitzant l'equació corresponent a una exponencial amb tres paràmetres (Equació 8.2):

$$\text{Metanol (g}\cdot\text{l}^{-1}) = y_0 + a \cdot \exp(b \cdot \text{Voltatge (V)}) \quad (\text{Eq. 8.2})$$

Els paràmetres obtinguts per cada cas es mostren a continuació (taula 8.1):

**Taula 8.1.** Paràmetres obtinguts de la calibratge del sensor de metanol Model 2.1 de Raven Biotech al fermentador Biostat UD 50.

	Amb medi Invitrogen	Amb medi Invitrogen i cèl·lules inactivades
$y_0$	-0.1486	-0.4158
$a$	0.0461	0.0096
$b$	0.9353	1.1082
$r^2$	0.9983	0.9978

Tal i com es pot comprovar a la Figura 8.2., la línia base del sensor es desplaça en presència de biomassa. Per a la utilització del sensor durant els cultius es va utilitzar el calibratge obtingut amb el medi Invitrogen però corregit en funció de la línia base de cada cultiu. Tal i com s'observa a la Figura 8.4 aquest fet ocasiona una desavinença entre els valors reals obtinguts per cromatografia de gasos i els valors indicats pel sensor amb el calibratge amb medi Invitrogen.

Si es realitza aquesta correcció, però a banda es suma al voltatge obtingut la diferència de voltatge entorn del valor consigna entre la corba sense biomassa i la corba amb biomassa (Figura 8.2), els resultats obtinguts són molt més satisfactoris (Figura 8.7).

La corba de calibratge segueix un comportament exponencial de saturació. A concentracions de metanol residual superior a  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  una petita variació de voltatge produeix una gran variació de la concentració de metanol, el que podria ocasionar majors errors de mesura. A la concentració de consigna desitjada,  $2.5 - 3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , aquest comportament no és tant accentuat. El senyal del sensor té en tot moment un comportament molt estable que permet un millor control del metanol residual que el que s'aconseguia amb el mesurador de PTI Instruments (Kathleen, USA), més sensible als canvis de pressió i interferències al bioreactor.

### 8.3.2 Cultius a escala pilot.

El factor d'escala entre el Biostat UD i el Biostat ED és de 10, un valor habitual en biotecnologia. Són dos equips molt semblants, tot i que no es compleix estrictament entre ells la semblança geomètrica. A la taula 8.2 es presenten les dimensions i relacions geomètriques entre ells. Pel que fa a l'agitació es van utilitzar tres turbines de



disc pel Biostat UD i quatre pel Biostat ED. Es va respectar la relació de volums que estaven submergits amb cada pala.

**Taula 8.2.** Dimensions i relacions geomètriques entre el Biostat ED i el Biostat UD, expressades en cm:  $D_i$ , diàmetre de l'impulsor;  $W_i$ , amplada de l'impulsor;  $D_t$ , diàmetre intern del bioreactor i  $H_t$ , alçada de líquid en repòs en el bioreactor.

	Biostat ED	Biostat UD
$D_i$	7	12.5
$W_i$	1.8	2.5
$D_t$	15.3	31.5
$H_t$	31	68.5
$D_i / D_t$	0.46	0.4
$W_i / D_i$	0.26	0.2

Tal i com es pot veure la relació alçada/diàmetre del reactor és més gran per al Biostat UD ja que presenta una relació cilíndrica més allargada. En el Biostat UD la relació entre el diàmetre de la turbina i el del bioreactor és menor que en el Biostat ED, la turbina és més estreta. També és menor pel Biostat UD que pel Biostat ED la relació entre l'amplada de l'impulsor i el diàmetre de l'impulsor. Els impulsors són, en relació al diàmetre del bioreactor, més petits pel Biostat UD que per l'ED. La distància entre impulsors es sol situar entre una i dues vegades el diàmetre de l'impulsor. Aquesta relació general es compleix entre els tres impulsors del Biostat UD, que es troben situats entre ells a 1.36  $D_i$  i 1.84  $D_i$ . Pel que fa al Biostat ED, la distància entre els impulsors és menor a una vegada el diàmetre de l'impulsor. Es troben situats a 0.57  $D_i$ , 0.78  $D_i$ , 0.82  $D_i$ . El Biostat ED és un bioreactor on dimensionalment la mescla està *a priori* més afavorida.

Una vegada analitzada la semblança entre els dos bioreactors, es va fixar per a l'escalat de la producció de la lipasa amb el sistema de *P. pastoris* la transferència d'oxigen com a paràmetre clau. Dels resultats previs s'havia observat que la millora de la producció anava molt lligada a la capacitat de transferir oxigen al cultiu durant la fase d'inducció transcorregudes les primeres hores d'adaptació.

Per aquest motiu es va plantejar la determinació del coeficient volumètric de transferència d'oxigen, el  $k_L a$ . Aquest coeficient es va determinar en el bioreactor Biostat UD50 mitjançant el mètode dinàmic. Aquest procediment consisteix en la

introducció al bioreactor d'un corrent de nitrogen per tal de reduir la concentració d'oxigen al medi. Un cop s'ha assolit l'estat estacionari es torna a introduir un cabal d'aire al bioreactor i es mesura l'evolució de l'oxigen dissolt al medi. Aquesta determinació es va fer amb medi de cultiu i a diferents vvm.

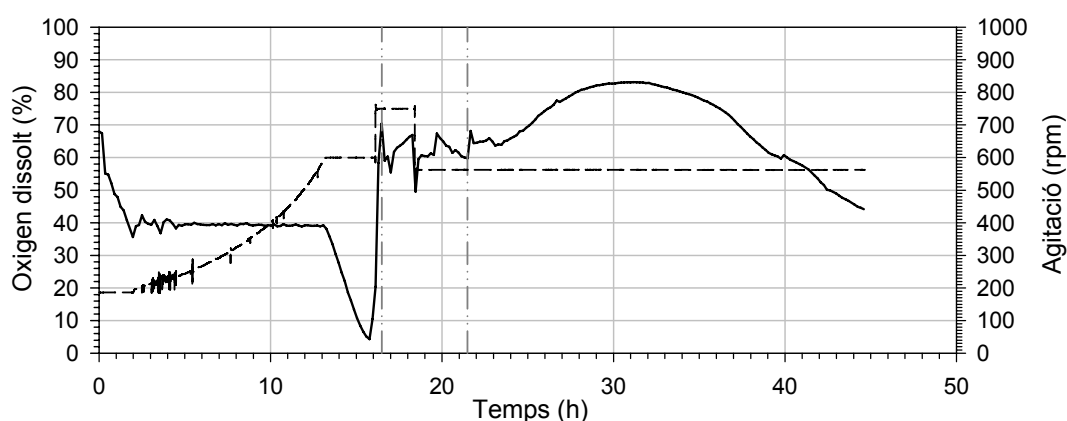
Per tal d'estimar el  $k_L a$  es va tenir en compte també la resposta de la sonda d'oxigen (OXYFERM 120, Hamilton, Reno, NV, USA), ja que ometre-la podria ocasionar una estimació poc acurada d'aquest coeficient volumètric de transferència de matèria. Per determinar-la es va mesurar l'evolució de l'oxigen dissolt en sotmetre la sonda a un esglaió de concentració d'oxigen quan es va transvasar d'un vas amb medi saturat en nitrogen a un vas que conté medi saturat en oxigen. El temps de resposta de la sonda ( $\tau$ ) es defineix com el temps que triga la sonda a assolir el 63.2% del valor final. Amb les dades experimentals obtingudes es va estimar un  $\tau$  d'aproximadament 20 s. Un cop avaluades les dades obtingudes de l'evolució de l'oxigen dissolt a diferents cabals d'aeració es va evidenciar que el temps de resposta de la sonda era massa gran per poder efectuar una bona determinació del  $k_L a$ . Com a criteri es recomana que  $\tau \leq (1/ k_L a)$  per obtenir mesures precises del coeficient volumètric de transferència d'oxigen. Una possible solució hauria estat reemplaçar la sonda per una altra amb un temps de resposta inferior però simultàniament a aquest procés el bioreactor Biostat ED va quedar inoperatiu i, amb això, la possibilitat d'efectuar la determinació del  $k_L a$  al bioreactor de referència.

Per aquest motiu es va decidir procedir a l'escalat directe del procés i permetre que durant el primer cultiu la velocitat d'agitació pugés fins el màxim recomanat durant l'operació (fixat a 600 rpm pels responsables tècnics de la planta pilot). El cabal d'aeració va quedar fixat a 1.5 vvm per prevenir possibles limitacions d'oxigen i la formació d'escumes a valors d'aeració superiors.

Malgrat tot, al final del cultiu discontinu de glicerol van donar-se limitacions de transferència de matèria i l'oxigen dissolt va baixar fins a nivells inferiors al 10% (Figura 8.3). És aconsellable que el percentatge d'oxigen dissolt no baixi per sota del 30% de saturació (Higgins & Cregg 1998). Paral·lelament a aquest fet, es va observar per cromatografia líquida d'alta prestació (HPLC) l'aparició d'un pic cromatogràfic corresponent a un compost que no apareixia al final dels discontinus en els cultius a escala laboratori, on no es donaven condicions de limitació d'oxigen. Es va comparar el temps de retenció d'aquest producte amb el dels subproductes típics com ara el piruvat i l'àcid fòrmic sense trobar-s'hi cap concordança.

En treballs posteriors del grup, en els que es treballa amb la inducció del promotor GAP en condicions de consum de glucosa, s'ha observat l'aparició d'un pic similar. Aquest pic s'ha pogut identificar com a arabitol mitjançant tècniques de LC/MS. S'ha descrit que l'arabitol es produeix en el llevat *Pichia anomala* en condicions de limitació d'oxigen en les fases finals del cultiu, fase estacionària (Passoth *et al.* 2006). En aquells casos, el creixement té lloc en condicions d'altres concentracions de sals i sucres. Es suggereix que, malgrat que no s'ha reportat que l'arabitol estigui involucrat en el metabolisme redox, 1 M de NADH es reoxida cada vegada que es sintetitza 1 M d'arabitol. Per tant, és possible que l'arabitol estigui involucrat en el balanç redox de les cèl·lules. Actualment, la continuació del treball d'escalat passa per minimitzar l'aparició d'aquest subproducte i confirmar si l'arabitol identificat amb el promotor GAP es també el que apareix sota el promotor AOX.

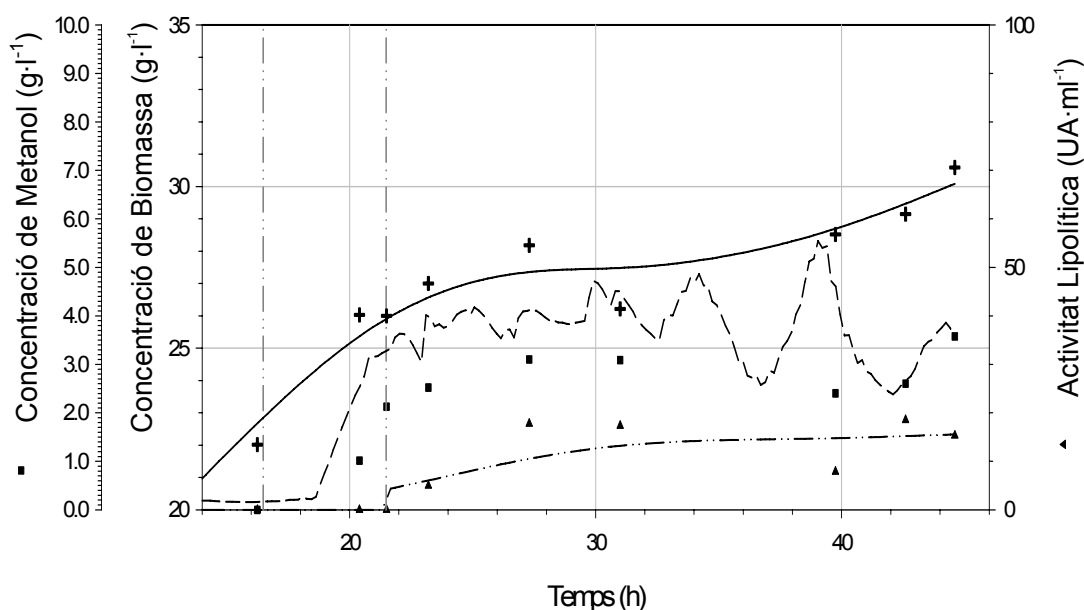
Un cop observada la limitació per oxigen es va incrementar a 2 vvm l'aeració del reactor i a unes 800 rpm l'agitació a l'inici de la transició. Aquestes modificacions van permetre recuperar uns valors acceptables d'oxigen dissolt i continuar amb la fase de transició una vegada esgotat el glicerol del medi (Figura 8.3). Posteriorment els requeriments d'oxigen van disminuir i això va permetre reduir l'agitació de nou. La presència del pic cromatogràfic aparegut al final del discontinu va durar fins aproximadament unes 32 h de cultiu.



**Figura 8.3.** Evolució de la concentració d'oxigen dissolt (—) i de l'agitació (---) al llarg del primer cultiu a escala pilot. Les línies discontinües verticals indiquen les 5 hores de transició del glicerol al metanol.

A la figura 8.4. es mostra l'evolució de les principals variables d'aquest cultiu. Tal i com es pot observar, malgrat que el creixement microbià va ser lleugerament inferior als cultius a escala 5L, és en la producció de lipasa extracel·lular on el comportament és més desfavorable (Figures 7.1 i 7.2). Tal i com succeïa en els cultius

a escala laboratori, un cop acabada la transició es produeix un període d'unes 15 h en els quals el cultiu s'adapta al creixement únicament sobre metanol.

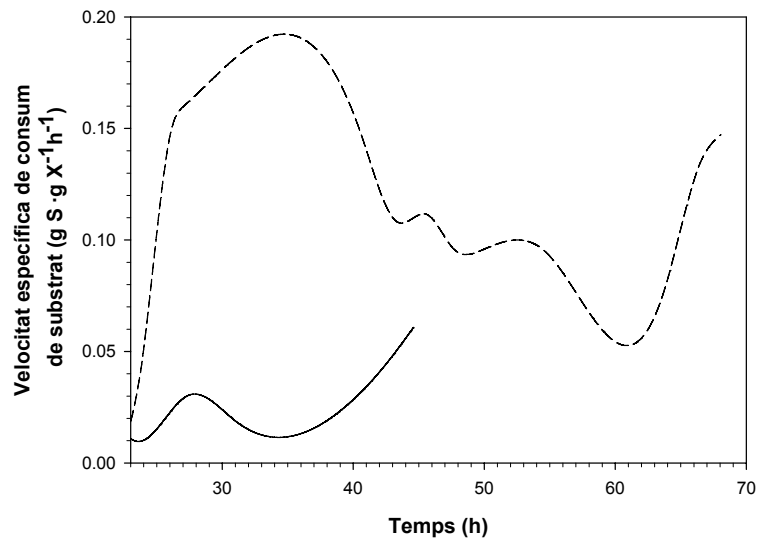


**Figura 8.4.** Evolució de diferents variables del procés durant el primer creixement discontinu alimentat de metanol a escala pilot. Biomassa *off line* (+) i suavitzada (—), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; metanol *off line* (■) i *on line* (- -), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica extracel·lular *off line* (▲) i suavitzada (-.-), en  $\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Un cop transcorregut aquest temps de latència, la producció de lipasa extracel·lular i el consum de metanol (Figura 8.5) no es van recuperar i es van mantenir a uns nivells significativament menors que en els cultius de referència a escala laboratori (Figura 7.10). En cap cas es va mesurar activitat lipolítica intracel·lular. Per aquests motius es va decidir aturar el cultiu i millorar la transferència d'oxigen al final de discontinu.

Com s'ha comentat a l'apartat 8.2.3 de materials i mètodes d'aquest capítol, durant aquest primer cultiu el control de metanol es va fer utilitzant un controlador PI que actuava sobre el cabal de metanol addicionat. S'observa (Figura 8.4.) que el control de metanol no va ser prou satisfactori, tot i que les dades mesurades *off-line* no indiquen grans oscil·lacions. Encara que el metanol residual desitjat estava a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  es va mantenir aproximadament a uns  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . No es considera aquest fet com a responsable de la disminució de totes les velocitats específiques del cultiu ja que la concentració màxima assolida no és en cap cas crítica. Cal constatar la diferència entre la mesura del sensor de metanol i la mesura cromatogràfica i la necessitat de millorar el calibratge.

La limitació d'oxigen al final de la fase discontinua de glicerol va ocasionar l'aparició d'un subproducte que podria causar una repressió de l'expressió de l'alcohol oxidasa i dificultar tant el consum de metanol com la producció extracel·lular. A les 32 hores de cultiu aquest subproducte estava completament metabolitzat i es va observar un augment en la velocitat específica de consum de substrat (Figura 8.5), que es mantenia en valors inferiors als observats pels cultius a escala laboratori. Es va aturar el cultiu perquè no s'havia complert l'objectiu d'escalar la productivitat.



**Figura 8.5.** Evolució de la velocitat específica de consum de metanol en la fase d'inducció de cultius a diferents escales. (—) cultiu en planta pilot i a  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de metanol, i (- - -) cultiu a escala laboratori i a  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de metanol.

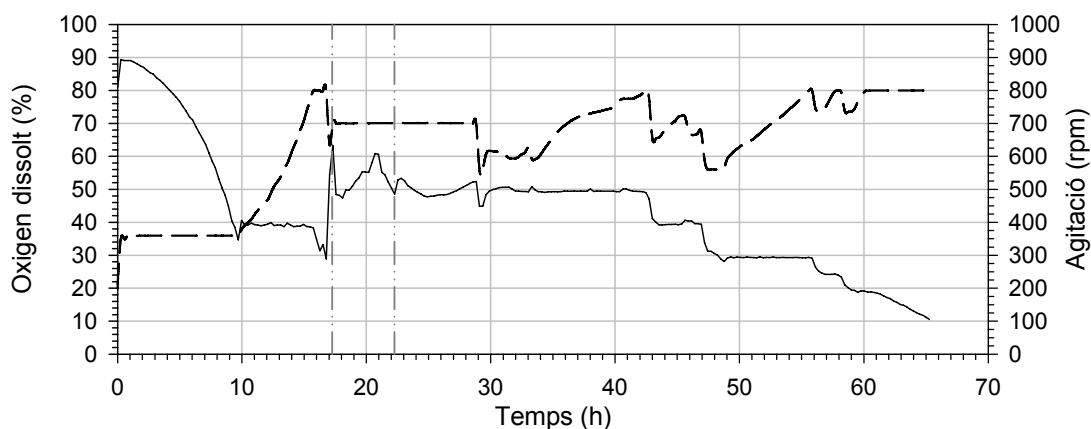
Un cop recollits els resultats corresponents al primer cultiu a escala pilot es van implementar diferents millores:

- Quant a la millora de la transferència d'oxigen, es va decidir permetre que l'agitació pogués augmentar automàticament fins a 800 rpm si era necessari (tot i que no ser recomanable durant períodes massa perllongats). Així mateix, i per contrarestar l'increment de potència consumida que aquest fet comportaria, es va decidir activar el control de l'agitació del bioreactor en funció del percentatge d'oxigen dissolt mesurat. Es va fixar una consigna del 40% d'oxigen dissolt durant el discontinu en glicerol. D'aquesta manera l'agitació és inicialment baixa i va incrementant-se segons els requeriments d'oxigen del cultiu. Es va decidir mantenir l'aeració durant la fase discontinua a 1.5 vvm per evitar la formació d'escumes.

- Quant a la millora del control de metanol, es va adaptar el programari incorporant-hi el controlador de metanol que considera també el consum de metanol del cultiu a banda de l'estructura típica d'un controlador PI (Cos *et al.* 2006).

Un cop implementades aquestes modificacions es va dur a terme el segon cultiu a escala pilot. A la figura 8.6 podem observar com l'agitació va augmentar fins al valor màxim permès al final de la fase discontinua (entorn de les 15-17 h de procés) i que l'oxigen dissolt va disminuir fins a valors no inferiors al 30%. Tot i que les condicions d'aport d'oxigen no van ser desfavorables es va mesurar cromatogràficament la presència del mateix subproducte que en el primer cultiu. En aquest cas, però, la concentració de subproducte era molt menor. Així doncs, controlar el percentatge d'oxigen dissolt i mantenir-lo a nivells no inferiors al 30% no va ser suficient per evitar la formació del subproducte però sí per disminuir-ne la quantitat.

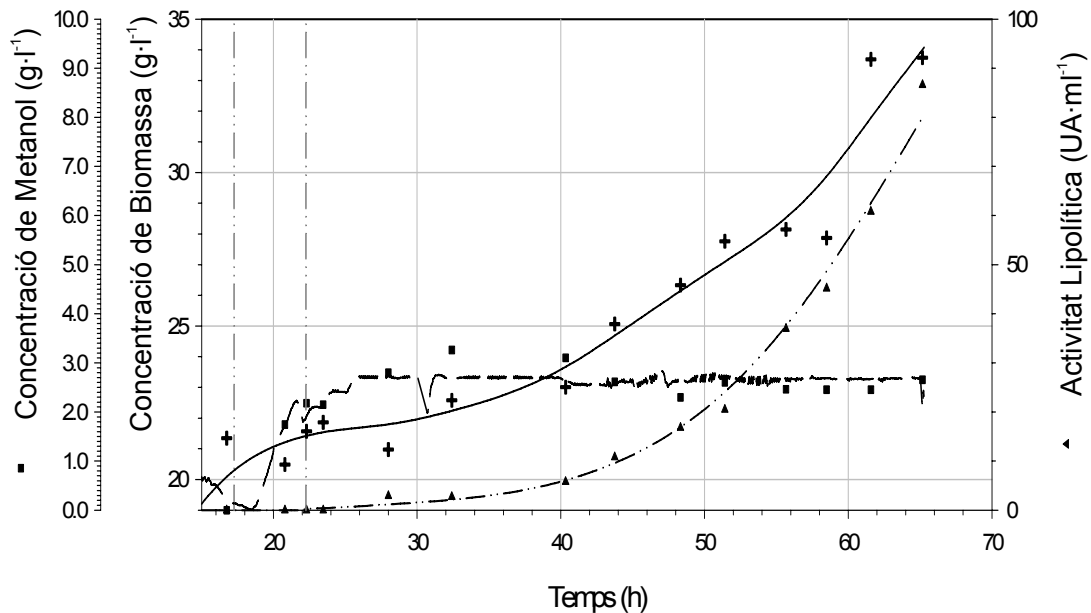
En aquest cas, abans d'iniciar la transició i l'alimentació de glicerol es va decidir esperar a que el subproducte fos consumit i per això es va incrementar momentàniament l'aeració a 2 vvm, amb el que l'oxigen dissolt va retornar al valor consigna del 40%. Transcorreguts 20 minuts des de l'exhauriment del glicerol no es mesurava cap pic de subproducte i es va iniciar la fase de transició.



**Figura 8.6** Evolució de la concentració d'oxigen dissolt (—) i de l'agitació (---) al llarg del segon cultiu a escala pilot. Les línies discontinúes verticals indiquen les 5 hores de transició després del discontinu amb glicerol.

A la figura 8.7 es mostra l'evolució de les principals variables al llarg del cultiu. Es pot observar que el creixement de la biomassa i de l'activitat lipolítica extracel·lular va ser més satisfactòria que en el primer cultiu a escala pilot. Pel que fa al control del metanol residual amb l'aplicació d'un controlador que utilitza la informació del consum

de substrat va ser més estable que en el primer cultiu. Tot i que en iniciar-se la fase d'inducció la concentració va augmentar fins a valors pròxims als  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , un cop estabilitzat el senyal, el metanol residual es va mantenir proper als  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  desitjats. En aquest cas es va ajustar el senyal de voltatge del sensor tal i com es comenta a l'apartat 8.3.1.

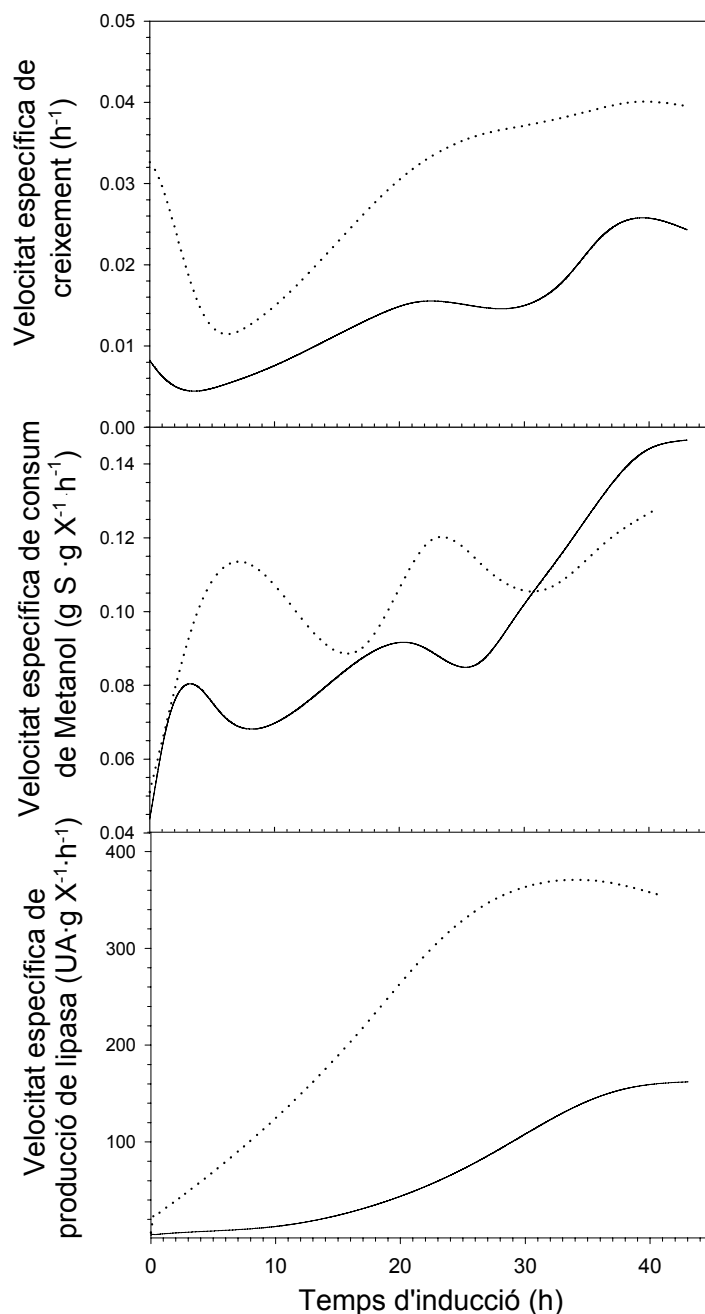


**Figura 8.7.** Evolució de diferents variables del procés durant el primer creixement discontinu alimentat de metanol a escala pilot. Biomassa *off line* (+) i suavitzada (—), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; metanol *off line* (■) i *on line* (---), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica extracel·lular *off line* (▲) i suavitzada (-.-.), en ( $\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Les velocitats específiques del cultiu (Figura 8.8) van ser inferiors a les del cultiu de referència a escala laboratori a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. La velocitat específica de creixement va augmentar un cop iniciada la inducció i va tendir a estabilitzar-se al final del cultiu. En relació al cultiu a escala laboratori aquesta estabilització es produeix més avançada la inducció. Respecte a la velocitat específica de producció de lipasa extracel·lular, el comportament va ser similar al cultiu a escala laboratori. La  $q_p$  estava entorn d'uns valors relativament baixos i va anar augmentant al llarg de la inducció fins a un valor màxim en el qual va estabilitzar-se. Pel que fa a l'evolució de la  $q_s$  va ser lleugerament diferent a la dels cultius de referència. Mentre que a escala laboratori la  $q_s$  es manté relativament constant entorn dels  $0.11 \text{ gS}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , a escala pilot va començar a valors inferiors als  $0.1 \text{ gS}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  i va anar augmentant fins a uns  $0.15 \text{ gS}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  més avançada la fase d'inducció.

Aquesta diferent evolució de la  $q_s$  podria ser deguda a la generació d'aquest subproducte al final de la fase de discontinu que pot comprometre la inducció del

promotor de l'alcohol oxidasa. En aquest segon cultiu a escala pilot, es va reduir la concentració d'aquest subproducte i es va esperar a la seva assimilació abans d'iniciar la transició. Aquesta actuació hauria beneficiat l'expressió sota el promotor i d'aquí l'obtenció de millors resultats, però no hauria estat suficient per aconseguir la inducció desitjada i uns valors de producció i creixement similars als d'escala laboratori. En cap dels cultius a escala pilot es mesuren nivells apreciables d'activitat lipolítica intracel·lular.



**Figura 8.8.** Evolució de les velocitats específiques de creixement, consum de metanol i producció de lipasa extracel·lular durant la fase d'inducció del segon cultiu a escala planta pilot (línia contínua) i del cultiu a escala laboratori a  $2.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de metanol (línia discontinua).



Així doncs, les millores proposades en el segon cultiu van resultar en tendències dels paràmetres clau del cultiu més similars a les esperades però en valors absoluts menors als desitjats (Taula 8.3).

**Taula 8.3.** Comparació de la productivitat del cultiu a una concentració de metanol residual de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a escala laboratori i escala pilot.

	Productivitat ( $\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
Escala laboratori	5869
Escala pilot	1329

Augmentar l'agitació fins a 800 rpm no va ser suficient per garantir l'aport d'oxigen necessari al cultiu. Seria necessari treballar en la millora de la transferència de matèria del reactor des d'una perspectiva de millora física del sistema (millorar la mescla del brou) o incorporació de nou utilatge: instal·lar un sistema de control de pressió que permetés treballar a sobrepressió i augmentar la solubilitat de l'oxigen (Charoenrat *et al.* 2006). Sense modificacions físiques del sistema es podria plantejar la reducció de la concentració de glicerol a la fase discontinua del cultiu. Això resultaria en uns nivells de biomassa menors i, per tant, en una reducció dels requeriments d'oxigen. D'aquesta manera es podria intentar assolir les mateixes velocitats específiques que en els cultius de referència.

Així mateix, la introducció d'oxigen pur al cultiu seria una altra possibilitat però, atesa la coexistència de combustible i comburent a les mateixes instal·lacions, es descarta aquesta opció (Curvers *et al.* 2001).

Si la distribució dels substrats no és homogènia poden crear-se gradients de concentracions de glicerol, d'oxigen i metanol que condueixin a resultats diferents als esperats. Cal considerar que les sondes de metanol i oxigen es troben situades a cues del bioreactor i poden no representar la concentració de metanol i oxigen presents en tot el volum. El grup d'investigació continua treballant en aquesta línia i també en l'estudi de la distribució dels substrats al bioreactor a escala pilot.

## 8.4 Conclusions

En aquest capítol s'ha descrit el procés d'escalat en planta pilot de l'estratègia de producció d'una lipasa de *R. oryzae* en el sistema d'expressió de *P. pastoris* Mut<sup>+</sup>. S'han assolit les següents conclusions:

- La transferència d'oxigen és un paràmetre clau per poder aconseguir la mateixa productivitat que a escala laboratori.
- Amb la incorporació d'un sistema de control on es consideren tant un terme PI com un terme basat en la velocitat de consum de metanol (Cos *et al.* 2006), és possible un control estable de la concentració de substrat residual. Així es poden obtenir, durant el cultiu, uns perfils de  $\mu$ ,  $q_S$  i  $q_P$  similars als del cultiu a escala laboratori.
- Amb el sistema experimental actual no és possible l'escalat del procés d'escala laboratori a escala pilot en termes de productivitat. Caldria afegir diferents components al sistema experimental o redissenyar-los per tal d'augmentar la transferència d'oxigen i permetre l'escalat de l'estratègia de procés desitjada. Així mateix, s'hauria d'estudiar l'efecte de la transferència de matèria en la distribució dels substrats al bioreactor.

## 8.5 Referències bibliogràfiques

Charoenrat,T., Ketudat-Cairns,M., Jahic,M., Veide,A. & Enfors,S.O. 2006. Increased total air pressure versus oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 205-211.

Cos,O. 2005. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia Pastoris*. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.

Cos,O., Ramon,R., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.

Curvers,S., Brixius,P., Klauser,T., Thommes,J., Weuster-Botz,D., Takors,R. & Wandrey,C. 2001. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnology Progress*, 495-502.

Dux,M.P., Barent,R., Sinha,J., Gouthro,M., Swanson,T., Barthuli,A., Inan,M., Ross,J.T., Smith,L.A., Smith,T.J., Webb,R., Loveless,B., Henderson,I. & Meagher,M.M. 2006. Purification and scale-up of a recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype E in *Pichia pastoris* GS115. *Protein Expression and Purification*, 45, 359-367.

Higgins,D. & Cregg,J.E. 1998. *Pichia* Protocols. Totowa, New Jersey.

Johnson,S.K., Zhang,W., Smith,L.A., Hywood-Potter,K.J., Todd Swanson,S., Schlegel,V.L. & Meagher,M.M. 2003. Scale-up of the fermentation and purification of

the recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 32, 1-9.

Junker,B.H. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. Journal of Biosciences and Bioengineering, 97, 347-364.

Passoth,V., Fredlund,E., Druvefors,U.A. & Schnurer,J. 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Research, 6, 3-13.

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*. Biotechnology Letters, 26, 1447-1452.

Solà,C. & Gòdia,F. 1994. Scale-up. In: Bioreactor System Design. .Ed. by J.A.Asenjo & J.C.Merchuk., pp. 511-552. New York: Marcel Dekker, Inc.

Zhao,W., Wang,J., Deng,R. & Wang,X. 2008. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 189-195.



# Conclusions

En aquest treball s'han desenvolupat i aplicat diferents tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu que han permès millorar la producció de la ROL en una soca Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris* a escala laboratori. Aquest fet ha permès poder estudiar el següent pas de canvi d'escala de la producció a nivell pilot.

Les conclusions generals que s'extreuen d'aquest treball són:

- Per al monitoratge del metanol en línia s'ha desenvolupat un analitzador SIA i s'ha aplicat un analitzador comercial.

L'analitzador SIA realitza una mesura enzimàtica amb extracció asèptica de brou de cultiu lliure de biomassa. És apte per al monitoratge de la concentració de metanol en cultius discontinus alimentats de soques Mut<sup>s</sup> però s'estima que té una freqüència d'anàlisi insuficient per al monitoratge de cultius de soques Mut<sup>+</sup>.

Pel que fa a l'analitzador comercial que s'aplica mesura directament el metanol de la fase líquida del cultiu mitjançant una membrana inserida al bioreactor. Aquest analitzador ha permès superar els desavantatges que s'havien observat amb altres analitzadors comercials de gasos de sortida, s'han eliminat les interferències amb l'amoníac i l'elevada sensibilitat a la pressió del bioreactor. D'altra banda és un analitzador que no consumeix reactius. La presència en aquest segon analitzador d'una sonda amb una membrana submergida dintre el brou de cultiu ha permès obtenir un seguiment més robust de la concentració de metanol.

- S'ha aplicat amb èxit la fluorimetria com a tècnica de monitoratge de la biomassa i el substrat en cultius discontinus induïts i no de *P. pastoris*.

S'ha aplicat la fluorimetria univariable i multivariable *in situ* per al seguiment de la concentració de biomassa i la multivariable *in situ* per al seguiment del substrat en aquests cultius.

Per poder aplicar la fluorimetria *in situ* multivariable a la predicció d'aquestes variables de cultiu s'han de tractar les mesures de fluorescència aplicant mètodes quimiomètrics. S'han validat tant l'aplicació d'un mètode de PLS com un PARAFAC + PLS. La segona metodologia permet obtenir de forma més senzilla una interpretació qualitativa de les mesures de fluorescència.

- Per al seguiment de la producció de ROL mitjançant fluorimetria univariable s'ha fet necessari unir la proteïna d'interès a un producte fluorescent, en aquest treball s'ha escollit fusionar la ROL a la GFP S65T. S'han observat algunes limitacions de la tècnica ja que la fusió a GFP disminueix els nivells de producció extracel·lular de ROL i, a banda, es mesuren interferències entre el senyal de fluorescència de la GFP S65T i la riboflavina endògena que *P. pastoris* excreta al medi. Aquesta limitació es podria evitar canviant a un altre mutant de GFP.
- Pel que fa a la producció de la ROL, s'ha estudiat l'efecte de la concentració de metanol residual sobre la producció extracel·lular de la lipasa en soques Mut+ de *P. pastoris* i s'ha observat un efecte clar d'aquesta variable en els nivells finals obtinguts de proteïna extracel·lular.
- Per poder obtenir una bona reproductibilitat de la producció de ROL amb una soca Mut+ de *P. pastoris* és necessari disposar d'un mètode robust i fiable de monitoratge del substrat, que faciliti aconseguir un control de la consigna de substrat entorn de l'òptim.
- S'ha determinat que la concentració òptima de metanol durant la fase d'inducció en discontinu alimentat està entorn els 2.5 g·l<sup>-1</sup>. La productivitat assolida en una fase d'inducció en condicions de metanol no limitant a aquesta concentració és de 5869 UA·L brou<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. S'ha observat un efecte inhibidor del metanol a concentracions superiors.
- S'han determinat les principals limitacions de l'estratègia de producció basada en una etapa de discontinu alimentat en condicions d'excés de metanol: la limitació per transferència d'oxigen durant la fase d'inducció, una elevada mortalitat cel·lular durant aquesta fase (entorn del 25% de les cèl·lules) i l'acumulació de lipasa intracel·lular al llarg de la fase d'inducció.
- S'han aplicat estratègies d'operació alternatives que permeten millorar algunes de les limitacions observades. S'ha treballat en addicionar una fase

d'alimentació en condicions de metanol limitant un cop s'observa la limitació per transferència d'oxigen. Aquesta estratègia no ha millorat la viabilitat cel·lular però ha evitat la limitació per oxigen i resulta en un augment de la productivitat del sistema fins a un valor de  $8106 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

- S'ha treballat amb l'estratègia de limitació per temperatura (TLFB) durant la fase d'inducció. Aquesta estratègia ha millorat els nivells de viabilitat cel·lular i la limitació per transferència d'oxigen però no ha resultat en una millor productivitat del sistema.
- S'ha aplicat una estratègia de discontinu alimentat en condicions no limitants de metanol a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  però emprant un medi amb un contingut de sals menor. Quan l'oxigen esdevé limitant, s'ha aplicat una fase final de limitació de temperatura. S'ha aconseguit millorar el percentatge de viabilitat cel·lular i la limitació per transferència d'oxigen. Encara que ha disminuït la productivitat del sistema un 26%, s'obté un producte final 1.3 vegades més pur en termes d'activitat lipolítica enfront de proteïna total.
- Quant a productivitat del sistema de producció, l'estratègia de MNLFB seguida d'una estratègia de MLFB ha aportat els millors resultats. Pel que fa a la puresa del producte, l'estratègia de MNLFB amb un medi amb un menor contingut salí seguit d'una fase de TLFB ha resultat en les millors condicions.
- Una vegada identificades les condicions més favorables a escala laboratori s'ha començat l'etapa d'escalat a escala pilot (50L). S'ha observat que, de nou, la transferència d'oxigen és un paràmetre clau. En condicions pilot, la limitació d'oxigen en el reactor s'ha observat ja durant la primera de creixement no induït i, en concret, al final del cultiu discontinu amb glicerol. Aquesta limitació ha provocat l'aparició d'un subproducte que sembla prevenir l'expressió extracel·lular de ROL. La millora parcial en la transferència d'oxigen ha produït una menor acumulació d'aquest subproducte i una millora de la producció de ROL extracel·lular. No s'ha aconseguit escalar la productivitat del sistema. Actualment s'està treballant per continuar millorant la transferència de matèria al sistema i extrapolar la productivitat obtinguda a escala pilot.



# Llistat de Publicacions

- Surribas,A., Cos,O., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2003. On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnology Letters*, 25, 1795-1800.
- Surribas,A., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006. Biomass estimation using fluorescence measurements in *Pichia pastoris* bioprocess. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 23-28.
- Surribas,A., Geissler,D., Gierse,A., Scheper,T., Hitzmann,B., Montesinos,J.L. & Valero,F. 2006. State variables monitoring by *in situ* multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 124, 412-419.
- Surribas,A., Amigo,J.M., Coello,J., Montesinos,J.L., Valero,F. & Maspoch,S. 2006. Parallel factor analysis combined with PLS regression applied to the on-line monitoring of *Pichia pastoris* cultures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1281-1288.
- Surribas,A., Resina,D., Ferrer,P. & Valero,F. 2007. Rivoflavin may interfere with on-line monitoring of secreted green fluorescence protein fusion proteins in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 6, 15.
- Surribas,A., Stahn,R., Montesinos,J.L., Enfors,S.O., Valero,F. & Jahic,M. 2007. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *Journal of Biotechnology*, 130, 291-299.
- Amigo,J.M., Surribas,A., Coello,J., Montesinos,J.L., Maspoch,S. & Valero,F. 2008. On-line parallel factor analysis. A step forward in the monitoring of bioprocesses in real time. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 92, 44-52.

# Abreviatures

A	Submatriu d'espectres d'emissió.
AFU	Unitats arbitràries de fluorescència.
AOX	Enzim alcohol oxidasa.
AOX1	Gen alcohol oxidasa 1.
AOX2	Gen alcohol oxidasa 2.
B	Submatriu d'espectre d'excitació.
BiP	Xaperona d'unió a proteïna.
BMG	Medi mínim tamponat amb glicerol.
BMGY	Medi mínim tamponat amb glicerol i extracte de llevat.
BOX	<i>Bis-(1,3-dibutilbarbituric acid) trimethine oxonol.</i>
C	Submatriu d'evolució de la senyal dels fluoròfors.
CER	Velocitat de producció de diòxid de carboni ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).
CG	Cromatografia de gasos.
DBS	Medi salí tamponat Dulbeccos.
DCU	Unitat de control digital.
DCW	Biomassa expressada en pes sec ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).
DHAS	Enzim dihidroxiacetona sintasa.
$D_i$	Diàmetre de l'impulsor (m).
DOT	Senyal d'oxigen dissolt (%).
$D_t$	Diàmetre intern del bioreactor (m).
EGFP	<i>Green Fluorescence Protein</i> millorada.
EMA	Agència Europea de Medicaments.
ER	Reticle endoplasmàtic.
F	Intensitat de fluorescència (AFU).
FAD	Dinucleòtid d'adenina i de flavina.
FDA	Administració Americana d'Aliments i Medicaments.
FER	Velocitat d'evolució de fluorescència ( $\text{AFU}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).
FIA	Analitzador d'injecció de flux.
FLD	Enzim formaldehid deshidrogenasa.
FMN	Mononucleòtid de flavina.
GFP	<i>Green Fluorescence Protein.</i>
GFPuv	Mutant de la GFP amb emissió a la regió de l'ultraviolat.
GRAS	Microorganisme reconegut com a generalment segur.
GSH	Glutathionina reduïda.
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució.
$H_t$	Alçada del líquid al bioreactor (m).

$k_{La}$	Coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen ( $h^{-1}$ ).
LB	Medi de cultiu de Luria-Bertani.
LC	Cromatografia líquida.
LSM	Medi amb un contingut baix en sals.
M	Matriu tridimensional de dades de fluorescència.
MARE	Valor mitjà de l'error relatiu absolut.
$m_{FIX}$	Coeficient de manteniment fluorescència-biomassa ( $AFU \cdot g^{-1} X \cdot l \cdot h^{-1}$ ).
MIR	Espectroscòpia d'infraroig mig.
MLFB	Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions limitants de substrat.
MNLFB	Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions no limitants de substrat.
MS	Espectrometria de masses.
MSCP	Control Estadístic i Multivariable de Processos.
Mut <sup>-</sup>	Fenotip de <i>P. pastoris</i> sense capacitat d'utilització de metanol.
Mut <sup>+</sup>	Fenotip de <i>P. pastoris</i> amb alta taxa d'utilització de metanol.
Mut <sup>s</sup>	Fenotip de <i>P. pastoris</i> amb baixa taxa d'utilització de metanol.
NAD(P)H	Dinucleòtid de nicotinamida adenina fosfat.
NIR	Espectroscòpia d'infraroig pròxim.
NOC	Condicions normals d'operació.
OD <sub>600</sub>	Densitat òptica a 600 nm (UAbs).
ODEs	Equacions diferencials ordinàries.
OUR	Velocitat de consum d'oxigen ( $mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ ).
P/V	Potència per unitat de volum ( $KW \cdot m^{-3}$ ).
<i>pAOX</i>	Promotor alcohol oxidasa.
PARAFAC	Mètode d'anàlisi per factors paral·lels.
PAT	Tecnologia Analítica de Procés.
PCA	Mètode d'anàlisi per components principals.
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa.
<i>pFLD1</i>	Promotor formaldehid deshidrogenasa.
<i>pGAP</i>	Promotor gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa.
PI	Iodur de propidi.
PI	Control proporcional integral.
<i>pICL1</i>	Promotor isocitrat liasa.
PID	Control proporcional, integral i derivatiu.

PLS	Ajust matemàtic per mínim quadrats parcials.
POD	Enzim peroxidasa.
PPF	Planta pilot de fermentació.
PRESS	<i>Predicted Residual Error Sum of Squares</i> .
PTFE	Politetrafluorur d'etilè, Tefló.
PTM1	Solució de sals traça.
PVC	Policlorur de vinil.
$q_p$	Velocitat específica de producció de lipasa extracel·lular ( $UA \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ ).
$q_s$	Velocitat específica de consum de substrat ( $gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ ).
R	Matriu de residuals
r-FIA	Analitzador revers d'injecció de flux.
RMSCV	<i>Root Mean Squared Error</i> de Validació Creuada.
RMSEC	<i>Root Mean Squared Error</i> de Calibratge.
RMSEP	<i>Root Mean Squared Error</i> de Predicció.
ROL	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> .
ROS	Espècies reactives d'oxigen.
RSD	Desviació estàndard relativa.
SCP	Single cell proteins.
SIA	Analitzador per injecció seqüencial.
SOE-PCR	PCR d'unió per extensions sobreposades.
TLFB	Cultiu discontinu alimentat de metanol en condicions de temperatura limitant.
UA	Unitats d'activitat lipolítica.
UPR	Resposta cel·lular a proteïnes no plegades.
v/v	Concentració en volum de solut dividit per volum de solució.
vvm	Aeració d'un cultiu expressada en cabal de gas dividit per volum de medi.
w/v	Concentració en pes de solut dividit per volum de solució.
$W_i$	Amplada de l'impulsor (m).
X	Concentració de biomassa ( $g \cdot l^{-1}$ ); Matriu de dades analítiques independents.
x	Variables independents: mesures analítiques.
Y	Matriu de concentracions.
y	Variables dependents: concentracions.
$Y_{F/X}$	Rendiment biomassa–fluorescència ( $AFU \cdot gX^{-1} \cdot l$ ).
YPD	Medi complex amb extracte de llevat, peptona i dextrosa.

**Abreviatures gregues:**

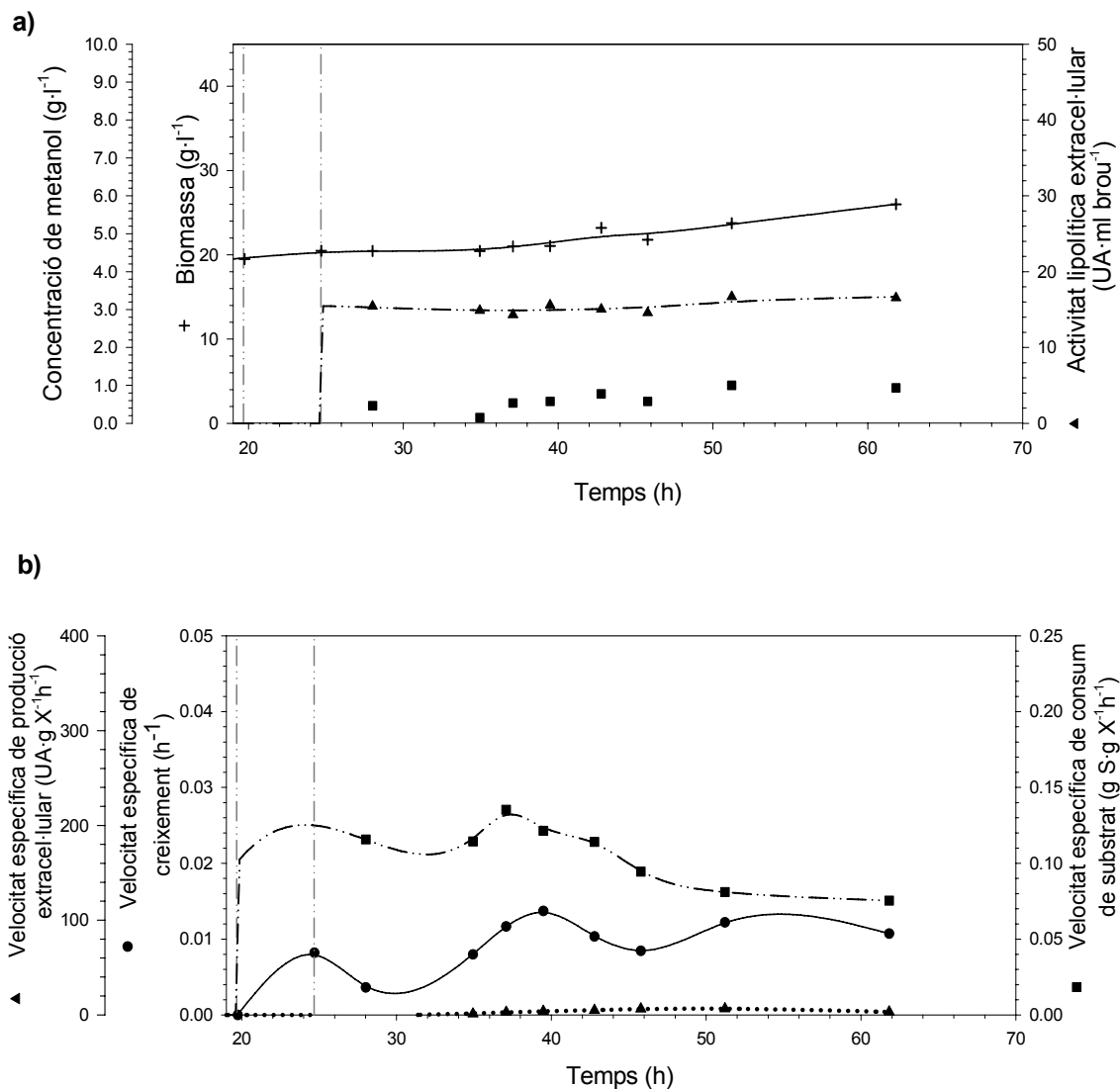
$\lambda$	Longitud d'ona (nm).
$\mu$	Velocitat específica de creixement ( $h^{-1}$ ).
$v_p$	Velocitat específica d'evolució d'un producte ( $g P \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ ).
$\tau$	Temps de residència (h); temps de resposta de la sonda d'oxigen (s).



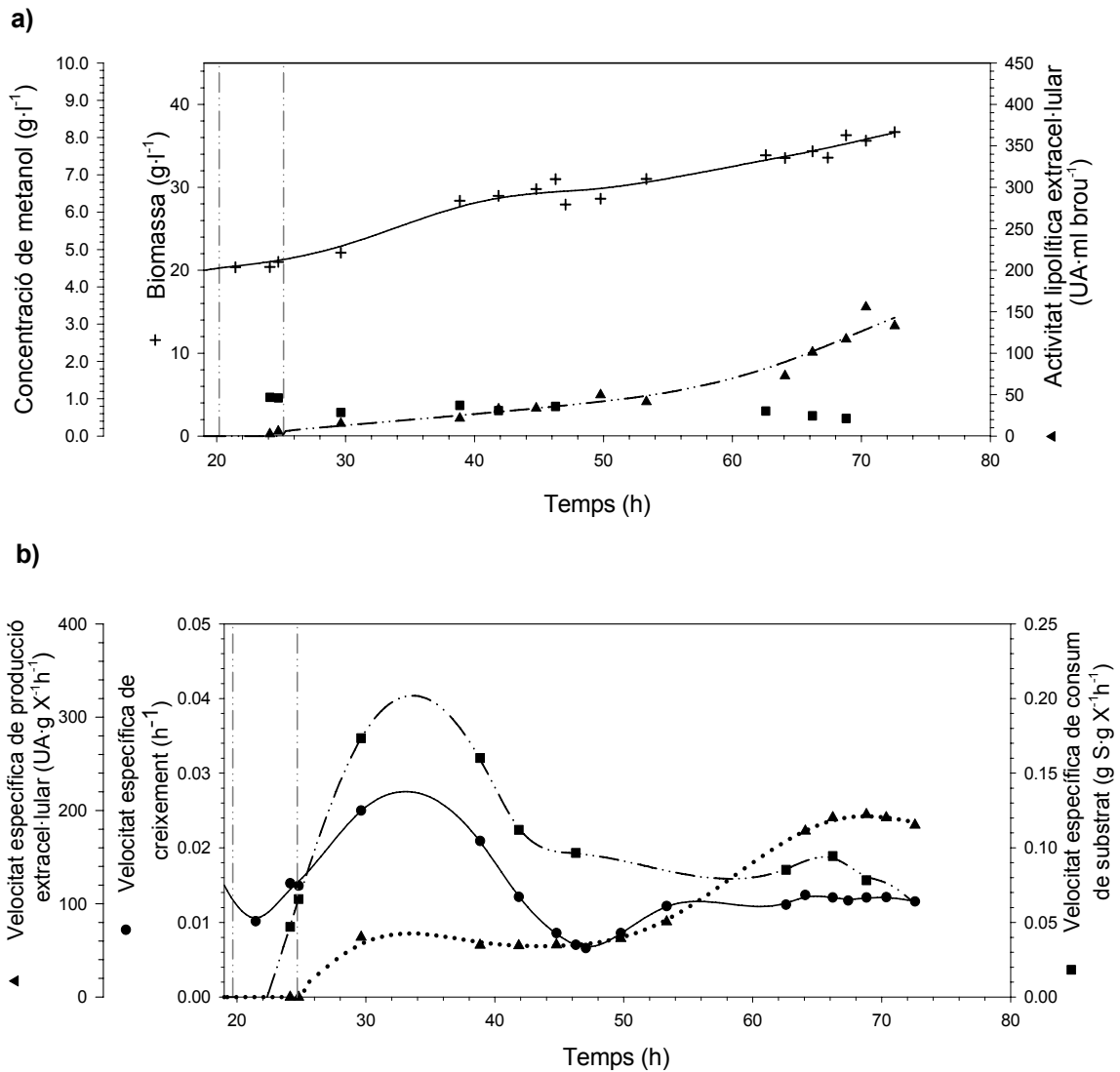


# Apèndix

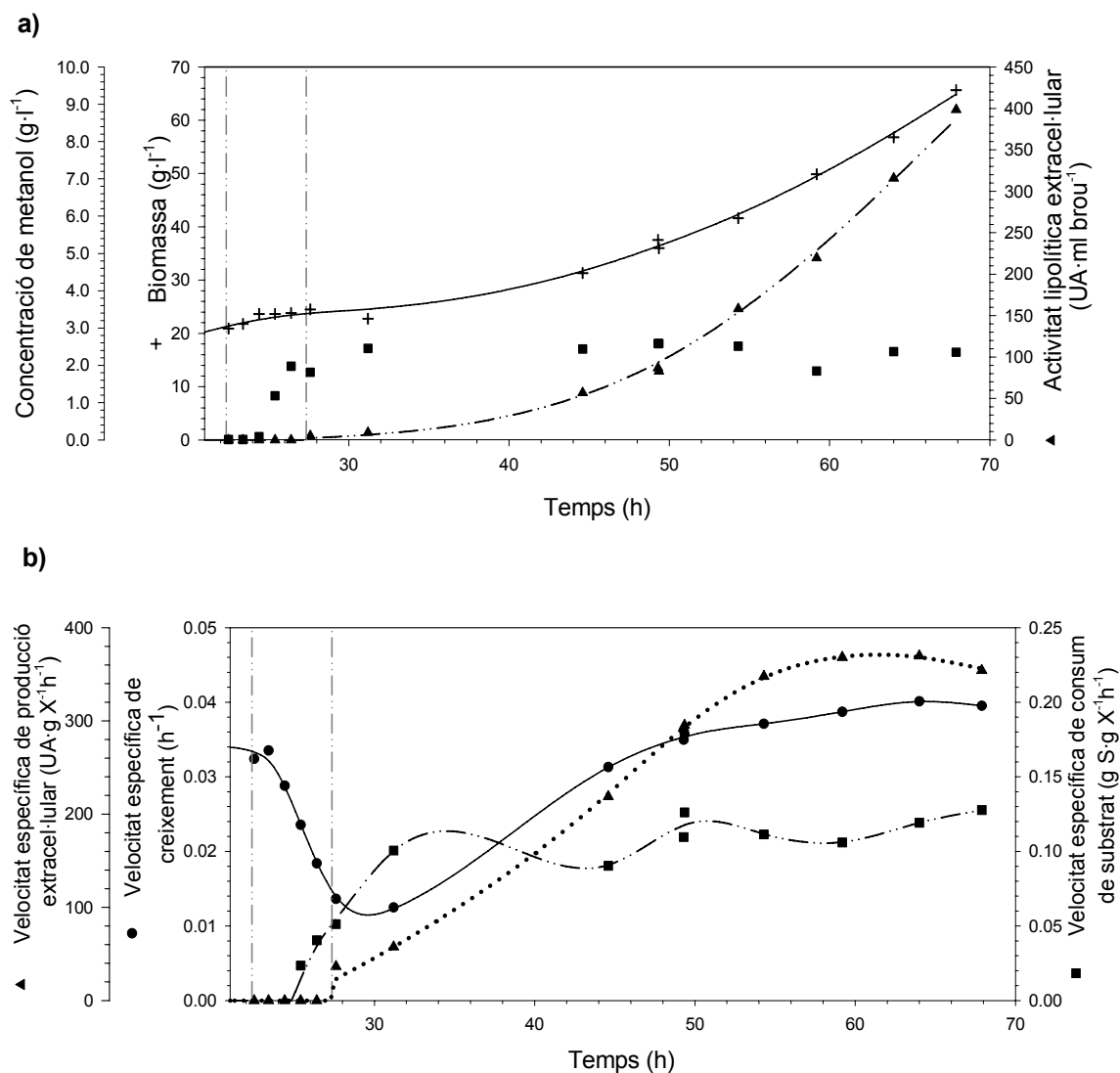
A continuació es presenten les gràfiques dels cultius discontinus alimentats a diferents concentracions de metanol residual:



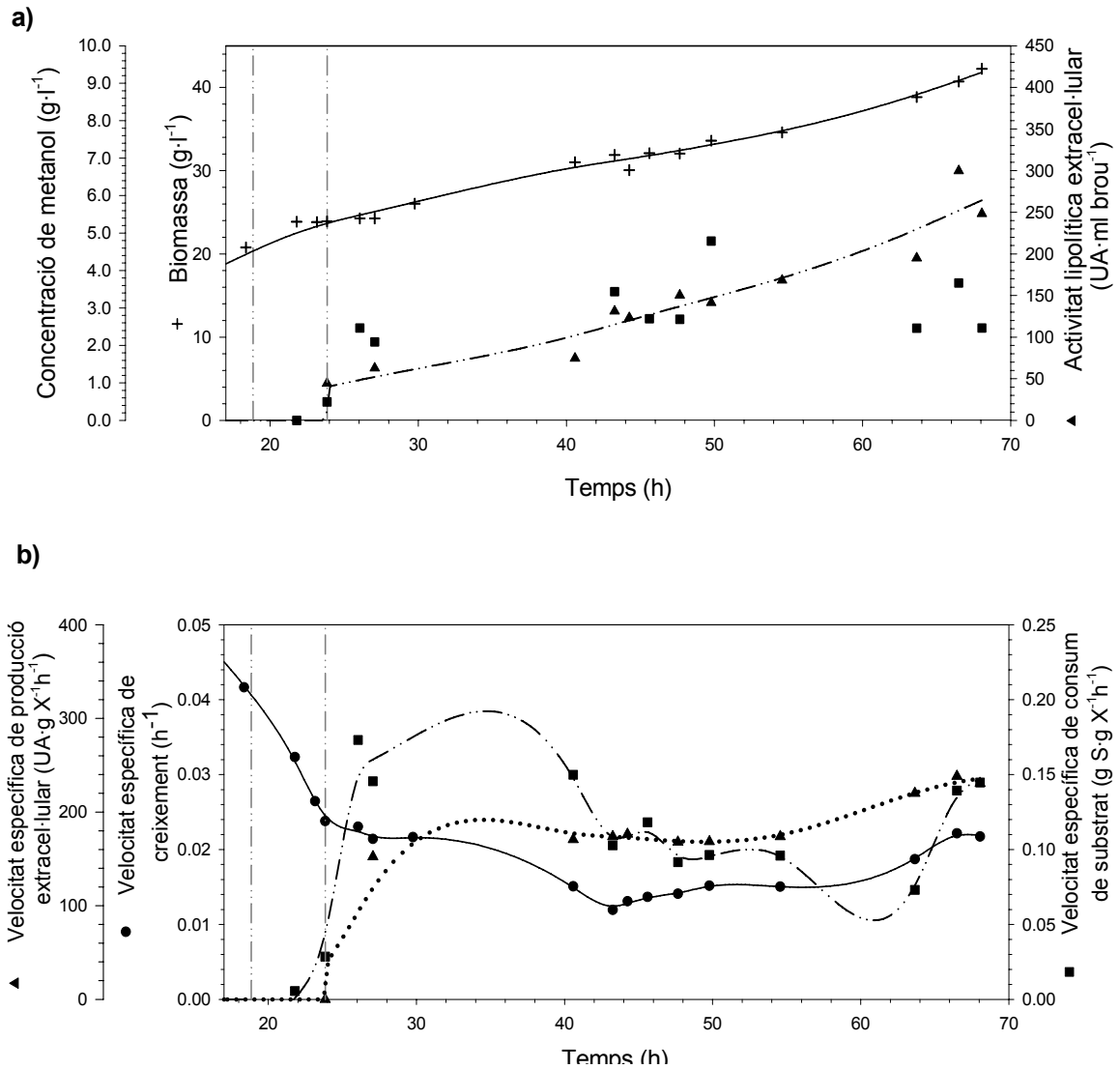
**Figura A.1.** a) Evolució de diferents variables del procés durant el cultiu discontinu alimentat a 0.5 g·l<sup>-1</sup> de metanol residual. Biomassa (+), en g·l<sup>-1</sup>; activitat lipolítica (▲), en (UA·ml brou<sup>-1</sup>) i (■) metanol per CG. Les línies corresponen als valors suavitzats. b) Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu.



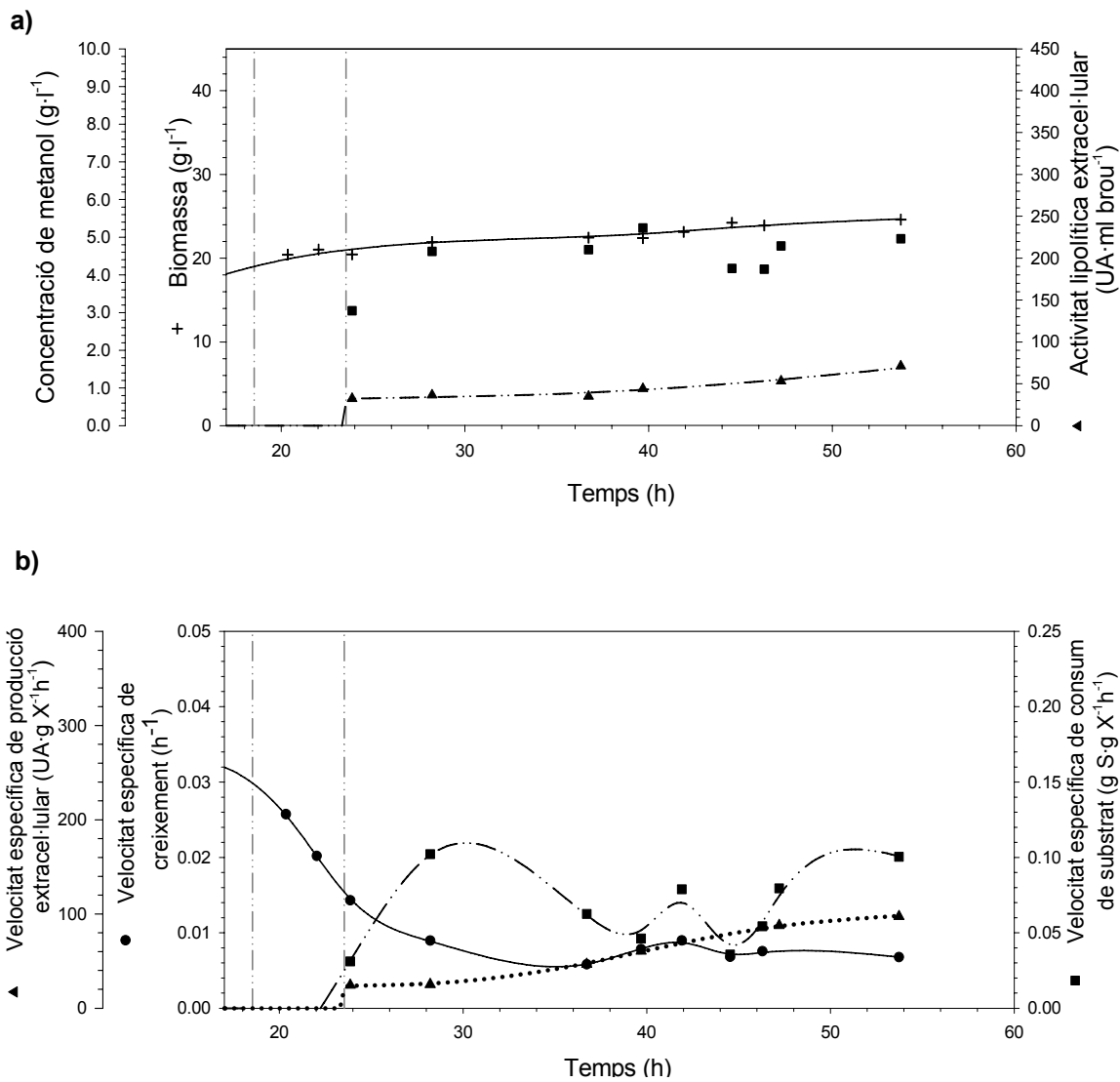
**Figura A.2. a)** Evolució de diferents variables del procés durant el cultiu discontinu alimentat a  $0.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. Biomassa (+), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica ( $\blacktriangle$ ), en ( $\text{UA}\cdot\text{ml brou}^{-1}$ ) i ( $\blacksquare$ ) metanol per CG. Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement ( $\bullet$ ), de consum de metanol ( $\blacksquare$ ) i de producció extracel·lular ( $\blacktriangle$ ) durant el cultiu.



**Figura A.3.** **a)** Evolució de diferents variables del procés durant el cultiu discontinu alimentat a  $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. Biomassa (+), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica (▲), en  $(\text{UA}\cdot\text{ml brou}^{-1})$  i (■) metanol per CG. Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu.



**Figura A.4. a)** Evolució de diferents variables del procés durant el cultiu discontinu alimentat a 3 g·l<sup>-1</sup> de metanol residual. Biomassa (+), en g·l<sup>-1</sup>; activitat lipolítica (▲), en UA·ml brou<sup>-1</sup> i (■) metanol per CG. Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu.



**Figura A.5. a)** Evolució de diferents variables del procés durant el cultiu discontinu alimentat a  $4.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de metanol residual. Biomassa (+), en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; activitat lipolítica (▲), en  $(\text{UA}\cdot\text{ml brou}^{-1})$  i (■) metanol per CG. Les línies corresponen als valors suavitzats. **b)** Evolució de la velocitat específica de creixement (●), de consum de metanol (■) i de producció extracel·lular (▲) durant el cultiu.



