



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Desarrollo de una Estrategia de Operación en Cultivo por Lote Alimentado
de *Pichia pastoris* para la Producción de Lipasa Recombinante**

Alumna: Nicole Arraño Ulloa
Profesores: Julio Berríos Araya
Claudia Altamirano Gómez

Para mis queridos padres

RESUMEN

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica ampliamente utilizada como sistema de expresión de proteínas heterólogas, bajo el control del promotor de la enzima alcohol oxidasa (pAOX1), el cual es inducible por metanol. Se han desarrollado un gran número de estrategias de cultivo que involucran la manipulación de parámetros operacionales para aumentar la producción de la proteína de estudio. En este trabajo se expresó la proteína lipasa proveniente del hongo *Rhizopus oryzae* (ROL), y se determinaron condiciones operacionales que maximizaran su productividad.

Como punto de partida de esta investigación, se dispuso de un conjunto de datos obtenidos de un trabajo experimental realizado en la Escuela de Ingeniería Bioquímica bajo el marco del proyecto FONDECYT N°11110486 el año 2013. Este trabajo consistió en un diseño experimental central compuesto por 20 cultivos continuos de *Pichia pastoris*, en los que se evaluó el efecto simultáneo de tres variables operacionales: tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación, sobre la productividad volumétrica y específica de ROL. El análisis de los datos generados en aquel trabajo se llevó a cabo utilizando el Método de Superficies de Respuesta, el cual permitió interrelacionar las variables, definiéndose así, un rango de condiciones operacionales que maximizan la producción de ROL. Este rango de condiciones corresponde a tasas de dilución comprendidas entre 0.045-0.07 [h⁻¹], temperaturas comprendidas entre 25-30 [°C] y velocidades de agitación comprendidas entre 500-700 [rpm]. Además, se obtuvieron los polinomios cuadráticos que describen el comportamiento de la productividad volumétrica y específica de ROL. Se buscó la solución a estos polinomios mediante métodos numéricos, determinándose que ambas productividades se maximizaban a 0.07 [h⁻¹], 30 [°C] y 700 [rpm]. En la etapa experimental, se evaluaron tres condiciones operacionales comprendidas en estos rangos bajo modalidad de cultivo continuo (incluida la solución), y se determinó que la condición con la que se obtenían las mayores productividades era una tasa de dilución de 0.07 [h⁻¹], una temperatura de 30 [°C] y una velocidad de agitación de 700 [rpm], obteniéndose una productividad volumétrica de ROL de 2.1 [UI/L h] y una productividad específica de ROL de 0.655 [UI/g biomasa h].

En la última etapa experimental, se evaluó esta condición bajo la modalidad de cultivo por lote alimentado con régimen de alimentación exponencial (considerando que la velocidad específica de crecimiento a controlar era 0.07 [h⁻¹]). El medio utilizado fue una mezcla de glicerol y metanol, en distinta proporción de concentración. En el primer cultivo desarrollado se utilizó un 40% de glicerol y un 60% de metanol, y en el segundo cultivo se utilizó un 60% de glicerol y un 40% de metanol. En ambos cultivos se planteó un diseño de la alimentación exponencial, mediante una función escalonada de flujos, que permitió incrementar el volumen aportado al reactor en el tiempo; y de esta forma, se mantuvo controlada la velocidad específica de crecimiento. Los resultados obtenidos señalan que la productividad volumétrica y específica de ROL promedio final para el término del primer cultivo fue de 1.67 [UI/L h] y 0.19 [UI/g biomasa h], respectivamente. En el caso del segundo cultivo fue de 1.89 [UI/L h] y 0.18 [UI/g biomasa h], respectivamente. No obstante, estas productividades específicas son similares, la estrategia de cultivo por lote alimentado que permite obtener la mayor productividad volumétrica de ROL y mantener la concentración de metanol en el medio bajo el límite de la inhibición del crecimiento, es aquella en la que se utiliza un régimen de alimentación exponencial de una mezcla de 60% de glicerol y 40% de metanol en términos de concentración, a una temperatura de 30 [°C], velocidad de agitación de 700 [rpm] y una velocidad específica de crecimiento de 0.07 [h⁻¹].

Agradecimientos

Primero que todo me gustaría agradecer al profesor guía de este proyecto, quien a la vez fue mi tutor de generación y me vio crecer durante estos años de estudio, el profesor Julio Berríos. Gracias por guiarme en el desarrollo de este trabajo y por haberme apoyado siempre en cada uno de los desafíos que me propuse concretar durante estos últimos años. También, me gustaría agradecer a la profesora Claudia Altamirano por haber colaborado como co-guía en este proyecto, por haberme apoyado y aconsejado durante los últimos años. Gracias a ambos por creer en mí.

Me gustaría agradecer a todos los integrantes que conforman el grupo de la Escuela de Ingeniería Bioquímica, tanto profesores, investigadores, personal administrativo, personal auxiliar y compañeros, por haberme brindado todo lo necesario para que pudiera cumplir mis metas como estudiante durante estos años.

El camino recorrido se hizo muy grato gracias a la alegría y apoyo incondicional de los grandes amigos que conocí en la universidad, Vanessa, Ronald y Polette. Sin duda, atesoramos lindos recuerdos de esta etapa como estudiantes, nuestros trabajos en grupo, conversaciones en la cafetería, entre tantos momentos que compartimos. También, me gustaría agradecer a una serie de amigos y amigas con los que compartí buenos momentos a lo largo de este camino, Danitza Frías, Carla Guerrero, Camila Barraza, Andrea Müller, Andrés Silva, Montserrat Gómez, Jessica Holthaeuer, Valentina Concha, Gabriel González, Fernanda Aranda, José Jorquera, Sebastián Rojas.

Además, quiero agradecer a personas que fueron fundamentales durante este proceso, los amigos de mi familia con los que compartí vacaciones y momentos agradables, y a mi querido padrino Sergio Castro. Gracias a ustedes por haberme apoyado todos estos años, por haberme dado energía y motivación para perseguir mis objetivos, por haber celebrado mis triunfos y haberme ayudado a superar los obstáculos que surgieron en el camino.

Otra de las personas que quiero destacar en estos agradecimientos, es Eduardo González, mi fiel acompañante durante estos años, mi apoyo incondicional, mi amor. Gracias por tu infinito cariño, alegría, consejo, enseñanzas, compañía y paciencia. Fuiste un apoyo fundamental en este proceso, me enseñaste muchas cosas, y la que más destaco es la perseverancia que uno debe tener para lograr sus objetivos. Además, me gustaría mencionar de forma especial a la familia González Vidal por haberme recibido siempre con amabilidad, cariño y alegría.

Y por último, los actores principales de mi vida, mis amados padres Myriam y Carlos junto a mi hermosa mascota. Como alguna vez les dije, y lo repito en esta ocasión: "Todo lo que soy y lo que he logrado, es gracias a ustedes". Gracias por su amor infinito e incondicional, por su comprensión y paciencia, por su entrega como padres para que pudiera alcanzar todas mis metas, por mostrarme con su ejemplo que el esfuerzo y la perseverancia son el camino al éxito, y por proveerme de las herramientas necesarias para enfrentar los desafíos de la vida.

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO 1.	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo General	3
1.1.2. Objetivos Específicos.....	3
CAPITULO 2.	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Antecedentes de <i>Pichia pastoris</i>	4
2.2. <i>Pichia pastoris</i> como Sistema de Expresión de Proteínas Heterólogas	5
2.3. Expresión de Genes Foráneos bajo el Control del Promotor pAOX.....	7
2.4. Fenotipo de Utilización de Metanol (Mut).....	8
2.5. Metabolismo del Metanol en Organismos Metilotróficos.....	8
2.6. Aspectos Relevantes en un Cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	11
2.6.1. Medios de Cultivos.....	11
2.6.2. Efecto de la Temperatura en Cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	12
2.6.3. Efecto de Velocidad Específica de Crecimiento en Cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	13
2.6.4. Efecto de la Velocidad de Agitación en Cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	15
2.6.5. Modalidades de Cultivo.....	16
a) Cultivo Continuo: Teoría del Quimiostato Simple.....	17
b) Cultivo por Lote Alimentado	19
2.7. Características y Aplicaciones de las Lipasas.....	24
2.7.1. Aspectos Generales de Lipasa proveniente de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)	25
2.8. Motivación del Proyecto	26

CAPITULO 3.	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Materiales	27
3.2. Microorganismo	28
3.3. Conservación de la Cepa	28
3.4. Diseño Experimental	29
3.5. Cultivos continuos	34
3.5.1. Preparación del Inóculo	34
3.5.2. Condiciones de Operación del Reactor	34
3.6. Cultivos por Lote Alimentado en Reactor	37
3.6.1. Condiciones Operacionales del Reactor.....	37
3.7. Metodología Analítica	40
3.7.1. Determinación de Glicerol	40
3.7.2. Determinación de Metanol	41
3.7.3. Determinación de Amonio	42
3.7.4. Determinación de Proteína Total	42
3.7.5. Determinación de Actividad Esterásica Extracelular de ROL	43
3.7.6. Determinación de Biomasa	45
3.7.7. Determinación de la Viabilidad Celular.....	46
3.7.8. Determinación de Ácidos Orgánicos	47
3.7.9. Determinación de CO ₂	48
CAPITULO 4.	50
RESULTADOS	50
4.1. Efecto de las variables tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación sobre Productividad Volumétrica y Específica de ROL.....	50
4.2. Condición Operacional Óptima	50

4.3.	Cultivos Continuos.....	55
4.4.	Cultivos por Lote Alimentado con Régimen de Alimentación Exponencial	61
4.4.1.	Cultivo por Lote	61
4.4.2.	Diseño de la Alimentación Exponencial de los Cultivos por Lote Alimentado	64
4.4.3.	Cinéticas de Crecimiento y Consumo de Sustratos en Cultivos por Lote Alimentado	68
4.4.4.	Producción de Proteína Total y Actividad ROL en Cultivos por Lote Alimentado.....	70
4.4.5.	Perfil de Tensión de Oxígeno Disuelto en Cultivos por Lote Alimentado	73
4.4.6.	Perfil de Amonio en Cultivos por Lote Alimentado.....	73
4.4.7.	Perfil de Ácidos Orgánicos en Cultivos por Lote Alimentado.....	74
4.4.8.	Distribución de Carbono del Sustrato Consumido en Cultivos por Lote Alimentado	75
CAPITULO 5.		76
DISCUSIÓN.....		76
5.1.	Análisis de las Superficies de Respuesta	76
5.2.	Cultivos Continuos.....	77
5.3.	Cultivos por Lote Alimentado con Alimentación Exponencial	80
5.3.1.	Cinéticas de Crecimiento y Consumo de Sustrato en Cultivos por Lote Alimentado	80
5.3.2.	Cinética de Producción de Proteína Total y Actividad ROL en Cultivos por Lote Alimentado.....	81
5.3.3.	Productividad Volumétrica y Específica de ROL en Cultivos por Lote Alimentado.....	82
5.3.4.	Perfil de Tensión de Oxígeno Disuelto, Amonio y Ácidos Orgánicos en Cultivos por Lote Alimentado.....	83
CAPITULO 6.		85
CONCLUSIÓN.....		85
CAPITULO 7.		86
RECOMENDACIONES.....		86
CAPITULO 8.		87

REFERENCIAS.....	87
ÍNDICE DE ANEXOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.....	10
Figura 2.2: Esquema de un reactor en continuo tanque agitado.	17
Figura 2.3: Representación esquemática de un CLA y sus principales variables de operación.....	21
Figura 3.1: Representación esquemática de un diseño central compuesto.....	31
Figura 3.2: Esquema experimental de un cultivo continuo de <i>Pichia pastoris</i> en reactor Biostat® A plus	36
Figura 3.3: Esquema experimental de un cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial de <i>Pichia pastoris</i> en reactor Biostat® A plus.....	39
Figura 4.1: Productividad Volumétrica ROL en función de la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación.....	51
Figura 4.2: Productividad Específica ROL en función de la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación	53
Figura 4.3: Cultivo por Lote. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato (A). Producción de proteína total y variación de actividad en el tiempo (B).....	62
Figura 4.4: Linealización de la cinética de crecimiento en cultivo por lote	64
Figura 4.5: Comparación del flujo teórico y experimental en ambos cultivos por lote alimentado	66
Figura 4.6: Simulación de Alimentación Exponencial en ambos cultivos por lote alimentado	67
Figura 4.7: Cinética de crecimiento y consumo de sustratos en ambos cultivos por lote alimentado	68
Figura 4.8: Linealización de las cinéticas de crecimiento de ambos cultivos por lote alimentado ..	70

Figura 4.9: Producción de proteína total y variación de actividad de ROL en el tiempo en ambos cultivos por lote alimentado	71
Figura 4.10: Productividad Volumétrica y Específica de ROL en el tiempo en ambos cultivos por lote alimentado	72
Figura 4.11: Perfil de tensión de oxígeno disuelto en ambos cultivos por lote alimentado	73
Figura 4.12: Perfil de Amonio en ambos cultivos por lote alimentado	74
Figura 4.13: Perfil de ácidos orgánicos en ambos cultivos por lote alimentado	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Proteínas heterólogas expresadas en <i>Pichia pastoris</i>	6
Tabla 3.1: Reactivos utilizados en el desarrollo de la experiencia.....	27
Tabla 3.2: Materiales utilizados en el desarrollo de la experiencia.....	27
Tabla 3.3: Equipos utilizados en el desarrollo de la investigación.....	28
Tabla 3.4: Valores de las variables operacionales para cada nivel del diseño.....	31
Tabla 3.5: Composición del Medio de Alimentación para los Cultivos por Lote Alimentado (CLA) .	38
Tabla 4.1: Condiciones de Operación evaluadas en Cultivos Continuos	55
Tabla 4.2: Composición del Medio de Cultivo Alimentado.....	57
Tabla 4.3: Parámetros Cuantificados en Estado Estacionario	58
Tabla 4.4: Productividades de ROL y Rendimiento de Sustratos en Biomasa en Estado Estacionario	59
Tabla 4.5: Producción de CO ₂ en Estado Estacionario	59
Tabla 4.6: Consumos de Glicerol y Metanol en Estado Estacionario.....	60
Tabla 4.7: Porcentaje de carbono del sustrato consumido destinado a la formación de biomasa y CO ₂	60

Tabla 4.8: Valores de Biomasa, Glicerol, Actividad y Proteína Promedio en 4 Puntos del Cultivo ..	62
Tabla 4.9: Concentración de Biomasa y Glicerol en Cultivo por Lote.....	63
Tabla 4.10: Porcentaje de Carbono del Sustrato Consumido para la Producción de Biomasa y Ácidos Orgánicos en el Final del Cultivo.....	75

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de expresión procariotas habitualmente son preferidos para la obtención de proteínas recombinantes de origen eucariota, debido a lo económico que puede llegar a ser este proceso. Sin embargo, algunas proteínas de origen eucariota que son producidas en células procariotas resultan inestables, o muestran falta de actividad biológica (Zhang *et al.*, 2000). Las levaduras ofrecen claras ventajas como sistemas hospederos con respecto a organismos procariota, ya que el ambiente intracelular de estas células generalmente es el ideal para el plegamiento y glicosilación de las proteínas, permitiendo que sea lo más similar posible al que se lleva a cabo en el sistema original. Esto último repercute de manera significativa en la integridad estructural, solubilidad, y actividad biológica de la proteína. Además, las levaduras son capaces de secretar algunas proteínas, lo cual facilita la separación de los productos recombinantes deseados de los constituyentes celulares (Cregg *et al.*, 1987).

El uso de *Pichia pastoris* como sistema de expresión para la producción de diversos tipos de proteínas recombinantes ha sido exitoso. Las investigaciones desarrolladas que involucran este sistema de expresión, han causado un gran impacto; no sólo en lo que se refiere a los altos niveles de expresión alcanzados, sino que también en la funcionalidad y actividad que presentan la mayoría de las proteínas expresadas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Este sistema de expresión está basado en la existencia de un promotor, conocido como pAOX1, el cual presenta un elevado nivel de transcripción. Este promotor puede ser inducido fuertemente por metanol, y reprimido por otras fuentes de carbono, tales como glucosa o glicerol (Cereghino & Cregg, 2000). Por esta razón, pAOX1 es utilizado como promotor de genes que codifican las proteínas heterólogas que se deseen expresar en esta levadura. En el caso de esta investigación se busca expresar una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* (ROL) bajo el control del promotor pAOX1.

La lipasa producida por este hongo (ROL) es de carácter extracelular, y despierta el interés del campo de la biotecnología y la investigación académica, ya que habitualmente se utiliza en la resolución de

mezclas racémicas debido a su alta regioespecificidad. A su vez, esta lipasa ha sido aplicada en diversas reacciones de interés industrial como la producción de ésteres de cadena corta (aromatizantes) (Ben Salah *et al.*, 2007), la resolución de mezclas racémicas (Palomo *et al.*, 2004), la producción de biodiesel (Matsumoto *et al.*, 2001), entre otras aplicaciones.

Con el fin de aumentar la productividad volumétrica y específica de ROL, y de otras proteínas recombinantes, se han reportado una gran cantidad de estrategias de cultivo que involucran experimentos con distintas modalidades de cultivo, uso de un cosustrato, cultivos con limitación de oxígeno, distintas tasas de alimentación de la fuente de carbono, variaciones en la temperatura del cultivo, entre otras. La estrategia de cultivo comúnmente utilizada para la producción de proteínas heterólogas bajo el pAOX1, está estructurada en dos fases principales. Una primera etapa para la generación de biomasa utilizando fuentes de carbono con un alto rendimiento biomasa-sustrato, tales como el glicerol; y una segunda fase, adicionando metanol para la inducción del pAOX1 y la expresión de la proteína heteróloga. Generalmente la modalidad de cultivo más empleada es el lote alimentado.

En base a las estrategias utilizadas en estas investigaciones, surgió la motivación de desarrollar un trabajo en la Escuela de Ingeniería Bioquímica bajo el marco del Proyecto FONDECYT N°11110486, que permitiera encontrar las condiciones operacionales que maximizaran la productividad de ROL. Este trabajo consistió en un diseño experimental central compuesto con un total de 20 cultivos continuos de *Pichia pastoris*, en los que se evaluó el efecto que tenían conjuntamente tres variables independientes: tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad volumétrica y específica de la lipasa en cuestión (Berríos & Flores, 2013).

La herramienta utilizada para determinar los rangos operacionales que maximizan la productividad volumétrica y específica fue el Método de Superficies de Respuesta. Este método brindó la posibilidad de interrelacionar las variables en cuestión, y permitió evaluar el efecto conjunto de éstas sobre ambas productividades. Una vez que se determinaron estos rangos de condiciones operacionales óptimos, se validaron tres condiciones comprendidas dentro de estos rangos bajo la modalidad de cultivo continuo (mismo esquema de trabajo utilizado en la investigación previa), y finalmente se

implementó aquella condición que maximizó ambas productividades en la modalidad de cultivo por lote alimentado. En base a esto se plantean los objetivos descritos a continuación en la Sección 1.1.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Desarrollar una estrategia de operación en cultivo por lote alimentado de *Pichia pastoris* para la producción de lipasa recombinante.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar los rangos de tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación, que conjuntamente maximizan la productividad volumétrica y específica de ROL, en base al análisis de datos generados en una investigación previa.
- Determinar la condición operacional que maximiza la productividad volumétrica y específica de ROL en cultivos continuos evaluando condiciones comprendidas dentro de los rangos obtenidos anteriormente.
- Determinar la productividad volumétrica y específica de ROL en modalidad de cultivo por lote alimentado, implementando la condición encontrada en la etapa previa.

CAPITULO 2.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes de *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura facultativa, perteneciente al grupo de los ascomicetes, de carácter metilotrófica, lo que le confiere la capacidad de metabolizar el metanol como única fuente de carbono y energía. Esta característica de algunas levaduras fue descrita por primera vez por Koichi Ogata en el año 1969, y señala que este tipo de levadura incorpora una vía metabólica especial para la metabolización del metanol, la cual contempla la oxidación de este sustrato, y su asimilación para una posterior formación de constituyentes celulares (Ogata *et al.*, 1969).

A lo largo del siglo XX el progreso de la tecnología de procesos y la microbiología permitió el desarrollo de procesos dirigidos al aprovechamiento directo de la biomasa de estas levaduras. En los años cincuenta, llama la atención el potencial de estos organismos metilotróficos para la producción de SCP (single-cell proteins), y por ello, surge la idea de comercializarlos como alimento de alto contenido proteico para animales. Posteriormente, durante la década de los 70, la Compañía Petrolera Phillips desarrolló un medio de cultivo y protocolos para el crecimiento de *Pichia pastoris* en cultivos continuos de alta densidad celular utilizando como sustrato metanol. Desafortunadamente, la crisis del petróleo de aquella época incrementó drásticamente el costo del metano, y al mismo tiempo, decayó el precio de la soya, que era la mejor alternativa como fuente de alimento animal. Esto se tradujo en que la producción de SCP utilizando metanol como sustrato ya no era una alternativa económicamente rentable (Cereghino & Cregg, 2000).

En la década que siguió, la petrolera Phillips contactó al Instituto de Biotecnología Salk/Asociados Industriales Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) para evaluar la posibilidad de desarrollar un sistema de expresión de proteínas heterólogas utilizando a *P. pastoris*. Los investigadores de SIBIA aislaron el gen y el promotor de la enzima alcohol oxidasa, y generaron vectores, cepas y protocolos adecuados para la manipulación genética de *P. pastoris*. Gracias a la combinación de las distintas estrategias de fermentación que se desarrollaron para el proceso de producción de SCP, y la presencia del fuerte

promotor que regula la expresión de la enzima alcohol oxidasa, resultó un sorpresivo aumento en los niveles de expresión de proteínas foráneas. En el año 1993, la petrolera Phillips vendió su patente de *P. pastoris* como sistema de expresión a la Corporación de Investigación y Tecnologías (Tucson, AZ), titular de la patente actual. Adicionalmente, la petrolera Phillips licenció a la Corporación Invitrogen (Carlsbad, CA) para comercializar los componentes del sistema, un acuerdo que continúa bajo el control de Corporación de Investigación y Tecnologías (Cereghino & Cregg, 2000).

2.2. *Pichia pastoris* como Sistema de Expresión de Proteínas Heterólogas

Actualmente, los genetistas poseen vasta experiencia con respecto a la manipulación del ADN para identificar, extraer y reubicar genes en una variedad de organismos que son bastante diferentes del organismo original desde el cual se obtuvieron. Uno de los principales usos que se les da a estos organismos recombinantes es la producción de proteínas. Muchos estudios se han focalizado en encontrar alternativas para producir este tipo de proteínas de forma eficiente y funcional, debido al gran valor comercial que éstas poseen (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

La producción de proteínas funcionales está íntimamente relacionada a la maquinaria celular del organismo que produce la proteína. La levadura *Pichia pastoris* es un sistema muy útil para la generación de cantidades de proteína del orden de miligramos y gramos, tanto a nivel de investigación en laboratorio como a nivel de producción industrial. La fermentación puede escalarse fácilmente para satisfacer mayores demandas, y pueden controlarse parámetros que influyen sobre la productividad y la actividad de la proteína, tales como: el pH, la aireación, la tasa de alimentación de la fuente de carbono (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

La expresión de cualquier gen foráneo utilizando *P. pastoris* comprende principalmente tres etapas: la primera de ellas es la inserción del gen en un vector de expresión, la segunda corresponde a la introducción de este vector de expresión en la hospedera *P. pastoris*, y finalmente, se realiza una evaluación del potencial de las cepas para expresar el gen foráneo (Cereghino & Cregg, 2000).

Se han expresado más de 400 proteínas heterólogas utilizando este sistema como hospedero (Cereghino & Cregg, 2000), y en la Tabla 2.1 se exponen algunos ejemplos que evidencian a esta levadura como un sistema adecuado para la expresión de proteínas de diversos orígenes. Por otra parte, actualmente se pueden encontrar patentes internacionales en las que se ha utilizado a *P.pastoris* como sistema de expresión de proteínas tales como xilanasas (Hao *et al.*, 2010), y una proteína de fusión Vif-Fc de la proteína auxiliar VIH-1 (Wenzheng *et al.*, 2011).

Tabla 2.1: Proteínas heterólogas expresadas en *Pichia pastoris*

Origen	Organismo	Proteína	Producción (Nivel de Expresión, Concentración)
Bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilasa	25 [g/L]
	<i>Escherichia coli</i>	β -galactosidasa	2000 [UI/mg]
Fungi	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipasa	60 [mg/L]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	2.5 [g/L]
Vertebrado (no humano)	Ratón	Endostatina	133.33 [mg/L]
	Bovino	β -caseína	1 [g/L]
Humano	Páncreas	α -amilasa	20 [m/L]
	Tejido	catepsina gástrica E	0.6 [mg/L]
Vegetal	Grano de Café	α -galactosidasa	400 [mg/L]
	<i>Allium sativum</i> (ajo)	liasa alliin	2167 [UI/g]
Virus	Virus	glicoproteína D herpes bovino	20 [mg/L]
	Virus	antígeno de superficie Hepatitis B	400 [mg/L]

Pichia pastoris es un organismo preparado para la expresión de proteínas foráneas debido a tres razones principalmente: la primera de ellas es que puede ser manipulada fácilmente a nivel de genética molecular (por ejemplo: localización de genes, alta frecuencia en cuanto a la transformación de ADN, clonación por complementación funcional), la segunda es que puede expresar altos niveles de proteínas, ya sean intracelulares o extracelulares, y por último, es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales a las proteínas propias de eucariotas superiores, tales como, glicosilaciones, formación de enlaces disulfuro y procesamiento proteolítico (Cereghino & Cregg, 2000). En base a todas estas características, algunas proteínas que no podían ser expresadas en bacterias, pudieron ser obtenidas de forma funcional y activa en *P. pastoris*. Las técnicas genéticas que hay disponibles

actualmente, sumadas a lo económico que resulta utilizar esta levadura, hacen de *P. pastoris* una alternativa atractiva como sistema de expresión de proteínas heterólogas (Cereghino *et al.*, 2002).

2.3. Expresión de Genes Foráneos bajo el Control del Promotor pAOX

Hay muchas razones que sustentan la popularidad de *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas, sin embargo, dos de ellas son las más significativas. La primera es la presencia de un promotor del gen que codifica la enzima alcohol oxidasa (pAOX1), el cual se caracteriza por ser eficiente, estrictamente regulado, y por utilizarse para la expresión de genes foráneos (Cregg & Madden, 1988). Este promotor es fuertemente reprimido por glucosa, y ligeramente reprimido por otras fuentes de carbono, como el glicerol. No obstante, es inducido más de un 1000% cuando las células son transferidas a un medio de cultivo que contiene metanol como única fuente de carbono. La habilidad de reprimir la expresión de proteínas foráneas representa una ventaja si la proteína es tóxica para la célula (como muchas proteínas recombinantes pueden llegar a serlo cuando se sintetizan en altos niveles). La segunda razón es que la fisiología de *P. pastoris* hace que ésta prefiera una vía respiratoria antes que una vía fermentativa para su crecimiento. Esto representa una ventaja ya que los productos de fermentación incluyen etanol y ácido acético, los cuales alcanzan rápidamente niveles tóxicos en cultivos de alta densidad celular (Cereghino *et al.*, 2002).

El genoma de *P. pastoris* contiene dos copias del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa, los cuales son conocidos como AOX1 y AOX2, y son los responsables de que esta levadura pueda crecer el metanol, utilizando este sustrato como su única fuente de carbono (Zhang *et al.*, 2000).

El nivel de expresión de genes foráneos en *P. pastoris* puede ser alto cuando se encuentran situados bajo el control del promotor AOX1, y éste es inducido adicionando metanol al medio. Se ha reportado que los niveles de transcripción de AOX son 3 a 5 veces mayores cuando las concentraciones residuales de metanol en el medio de cultivo, son bajas o limitantes (Cereghino & Cregg, 2000). A concentraciones elevadas de metanol (sobre 5 [g/L]), se puede llegar a inhibir el crecimiento celular por el efecto tóxico de este sustrato (Zhang *et al.*, 2000). Para maximizar la estabilidad del gen

heterólogo, el cassette de expresión conformado por promotor AOX1-gen foráneo debe ser integrado en el genoma de *P. pastoris* (Chiruvolu *et al.*, 1997).

El gen AXO2 también codifica para la actividad de la enzima alcohol oxidasa, aunque su rendimiento es 10 a 20 veces menor que la del gen AXO1 (Cregg & Madden, 1988). Sin embargo, se han reportado estudios en los se ha tenido éxito aumentando la expresión de genes al utilizar el promotor AOX2, o una versión modificada de este mismo (Mochizuki *et al.*, 2001).

2.4. Fenotipo de Utilización de Metanol (Mut)

Hay tres tipos de fenotipos de cepas hospederas de *P. pastoris* que pueden hacer uso del metanol de cierta forma. La cepa Mut⁺, o fenotipo de utilización de metanol positivo, crece en metanol a la misma tasa que lo hace la cepa salvaje y requiere altas tasas de alimentación de este sustrato en fermentaciones a gran escala (Cereghino & Cregg, 2000). La cepa Mut^s, o fenotipo de utilización lenta del metanol, presenta una deleción en el gen AOX1. La deleción del gen AOX1 implica desproveer a la célula del 90% de la enzima alcohol oxidasa, quedando tan sólo el gen AOX2 funcional (Serrano, 2001). Dado que estas cepas deben apoyarse en el gen AOX2 para la metabolización del metanol, presentan una tasa de crecimiento más lenta, y una tasa de consumo de metanol menor, debido a la baja concentración de alcohol oxidasa sintetizada. Por último, la cepa Mut⁻, o fenotipo de utilización de metano negativo, es incapaz de crecer en metanol, dado que ambos genes AOX presentan deleciones (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

2.5. Metabolismo del Metanol en Organismos Metilotróficos

Hasta la fecha, las levaduras metilotróficas han sido clasificadas en cuatro géneros: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis* (Faber *et al.*, 1995). Estos organismos comparten una ruta específica de utilización de metanol que involucra la participación de enzimas únicas. Las reacciones iniciales tienen lugar en organelos especializados llamados peroxisomas, seguidas por una secuencia de pasos metabólicos que ocurren en el citoplasma. Los peroxisomas juegan un rol indispensable durante el

crecimiento, ya que albergan las tres enzimas esenciales para la metabolización del metanol: alcohol oxidasa, catalasa y la dihidroxiacetona sintasa (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

La Figura 2.1 representa las reacciones involucradas en el proceso de metabolización del metanol en levaduras, así como muestra gráficamente la compartimentalización del conjunto del proceso en el interior de la célula. La oxidación completa del metanol a CO₂ y H₂O en microorganismos metilotróficos comprende tanto una vía oxidativa, de generación de energía, mostrada en rojo, como una vía asimilatoria, para la generación de nuevos constituyentes celulares, presentada en azul.

Una vez que el metanol ingresa al peroxisoma, éste es oxidado a peróxido de hidrógeno y formaldehído a través de la acción de la enzima alcohol oxidasa, utilizando al oxígeno como aceptor de electrones. El peróxido es oxidado hasta agua y oxígeno a través de la catalasa peroxisomal. Una parte del flujo de formaldehído ingresa al citosol, donde puede formar un complejo con glutatióna reducida, el cual es oxidado a dióxido de carbono a través de dos reacciones continuas en las que actúan enzimas deshidrogenasas. En la primera etapa, la enzima formaldehído deshidrogenasa cataliza la producción de formiato, y posteriormente, la formiato deshidrogenasa actúa sobre este metabolito, generando dióxido de carbono (Gleeson & Sudbery, 1988).

En la vía asimilatoria, el formaldehído presente en el peroxisoma puede condensarse con la xilulosa 5-fosfato que ingresa a este organelo. Esta reacción es catalizada por la dihidroxiacetona sintasa (DAS), y se generan dos compuestos de tres carbonos, la dihidroxiacetona y el gliceraldehído-3-fosfato. Una vez fuera del peroxisoma, la dihidroxiacetona (DHA) es fosforilada, formando dihidroxiacetona fosfato (DHAP), y ésta se condensa con el gliceraldehído-3-fosfato (GAP), formando la fructuosa 1,6-bifosfato (FBP) (Zhang *et al.*, 2000; Cereghino & Cregg, 2000). Por otra parte, existe la posibilidad de que dos moléculas de fructuosa 1,6-bifosfato (FBP), y una molécula de dihidroxiacetona fosforilada (DHAP) se combinen para generar tres moléculas de xilulosa-5-fosfato (Xu₅P), con lo que el ciclo queda cerrado (Serrano, 2001). Un tercio del gliceraldehído-3-fosfato producido queda disponible para ingresar al metabolismo central y generar biomasa (Zhang *et al.*, 2000; Cereghino & Cregg, 2000).

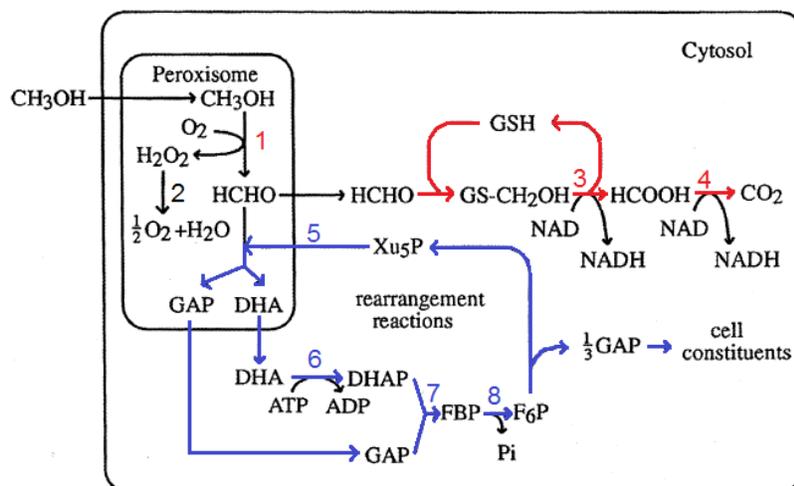


Figura 2.1: Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. En color rojo: vía oxidativa y las enzimas involucradas. En color azul: vía asimilatoria y las enzimas involucradas. Enzimas: **1:** alcohol oxidasa (AOX). **2:** catalasa. **3:** formaldehído deshidrogenasa (FLD). **4:** formiato deshidrogenasa (FMD). **5:** dihidroxiacetona sintasa (DAS). **6:** dihidroxiacetona quinasa. **7:** fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa. **8:** fructuosa-1,6-fosfatasa. Metabolitos: **CH_3OH :** metanol, **HCHO :** formaldehído, **$\text{GS-CH}_2\text{OH}$:** S-Formilglutathión. **HCOOH :** formiato. **CO_2 :** dióxido de carbono. **GAP :** gliceraldehído-3-fosfato. **DHA :** dihidroxiacetona. **DHAP :** dihidroxiacetona fosfato. **FBP :** fructuosa 1,6-bifosfato. **F_6P :** fructuosa 6-fosfato. **Xu_5P :** xilulosa monofosfato (Cereghino & Cregg, 2000)

La regulación del metabolismo del metanol en levaduras es un proceso complejo que incluye un control de la síntesis y activación de las enzimas adecuadas, así como sobre su degradación (Veenhuis *et al.*, 1983). La síntesis de las enzimas encargadas de metabolizar el metanol es inducida por este sustrato, y es reprimida por la glucosa y el etanol (Egli *et al.*, 1980).

Dado que las enzimas alcohol oxidasa, dihidroxiacetona sintasa, y catalasa se localizan en la membrana de los peroxisomas, la síntesis de estas enzimas está asociada a la generación de estos organelos (Veenhuis *et al.*, 1983). Cuando los cultivos de *H. polymorpha* o *P. pastoris* crecen en metanol, y posteriormente, son transferidos a un medio que contiene glucosa o etanol, los peroxisomas (y las enzimas contenidas en ellos) se destruyen. Esta degradación activa se debe a la fusión de los peroxisomas con vesículas vacuolares, seguida por una proteólisis, y este proceso se conoce como inactivación degradativa (Tuttle & Dunn, 1995).

Por otra parte, las levaduras metilotróficas también son capaces de hacer uso de otros sustratos como fuente de carbono y energía, por ejemplo: el glicerol. Estos organismos cuentan con una vía catabólica que involucra las siguientes etapas: difusión pasiva del compuesto a través de la membrana plasmática, fosforilación mediante la enzima glicerol quinasa, y oxidación mediante la enzima glicerolfosfato oxidasa. El glicerol ingresa a la ruta glicólisis una vez que ha sido transformado a gliceraldehído 3-fosfato, y requiere de NADH como recurso energético (Gancedo *et al.*, 1968).

2.6. Aspectos Relevantes en un Cultivo de *Pichia pastoris*

Se ha reportado que se han utilizado distintos fenotipos para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor pAOX, promotores alternativos, distintos medios de cultivo y estrategias operacionales, con el objetivo de maximizar ya sea, el rendimiento o la productividad de la proteína heteróloga. Sin embargo, estas alternativas también buscan obtener un producto que sea reproducible lote a lote, para poder implementar un proceso de producción robusto con posibles aplicaciones industriales (Cos *et al.*, 2006).

2.6.1. Medios de Cultivos

El material reportado sobre *Pichia pastoris* como un sistema de producción de proteínas recombinantes muestra que las mejores condiciones de cultivo (medio, pH, temperatura, etc.) varían de acuerdo al tipo de cepa utilizada y la proteína que quiere expresarse (Files *et al.*, 2001). Ciertamente, no hay condiciones fijas que aseguren una producción óptima, sin embargo, existen algunas directrices que permiten incrementar la productividad de manera considerable. El medio de cultivo más comúnmente utilizado para alcanzar una alta densidad celular de esta levadura es el Basalt Salt Medium, o BSM. Es considerado un estándar, no obstante, podría no ser el medio óptimo y generar algunos problemas, como por ejemplo, composición desbalanceada, precipitados, tensión iónica, entre otros (Cos *et al.*, 2006).

Uno de los aspectos más importantes en la formulación del medio es la fuente de nitrógeno. En el caso de un cultivo con medio BSM, este elemento se incorpora principalmente adicionando hidróxido de amonio, que a su vez permite controlar el pH (Cos *et al.*, 2006). La falta de nitrógeno está directamente relacionada con el aumento de la actividad proteolítica, y por ende, a la degradación de la proteína extracelular (Kobayashi *et al.*, 2000). En algunos casos, esta falta de nitrógeno se presenta cuando se alcanza la máxima densidad celular, y puede ser superada adicionando algún suplemento que contenga nitrógeno. Sin embargo, es necesario evitar su acumulación ya que puede provocar la inhibición del crecimiento y la extensión de la fase de latencia (Yang *et al.*, 2004).

2.6.2. Efecto de la Temperatura en Cultivos de *Pichia pastoris*

Uno de las variables operacionales importantes en un cultivo de esta levadura es la temperatura, ya que influye considerablemente en la producción de proteínas heterólogas. El modo de operación estándar para la producción de proteínas recombinantes consiste en diseñar estrategias de alimentación adecuadas para la fase de crecimiento e inducción, manteniendo la temperatura a 30 [°C] a lo largo de toda la fermentación (Potvin *et al.*, 2012)

La temperatura óptima de crecimiento y de producción de *P. pastoris* son 30 [°C]; sobre los 32 [°C] se detiene la expresión de proteínas y el crecimiento decae drásticamente (Cos *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos autores señalan que trabajando a temperaturas más bajas se incrementan significativamente la producción de proteínas heterólogas (Cos *et al.*, 2006; Dragosits *et al.*, 2009). La disminución de la temperatura tiene un efecto positivo sobre la productividad específica de proteínas heterólogas. Esto se debe principalmente a la disminución de la actividad proteolítica y a la disminución de la lisis celular, cuando se utiliza metanol como fuente de carbono. Por otra parte, la variación de la temperatura incide en los procesos que ocurren dentro de la célula, como por ejemplo, las reacciones involucradas en el metabolismo central, el plegamiento de proteínas y la respuesta al estrés oxidativo (Dragosits *et al.*, 2009).

En la investigación de Dragosits *et al.* (2009), se observa que a la menor temperatura de estudio (20 [°C]), se puede aumentar un 3% la productividad específica de un fragmento de anticuerpo Fab,

acompañado de una disminución del flujo a través del ciclo de los TCA, una disminución en los niveles de proteínas involucradas la respuesta de estrés oxidativa y una disminución en los niveles de chaperonas.

A continuación se presentan otros ejemplos en los que la disminución de la temperatura repercute en forma positiva. Li *et al.* (2001) disminuyeron la temperatura de cultivo desde 30 [°C] a 23 [°C], y comprobaron que hubo un aumento de un 3% de la producción de una proteína anticongelante de un pez, y que aumentó la viabilidad celular. Hong *et al.* (2002) alcanzaron una mayor actividad específica de la oxidasa lacasa disminuyendo la temperatura de cultivo desde 30 [°C] a 20 [°C], y reduciendo la concentración de metanol desde un 1% a un 0.5%.

En resumen, algunos investigadores reportan que reducir la temperatura de inducción desde 30 [°C] a 20 [°C] o a una temperatura aún menor favorece la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, también debe tomarse en cuenta que el proceso de producción de proteína recombinante utilizando *P. pastoris* es altamente demandante de oxígeno (Jahic *et al.*, 2002), por lo tanto, si se disminuye la temperatura (por ejemplo, 20 [°C]), la fase de inducción requeriría de un mayor suplemento de oxígeno para satisfacer el aumento de la velocidad de consumo que tendría el proceso (Minjie & Shi, 2013).

2.6.3. Efecto de Velocidad Específica de Crecimiento en Cultivos de *Pichia pastoris*

En los cultivos de *P. pastoris* donde se utiliza el metanol como fuente de carbono y energía, diferentes autores han señalado que existe una proporcionalidad directa entre la velocidad específica a la cual crece el microorganismo, y el flujo de carbono que es destinado a reacciones anabólicas. Por otra parte, también señalan que existe una proporcionalidad inversa entre la velocidad de crecimiento y el flujo de carbono destinado a la manutención u oxidación directa de metanol a CO₂, mostrando además, que una velocidad específica de crecimiento constante es más favorable para la productividad específica y volumétrica de una proteína heteróloga en *P. pastoris*, que mantener una concentración de oxígeno constante o una concentración de metanol constante en el medio de cultivo (Solá *et al.*; 2007; Jahic *et al.*, 2002; Trinh *et al.*, 2003).

Solá *et al.* (2007) desarrollaron una investigación en la que construyeron un perfil de flujos metabólicos de *P. pastoris*, utilizando mezclas de glicerol y metanol en cultivos continuos, a bajas y altas tasas de dilución. Los resultados mostraron que a una alta tasa de dilución de 0.16 [h⁻¹], la levadura crecía a un 90% de su velocidad específica de crecimiento máxima, y bajo este esquema, las cantidades netas de metanol que efectivamente fueron asimiladas por las células, se incrementaron con la fracción de metanol en la alimentación. El análisis de los flujos metabólicos a esta tasa de dilución reveló que, independiente de la fracción de metanol que haya tenido el medio de alimentación, estos flujos eran muy similares a los flujos observados en cultivos sólo con glicerol como fuente de carbono. Esta observación, podría indicar que el metanol que es consumido por las células que crecen a una alta tasa de dilución o velocidad específica de crecimiento, tiene un destino completamente diferente al metanol que es consumido por células que crecen a una baja tasa de dilución, lo que indicaría que este metanol se estaría yendo por la vía oxidativa hasta CO₂.

En la investigación de Trinh *et al.* (2003) se evaluó la producción de endostatina en *P. pastoris*, y demostraron que entre operar a una tensión de oxígeno disuelto constante y concentración de metanol constante, con μ variable en ambos casos, no existieron diferencias en la productividad volumétrica de proteína expresada. Sin embargo, al mantener constante la velocidad específica de crecimiento en un valor 0.02 [h⁻¹], se obtuvo una productividad volumétrica y específica mayor, en comparación con las estrategias donde operaban a una TOD constante o una concentración de metanol constante, con μ variable. Se observó que aunque la cantidad de proteína obtenida fue similar en los tres sistemas de operación, al operar a una velocidad específica de crecimiento constante, la cantidad de metanol utilizada fue significativamente menor. La mayor eficiencia de utilización de metanol bajo este régimen de alimentación exponencial sugiere que el metanol es dirigido principalmente a la generación de energía, y que una fracción menor es dirigida a la formación de biomasa (Trihn *et al.*, 2003). Los resultados de esta investigación, concuerdan con la evidencia que muestra que cuando las células son alimentadas con metanol a una tasa de crecimiento limitado, la enzima alcohol oxidasa se induce 3 a 5 veces que cuando las células que están creciendo a excesos de metanol (Cos *et al.*, 2006).

Por otra parte, se considera que la producción de proteína heteróloga está asociada al crecimiento. Por esta razón, al aumentar la velocidad específica de crecimiento durante una fermentación

continua, inevitablemente se aumentará la productividad. Esta afirmación puede ser correcta para el parámetro de productividad, pero no para la cantidad de proteína producida, ya que muchos autores han demostrado que la máxima cantidad de producto se alcanza a bajas tasas de dilución (Brierley *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2004)

2.6.4. Efecto de la Velocidad de Agitación en Cultivos de *Pichia pastoris*

La velocidad de agitación es un factor esencial en un cultivo microbiano por dos razones principalmente: permite la transferencia de masas entre las distintas fases presentes, y permite el mezclamiento adecuado del cultivo para mantener la homogeneidad en el contenido del fermentador, lo cual es un aspecto importante en cuanto a la dispersión de biomasa. La velocidad de agitación afecta de distintas formas la transferencia de masa en el cultivo, una de éstas es la dispersión del gas en pequeñas burbujas lo que incrementa el área interfacial, y como consecuencia aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). La variación de la velocidad de agitación no sólo incide en la cantidad de oxígeno disponible, sino también en la disponibilidad de otros nutrientes en el medio, especialmente en la transferencia de éstos desde el medio hacia la célula. Dependiendo de la velocidad de agitación, se conseguirán distintas VTO debido al efecto que ejerce el movimiento del líquido al disminuir el espesor de las películas estáticas que oponen resistencia a la transferencia de masa (Acevedo, 2002).

La concentración de oxígeno disuelto es un parámetro importante que afecta la expresión de proteínas recombinantes al utilizar *P. pastoris*, dado el oxígeno se utiliza en la reacción de oxidación de metanol a formaldehído como lo muestra la Figura 2.1. Además, se sabe que el proceso de producción de proteína presente un alto consumo de oxígeno, por ende, está estrechamente asociado a la velocidad de consumo de oxígeno (Jahic *et al.*, 2002). La alta demanda de oxígeno y el suplemento que se requiere para satisfacerla surgen de la oxidación del formaldehído en la vía oxidativa del metabolismo del metanol, y de la reacción de fosforilación oxidativa que permite la regeneración del ATP desde NADH (Lee *et al.*, 2003). Para asegurar una mayor velocidad de transferencia de oxígeno y tener una mayor concentración de oxígeno disuelto, se debe maximizar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno o la fuerza impulsora, mediante el aumento de la velocidad de agitación o utilizando aire enriquecido en oxígeno (Minjie & Shi, 2013).

Algunos investigadores, han observado que al aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se promueve un incremento en la velocidad de consumo de la fuente de carbono y como consecuencia se genera más producto en el tiempo. Sin embargo, la productividad específica y volumétrica de la proteína varían dependiendo del caso (Charoenrat *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000).

Charoenrat *et al.* (2005), compararon un sistema CLA con limitación de oxígeno y un sistema CLA con limitación de metanol tradicional para la producción de una proteína β -glucosidasa de palorosa *Thai*. Dado que la fuerza motriz de la transferencia de oxígeno del sistema CLA con limitación de oxígeno fue mayor, las tasas de consumo de oxígeno y metanol fueron un 40% mayor que el sistema CLA tradicional con limitación de metanol. Debido a que la levadura *Pichia pastoris* es un organismo que preferentemente respira, ante una limitación severa de oxígeno, responde con un aumento de la demanda de mantenimiento, definido como la cantidad de carbono que se convierte en CO₂ desde metanol ($Y_{CO_2/S}$). Sin embargo, aún bajo estas condiciones fue posible mantener altas densidades celulares y de concentración de producto; y aún más destacable, la pureza de la proteína obtenida fue 64% mayor que la que se obtuvo en un sistema CLA limitado por el metanol, ya que las proteínas totales (proteína recombinante más otras proteínas) liberadas al medio fue significativamente menor.

2.6.5. Modalidades de Cultivo

La estrategia de cultivo más común para la producción de proteínas heterólogas bajo el pAOX1, está estructurada en dos etapas esencialmente. La primera consiste en generar altas concentraciones de biomasa utilizando fuentes de carbono con un alto rendimiento de sustrato en biomasa, tales como el glicerol desarrollando un cultivo por lote. La segunda etapa consiste en inducir el promotor pAOX1 utilizando metanol, para la de la proteína heteróloga. Generalmente la modalidad de cultivo más empleada es el lote alimentado, y en algunas ocasiones involucra una fase de transición en la que se alimenta glicerol y metanol, con el objetivo de dereprimir el promotor, debido a la alta concentración de glicerol que se tuvo en la etapa anterior (Minning *et al.*, 2001). Sin embargo, también se han llevado a cabo un gran número de investigaciones en la que se utiliza la modalidad de cultivo continuo, ya que otorga la ventaja de mantener la velocidad específica de crecimiento en un valor constante. A continuación se presentan el fundamento de las dos modalidades de cultivo consideradas para esta investigación.

a) Cultivo Continuo: Teoría del Quimiostato Simple

Las fermentaciones continuas pueden realizarse en diversos equipos y modalidades de operación. Por su versatilidad y simpleza el tanque agitado es el fermentador continuo más empleado. Desde el punto de vista cinético el tanque agitado es la opción más adecuada, debido al carácter autocatalítico del crecimiento microbiano y a los bajos valores de la constante de saturación. Este reactor funciona bajo el esquema de perfecta homogeneidad en su contenido, por lo tanto, la composición del flujo de salida es la misma que se encuentra dentro del fermentador. Por esta razón, las células están en todo momento en contacto con la composición de salida y nunca con la alimentación. En la Figura 2.2, se presenta el esquema de un quimiostato simple (Acevedo & Gentina, 2002).

El tratamiento cualitativo del quimiostato simple de una etapa se basa en la aplicación de balances de masa y ecuaciones cinéticas, junto a un cierto número de suposiciones y restricciones, que permiten determinar las concentraciones en la entrada y en la salida. A continuación se plantean los balances de masa de células, nutriente limitante y producto de acuerdo a la ecuación general:

$$\text{variación de composición} = \text{entradas} - \text{salidas} + \text{producción} - \text{consumo} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

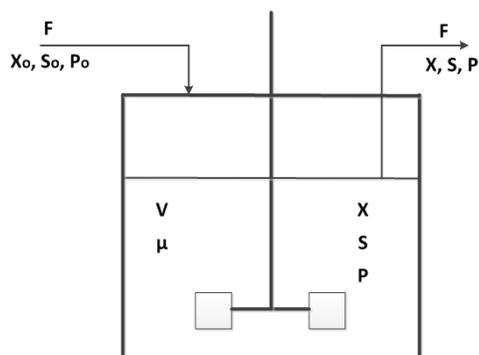


Figura 2.2: Esquema de un reactor en continuo tanque agitado. X: concentración de células; S: concentración de sustrato; P: concentración de producto; F: flujo volumétrico de alimentación; V: volumen de trabajo; μ : velocidad específica de crecimiento; subíndice 0: concentraciones en la alimentación (Acevedo & Gentina, 2002)

Como primera suposición, se considera que durante la operación no varían los valores de biomasa inicial (X_0), flujo (F), volumen (V) y rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$). Luego, el balance de células se expresa a través de la Ecuación 3.1:

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = F \cdot X_0 - F \cdot X + \mu \cdot X \cdot V \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Como se opera a volumen constante, la Ecuación 2.2 queda como sigue:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V} (X_0 - X) + \mu \cdot X \quad (\text{Ec. 2.3})$$

Se define la velocidad o tasa de dilución, D , el cual a su vez, corresponde al valor recíproco del tiempo de residencia en el fermentador:

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

Si la alimentación es estéril, entonces se asume que $X_0=0$, y la Ecuación 2.3 queda de la siguiente forma:

$$\frac{dX}{dt} = -D \cdot X + \mu \cdot X \quad (\text{Ec. 2.5})$$

En el caso de hacer un balance al nutriente limitante, se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec. 2.6})$$

En el caso de hacer un balance al producto (P), considerando que no hay producto en la alimentación, se tiene la siguiente ecuación, donde Q_p es la productividad volumétrica del microorganismo

$$\frac{dP}{dt} = -D \cdot P + Q_P \quad (\text{Ec. 2.7})$$

Hasta el momento, se tienen 3 ecuaciones y 4 incógnitas (X , S , P , μ), por lo que se requiere de una ecuación más. Por esta razón, se completa el número de ecuaciones con la expresión cinética de crecimiento de Monod (μ):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{S}{k_s + S} \quad (\text{Ec. 2.8})$$

Las Ecuaciones 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8 constituyen un esquema general del comportamiento de quimiostato simple. En el caso de régimen estacionario o permanente, las derivadas respecto al tiempo son nulas y el conjunto de ecuaciones queda como sigue (Acevedo & Gentina, 2002):

$$\mu = D \quad (\text{Ec. 2.9})$$

$$S = \frac{D \cdot k_s}{\mu_{m\acute{a}x} - D} \quad (\text{Ec. 2.10})$$

$$X = Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D \cdot k_s}{\mu_{m\acute{a}x} - D} \right) \quad (\text{Ec. 2.11})$$

$$P = \frac{1}{D} \cdot Q_P \quad (\text{Ec. 2.12})$$

b) Cultivo por Lote Alimentado

El cultivo por lote alimentado (CLA) es una modalidad de fermentación, cuyas características hacen atractiva su aplicación a una variada gama de procesos de fermentación, tanto en el área de la investigación, como en el área de producción (Acevedo & Gentina, 2002). Principalmente se trata de una operación discontinua, durante la cual los nutrientes o parte de ellos ingresan al fermentador por

una corriente de alimentación, y al no existir una corriente de descarga, resulta en una continua variación del volumen de fermentación. Las condiciones iniciales de un cultivo por lote alimentado se logran a través de una etapa previa de carácter obligatoria de cultivo por lote. Una vez que se han alcanzado las condiciones deseadas, se inicia la alimentación, marcando el comienzo del CLA. La Figura 2.3 muestra la operación de un CLA, y las principales variables.

La velocidad con que una población celular consume un nutriente cualquiera, viene dada por la expresión:

$$\text{Velocidad de consumo} = \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{X/S}} \left[\frac{g}{h} \right] \quad (\text{Ec. 2.13})$$

La Ecuación 2.13 muestra que la velocidad de consumo relaciona la velocidad específica de crecimiento (μ), el nivel de masa celular en términos másicos (XV), y el rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$). Como se puede apreciar la demanda depende directamente de la velocidad específica de crecimiento, por lo tanto, controlando la concentración del nutriente limitante en el caldo de fermentación, se va a repercutir sobre la velocidad específica de crecimiento de la población. Esto puede lograrse a través de la velocidad de alimentación u oferta del nutriente limitante, que viene dado por la Ecuación 2.14:

$$\text{Velocidad de alimentación} = F \cdot S_F \left[\frac{g}{h} \right] \quad (\text{Ec. 2.14})$$

La Ecuación 2.14 muestra que la velocidad de alimentación relaciona el flujo de alimentación (F) y la concentración de sustrato limitante en la alimentación (S_F). Una vez que se han definido la demanda y oferta de nutrientes, se tendrán dos situaciones desde el punto de vista de la velocidad específica de crecimiento: la primera de ellas es que la oferta sea mayor que la demanda, situación en la cual el sustrato limitante se acumulará en el fermentador y la masa celular crecerá a su velocidad máxima específica de crecimiento; y la segunda es que la oferta sea menor que la demanda, situación en la cual la concentración del nutriente limitante en el fermentador disminuirá hasta un punto en que el

crecimiento celular será a una velocidad específica de crecimiento menor a la máxima (Acevedo & Gentina, 2002).

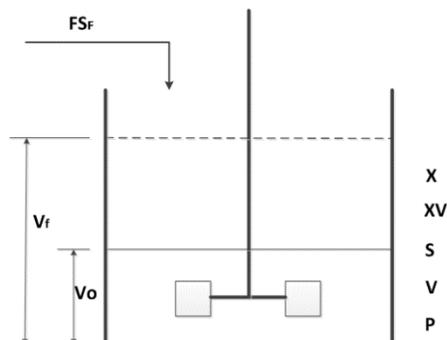


Figura 2.3: Representación esquemática de un CLA y sus principales variables de operación. **F:** flujo volumétrico alimentación; **S_F :** concentración del sustrato limitante en la alimentación; **V:** volumen total de fermentación; **S:** concentración de sustrato limitante en el fermentador; **X:** concentración de biomasa en el fermentador; **P:** concentración de producto formado dentro del fermentador (Acevedo & Gentina, 2002)

Para realizar una correcta programación con respecto a la velocidad de alimentación del cultivo, se debe considerar la demanda del microorganismo, la cual se define por las condiciones de crecimiento que se impongan en el proceso que se lleve a cabo. Generalmente, para obtener estas funciones de alimentación se ha optado por mantener constante S_F y variar F con el tiempo del cultivo. No obstante, se pueden obtener distintas funciones de la oferta de forma más simple, manteniendo F constante y haciendo variable S_F con el tiempo (Fuenzalida & Gentina, 1979).

Para plantear en forma simple los balances de materia del sistema, se deben tener en consideración las siguientes suposiciones, validadas por la investigación de Jones y Anthony (Jones & Anthony, 1977), primero que todo, el rendimiento del sustrato limitante ($Y_{X/S}$) es constante durante toda la fermentación; en segundo lugar, el consumo de sustrato para la mantención es despreciable; y por último, el aumento de volumen en el reactor es igual al volumen de solución de nutriente alimentada.

Planteando los balances de materia en torno al fermentador, se llega a las siguientes ecuaciones, las cuales establecen la dinámica del sistema:

- a) Velocidad de cambio del volumen del cultivo

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad (\text{Ec. 2.15})$$

- b) Velocidad de cambio de la masa de microorganismos en el fermentador:

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = \mu X V \quad (\text{Ec. 2.16})$$

- c) Velocidad de cambio de la cantidad de sustrato limitante en el fermentador:

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F \cdot S_F - \frac{\mu X V}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec. 2.17})$$

- d) La relación de Monod expresa la funcionalidad de μ con respecto a la concentración de sustrato limitante:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}s} * \frac{S}{K_S + S} \quad (\text{Ec. 2.18})$$

Como se puede apreciar, se tienen 4 ecuaciones y 5 incógnitas, por lo tanto, es necesario definir una variable. Para ello existen dos alternativas, la primera de ellas consiste en fijar la respuesta del cultivo a fin de obtener el tipo de alimentación que satisfaga esta condición, o bien, fijando la funcionalidad de la corriente de alimentación, para obtener como resultado el comportamiento del cultivo. En base a esto se analizan dos tipos de CLA, uno con velocidad de alimentación exponencial y un CLA con velocidad de alimentación constante.

En el caso del CLA con velocidad de alimentación exponencial, se impone que la masa celular crezca a una velocidad específica de crecimiento (μ) constante durante todo el cultivo y se determina cuál debe ser la función oferta para satisfacer esta condición, considerando S_F constante. En el caso del CLA con velocidad de alimentación constante, F y S_F vienen dados, y son constantes. Con esta condición se logra un sistema de cultivo de cuatro ecuaciones (Ecuación 2.15, 2.16, 2.17, 2.18) y cuatro incógnitas. La solución se logra a través de métodos numéricos dada la no linealidad que exhibe la Ecuación 2.18. No obstante, si se hace uso de aproximaciones se puede superar el hecho de no poder realizar integración analítica, y aunque se pierda exactitud en la solución, se obtiene un método mucho más sencillo para conocer los valores de X , V , S y μ a través del CLA (Acevedo & Gentina, 2002).

En el caso de esta investigación, uno de los objetivos es desarrollar cultivos por lote alimentado fijando una condición operacional que incluye a la velocidad específica de crecimiento. Por lo tanto, se busca mantener la velocidad específica de crecimiento constante durante el cultivo. Para ello, la alternativa más adecuada es desarrollar el CLA utilizando alimentación de tipo exponencial, y se analiza con mayor detalle a continuación. De acuerdo a la relación de Monod, para que un cultivo crezca a μ constante, se debe imponer que durante todo el CLA la concentración de sustrato limitante en el fermentador (S_R) sea constante. Considerando las Ecuaciones 2.15, 2.16, 2.17 y 2.18 que describen el comportamiento de una CLA, y que S_R es constante, se obtiene un sistema de 3 ecuaciones y 3 incógnitas:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad (\text{Ec. 2.19})$$

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = \mu X V \quad (\text{Ec. 2.20})$$

$$\frac{d(S_R \cdot V)}{dt} = F S_F - \frac{\mu X V}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec. 2.21})$$

Primero que todo, se deriva la ecuación 2.21, a continuación se reemplaza en ella la Ecuación 2.19 y la Ecuación 2.20, la cual debe ser integrada previamente (μ =constante). De estos cálculos se obtienen las siguientes ecuaciones que representan un CLA con alimentación exponencial.

$$S_R \cdot F = F \cdot S_F - \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot e^{(\mu \cdot t)}}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec. 2.22})$$

Desde la Ecuación 2.22 se puede despejar F, obteniéndose:

$$F = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot (S_F - S_R)} \cdot e^{(\mu \cdot t)} \quad \text{ó} \quad F = F_0 \cdot e^{(\mu \cdot t)} \quad (\text{Ec. 2.23})$$

Así, se puede concluir que para lograr que la masa celular en un cultivo por lote alimentado crezca a una velocidad específica constante, la alimentación debe ser de tipo exponencial, en la cual el factor F_0 viene determinado por las características del microorganismo y las condiciones iniciales del CLA (Acevedo & Gentina, 2002).

2.7. Características y Aplicaciones de las Lipasas

Las lipasas, cuya denominación bioquímica es acil-éster-hidrolasas, constituyen un grupo muy versátil de enzimas debido a la gran cantidad de reacciones que catalizan y, por ende, al elevado potencial de aplicaciones que poseen. Originalmente se han utilizado para la hidrólisis de grasas y aceites, aunque también son capaces de llevar a cabo el proceso inverso, es decir sintetizar enlaces éster. Debido a su estereoespecificidad, el potencial biotecnológico de las lipasas es tremendo y llaman la atención de la industria alimentaria, agrícola, química, farmacéutica, clínica y cosmética, para hacer uso de ellas (Jaeger & Reetz, 1998). El potencial de las lipasas como biocatalizadores para la producción de derivados de ácidos grasos es tremendo, ya que se obtienen productos muy valorados en la industria alimentaria y nutraceútica, tales como: ésteres aromatizantes, ésteres de ácidos grasos de antioxidantes y lípidos estructurados. Esto se debe principalmente a su alta regio

estereoespecificidad, además de las ventajas que ofrece un proceso enzimático en sí (Ferreira-Dias *et al.*, 2013).

2.7.1. Aspectos Generales de Lipasa proveniente de *Rhizopus oryzae* (ROL)

La síntesis de lipasas es una característica común en las especies del género *Rhizopus*. Se han descrito hasta 30 lipasas diferentes sintetizadas por las distintas especies de este hongo, cuya principal aplicación es la modificación de lípidos (Minning *et al.*, 1998). El hongo *Rhizopus oryzae* es un hongo filamentoso y lipolítico, que crece en los frutos de la palmera. Las especies del género *Rhizopus* se encuentran divididas en tres grupos principales: *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus stolonifer*. Las lipasas producidas por estos microorganismos, presentan ciertas sustituciones en algunas posiciones de la secuencia madura (Guillén, 2012).

La lipasa producida por este hongo de forma extracelular (ROL) despierta el interés del campo de la biotecnología y la investigación académica, ya que es muy utilizada en la resolución de mezclas racémicas debido a su alta regioespecificidad. Esta lipasa ha sido aplicada en diversas reacciones de interés industrial como en la producción de ésteres de cadena corta (aromatizantes) (Ben Salah *et al.*, 2007), en la resolución de mezclas racémicas (Palomo *et al.*, 2004), en la producción de biodiesel (Matsumoto *et al.*, 2001), entre otras aplicaciones.

Minning *et al.* (1998) desarrollaron una investigación en la que, por primera vez, se pudo expresar y secretar la proteína ROL (madura y funcional), en la levadura *Pichia pastoris*. Los experimentos se desarrollaron bajo la modalidad de cultivo por lote alimentado, obteniéndose niveles de producción aproximados de 60 [mg/L], y presentando propiedades similares a las de ROL nativa. Con este sistema de expresión no se formaron cuerpos de inclusión, lo cual facilitó el proceso de purificación. Finalmente, se obtuvo ROL recombinante de 30 kDa, con un pH óptimo de actividad de 8.1 a 30°C. El gen que codifica la lipasa extracelular en *R. oryzae*, comprende una secuencia señal de 26 aminoácidos, una prosequencia de 97 aminoácidos y una región de lipasa madura de 269 aminoácidos (Beer *et al.*, 1996). La enzima nativa purificada posee un peso molecular de 32 [kDa] (Beer *et al.*,

1996), estable en el rango de pH de 4.5 a 7 a 30 [°C], presentando un pH óptimo de actividad de 8.5 (Ben Salah *et al.*, 1994).

2.8. Motivación del Proyecto

Como se puede apreciar en esta revisión bibliográfica se han planteado una serie de estrategias de cultivo que permitan aumentar la productividad de esta proteína ROL y de otras proteínas de estudio. En gran parte de estas investigaciones se analiza la influencia de distintas variables operacionales como la temperatura, transferencia de oxígeno, uso de cosustrato, tasas de dilución, entre otras, sobre la productividad de la proteína recombinante al utilizar *Pichia pastoris*. Sin embargo, se notó que no había una investigación que evaluara la influencia de tres variables operacionales en conjunto sobre la producción de proteína recombinante. En la revisión se vio que el oxígeno disuelto en el medio, la velocidad específica de crecimiento del microorganismo y la temperatura son factores que inciden en el metabolismo de *P. pastoris*, y en consecuencia, en la producción de proteína. Por ello, se propuso evaluar de qué forma afectaban conjuntamente la velocidad de agitación, temperatura y velocidad específica de crecimiento sobre la productividad volumétrica y específica de la proteína. Desde este análisis hecho en cultivos continuos, sería posible encontrar una condición óptima para cada una de estas variables, y así, implementarlas en conjunto en modalidad de cultivo por lote alimentado.

CAPITULO 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Tabla 3.1: Reactivos utilizados en el desarrollo de la experiencia

Reactivo	Marca
Yeast Nitrogen Base	Winkler
Sulfato de Amonio	Merck
Hidróxido de Sodio	Merck
Glucosa	Merck
Agar agar	Loba Chemie
Zeocina	Life Technology
Glicerol (85%)	Merck
Metanol	Merck
Peptona	BD
Extracto de Levadura	BD
P-Nitrofenil Butirato	Sigma
Fenol	Merck
Sulfato de Cobre	Winkler
Hipoclorito de Sodio	Marca Comercial

Tabla 3.2: Materiales utilizados en el desarrollo de la experiencia

Materiales	
Placas Petri	Tubos Eppendorf, 2 [mL]
Pipeta desechable, 10 [mL]	Cámara Neubauer
Probeta de 10 [mL], 250 [mL], 1[L]	Porta y Cubreobjetos
Vasos de Precipitado	Algodón Hidrofóbico
Matraces de 100 [mL], 500 [mL]	Cinta Masking, Gasa
Shott de 500 [mL], 5 [L], 1[L]	Palillos estériles
Jeringas estériles, 3 [mL]	Crioviales de 2 [mL]
Filtros Embudo, 0.22 [µm]	Agitadores Magnéticos
Filtros Millipore, 0.22 [µm]	Gradilla, Pinzas, Capacho
Puntas desechables	Celdas Espectrofotométricas
Tubos Falcon, 50 [mL]	Mangueras Masterflex, diámetro
Tubos Falcon, 15 [mL]	14,13,16
Micropipetas de 200 [µL], 1 [µL], 1 [mL] y 5 [mL]	Papel alusa, papel film

Tabla 3.3: Equipos utilizados en el desarrollo de la investigación

Equipos	Marca	Modelo
Autoclave	Lab- tech	LAC-5100SD
Campana flujo laminar	Lab- tech	LCB-0121V
Espectrofotómetro	-	UV mini -1240V
Microscopio	ZEISS	Exiostar plus
Estufa	Lab- tech	Memmert
Centrífuga	Thermo scientific	SL16
Shaker	Lab- tech	LSI-3016R
Fermentador	Biostat® A plus	Sartorius BBI systems
Vórtex	Lab- tech	V-1 plus
Temporizador Digital Programable	375475	Extech Instruments
Bomba Peristáltica	Masterflex	L/S Analógica

3.2. Microorganismo

Se utilizará la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* cepa X-33/pPICZαA-ROL, con un fenotipo Mut⁺ capaz de expresar el gen heterólogo de lipasa proveniente de *Rhizopus oryzae* (ROL). La cepa recombinante se obtuvo mediante la inserción del vector de expresión pPICZαA en la cepa salvaje X-33, el cual fue linealizado e integrado al cromosoma de la célula. El gen de la lipasa se dispuso bajo el control del promotor pAOX1, de esta forma la expresión de la lipasa en la cepa resultante está sujeta a ser inducida por metanol. Las cepas transformadas con el vector que posee el gen ROL fueron identificadas y aisladas, mediante un marcador de selección, que corresponde a un gen de resistencia a zeocina, presente en el vector de expresión (Serrano, 2001).

3.3. Conservación de la Cepa

Se realizó un banco celular, conservado a -80°C para que las levaduras pudieran ser almacenadas por un periodo prolongado de tiempo. De esta forma, se tuvo certeza que todas las células provenían de una misma colonia, y así se evitaron posibles variaciones por mutaciones generacionales. El banco celular se realizó tomando muestra de un vial que contenía la cepa original, para sembrar placas Petri en modalidad de estrías por agotamiento. El medio utilizado para las placas fue YPD-agar: 10 [g/L] de

extracto de levadura, 20 [g/L] de peptona, 15 [g/L] de agar, 20 [g/L] de glucosa y 1 [uL/mL] de zeocina. Se preparó una solución de glucosa que fue autoclavada por separado de los otros componentes del medio. Para obtener colonias aisladas, se utilizó 1 [μL/mL] de zeocina como marcador de selección de las cepas transformadas. Las placas se incubaron en estufa por 48 horas a 30°C. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se tomó una colonia aislada obtenida en la placa, y se propagó en 20 [mL] de medio YPD-glucosa: 10 [g/L] de extracto de levadura; 20 [g/L] de peptona; 20 [g/L] de glucosa y 1 [μL/mL] de zeocina, por 12 horas, a 200 [rpm] y 30 [°C]. Posteriormente, se hizo una segunda propagación en la que se tomaron 15 [mL] de muestra de la primera, y se transfirieron a un volumen de 150 [mL] de YPD glucosa, el cual se incubó por 12 horas, a 200 [rpm] y 30 [°C]. El volumen total de esta segunda propagación se centrifugó a 3000 [rpm] por 4 minutos, y el pellet obtenido fue resuspendido en 25.5 [mL] de YPD-glicerol: 10 [g/L] de extracto de levadura, 20 [g/L] de peptona, 6 [g/L] de glicerol; más 4.5 [mL] de glicerol (99%). Esta suspensión se distribuyó y almacenó en crioviales de 1.5 mL a -80°C. Se obtuvo un banco celular de 24 crioviales, los cuales se utilizaron para toda la experimentación posterior.

Para asegurar la viabilidad de la cepa, se descongeló un vial e incubó en una placa con medio selectivo YPD-agar a 30°C por 48 horas. Para evitar pérdidas de viabilidad celular, las cepas sembradas en placas se descartaron después de un período de almacenamiento de 15 días. Se evitó la resiembra en placas para evitar variabilidad genética y/o mutaciones (Flores, 2013).

3.4. Diseño Experimental

Para el inicio de esta investigación, se dispuso de un conjunto de datos que surgieron de un trabajo experimental realizado bajo el marco del proyecto FONDECYT N°11110486 el año 2013. Este trabajo corresponde a un diseño central compuesto con un total de 20 cultivos continuos de *Pichia pastoris*, en los que se evaluó el efecto de tres variables independientes: tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación. Una vez que cada uno de los experimentos habían alcanzado el estado estacionario, se cuantificaron las siguientes variables: tensión de oxígeno disuelto, dióxido de carbono en el aire de entrada y gases de salida, peso seco, viabilidad celular, concentración de metanol y glicerol que quedó en el medio de cultivo, proteína total, actividad de la lipasa ROL, ácidos orgánicos y aminoácidos. En base a la cuantificación de estas variables, se calcularon algunos parámetros, tales

como: rendimiento de sustrato en biomasa, productividad específica de ROL, y productividad volumétrica de ROL.

Se utilizó el método de superficies de respuesta con el fin de establecer una relación entre las variables independientes (variables operacionales) evaluadas en este diseño, y posteriormente, determinar aquellas condiciones que maximizan la productividad volumétrica y específica de la proteína ROL. Hacer uso de este método contempla tres etapas:

- a) Diseño y recopilación de datos experimentales
- b) Aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple
- c) Análisis de la superficie ajustada mediante gráficos y técnicas numéricas

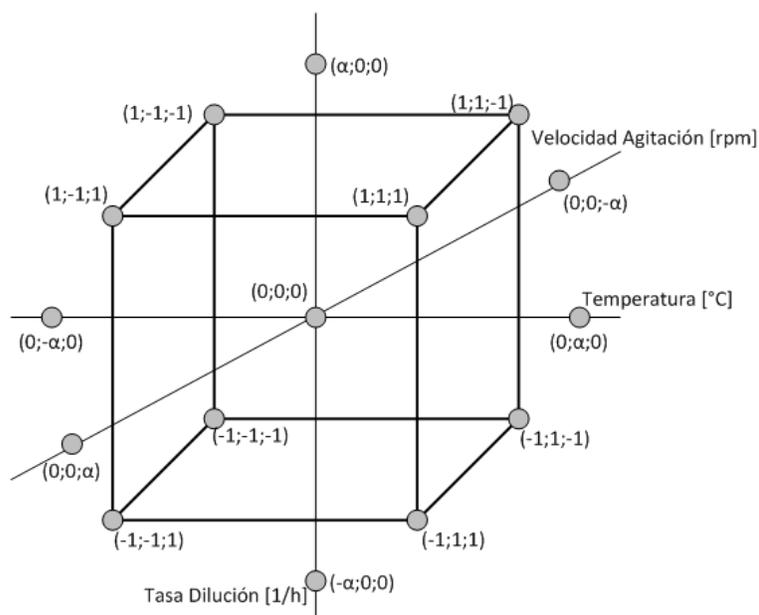
El análisis de superficies de respuesta fue efectuado considerando como variables independientes la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación. Este método explora la relación entre estas variables y una variable dependiente dentro de una región experimental, y no solamente en las fronteras, como sucede en los diseños factoriales (Lawson *et al.*, 1992). En la Tabla II.1 se encuentra el diseño con el que se inicia esta investigación (Ver Anexo II).

- a) Diseño y recopilación de datos experimentales

Como se mencionó anteriormente, el diseño experimental se llevó a cabo sobre la base de un diseño central compuesto, y está representado por la Figura 3.1. Este tipo de diseño se construye en base a factoriales con dos niveles (1;-1), incluyendo un conjunto de puntos en los ejes $(-\alpha; 0; \alpha)$ y el punto central $(0; 0; 0)$. Esto significa que para cada una de las variables se deben fijar cinco niveles $(-\alpha; -1; 0; 1; \alpha)$, y se pueden ver en la Tabla 3.4. La distancia que existe entre α y el origen para tres variables es igual a la raíz cuadrada de 3 ($\alpha=1.73$) (Lawson *et al.*, 1992). Las productividades volumétrica y específica de la proteína ROL, fueron analizadas por regresión lineal múltiple.

Tabla 3.4: Valores de las variables operacionales para cada nivel del diseño

Variables	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
D [1/h]	0.02	0.031	0.045	0.059	0.07
T [°C]	20	22	25	27.9	30
V. Agitación [rpm]	300	385	500	615	700

**Figura 3.1:** Representación esquemática de un diseño central compuesto

b) Aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple

A modo de simplificar los cálculos utilizados en la regresión lineal múltiple se trabajó con álgebra de matrices. El modelo cuadrático para tres variables independientes se presenta a continuación con la Ecuación 3.1:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (Ec. 3.1)$$

Para conocer los valores de los coeficientes de la ecuación (b_i) se construyó una matriz Y con las variables dependientes (resultados de cada uno de los experimentos, en este caso se considerará para el análisis las productividades volumétricas y específicas de la proteína ROL), y una matriz X con los valores de las variables independientes (los valores de $-\alpha$; -1 ; 0 ; 1 y α que se usaron para cada uno de los experimentos, en este caso los valores de la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación) de la siguiente forma:

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{21} & x_{31} & x_{11}^2 & x_{21}^2 & x_{31}^2 & x_{11}x_{21} & x_{11}x_{31} & x_{21}x_{31} \\ 1 & x_{12} & x_{22} & x_{32} & x_{12}^2 & x_{22}^2 & x_{32}^2 & x_{12}x_{22} & x_{12}x_{32} & x_{22}x_{32} \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ 1 & x_{1n} & x_{2n} & x_{3n} & x_{1n}^2 & x_{2n}^2 & x_{3n}^2 & x_{1n}x_{2n} & x_{1n}x_{3n} & x_{2n}x_{3n} \end{bmatrix}$$

Donde y_n es el valor experimental de la variable dependiente en el experimento n –ésimo, y x_{mn} es el valor de la variable independiente m en el experimento n –ésimo. Los valores de la matriz Y y X se encuentran disponibles en el Anexo II.

Se define una matriz B que incluye los valores de los coeficientes b_i de la Ecuación 3.1:

$$B = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{11} \\ b_{22} \\ b_{33} \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \end{bmatrix}$$

La matriz B puede ser calculada como se muestra en la Ecuación 3.2 (Lawson *et al.*, 1992):

$$B = (X^T X)^{-1} (X^T Y) \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Esta ecuación implica el cálculo de una matriz inversa de 20x10, y para resolverla se utilizó el software MatLab versión 2010. Los valores de la matriz B encontrados, se reemplazaron en los coeficientes b_i de la Ecuación 3.1, con lo que finalmente se obtuvo un polinomio cuadrático.

c) Análisis de la superficie ajustada mediante gráficos y técnicas numéricas

Finalmente, se procedió a evaluar la Ecuación 3.1 en una región experimental definida por los rangos dados para las tres variables independientes (D [h⁻¹], T [°C] y Velocidad de Agitación [rpm]). Esta ecuación se graficó construyendo una matriz de 36x36, en donde cada valor que toma y está en función de las variables independientes, dependiendo de cuál sea el caso que se quiera representar. La Ecuación 3.1 se evalúa en un rango experimental de x_1 ($x_{1,i}$) y de x_2 ($x_{2,j}$), donde i y j son números enteros desde 1 a 36, y corresponden a la división en 36 intervalos iguales del rango que va desde $-\alpha$ hasta α .

Esta metodología significó un gran aporte para establecer la relación existente entre las tres variables independientes, sin embargo, también resultó interesante conocer el máximo global de ambas productividades considerando el efecto de estas variables en simultáneo. Si bien, este máximo no puede visualizarse en una gráfica, puede ser calculado maximizando el polinomio obtenido anteriormente. Para ello, se hizo uso de la herramienta Solver del software Microsoft Excel versión 2010 (Berríos, 2002).

3.5. Cultivos continuos

3.5.1. Preparación del Inóculo

El volumen total de un criovial se incubó en 100 [mL] de medio líquido YPD-glucosa (10 [g/L] de extracto de levadura; 20 [g/L] de peptona; 20 [g/L] de glucosa) a 200 [rpm] y 30 [°C], durante 24 horas. Este tiempo está destinado a la activación de la célula con el fin de sacarla del estado de latencia en el que se encuentra debido a su almacenamiento a -80 [°C]. De este pre inóculo se tomaron 30 [mL], los que se centrifugaron por 4 minutos a 3000 [rpm]. El pellet obtenido fue re suspendido en un matraz con 100 [mL] de medio definido compuesto por 5 [g/L] de Sulfato de amonio, 1.7 [g/L] de YNB (Yeast Nitrogen Base, DIFCO 233520, ver Anexo I), 6 [g/L] de glicerol, 4 [g/L] de metanol; e incubado a 30 [°C], 200 [rpm] por 12 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial, y se tiene la seguridad de que se inocula el reactor con células en fase exponencial. El volumen de trabajo del reactor fue de 1 [L], y se inoculó con un 10% de este volumen, equivalente a 100 [mL].

3.5.2. Condiciones de Operación del Reactor

Cada uno de los cultivos continuos fue desarrollado a una tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación determinadas en base al análisis de los datos disponibles en el que trabajo que se desarrolló anteriormente. El pH se mantuvo controlado en 5.5 adicionando una solución de NaOH 3 [N], y la aireación se mantuvo a una tasa de 1.2 [vvm]. En la etapa previa de cultivo por lote se utilizó un volumen de trabajo de 1 [L] de medio definido compuesto por: 1.7 [g/L] de YNB, 5 [g/L] de sulfato de amonio y 10 [g/L] de glicerol, utilizando este último como fuente de carbono y energía. Una vez que se alcanzaron 3 a 4 [g/L] de biomasa en la etapa de lote (momento en el que las células están en fase de crecimiento) se comenzó la alimentación, dando inicio al cultivo continuo. El medio de cultivo alimentado es un medio definido compuesto por 1.7 [g/L] YNB; 5 [g/L] de sulfato de amonio, y 15 [g/L] de fuente de carbono y energía, correspondiente a una mezcla de metanol y glicerol, en una proporción de 70%-30%, respectivamente (10.5 [g/L] de metanol y 4.5 [g/L] de glicerol).

El reactor se esterilizó en el autoclave a 121 [°C] por 30 minutos, sólo con una parte del medio de cultivo, correspondiente al sulfato de amonio y glicerol. La esterilización de la solución de YNB debió hacerse de forma separada a través de microfiltración (filtros Millipore PVDF de 0.22 [µm] de poro). La solución de YNB se adicionó al reactor cuando éste se encontraba a la temperatura de operación del cultivo. De la misma forma, se procedió con la preparación y esterilización del bidón de alimentación del cultivo continuo, el cual, al momento de ser autoclavado, contenía sólo el glicerol y sulfato de amonio, a una concentración de 4.5 [g/L] y 5 [g/L], respectivamente. El metanol y solución YNB (filtrada) se adicionaron al bidón una vez que éste se encontraba a temperatura ambiente, e instantes previos al inicio de la alimentación para minimizar pérdidas de metanol por volatilización.

Todos los cultivos se llevaron a cabo en un reactor Bioreactor Biostat® A plus (Sartorius BBI systems) con una vasija 2 [L] de capacidad total. Al reactor se le incorporaron sensores de oxígeno, pH y temperatura. El pH se monitoreó mediante el uso de un pHmetro EasyFerm Plus K8 (Hamilton), y se controló con la ayuda de un software incorporado al reactor, que actuaba sobre una bomba peristáltica, la cual permitía la adición de una solución de NaOH. El oxígeno disuelto no se controló, sólo fue monitoreado por medio de un electrodo Oxiferm FDA (Hamilton). La temperatura se monitoreó utilizando una termocupla, y se mantuvo constante gracias a un sistema termorregulador acoplado al reactor, que permitió el paso de agua a través de éste (sistema en forma de U). Durante los cultivos, se visualizaron en línea las mediciones de pH, oxígeno disuelto y temperatura, mediante el software MFCS/DA, que a su vez permitió la adquisición de datos.

La alimentación del medio de cultivo se realizó utilizando una bomba peristáltica Masterflex (Modelo L/S Analógica). El volumen de trabajo se mantuvo por rebalse, y el flujo de descarga fue controlado con la misma bomba que controló el flujo de alimentación. Una vez que el cultivo había cumplido los tres tiempos de residencia, se hacía pasar el flujo de gases de salida por una columna desecadora (sílica), y posteriormente por un rotámetro para regular el flujo de entrada hacia el analizador de CO₂, equipo utilizado para analizar la producción de CO₂ (Flores, 2013).

Todos los cultivos realizados alcanzaron estado estacionario, el cual tuvo lugar después del tercer tiempo de residencia. Para comprobarlo, se tomaron 4 muestras separadas por un tiempo de 1 hora, a las cuales se les midió absorbancia, se registraron las ppm de CO₂ y la tensión de oxígeno disuelto,

en esos mismos instantes de tiempo. El criterio establecido para asegurar el estado estacionario consistió en que no hubiera una variación de más de un 5% entre una muestra y otra, con respecto a los tres parámetros mencionados anteriormente.

La toma de muestra para cuantificación de parámetros se realizó una vez que el cultivo había alcanzado el estado estacionario. Se tomaron tres muestras de 20 [mL] desde el medio de cultivo, las cuales fueron centrifugadas a 10000 [rpm] por 10 minutos. Terminada la centrifugación, se conservaron los sobrenadantes en un congelador a -20 [°C] para los análisis posteriores, y los pellets fueron destinados a la cuantificación de biomasa mediante peso seco.

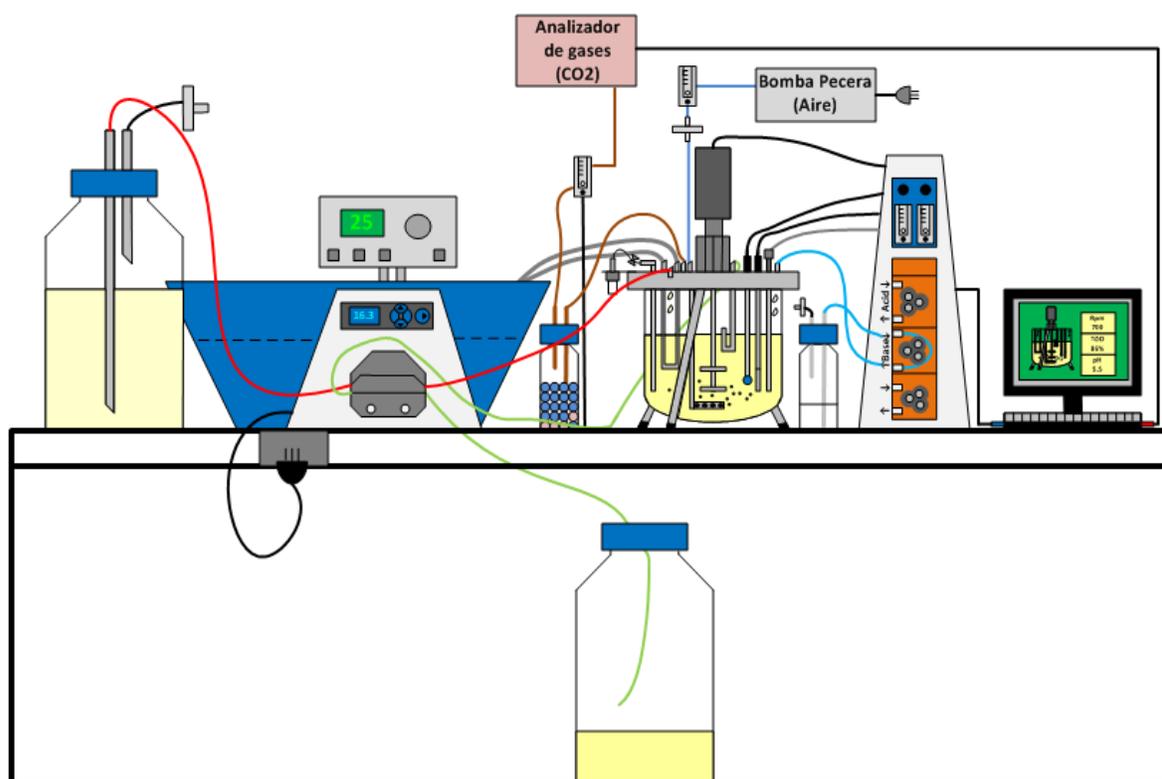


Figura 3.2: Esquema experimental de un cultivo continuo de *Pichia pastoris* en reactor Biostat® A plus

3.6. Cultivos por Lote Alimentado en Reactor

En esta etapa de cultivos por lote alimentado se aplicaron procedimientos similares a los utilizados en la etapa de cultivos continuos, de tal manera que los resultados obtenidos en estos experimentos pudiesen ser comparables. Por ello, la preparación del inóculo fue exactamente la misma que se vio en la Sección 3.4.1. Al igual que en la etapa de lote de los cultivos continuos, se utilizó un volumen de trabajo de 1 [L] para la etapa de lote, el reactor fue inoculado con 100 [mL] de inóculo, y para cuando se tuvo una concentración aproximada de 3 [g/L] de biomasa, se inició la alimentación del medio de cultivo.

Para mantener el control de la velocidad específica de crecimiento en este tipo de cultivo, así como se hacía en el caso de los cultivos continuos manipulando la tasa de dilución, se implementó la modalidad de alimentación exponencial, vista en el apartado B de la Sección 2.6.5. Para simular este tipo de alimentación, se utilizó un temporizador digital automático, el cual fue programado. La bomba se conectó a este temporizador, para que se encendiera y apagara en determinados instantes de tiempo. Con el funcionamiento de la bomba durante ciertos periodos de tiempo, los cuales se van prologando a medida que avanza la fermentación, se van aportando cada vez mayores volúmenes de alimentación, con lo cual se simulan flujos que van en aumento. Así, se logra ajustar una función de flujo de alimentación tipo escalonada a una función de alimentación exponencial.

3.6.1. Condiciones Operacionales del Reactor

Para llevar a cabo los cultivos por lote alimentado con alimentación exponencial se utilizó aquella condición operacional de temperatura, velocidad de agitación y, en este caso, velocidad específica de crecimiento, que reportó los mayores valores de productividad volumétrica y específica en la etapa de cultivos continuos. El pH se mantuvo controlado en 5.5 adicionando una solución de NaOH 3 [N], y la aireación se mantuvo a una tasa de 1.2 [vvm]. Para la etapa previa de cultivo por lote se utilizó un volumen de trabajo de 1 [L] de medio definido compuesto por: 1.7 [g/L] de YNB, 5 [g/L] de sulfato de amonio y 10 [g/L] de glicerol, utilizando este último como fuente de carbono y energía.

Se realizaron dos cultivos por lote alimentado en los cuales se alimentó un volumen total de 500 [mL] de medio definido. La alimentación del medio de cultivo se realizó utilizando una bomba peristáltica Masterflex (Modelo L/S Analógica). En la Tabla 3.5 se muestra la composición del medio alimentado en cada uno de los casos (concentración de glicerol y metanol), la cual se determinó en base al cálculo de la concentración de glicerol y los porcentajes de cada sustrato, definidos previamente. El cálculo de la concentración de glicerol requerida para alcanzar la biomasa deseada se encuentra disponible en el Anexo VII, y se requirió de parámetros como la máxima velocidad específica de crecimiento y rendimiento de sustrato en biomasa, obtenidos de una experiencia previa de cultivo por lote.

El reactor se esterilizó en el autoclave a 121 [°C] por 30 minutos, sólo con una parte del medio de cultivo, correspondiente al sulfato de amonio y glicerol. La esterilización de la solución de YNB debió hacerse de forma separada a través de microfiltración (filtros Millipore PVDF de 0.22 [μm] de poro). La solución de YNB se adicionó al reactor cuando éste se encontraba a la temperatura de operación del cultivo. De la misma forma, se procedió con la preparación y esterilización del bidón de alimentación del cultivo por lote alimentado, el cual, al momento de ser autoclavado, contenía sólo el glicerol y sulfato de amonio a las concentraciones mencionadas anteriormente. El metanol y la solución YNB (filtrada) se adicionaron al bidón una vez que éste se encontraba a temperatura ambiente, e instantes previos al inicio de la alimentación para minimizar pérdidas de metanol por volatilización.

Tabla 3.5: Composición del Medio de Alimentación para los Cultivos por Lote Alimentado (CLA)

N° del CLA	Porcentaje de Sustratos [%]		Concentración [g/L]			
	Metanol	Glicerol	Metanol	Glicerol	YNB	Sulfato de Amonio
1	60	40	54	36	1.7	5
2	40	60	24	36	1.7	5

Todos los cultivos se llevaron a cabo en un reactor Bioreactor Biostat® A plus (Sartorius BBI systems) con una vasija 2 [L] de capacidad total. Al reactor se le incorporaron sensores de oxígeno, pH y temperatura. El pH se monitoreó mediante el uso de un pHmetro EasyFerm Plus K8 (Hamilton), y se controló con la ayuda de un software incorporado al reactor, que actuaba sobre una bomba

peristáltica, la cual permitía la adición de una solución de NaOH. El oxígeno disuelto no se controló, sólo fue monitoreado por medio de un electrodo Oxiferm FDA (Hamilton). La temperatura se monitoreó utilizando una termocupla, y se mantuvo constante gracias a un sistema termorregulador acoplado al reactor, que permitió el paso de agua a través de éste (sistema en forma de U). Durante los cultivos, se visualizaron en línea las mediciones de pH, oxígeno disuelto y temperatura, mediante el software MFCS/DA, que a su vez permitió la adquisición de datos.

La toma de muestra para cuantificación de parámetros se realizó cada dos horas, desde el momento en el que inició a alimentación del cultivo. Se tomaron alrededor de 5 [mL] del medio de cultivo, los cuales se distribuyeron en volúmenes de 1.5 [mL] en tubos Eppendorf, y fueron centrifugados a 10000 [rpm] por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y conservado en un refrigerador a - 20 [°C] para los análisis posteriores, y el pellet fue descartado. Cabe destacar que la cuantificación de biomasa durante el transcurso de la fermentación, fue determinada mediante la medición de absorbancia e interpolación en una curva de calibrado adecuada para cada caso. Se determinó de esa forma ya que se requería de un volumen de muestra mínimo para el análisis, que no alteraba significativamente el volumen total que había en el reactor durante el cultivo.

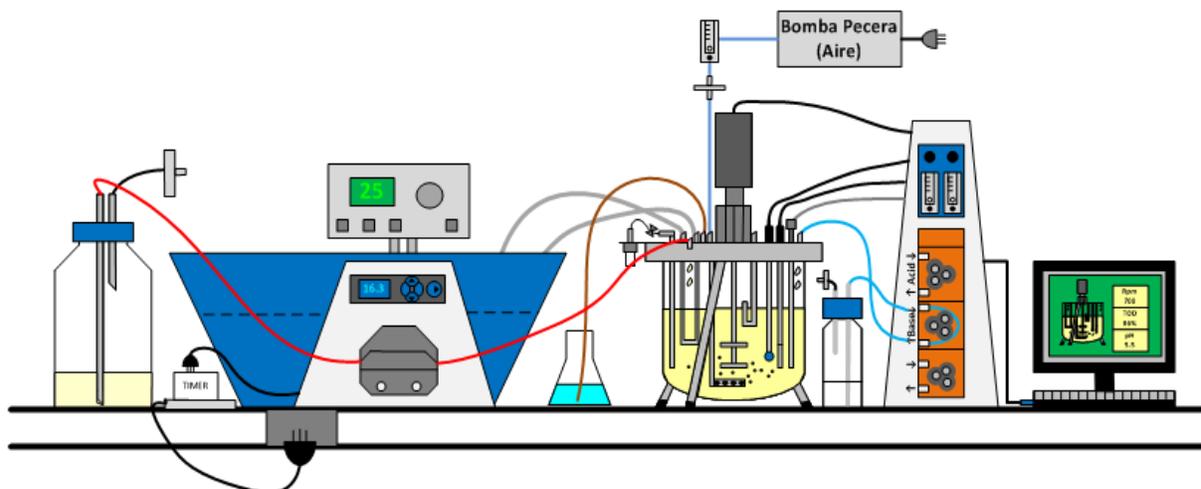


Figura 3.3: Esquema experimental de un cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial de *Pichia pastoris* en reactor Biostat® A plus

3.7. Metodología Analítica

3.7.1. Determinación de Glicerol

Para la determinación de glicerol, las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta presión, HPLC. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H de 300x7, de 8 [mm]. El equipo corresponde a un cromatógrafo HPLC Perkin-Elementer modelo series 200 con un analizador GlycoChrom, y la detección se realiza por índice de refracción (IR).

Condiciones de operación:

- Fase móvil: H₂SO₄, 5 [mM]
- Temperatura horno: 35 [°C]
- Temperatura detector: 45 [°C]
- Flujo: 0.6 [mL/min]
- Volumen de muestra inyectada: 10 [μL]
- Tiempo de retención para el glicerol: aproximadamente 12.95 [minutos]

Procedimiento medición:

Primero que todo, se obtuvo una curva de calibrado (Ver Anexo III.1). Para ello, se preparó una solución estándar de glicerol de 7 [g/L], a partir de la cual se realizaron diluciones en tubos Eppendorf con agua destilada miliQ, las cuáles fueron medidas en el equipo. En el caso de las muestras del sobrenadante, éstas debieron ser filtradas, utilizando filtros de 0,22 [μm] de diámetro de poro, para que así, pudiesen ser depositadas en los viales del análisis. Por otra parte, se debe contar con la precaución de sonicar la fase móvil previamente, para eliminar la presencia de burbujas. Basándose en la curva de calibrado, se estableció una correlación entre el valor de área obtenida en el cromatograma y la concentración de glicerol.

3.7.2. Determinación de Metanol

La determinación de metanol se realizó por cromatografía de gases GC-FID. La columna utilizada fue una columna capilar Supelco Equity-1, diseñada para fines generales (no polares). El cromatógrafo de gases es Perkin-Elmer Clarus 500 con detector de ionización de llama FID.

Condiciones de operación:

- Temperatura inyector: 200 [°C]
- Temperatura horno: 80 [°C]
- Temperatura detector FID: 200 [°C]
- Fase móvil: N₂
- Flujo fase móvil: 5 [mL/min]
- Tiempo de retención: 1.67 [minutos]
- Volumen de inyección: 0.1 [μL]

Procedimiento de medición:

Se preparó una solución estándar de metanol con una concentración, de la cual se preparan diluciones en un rango entre 0.79 - 4.74 [g/L] para la construcción de la curva de calibrado (Ver Anexo III.2). Se utiliza como patrón interno una solución de etanol o propanol. Las muestras se prepararon mezclando en una razón 1:1 el volumen de sobrenadante filtrado y el estándar interno. Las áreas de metanol y el estándar obtenidas en los cromatograma se relacionan mediante la Ecuación 3.3. La determinación de la concentración de metanol se realizó interpolando la razón de áreas obtenida, en la curva de calibrado.

$$\text{Razón de Áreas} = \frac{\text{Área}_{\text{Metanol}}}{\text{Área}_{\text{Estándar Interno}}} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

3.7.3. Determinación de Amonio

La concentración de amonio se determinó por medio del método del fenol-hipoclorito. El método se basa en la transformación del amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona el cuál absorbe a 635 [nm] y cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de amonio. Para la medición del amonio se utilizan dos soluciones, denotadas con las letras A y B. La solución A está compuesta por fenol 0.106 [M] y nitroferricianuro de sodio 0.17 [mM]. La solución B está compuesta por hidróxido de sodio 0.125 [N] e hipoclorito de sodio 11 [mM].

Procedimiento de medición:

Para la construcción de la curva de calibrado se preparó una solución patrón de sulfato de amonio a una concentración de 1 [g/L] (con agua desionizada tipo II) a partir de la cual se realizan diluciones con agua desionizada tipo II (Ver Anexo III.3).

Para la determinación de amonio en las muestras de sobrenadante, se tomó 1 [mL] y se diluyó 25 veces. De esta dilución se tomaron 25 [μL], a los cuales se les adicionó 1 [mL] de solución A. Esta preparación se agitó en vórtex, luego se le adicionó 1 [mL] de solución B, y se volvió a agitar. Las muestras preparadas se incubaron en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio a 25 [°C] por 30 minutos. Se midió la absorbancia de cada muestra contenida en los tubos a 635 [nm], utilizando como blanco agua milli Q. Los valores obtenidos de absorbancia se correlacionan con la curva de calibrado de amonio obtenida previamente.

3.7.4. Determinación de Proteína Total

Para la determinación de proteína total se utilizó el método de Bradford. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico llamado azul brillante de Coomassie y las proteínas. El complejo proteína-colorante posee un alto coeficiente de extinción, lo que hace que se logre una gran sensibilidad en la cuantificación de proteína. Para lograr la unión

efectiva entre el colorante y las proteínas es necesario un tiempo de reacción de 15 minutos como mínimo. El complejo generado permanece disuelto en solución por alrededor de 1 hora.

Bajo condiciones muy ácidas (pH cercano a 1) el azul brillante de Coomassie es más estable en su forma diprotonada, presentando una coloración roja, sin embargo, al unirse a proteínas queda desprotonado y muestra una coloración azul. Por lo tanto, la intensidad de coloración azul se correlaciona con la concentración de proteína.

Procedimiento de medición:

Primero que todo, debe prepararse el reactivo de Bradford. Se disuelven 100 [mg] de *Coomassie Brilliant Blue* G250 en 50 [mL] de etanol al 95%, luego se adicionan 100 [mL] de ácido fosfórico 85 % [p/v], y se afora a 1 [L] con agua desionizada. A continuación, se debe filtrar esta solución, utilizando un embudo con papel filtro Whatman N°1, y debe ser almacenada en un envase ámbar.

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser seroalbúmina bovina (BSA) (Ver Anexo III.4). Se preparó esta solución estándar a una concentración de 1 [mg/ml], de la cual se realizaron diluciones para la construcción de la curva. De cada dilución se tomó 1 [mL] y se adicionó 1 [mL] de reactivo de Bradford. Se dejó reaccionar por 15 minutos (tiempo mínimo de reacción), y se midió absorbancia a 595 [nm]. Para el análisis de las muestras de sobrenadante se sigue el mismo procedimiento, y las absorbancias obtenidas se correlacionan mediante la curva de calibrado.

3.7.5. Determinación de Actividad Esterásica Extracelular de ROL

La actividad enzimática de la lipasa ROL se determinó mediante una adaptación del método de Fukuda (Fukuda *et al.*, 1996), analizando con espectrofotómetro el incremento de absorción a 348 [nm] que genera la liberación de p-nitrofenol (p-NP) en la hidrólisis que la lipasa produce sobre el sustrato p-nitrofenilbutirato (p-NPB). Se debe preparar una solución de paranitrofenilbutirato (p-

NPB), 50 [mM], y como solvente debe utilizarse acetonitrilo; una solución tampón fosfato (Tpn NaP) a pH 7.0 y concentración 25 [mM] y un tampón fosfato-acetonitrilo (Tpn NaPA) a pH 7.0, preparado con 96% [v/v] tampón fosfato y 4% [v/v] de acetonitrilo.

Procedimiento de medición:

Se preparó una solución estándar de p-nitrofenol (p-NF) de concentración 0.15 [mM] utilizando como solvente agua destilada. De esta solución se deben realizar diluciones en tampón fosfato-acetonitrilo para la construcción de la curva de calibrado. A cada dilución se le midió absorbancia a 348 [nm], y estos valores de absorbancia se correlacionan linealmente con las concentraciones, obteniéndose una pendiente y un intercepto (Ver Anexo III.5). La pendiente de esta recta corresponde al coeficiente de extinción molar.

La hidrólisis espontánea se llevó a cabo adicionando a una celda espectrofotométrica 0.1 [mL] de agua destilada, 2.5 [mL] de tampón fosfato (concentración 25 [mM], y pH 7.0) y 0.02 [mL] de sustrato p-NPB (concentración final 0.4 [mM]), procurando agitar la celda, y que ésta se encontrara a una temperatura de 25 [°C]. Se siguió la absorbancia a 348 [nm] por 5 minutos, y se determinó la pendiente.

La determinación de la actividad de ROL se llevó cabo adicionando a una celda espectrofotométrica con agitación y acondicionada a 25 [°C], 0.3 [mL] de una solución o suspensión enzimática (muestra sobrenadante), 2.4 [mL] de tampón sódico (concentración 25 [mM], y pH 7.0) y 0.02 [mL] de sustrato p-NPB (concentración final 0.4 [mM]). Se siguió la absorbancia a 348 [nm] por 5 minutos y se determina la pendiente. La actividad enzimática se obtiene mediante la Ecuación 3.4.

$$Actividad = \frac{Pendiente\ Actividad\ de\ ROL - Pendiente\ Hidrólisis\ Espontánea}{\epsilon\ (coeficiente\ de\ extinción\ molar)} \cdot \frac{mL\ totales}{mL\ enzima} \quad (Ec. 3.4)$$

La actividad enzimática resultante se expresa en [UI/L], donde las unidades internacional (UI) de enzima se definen como la cantidad que cataliza la formación de 1 [μmol] de p-nitrofenol por minuto.

3.7.6. Determinación de Biomasa

La determinación de la concentración celular se llevó a cabo mediante dos métodos, el primero de ellos fue turbidimetría a 600 [nm], y el segundo, fue método de peso seco.

La turbidimetría a 600 [nm], correlaciona la densidad óptica con la concentración celular a partir de una curva de calibrado previamente realizada (Ver Anexo III.6). La construcción de la curva de calibrado, requiere de un pre-inóculo que se encuentre en fase exponencial. Para obtenerlo, se deben tomar 3 asadas de una placa de acondicionamiento e inocular matraces que contengan medio complejo (YPG-glicerol: 6 [g/L] de glicerol, 20 [g/L] de peptona, 10 [g/L] de extracto de levadura). Posteriormente, éstos se incuban a 200 [rpm] y 30 [°C], durante 15 horas. Una vez que se tenga este pre-inóculo, se debe tomar una muestra de 20 [mL], y centrifugarla a 3000 [rpm] por 4 minutos. El pellet resultante se resuspende en 10 [mL] de YNB estéril, y se incorpora a matraces con medio definido (1.7 [g/L] YNB, 5 [g/L] de sulfato de amonio, y una concentración de fuente de carbono, la cual dependerá de cada caso en particular). La incubación de este inóculo debe ser a 200 [rpm] y 30 [°C], y el tiempo para tener las células en fase de crecimiento, dependerá de la fuente de carbono utilizada (se estima que para glicerol son 15 horas y para metanol son 24 horas). Con los inóculos listos, se procedió a realizar peso seco por triplicado, de tal forma de conocer su concentración, y a tomar muestra para la preparación de diluciones a las que se les midió absorbancia a 600 [nm]. Finalmente, se puede establecer una correlación entre el valor de las absorbancias y la concentración, obteniéndose la curva de calibrado (Ver Anexo III.6).

La estimación de biomasa en base seca, o también llamado Método de Peso Seco se basa en determinar la cantidad de biomasa seca que hay en un volumen conocido, en base a una diferencia de masas. Se tomaron 20 [mL] de muestra de un cultivo, los cuales fueron centrifugados a 10000 [rpm] por 10 minutos (Modelo centrífuga: SL 14R Centrifuge Thermo Scientific). El pellet obtenido se lavó 2 veces con agua destilada, procurando resuspender el pellet en el mismo volumen de agua destilada, y centrifugar a la misma velocidad y tiempo. Concluidos los lavados, el pellet obtenido fue resuspendido en 5 [mL] de agua destilada, y esta suspensión fue secada en capachos (previamente tarados), por 24 horas a 105 [°C] en estufa. Finalmente, los capachos con el pellet seco fueron

pesados. La concentración de biomasa se determina dividiendo los gramos de biomasa seca, por el volumen de muestra utilizado, como sigue en la Ecuación 3.5.

$$Biomasa \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{Masa \ de \ capacho \ con \ biomasa \ (g) - Masa \ de \ capacho \ seco(g)}{Volumen \ de \ muestra \ utilizado \ (mL)} * \frac{1000(mL)}{1(L)} \quad (Ec. \ 3.5)$$

Procedimiento de medición:

En el caso de los cultivos continuos se aplica este método de peso seco tomando una muestra cuando el cultivo alcanzó el estado estacionario. Para medir la concentración de biomasa en el caso del cultivo por lote alimentado, se tomaron muestras, a las que se les midió absorbancia a 600 [nm], y este valor fue interpolado en una curva de calibrado previamente realizada.

3.7.7. Determinación de la Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el Método de tinción con azul de metileno. Es un método simple de coloración basado en la interacción del colorante con componentes citoplasmáticos de las levaduras, por lo cual las células muertas se tiñen y adquieren igual color al del colorante. Esto permite aumentar el contraste de la célula con el medio de suspensión para observarlas por microscopía óptica.

Procedimiento de medición

Se preparó una solución de azul de metileno al 0.01% diluida con agua destilada. Esta solución de tinción debe mezclarse con un mismo volumen de muestra de medio de cultivo previamente diluida (relación volumétrica 1:1). Esta mezcla debe agitarse en vórtex y dejarse reaccionar por 10 minutos. A continuación, ésta es cargada en un hemacitómetro Neubauer y dejada por 3-5 minutos para que se fije, y pueda ser observada en microscopio óptico en aumento 40x.

La dilución de la muestra depende de la concentración celular que se tenga y del número de células que se cuenten por cuadro del hemacitómetro. El porcentaje de viabilidad celular se calcula de acuerdo a la Ecuación 3.6. La cuantificación del porcentaje de viabilidad se llevó a cabo en la etapa de cultivos continuos, una vez que éstos habían alcanzado el estado estacionario.

$$\% Viabilidad = \frac{N^{\circ} \text{ Células Vivas}}{N^{\circ} \text{ Células Vivas} + N^{\circ} \text{ Células Muertas}} \quad (Ec. 3.6)$$

El número de células por volumen de cultivo (NCV) se calcula a partir de la Ecuación 3.7:

$$NCV \left[\frac{10^6 \text{ células}}{mL} \right] = \left(\frac{N^{\circ} \text{ células vivas} + N^{\circ} \text{ células muertas}}{N^{\circ} \text{ cuadros contados}} \right) \cdot \left(\frac{N^{\circ} \text{ cuadros de cámara}}{\text{Volumen de cámara}} \right) \cdot \left(\frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \right) \cdot FD \quad (Ec. 3.7)$$

Donde el volumen de cámara corresponde a 0.1 [mm³] y FD al factor de dilución de la muestra utilizada en el conteo.

3.7.8. Determinación de Ácidos Orgánicos

Para determinar la concentración de ácidos orgánicos, tales como el ácido málico, pirúvico, fumárico, cítrico, láctico, fórmico, succínico, y oxálico las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta presión, HPLC. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H de 300x7, 8 [mm]. El equipo corresponde a un cromatógrafo HPLC Perkin-Elmer modelo series 200 con un analizador GlycoChrom. La detección se realizó por detección UV.

Condiciones de operación:

- Fase móvil: H₂SO₄, 5 [mM]
- Temperatura horno: 35 [°C]
- Temperatura detector: 45 [°C]
- Flujo: 0.6 [mL/min]
- Volumen de muestra inyectada: 10 [μL] (filtrada)
- Tiempos de retención: ácido málico, 9.64 [min]; ácido pirúvico, 9.15 [min]; ácido fumárico, 15.18 [min]; ácido cítrico, 8.04 [min]; ácido láctico, 12.51 [min]; ácido fórmico, 13.85 [min]; ácido succínico, 11.85 [min] y ácido succínico, 6.56 [min].

Procedimiento medición:

Se preparó una solución estándar de cada uno de los ácidos, a partir de la cual se prepararon diluciones para la construcción de las curvas de calibrado. De estas curvas sólo se consideraron las de los ácidos reportados en los cromatogramas (Ver Anexo III.7). Todas las muestras fueron filtradas (filtro de 0.22 [μm] de diámetro de poro) antes de ingresarlas a los viales, y la fase móvil fue sonicada. A partir de la curva de calibrado se correlaciona el valor de área obtenida en el cromatograma con la concentración de cada ácido.

3.7.9. Determinación de CO₂

La medición de CO₂ en la fase gas de salida del reactor se realizó en línea, mediante la medición continua con un analizador de gas infrarrojo no dispersivo (NDIR por sus siglas en inglés), basado en un sistema de detección infrarrojo con el equipo “LI-820 CO₂ gas analyzer” bajo las especificaciones del mismo equipo. La recopilación de datos se realizó mediante el software 820-500, específico del equipo. Se debe calibrar el equipo con una mezcla de gases de nitrógeno y CO₂ (4200 ppmv, partes por millón volumen /volumen). La calibración de la pendiente se realizó con esta mezcla de gases (4100 ppm de CO₂), y el cero se calibró utilizando nitrógeno. La unidad en que el software entrega los datos se detalla en la Ecuación 3.8.

$$ppmv = \frac{\mu\text{mol de CO}_2}{\text{mol de aire}} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Se realizó la determinación de la velocidad de producción de CO₂ (VPC) en la etapa de cultivos continuos, una vez que éstos habían alcanzado estado estacionario. Esta velocidad fue determinada a partir de la Ecuación 3.9 (Quishpe, 2010).

$$VPC \left[\frac{mM}{h} \right] = \frac{[\Delta ppmv] \cdot vvm \cdot 60 \cdot 273,15}{\frac{1000 \cdot T \cdot V}{n}} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

Donde:

$[\Delta\text{ppmv}]$: $\text{ppmv CO}_2 \text{ SALIDA REACTOR} - \text{ppmv CO}_2 \text{ ENTRADA REACTOR}$

vvm: flujo de aire por volumen de reacción [1/min]

T: temperatura del cultivo [K]

V/n: volumen molar (valor constante igual a 22.4 [L/mol] en condiciones de 1 [atm] y 0 [°C])

CAPITULO 4.

RESULTADOS

4.1. Efecto de las variables tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación sobre Productividad Volumétrica y Específica de ROL

A continuación se presentan las gráficas de productividad volumétrica y específica obtenidas a través del método de superficie de respuesta descrito en la Sección 3.4, utilizando los datos del diseño expuestos en el Anexo II. Se muestra de qué forma se interrelacionan las variables tasa de dilución, la temperatura y la velocidad de agitación con ambas productividades de ROL. Las superficies se encuentran comprendidas en los siguientes rangos: tasa de dilución, 0.02-0.07 [h^{-1}]; temperatura, 20-30 [$^{\circ}\text{C}$], y velocidad de agitación, 300-700 [rpm]. Para la obtención de las gráficas tridimensionales de la Figura 4.1 y la Figura 4.2, se requirió que una de las tres variables independientes (tasa de dilución, temperatura, velocidad de agitación) fuese definida en un valor de los niveles del diseño.

4.2. Condición Operacional Óptima

En el proceso de la generación de las superficies de respuesta, se obtuvieron dos polinomios cuadráticos que modelan el comportamiento de los datos de productividad volumétrica y específica de ROL, rescatados desde el trabajo realizado previamente. Se buscó aquella solución que maximizara el valor de productividad volumétrica y específica de estos polinomios utilizando la herramienta de Solver de Microsoft Excel 2010. La razón por la cual se complementó la información obtenida desde las superficies de respuesta obtenidas, se debe a que en las gráficas no es posible visualizar el máximo global de la productividad en cada caso, ya que, por tratarse de gráficas tridimensionales, sólo se puede ver la influencia que dos variables operacionales ejercen sobre ésta, y no la de las tres en conjunto. El solución óptima obtenida señala que para maximizar la productividad volumétrica a 3.59 [UI/L h] y la específica a 2.39 [UI/g biomasa h], la tasa de dilución debía ser 0.07 [h^{-1}], la temperatura debía ser 30 [$^{\circ}\text{C}$], y la velocidad de agitación, debían ser 700 [rpm] (Ver Anexo IV).

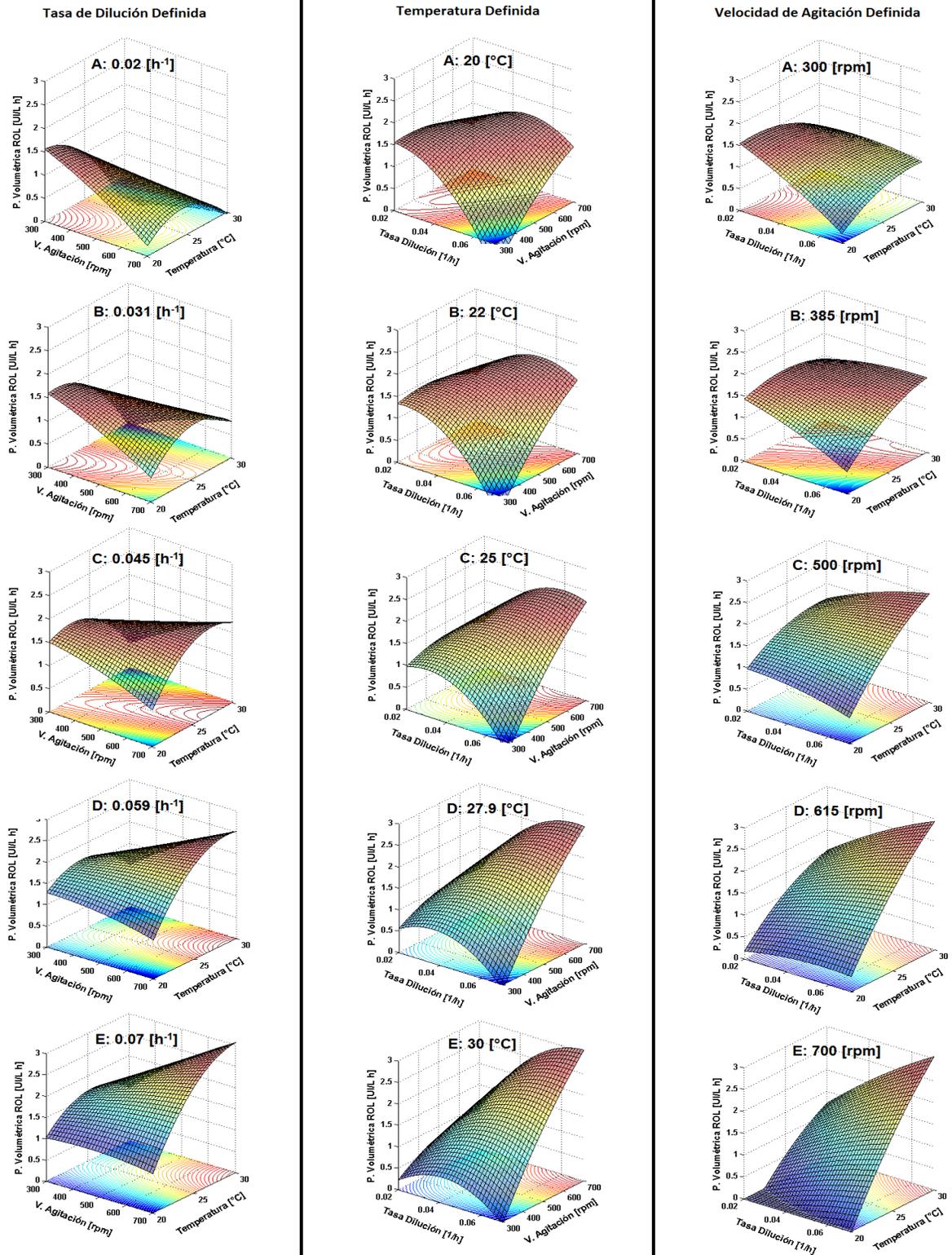


Figura 4.1: Productividad Volumétrica ROL en función de la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación

En las superficies de la primera columna de la Figura 4.1 se observó que para valores de tasa de dilución de $0.059 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (D) y $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (E), se aprecia un aumento en la productividad si se trabaja a temperaturas mayores a $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y velocidades de agitación mayores a 500 [rpm] . Cabe destacar que para una tasa de $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (C), la superficie presenta una zona importante donde la productividad se hace independiente del valor de la velocidad de agitación y temperatura. Como tendencia general de las 5 superficies de la columna, se aprecia que las menores productividades se obtienen al trabajar a bajas velocidades de agitación (menores a 500 [rpm]) y altas temperaturas (mayores a $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$), así como en el caso contrario, altas velocidades de agitación y bajas temperaturas. Esto queda en evidencia porque las superficies tienden a tener una caída en dos de sus extremos cuando se trabaja a las condiciones mencionadas anteriormente.

En las superficies de la segunda columna de la Figura 4.1 se observó que la superficie A ($20 \text{ [}^\circ\text{C]}$), presenta una zona importante en la que la productividad se hace independiente del valor de tasa de dilución y velocidad de agitación al que se trabaje. Desde la superficie B hasta la E se aprecia que la tendencia es que la productividad aumenta siempre y cuando se trabaje a tasas de dilución mayores de $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ y velocidades de agitación mayores a 500 [rpm] . La situación que se repite desde la superficie A hasta la E en esta columna, es que éstas decaen drásticamente hasta llegar a valores de cero cuando se trabaja a altas tasas de dilución (mayores a $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$) y bajas velocidades de agitación (menores a 500 [rpm]). La superficies C, D y E también muestran una tendencia a decaer al trabajar a tasa de dilución cercanas a $0.02 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ y velocidades de agitación menores a 500 [rpm] .

En las superficies de la tercera columna de la Figura 4.1 se observó que la superficie B (385 [rpm]) muestra que en gran parte de ésta la productividad se hace independiente de los valores de tasa de dilución y temperatura. A partir de la superficie C en adelante, se comienza a apreciar que conforme se trabaje a valores de tasa de dilución sobre $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ y temperaturas mayores a $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$, la productividad comienza a aumentar. De hecho, cabe destacar que la superficie E (700 [rpm]) se inclina de tal manera, que para cualquier valor de tasa de dilución, a bajas temperaturas (cercanas a los $20 \text{ [}^\circ\text{C]}$), la productividad cae a cero. Tanto en la superficie D como en la E, la productividad es cercana a cero o directamente cero, cuando la temperatura es cercana a $20 \text{ [}^\circ\text{C]}$, para cualquier valor de tasa de dilución. Como resultado general se puede apreciar que la mayor productividad se obtiene a una tasa de dilución de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, temperatura de $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y velocidad de agitación de 700 [rpm] .

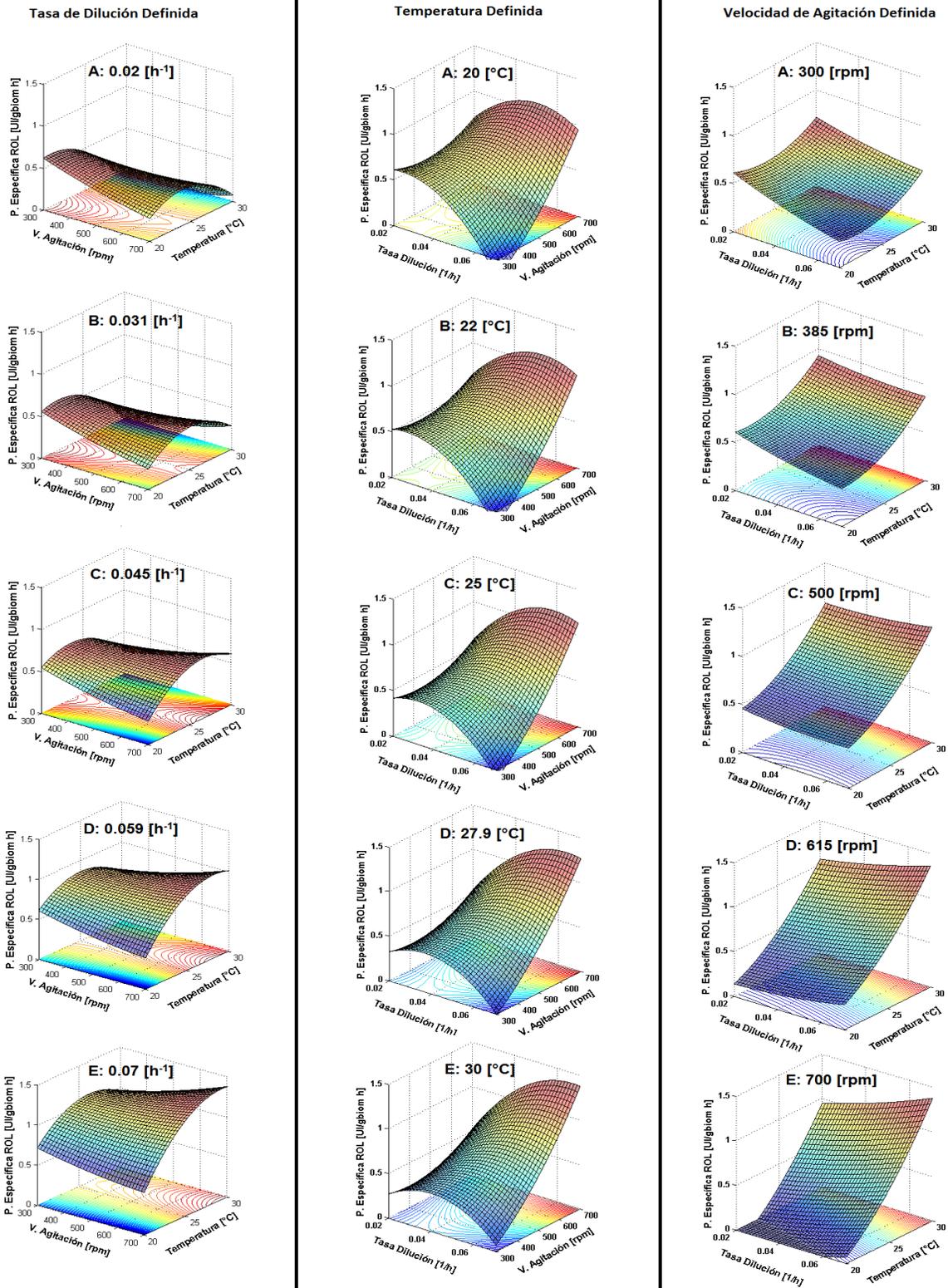


Figura 4.2: Productividad Específica ROL en función de la tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación

En las superficies de la primera columna de la Figura 4.2 se observó que para las superficie A ($0.02 \text{ [h}^{-1}\text{]})$ la productividad decae para temperaturas cercanas a $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ independiente del valor de la velocidad de agitación al que se trabaje. Sin embargo, esta situación comienza a revertirse desde la superficie B en adelante al trabajar a la condición que se mencionó anteriormente. De esta forma, cuando se trabaja a una tasa de dilución de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, temperaturas cercanas a $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y velocidades de agitación cercanas a 700 [rpm] , se obtiene la mayor productividad. En el caso de superficies C se aprecia una zona significativa en la que la productividad de hace independiente de a velocidad de agitación y temperatura. Una tendencia que tienen en común estas cinco superficies es que muestran una caída cuando se trabaja a temperaturas cercanas a $20 \text{ [}^\circ\text{C]}$, independiente de la velocidad de agitación.

En las superficies de la segunda columna de la Figura 4.2 se observó que todas siguen una misma tendencia que es que independiente del valor de temperatura al que se trabaje, todas presentan un aumento de la productividad cuando se trabaja a altas velocidades de agitación (mayores a 500 [rpm]) y a altas tasas de dilución (mayores a $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]})$. Por el contrario, la productividad decae en dos situaciones particularmente, la primera de ellas es cuando se trabaja a tasas de dilución cercanas a $0.02 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ y velocidades de agitación menores a 500 [rpm] ; y la segunda ocurre cuando se trabaja a altas tasas de dilución (mayores de $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]})$ y bajas velocidades de agitación (menores a 500 [rpm]).

En las superficies de la tercera columna de la Figura 4.2 se observó que a medida que se aumenta la velocidad de agitación yendo desde la superficie A hasta la E, la productividad se maximiza siempre y cuando se trabaje a altas temperaturas (mayores de $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$) y altas tasas de dilución (mayores a $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]})$. Cabe destacar que el máximo de la superficie A se presenta en caso de trabajar a $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y la menor tasa de dilución, $0.02 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. Desde la superficie C en adelante la productividad disminuye llegando hasta cero en el caso de las 700 [rpm] , cuando se trabaja a bajas temperaturas (menores a $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$), independiente de la tasa de dilución.

Como resultado general, la mayor productividad se obtiene para una tasa de dilución de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, temperatura de $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y 700 [rpm] , que corresponden a los límites del diseño.

4.3. Cultivos Continuos

En esta etapa de la investigación se llevaron a cabo 4 cultivos continuos (quimiostato simple) con el fin de evaluar aquellas condiciones operacionales que maximizan la productividad volumétrica y específica de ROL. Los cultivos se desarrollaron bajo el mismo esquema de trabajo que se utilizó en los experimentos hechos en el diseño experimental previo (fuente de carbono (15 [g/L]), proporción de metanol/glicerol en el bidón de alimentación equivalente a 70%-30%, tasa de aireación de 1.2 [vvm], pH de 5.5). Al trabajar bajo este mismo esquema permite comparar los resultados obtenidos con los datos de los que ya se dispone. Las condiciones de operación utilizadas en cada una de las experiencias se exponen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Condiciones de Operación evaluadas en Cultivos Continuos

N° Cultivo	Condiciones		
	D [h ⁻¹]	T [°C]	V. Agitación [rpm]
1.1	0.07	25	500
1.2	0.07	25	500
2	0.07	30	700
3	0.045	30	700

El cultivo 1.2 corresponde a un duplicado del cultivo 1.1, y se hizo para evaluar el grado de variación de los resultados obtenidos entre réplicas (Ver Tabla 4.3). Al comparar los parámetros cuantificados se vio que entre réplicas (cultivo 1.1 y 1.2) no había una variación mayor al 10%. Por lo tanto, se considera que estos experimentos son reproducibles, y se pueden omitir los duplicados de los cultivos restantes (cultivo 2 y 3). Esto confirmó lo que se había reportado en las experiencias previas con cultivos de *P. pastoris*, en las que se omitieron los duplicados en la mayoría de los casos (Berríos & Flores, 2013).

Las tasas de dilución, temperaturas y velocidades de agitación evaluadas en esta etapa, corresponden a valores comprendidos dentro de los rangos del diseño previo (Ver Tabla 3.5). Se definió que se

trabajaría en los siguientes intervalos para las variables operacionales por las razones que se presentan a continuación:

- Una temperatura menor a 30 [°C], dado que ésta es la óptima de crecimiento y producción de proteína, y sobre 32 [°C] la expresión de proteínas se detiene y el crecimiento decae rápidamente (Cos *et al.*, 2006).
- Una tasa de dilución menor o igual a 0.07 [h⁻¹] ya que al llevar a cabo el cultivo 1 y 2 se observó que la concentración de metanol en el reactor alcanzaba entre 3-4 [g/L], la cual era cercana a la concentración límite inhibitoria del crecimiento que se ha reportado (5 [g/L]). Además, se tomaron en cuenta los resultados reportados en algunas investigaciones en los que se trabajó a una tasa de dilución menor 0.07 [h⁻¹]; por ejemplo, D'Anjou & Daugulis observaron que la mayor productividad volumétrica de la proteína recombinante se obtenía a una tasa de dilución de 0.01 [h⁻¹] y que el mayor consumo específico de metanol se presentaba entre 0.03 y 0.07 [h⁻¹] (D'Anjou & Daugulis, 2001). Nakano *et al.* (2006), observaron que en un cultivo continuo con alimentación constante de un medio que contiene metanol, la productividad volumétrica de la proteína α -amilasa alcanza su máximo valor a 0.05 [h⁻¹]. Además, muestra que en un cultivo continuo en el que se suministra de forma constante un medio sin metanol, y se incorpora este último en base a una estrategia de oxígeno disuelto, la productividad volumétrica disminuye con la tasa de dilución, alcanzando un máximo a 0.013 [h⁻¹] (Nakano *et al.*, 2006).
- A una velocidad de agitación menor a 700 [rpm] dado que se presentaron dificultades técnicas al utilizar velocidades sobre este valor. Estas dificultades se relacionan con la generación de cantidades considerables de espuma, y el espacio de cabeza que ésta ocupa.

En base a estos antecedentes, se plantearon las tres condiciones operacionales con las que se trabajó, y a continuación se exponen las razones por las cuales se escogieron de esa forma.

La primera condición evaluada en el cultivo 1.1 y 1.2 corresponde a aquella que reporta la mayor productividad volumétrica (2.66 [UI/L h]) y específica (1.51 [UI/g biomasa h]) de ROL dentro del diseño experimental planteado en la investigación previa. Existe una leve diferencia entre estos valores, y los que se obtienen al calcular la productividad volumétrica con los modelos cuadráticos obtenidos desde las superficies de respuesta (2.48 [UI/L h]) y específica (1.72 [UI/g biomasa h]). Por ello, se quiso validar esta condición y los resultados se presentan en la Tabla 4.4.

En el caso de la condición evaluada en el cultivo 2 se quiso probar qué sucedía al aumentar tanto la temperatura como la velocidad de agitación, que según los antecedentes vistos en la revisión bibliográfica, propiciarían el aumento de la productividad. Adicionalmente, esta condición corresponde a la solución de los modelos cuadráticos (Ver Anexo IV), y experimentalmente es la que debería maximizar ambas productividades.

La condición evaluada en el cultivo 3 no estaba contemplada en el diseño previo. En este caso se quiso saber cómo respondía el sistema al operar a una tasa de dilución menor a $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. Se esperaba que se favoreciera el procesamiento de mayores cantidades de sustrato para la formación de mayores constituyentes celulares, dado que se estaba trabajando a una velocidad específica de crecimiento menor y constante. Se trabajó a una tasa de $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ para que hubiera una diferencia notoria con la que se había utilizado anteriormente ($0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$).

A continuación se muestra la composición del medio alimentado durante el desarrollo de los cultivos, y la concentración de cada uno de los componentes de éste.

Tabla 4.2: Composición del Medio de Cultivo Alimentado

Componente	Cantidad [g/L]
YNB	1.7
Amonio	5
Metanol	10.5
Glicerol	4.5

Tabla 4.3: Parámetros Cuantificados en Estado Estacionario

Parámetros Cuantificados	N° Cultivo: 1.1	N° Cultivo: 1.2	N° Cultivo: 2	N° Cultivo: 3
Peso seco [g/L]	2.620 ± 0.009	2.613 ± 0.008	3.207 ± 0.013	3.345 ± 0.085
Actividad [UI/mL]	0.021 ± 0.011	0.023 ± 0.010	0.030 ± 0.006	0.033 ± 0.016
Proteína Total [g/L]	0.558 ± 0.018	0.500 ± 0.024	0.232 ± 0.069	0.271 ± 0.053
Metanol [g/L]	2.297 ± 0.09	3.108 ± 0.043	4.122 ± 0.216	3.772 ± 0.186
Glicerol [g/L]	ND	ND	ND	0.199 ± 0.030
Amonio [g/L]	2.920 ± 0.019	2.696 ± 0.163	2.612 ± 0.015	1.812 ± 0.110
% Viabilidad	78.31 ± 3.42	88.73 ± 4.35	92.67 ± 1.91	87.00 ± 4.24

*ND: no detectado

La mayor actividad de ROL se obtuvo con la tercera condición (Ver Tabla 4.3), sin embargo, ésta no es la que presenta la mayor productividad volumétrica, ni específica. Esto se debe a que en el caso de la volumétrica, esta actividad se relaciona con la menor tasa de dilución evaluada ($0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$) mediante un producto; y en el caso de la específica, esta actividad se relaciona con la mayor cantidad de biomasa obtenida (3.345 [g/L]) mediante un cociente.

En las condiciones 1 y 2 quedó en evidencia que el glicerol no era detectado en estado estacionario, y en el caso de la tercera condición, la concentración de este sustrato fue mínima en comparación a la concentración en la alimentación (Ver Tabla 4.2 y Tabla 4.3). Se observó que hubo consumo de metanol y que éste se mantuvo bajo la concentración inhibitoria del crecimiento que se ha reportado al alcanzar el estado estacionario, bajo las tres condiciones evaluadas (Ver Tabla 4.3). Los ácidos orgánicos reportados por HPLC corresponden a ácido oxálico, pirúvico, fumárico, cítrico y fórmico. Sin embargo, los peaks corresponden a cantidades despreciables que no son comparables con el resto de parámetros cuantificados. Por esta razón, no se muestran en tabla, ya que en todos los cultivos representan menos de un 0.5% del carbono total consumido aportado por los sustratos. Por otra parte, en todas las condiciones se pudo verificar que el porcentaje de viabilidad daba cuenta de células que se encontraban vivas y activas, ya que generaron proteína y reportaron actividad de ROL (Ver Tabla 4.3).

A partir de los datos cuantificados, se calcularon una serie de parámetros que se presentan en las Tablas 4.4, 4.5 y 4.6; el detalle del cálculo se encuentra disponible en el Anexo V. Como puede apreciarse en la Tabla 4.4, al comparar los valores de productividad se puede notar que la mayor productividad volumétrica y específica de ROL resultaron al evaluar la condición de tasa de dilución $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, temperatura $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y velocidad de agitación 700 [rpm] . Bajo esta condición, se obtuvo una productividad volumétrica de ROL de 2.100 [UI/L h] , una productividad específica de $0.655 \text{ [UI/g biomasa h]}$, uno de los mayores rendimientos de la fuente total de carbono en biomasa (Ver Tabla 4.4) y el mayor porcentaje de viabilidad celular (Ver Tabla 4.3). Este resultado se condice con la solución óptima encontrada con los modelos cuadráticos, y con la tendencia general a la que apuntaron las superficies de respuesta. Los menores valores de productividad los registra la tercera condición, con una tasa de dilución de $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, temperatura de $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y velocidad de agitación de 700 [rpm] .

Tabla 4.4: Productividades de ROL y Rendimiento de Sustratos en Biomasa en Estado Estacionario

Parámetros Calculados	N° Cultivo: 1.1	N° Cultivo: 1.2	N° Cultivo: 2	N° Cultivo: 3
Productividad Volumétrica ROL [UI/L h]	1.47	1.61	2.1	1.485
Productividad Específica ROL [UI/g biomasa h]	0.561	0.616	0.655	0.444
Rendimiento Global [g biomasa/g fuente C]	0.206	0.220	0.295	0.303

Tabla 4.5: Producción de CO_2 en Estado Estacionario

Parámetros Calculados	N° Cultivo: 1.1	N° Cultivo: 1.2	N° Cultivo: 2	N° Cultivo: 3
Producción Volumétrica CO_2 [g CO_2 /L h]	0.180	0.159	0.229	0.240
Producción Específica de CO_2 [g CO_2 / g biomasa h]	0.069	0.061	0.072	0.072
Velocidad Producción de CO_2 [mM/h]	4.087	3.604	5.212	5.452

Tabla 4.6: Consumos de Glicerol y Metanol en Estado Estacionario

Parámetros Calculados	N° Cultivo: 1.1	N° Cultivo: 1.2	N° Cultivo: 2	N° Cultivo: 3
Consumo Metanol [g MetOH/L h]	0.574	0.517	0.446	0.303
Consumo Específico Metanol [g MetOH/g biomasa h]	0.219	0.198	0.139	0.091
Consumo Glicerol [g glicerol/L h]	0.315	0.315	0.315	0.194
Consumo Específico Glicerol [g glicerol/g biomasa h]	0.12	0.121	0.098	0.058

Analizando la Tabla 4.6, cabe destacar que el cultivo hecho bajo la tercera condición, fue el que tuvo los menores consumos de metanol y de glicerol, tanto volumétrico como específico. Al contrario, el mayor consumo volumétrico y específico de metanol y glicerol se observó en el cultivo hecho bajo la primera condición. Sin embargo, la primera condición no es la que reportó la mayor productividad específica y volumétrica de ROL.

Con la cuantificación del metanol y glicerol en el medio, la biomasa y la velocidad de producción de CO₂, una vez que los cultivos habían alcanzado estado estacionario, se calculó qué porcentajes del consumo de sustratos (en términos de carbono) fue destinado a la formación de biomasa y CO₂, y se presentan en la Tabla 4.7 (Ver Anexo VI). Los resultados obtenidos muestran que al evaluar la tercera condición se obtuvo el mayor aporte de los sustratos tanto para la formación de biomasa (38.16%) como para la de CO₂ (34.47%).

Tabla 4.7: Porcentaje de carbono del sustrato consumido destinado a la formación de biomasa y CO₂

N° de Cultivo	% de Carbono del Sustrato Consumido	
	Biomasa	CO₂
1.1	26.05	14.39
1.2	27.51	13.49
2	36.99	21.39
3	38.16	34.47

4.4. Cultivos por Lote Alimentado con Régimen de Alimentación Exponencial

Desde la etapa de los cultivos continuos se determinó que la condición que maximizaba tanto la productividad volumétrica como específica de ROL, era trabajar a una tasa de dilución de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, una temperatura de $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y una velocidad de agitación de 700 [rpm] . Por esta razón, se quiso evaluar esta condición bajo esta nueva modalidad de cultivo, y a su vez, determinar el comportamiento de la productividad de ROL.

En el caso de cultivos continuos, al establecer una tasa de dilución constante, se está manipulando la velocidad específica de crecimiento para que ésta sea constante. Como se vio en la Sección 2.6.5 de la revisión bibliográfica, la estrategia para mantener esta velocidad específica de crecimiento controlada es diseñar un régimen de alimentación exponencial.

Se realizaron dos cultivos por lote alimentado con este tipo de alimentación para controlar la velocidad específica de crecimiento en un valor de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. Para el diseño de la alimentación se requirieron de parámetros tales como: máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{MÁX}$), rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$), concentración de sustrato para el inicio de la alimentación, los cuales se determinaron de experiencias previas de cultivo por lote con glicerol y se muestran en la Sección 4.4.1. Se definió que el sustrato limitante para este diseño sería el glicerol en base a lo observado en los cultivos continuos y en experiencias anteriores de este proyecto, donde se vio que había un mayor consumo de glicerol que metanol a lo largo de la fermentación.

4.4.1. Cultivo por Lote

Para la determinación de los parámetros necesarios para el diseño de la alimentación del cultivo por lote alimentado (máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{MÁX}$), rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$), concentración de sustrato para el inicio de la alimentación (16 [h] de cultivo por lote), se realizó un cultivo por lote con glicerol hasta alcanzar la fase estacionaria. Se cuantificó concentración de biomasa y glicerol (Ver Figura 4.3, A) y, concentración de proteína total y actividad

de ROL (Ver Figura 4.3, B) a lo largo de las 26 horas de la fermentación. El medio de cultivo utilizado en este cultivo por lote fue el mismo que se utilizó para la etapa previa de lote de los cultivos continuos, y se describe en la Sección 3.6.1.

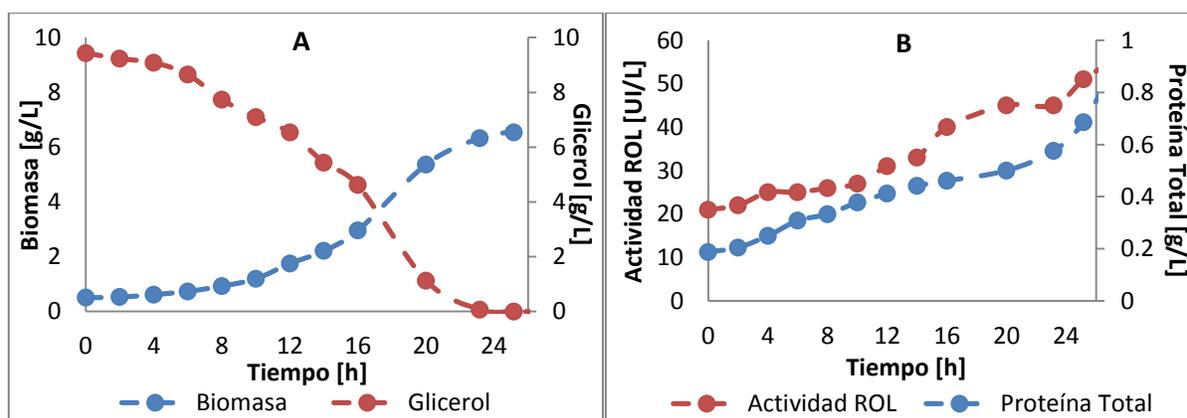


Figura 4.3: Cultivo por Lote. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato (A). Producción de proteína total y variación de actividad en el tiempo (B)

Por otra parte, se corroboró la reproducibilidad de esta experiencia, complementando los datos cuantificados del cultivo por lote mostrado en la Figura 4.3, con mediciones hechas durante la etapa lote del primer cultivo por lote alimentado. De esta forma, se tuvieron dos mediciones de concentración de biomasa, glicerol, proteína total y actividad de ROL para 4 puntos de la fermentación: a las 0 [h], 12 [h], 14 [h] y 16 [h]. Con ambas mediciones para estos 4 puntos, se calculó un promedio y se muestra en la Tabla 4.8. En general, se pudo apreciar que entre ambas mediciones de estos 4 puntos de la fermentación hay una variación promedio menor al 15%.

Tabla 4.8: Valores de Biomasa, Glicerol, Actividad y Proteína Promedio en 4 Puntos del Cultivo

Valor Promedio	Tiempo del Cultivo			
	0 [h]	12 [h]	14 [h]	16 [h]
Biomasa [g/L]	0.496±0.009	1.789±0.029	2.284±0.052	2.905±0.036
Glicerol [g/L]	9.284±0.106	6.078±0.321	4.496±0.667	3.617±0.706
Actividad [UI/L]	24±2	34±2	37.5±3	36.5±2
Proteína [g/L]	0.200±0.016	0.424±0.016	0.407±0.049	0.449±0.017

Para el cálculo del rendimiento de sustrato en biomasa del cultivo mostrado en la Figura 4.3 se utilizaron los datos presentados en la Tabla 4.9, utilizando la Ecuación 4.1.

Tabla 4.9: Concentración de Biomasa y Glicerol en Cultivo por Lote

Concentración [g/L]	Tiempo del Cultivo		
	0 [h]	16 [h]	25 [h]
Biomasa	0.503	2.956	6.539
Glicerol	9.434	4.616	ND

*ND: no detectado

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\text{Concentración Biomasa}(t=25 [h]) - \text{Concentración Biomasa}(t=0 [h])}{\text{Concentración Glicerol}(t=0 [h]) - \text{Concentración Glicerol}(t=25 [h])} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{6.539 - 0.503}{9.434 - 0} = 0.63 \cong 0.6 \left(\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ glicerol}} \right)$$

Al linealizar la Ecuación 4.2 que describe la cinética de un cultivo por lote se obtiene la Ecuación 4.3, desde la cual se determina el valor de μ .

$$X_f = X_0 * \exp(\mu t) \quad (\text{Ec. 4.2})$$

$$\ln\left(\frac{X_f}{X_0}\right) = \mu * t \quad (\text{Ec. 4.3})$$

En la Ecuación 4.2, X_f representa la concentración de biomasa en el tiempo, X_0 representa la concentración de biomasa inicial, μ representa la máxima velocidad específica de crecimiento y t , el tiempo del cultivo. Agregando una línea de tendencia lineal a ciertos puntos de la Figura 4.4, se determinó que $\mu_{\text{máx}}$ equivalía a $0.14 [h^{-1}]$, y corresponde a la pendiente de la Ecuación 4.4.

$$\ln\left[\frac{X_f}{X_0}\right] = 0.1439 * \text{tiempo} - 0.5226, \quad R^2 = 0.9978 \quad (\text{Ec. 4.4})$$

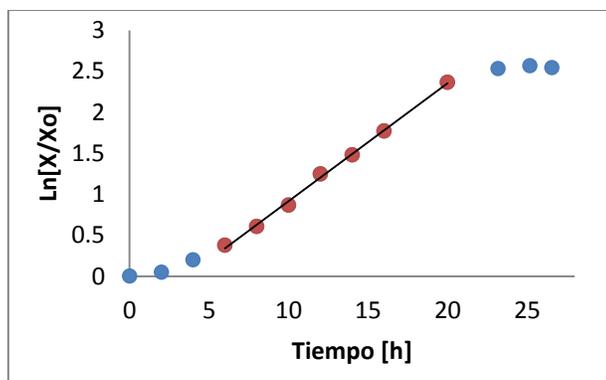


Figura 4.4: Linealización de la cinética de crecimiento en cultivo por lote

4.4.2. Diseño de la Alimentación Exponencial de los Cultivos por Lote Alimentado

Basado en los datos obtenidos del primer cultivo por lote que se hizo (Ver Figura 4.3), se definió que la alimentación iniciaría a las 16 [h] de la etapa de cultivo por lote, momento en el que la concentración de glicerol es 4.62 [g/L] y la concentración de biomasa es 2.9 [g/L] (células en fase de crecimiento). Además, se consideró que el rendimiento permanecería constante en 0.6 [g biomasa/g sustrato], y que la máxima velocidad específica de crecimiento sería 0.14 [h⁻¹]. Se planificó alcanzar casi el doble de la concentración de biomasa obtenida al término del cultivo por lote, equivalente a 11 [g/L], y que la velocidad específica de crecimiento sería controlada en un valor de 0.07 [h⁻¹].

Se consideró que la alimentación, al igual que los cultivos continuos, estaría constituida de metanol y glicerol, y que éste último correspondería al sustrato limitante dado que la constante de saturación del glicerol ($k_s=0.178$ [g/L], (Ghosalkar *et al.*, 2008)) es menor que la del metanol ($k_s=0.223$ [g/L], (Cos *et al.*, 2006)), por ende este microorganismo tendría mayor afinidad por este sustrato. Por ende, se tuvo que calcular la concentración de glicerol que debía haber en el bidón de alimentación ($S_{F \text{ glicerol}}$) de acuerdo a la Ecuación 4.5, la cual resultó en 36 [g/L] de glicerol (Ver Anexo VII). El cultivo por lote alimentado inició con un volumen de 1 [L] y finalizó con volumen de 1.5 [L]. La bomba trabajó a un caudal de 1.75 [mL/min].

$$S_{F\text{ glicerol}} \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{\frac{(C_{Biom} \left[\frac{g}{L} \right] * V_{final} [L]) - (C_{Biom(t=16\text{ h})} \left[\frac{g}{L} \right] * V_{(t=16\text{ h})} [L])}{Y_{X/Glicerol} \left(\frac{g_{biom}}{g_{glicerol}} \right)} - (C_{glic(t=16\text{ h})} \left[\frac{g}{L} \right] * V_{(t=16\text{ h})} [L])}{\text{Volumen de la Alimentación [L]}} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Donde:

C_{Biom} : concentración de biomasa final, [g/L]

$C_{Biom(t=16\text{ h})}$: concentración de biomasa al inicio de la alimentación, [g/L]

V_{final} : volumen final en el reactor una vez que termina la alimentación, [L]

$V_{(t=16\text{ h})}$: volumen en el reactor al inicio de la alimentación, que corresponde al volumen con el que se trabaja en la etapa de lote, [L]

$C_{glic(t=16\text{ h})}$: concentración de glicerol al inicio de la alimentación, [g/L]

$Y_{X/Glicerol}$: rendimiento de glicerol en biomasa, [g biomasa/g glicerol]

Para definir la concentración de metanol en la alimentación, fue necesario establecer una proporción entre este sustrato y el glicerol. Inicialmente, se consideró trabajar con una proporción de 70% metanol-30% glicerol; sin embargo, el metanol puede llegar a ser un sustrato inhibitorio si sobrepasa los 5 [g/L] en el medio (Zhang *et al.*, 2000). Por esta razón, se tuvo que simular qué cantidad de metanol había en el reactor a cada momento de la fermentación desde que inició la alimentación, y se encuentra detallado en el Anexo VIII. El resultado de esta simulación mostró que, para evitar una acumulación significativa de metanol durante toda la fermentación, la proporción adecuada es 60% metanol-40% glicerol en el caso del primer cultivo. Sin embargo, dado que el metanol pudiese acumularse con esa alternativa, se planteó realizar un segundo cultivo con otra proporción metanol-glicerol, donde el glicerol fuese un 60% y el metanol un 40%. Así, se pudieron comparar ambos cultivos ante este cambio de proporción.

El diseño de esta alimentación exponencial, primero que todo, estableció un intervalo de tiempo de 2 horas para el encendido de la bomba. Se calculó un flujo inicial (F_0) que resultó 0.011 [L/h] para ambos cultivos, un flujo teórico, y un volumen teórico para cada instante de tiempo utilizando las ecuaciones de la Sección 2.6.5 (apartado B). Con estos volúmenes teóricos e intervalos de tiempo de 2 horas, se calcularon flujos experimentales para determinar si éstos coincidían con los flujos teóricos, y así, corroborar que el intervalo de tiempo dado era acertado (Barraza & Guerrero, 2015). En la

Figura 4.5 se muestra la comparación entre el flujo teórico y experimental obtenido para el primer y segundo cultivo.

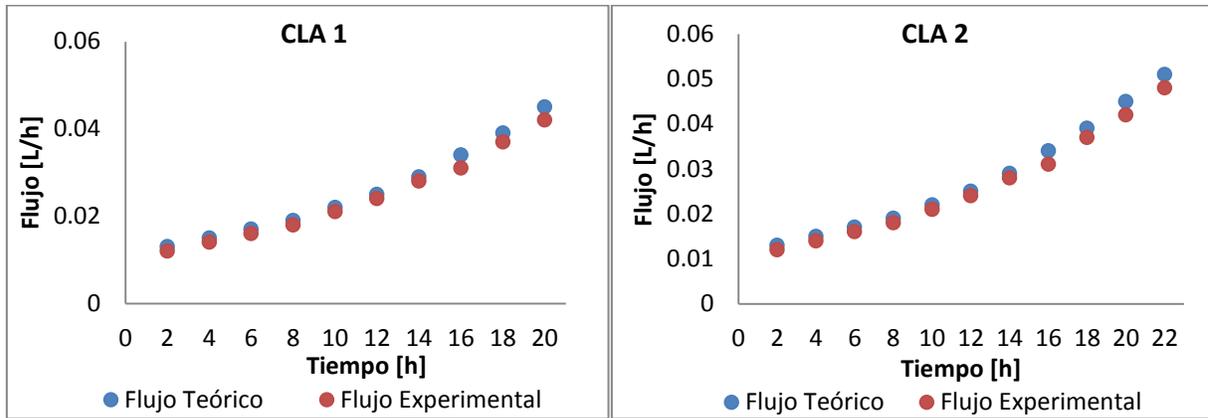


Figura 4.5: Comparación del flujo teórico y experimental en ambos cultivos por lote alimentado

Con el valor de los flujos experimentales se procede a calcular el tiempo de funcionamiento de la bomba para cada instante en que ésta se encendiera. El cálculo se muestra en la Ecuación 4.6.

$$Tiempo\ funcionamiento\ bomba\ (t) = \frac{Flujo\ experimental\ (t) \left[\frac{L}{h} \right] * 2[h] * \frac{1000 [mL]}{1[L]}}{1.75 \left[\frac{mL}{minuto} \right]} \quad (Ec. 4.6)$$

Conociendo estos tiempos de funcionamiento, y los flujos experimentales para cada instante de tiempo se pudo llevar a cabo esta simulación de alimentación exponencial a través de una función escalonada, en la que se van aumentando los flujos a medida que avanza el tiempo, por ende, se aportan mayores volúmenes cada vez (Ver Anexo IX). El objetivo de plantear esta función escalonada es que al ajustar una línea de tendencia exponencial a esta función, se obtenga un coeficiente de correlación aceptable. En la Figura 4.6 se presentan las funciones escalonadas obtenidas para ambos cultivos, junto a las líneas de tendencia exponencial que se ajustan a éstas.

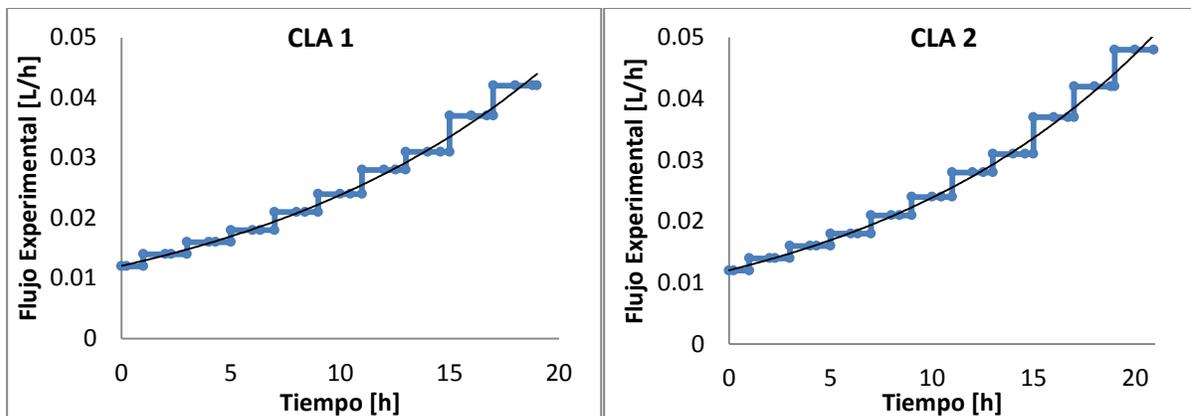


Figura 4.6: Simulación de Alimentación Exponencial en ambos cultivos por lote alimentado

La función de alimentación exponencial viene dado por la Ecuación 4.7, en donde $F(t)$ representa el flujo a cada instante de tiempo [L/h], F_0 representa el flujo inicial [L/h], μ representa la velocidad específica de crecimiento [h^{-1}], que en este caso debiera ser $0.07 [h^{-1}]$, y t el tiempo del cultivo [h].

$$F(t) = F_0 * \exp(\mu * t) \quad (Ec. 4.7)$$

Las ecuaciones que representan las líneas de tendencia exponencial ajustadas a las funciones escalonadas, se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} CLA 1: \quad y &= 0.0121 * \exp^{0.0681x}; \quad R^2 = 0.9826 \\ CLA 2: \quad y &= 0.012 * \exp^{0.0684x}; \quad R^2 = 0.9849 \end{aligned}$$

En ambas se puede apreciar que el flujo inicial casi coincide con el que se calculó anteriormente ($0.011 [L/h]$), y así mismo ocurre en el caso de la velocidad específica de crecimiento. Por lo tanto, con todos los cálculos y simulaciones realizadas, se asumió que el diseño de alimentación exponencial era adecuado para implementarlo en la práctica.

4.4.3. Cinéticas de Crecimiento y Consumo de Sustratos en Cultivos por Lote Alimentado

Alimentado

Las cinéticas de la Figura 4.7 consideran que el tiempo cero del cultivo por lote alimentado corresponde al momento en el que comienza la alimentación, cuando ya han transcurrido 16 [h] en fase de lote. En la Figura 4.7 se muestra la cinética de crecimiento, consumo de metanol y consumo de glicerol para ambos cultivos por lote alimentado.

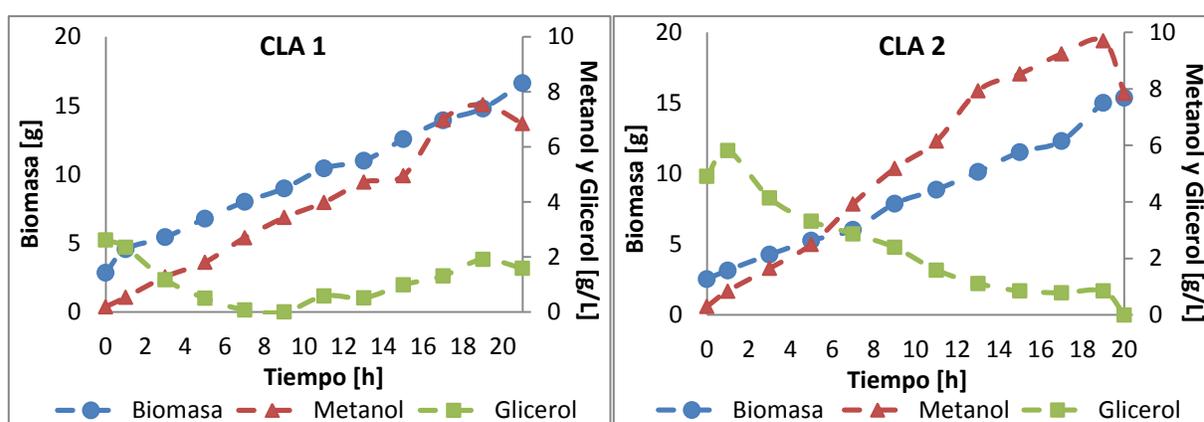


Figura 4.7: Cinética de crecimiento y consumo de sustratos en ambos cultivos por lote alimentado

Al diseñar la alimentación se definió que la concentración de biomasa esperada para el término del cultivo fueran 11 [g/L]; lo cual se podría considerar como un objetivo cumplido, ya que en el caso del CLA 1 se obtuvo 10.39 [g/L], y en el caso del CLA 2 se obtuvo 11.08 [g/L]. Con respecto al consumo de metanol, se puede apreciar que en ambos casos hubo una acumulación de este sustrato ya que sobrepasó el máximo reportado (5 [g/L]). El primer cultivo alcanzó un máximo de metanol en el medio de 9.7 [g/L], y en caso del segundo, se alcanzó un máximo de 7.53 [g/L], lo cual muestra que haber disminuido la proporción de metanol desde un 60% a un 40% impidió que hubiera una acumulación mayor.

Por otra parte, cabe mencionar que, para la primera simulación de acumulación de metanol se utilizó como dato el mínimo consumo específico de este sustrato obtenido en los cultivos continuos, el cual fue de 0.14 [g metanol/g biomasa h]. Sin embargo, una vez que se obtuvo la cinética de consumo de

metanol del CLA 1, se calcularon los consumos específicos de metanol punto a punto, y se utilizó el mínimo de ellos (0.02 [g metanol/g biomasa h]) para la simulación de acumulación del CLA 2 (Ver Anexo VIII). En el caso del CLA 2, se utilizó este dato porque corresponde a un consumo real en la modalidad de cultivo por lote alimentado, y se eligió el mínimo porque se quiso simular un escenario en el que la levadura consumiera lo más lentamente posible. Con respecto al consumo de glicerol, en el caso del CLA 1 se puede apreciar que va disminuyendo su concentración conforme va aumentando la biomasa. En el caso del CLA 2, el glicerol disminuye hasta las 10 [h] del cultivo, luego comienza a notarse una acumulación hasta las 20 [h], y finalmente disminuye hasta 1.58 [g/L].

La Ecuación 4.8 describe cómo varía la concentración de biomasa en el tiempo, y para conocer el valor de la velocidad específica de crecimiento se tuvo que linealizar esta ecuación, obteniendo la Ecuación 4.9.

$$X(t) * V(t) = X_0 * V_0 * \exp(\mu t) \quad (\text{Ec. 4.8})$$

$$\text{Ln} \left(\frac{X(t) * V(t)}{X_0 * V_0} \right) = \mu * t \quad (\text{Ec. 4.9})$$

En la Figura 4.8 se muestra la linealización de las cinéticas de crecimiento descritas por la Ecuación 4.9. Las ecuaciones que representan las líneas de tendencia presentadas en la figura, y sus coeficientes de correlación respectivos, se muestran a continuación:

$$\text{CLA 1: } y = 0.074 * x + 0.372; \quad R^2 = 0.9838$$

$$\text{CLA 2: } y = 0.0624 * x + 0.5208; \quad R^2 = 0.9744$$

Las ecuaciones muestran coeficientes de correlación aceptables (mayores a 0.95), y valores de pendiente bastante cercanas a la velocidad específica de crecimiento definida para el diseño (0.07 [h⁻¹]). Considerando el total de las mediciones en ambos cultivos, la tendencia global muestra que hubo control sobre la velocidad específica de crecimiento.

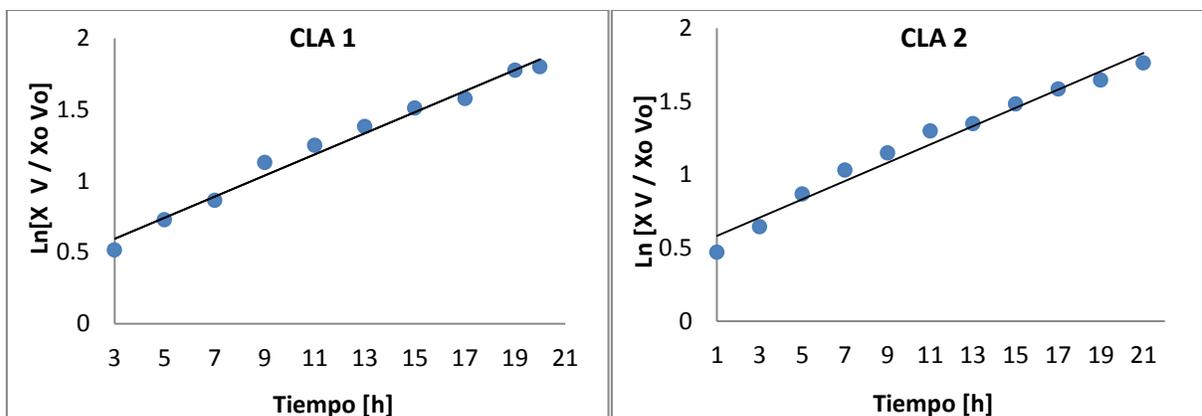


Figura 4.8: Linealización de las cinéticas de crecimiento de ambos cultivos por lote alimentado

4.4.4. Producción de Proteína Total y Actividad ROL en Cultivos por Lote Alimentado

En cuanto a la cinética de producción de proteína total y la variación de la actividad de ROL en el tiempo, mostradas en la Figura 4.9, se puede apreciar que existe una tendencia de aumento de la actividad de ROL en el tiempo, si se observa al dato inicial y el final. Cabe destacar que, puntualmente en el CLA 1, se observó un aumento significativo de la actividad a partir de las 12 [h], alcanzando un máximo a las 20 [h] de 50.32 [UI]. Por el contrario, en el caso del CLA 2 sólo se puede mencionar que los mayores valores de actividad se encuentran comprendidos entre las 5 y 15 [h], observándose una máxima de 55.66 [UI] a las 15 [h]. Comparando ambos cultivos, se puede observar que se tuvieron mayores actividades en el caso del segundo.

En términos generales, en ambos cultivos la cantidad de proteína total cuantificada en el medio de cultivo sigue una tendencia de aumento conforme avanza el tiempo. En el caso del CLA 1 se obtuvo un máximo de 1.428 [g] a las 20 [h], y en el caso del CLA 2, fue de 1.03 [g] a las 21 [h]. Por lo tanto, se puede afirmar que en el CLA 1 que se tuvo un 38.6% más de proteína total que en el CLA 2.

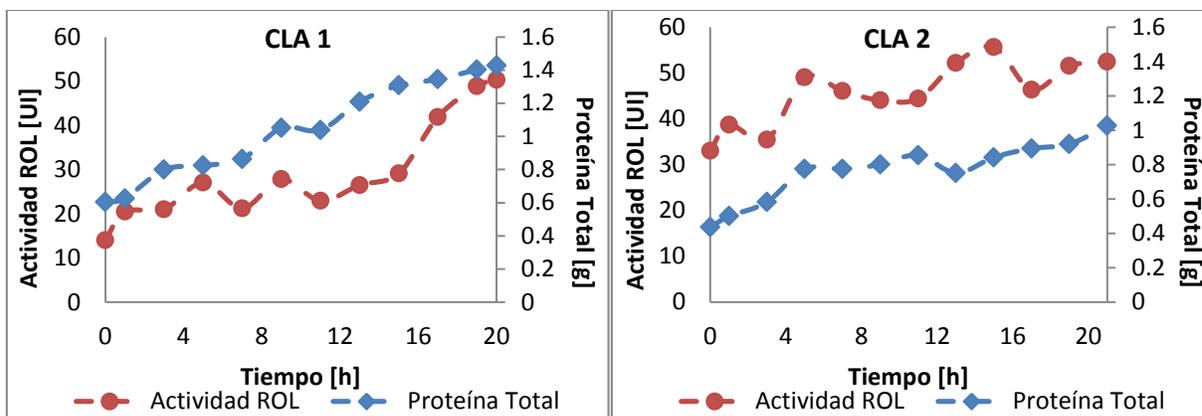


Figura 4.9: Producción de proteína total y variación de actividad de ROL en el tiempo en ambos cultivos por lote alimentado

Con los datos de actividad de ROL, concentración de biomasa, y variación de volumen en el tiempo, se calculó la productividad volumétrica y específica de acuerdo a la Ecuación 4.10 y 4.11, respectivamente.

$$Productividad\ Específica\ ROL(t) \left[\frac{UI}{g \cdot h} \right] = \frac{Actividad_{(t)} [UI]}{Biomasa_{(t)} [g] * \Delta tiempo [h]} \quad (Ec. 4.10)$$

$$Productividad\ Volumétrica\ ROL(t) \left[\frac{UI}{L \cdot h} \right] = \frac{Actividad_{(t)} [UI]}{Volumen\ reactor_{(t)} [L] * \Delta tiempo [h]} \quad (Ec. 4.11)$$

Se consideró que ambos parámetros serían productividades puntuales calculadas en un tiempo t. El delta tiempo, son la cantidad de horas que han pasado desde que comenzó la alimentación. Ambas productividades de ROL se muestran en la Figura 4.10.

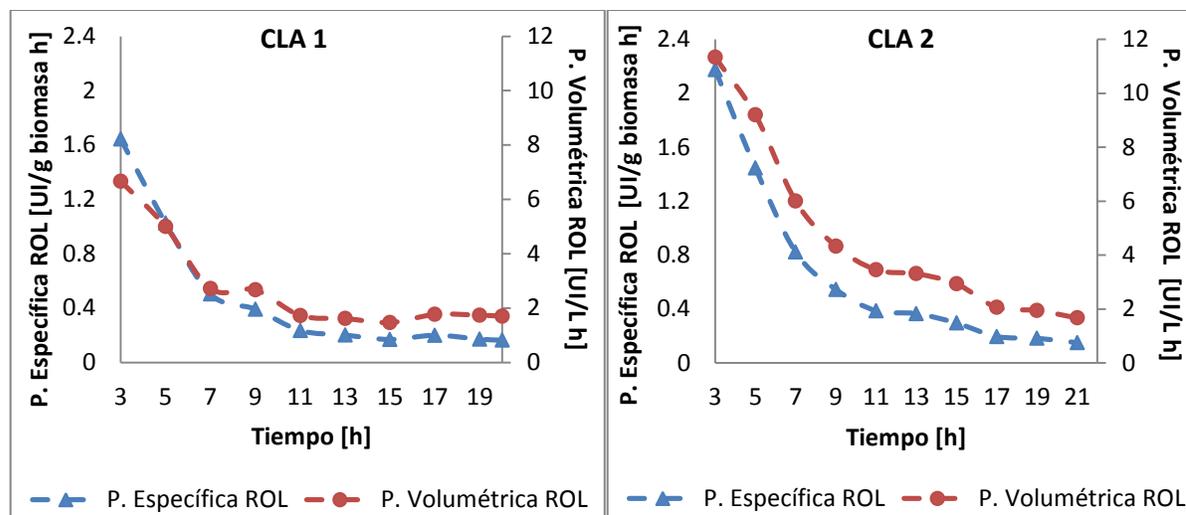


Figura 4.10: Productividad Volumétrica y Específica de ROL en el tiempo en ambos cultivos por lote alimentado

Esta gráfica muestra los valores de productividad a partir de las 3 [h] de cultivo, ya que los máximos valores de ambas productividades se obtuvieron después de 1 [h] de cultivo, y éstos son mayores en orden de magnitud comparados a los que se obtuvieron a partir de las 3 [h] de cultivo (para un tiempo de 1 hora, CLA 1: 20 [UI/L h] y 6.49 [UI/g biomasa h] y CLA 2: 38 [UI/L h] y 8.48 [UI/g biomasa h]). De esta forma, al excluir estos máximos de la gráfica se visualiza mejor la tendencia que siguen ambas productividades para el final de la fermentación.

En el caso del CLA 1 y CLA 2 se observó que, tanto la productividad volumétrica como la productividad específica, tendieron a disminuir a lo largo del tiempo del cultivo. En el caso del CLA 1, tanto la productividad volumétrica como específica de ROL disminuyeron drásticamente hasta las 11 [h], y a partir de este punto, se estabilizaron en un valor promedio de 1.67 [UI/L h] y 0.19 [UI/g biomasa h], respectivamente. En el caso del CLA 2, tanto la productividad volumétrica como específica de ROL disminuyeron drásticamente hasta las 9 [h], y a partir de este punto, continuó disminuyendo más lentamente hasta las 17 [h], para luego estabilizarse durante las últimas 4 horas en valores promedio de 1.89 [UI/L h] y 0.18 [UI/g biomasa h], respectivamente.

Se determinó que la productividad volumétrica promedio final del CLA 2 es aproximadamente un 12% mayor que la del CLA 1, y que sus productividades específicas promedio final son prácticamente las

mismas. Por otra parte, cabe destacar que estas productividades en modalidad de lote alimentado no superan las que se obtuvieron en modalidad de cultivo continuo bajo esta misma condición operacional (productividad volumétrica ROL: 2.1 [UI/L h], productividad específica ROL: 0.655 [UI/ g biomasa h]).

4.4.5. Perfil de Tensión de Oxígeno Disuelto en Cultivos por Lote Alimentado

Se recopilaron datos de tensión de oxígeno disuelto para analizar si se estaba consumiendo el oxígeno provisto a través de la aireación durante el cultivo. Considerando que el oxígeno en este tipo de cultivo pasa a ocupar el lugar de un nutriente, por el hecho de ser necesario para el primer paso de oxidación del metanol, es importante medir la tensión de oxígeno disuelto, para conocer cuál es la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Como se puede observar en la Figura 4.11, en el caso del CLA 1 la tensión de oxígeno disuelto disminuye desde un 77.6% hasta un 56.8%. En el caso del CLA 2, ésta disminuye desde un 73.3% hasta un 55% a las 9 [h], y desde aquel momento la tensión comienza a subir hasta alcanzar un 70%, para luego mantenerse estable en un rango entre 68 y 70%.

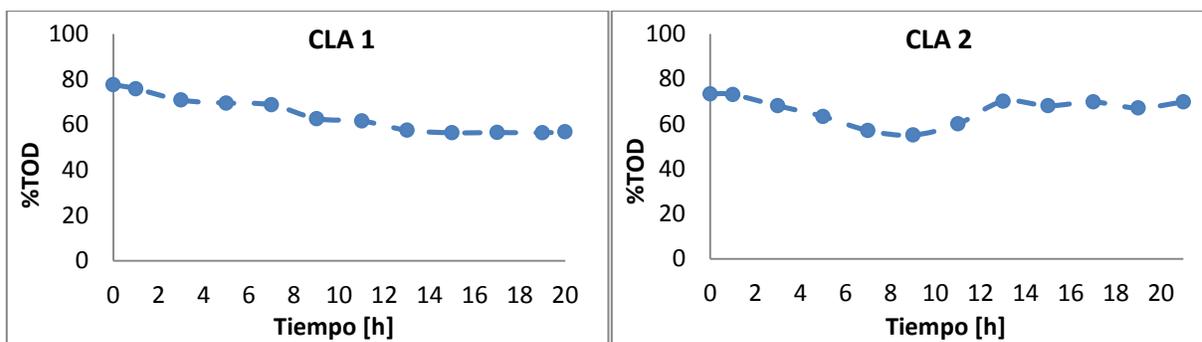


Figura 4.11: Perfil de tensión de oxígeno disuelto en ambos cultivos por lote alimentado

4.4.6. Perfil de Amonio en Cultivos por Lote Alimentado

Para complementar la información obtenida sobre el consumo de sustratos, se cuantificó la cantidad de amonio en el medio de cultivo durante la fermentación, considerando que el medio alimentado

contiene sulfato de amonio. En ambos cultivos de la Figura 4.12 se observa que la tendencia general del amonio es ir disminuyendo conforme avanza el tiempo, con algunos puntos en los que tiende a subir. En el caso del CLA 1 la concentración inicial es de 3.59 [g/L] y la final es 2.71 [g/L], y en el caso del CLA 2 la concentración inicial es de 3.87 [g/L] y la final es de 2.11 [g/L].

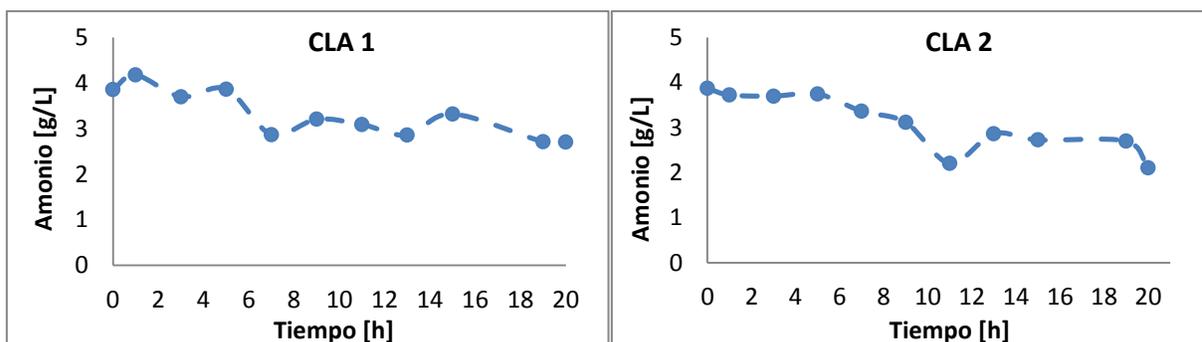


Figura 4.12: Perfil de Amonio en ambos cultivos por lote alimentado

4.4.7. Perfil de Ácidos Orgánicos en Cultivos por Lote Alimentado

Se cuantificaron una serie de ácidos orgánicos a lo largo de la fermentación y se reportaron concentraciones significativas de ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido pirúvico. En la Figura 4.13, para el caso del CLA 1 se observa que estos cuatro ácidos tienden a aumentar desde el tiempo cero hasta que han transcurrido 19 horas, momento en el que alcanzan una máxima concentración (ácido málico: 0.77 [g/L], ácido cítrico: 0.53 [g/L], ácido láctico: 0.36 [g/L], ácido pirúvico: 0.29 [g/L]). El último punto de medición muestra una disminución de la concentración de los cuatro ácidos. En el caso del CLA 2, la concentración de los ácidos muestra un alza una vez que ha transcurrido una hora del cultivo, y luego disminuye drásticamente en el caso del málico, láctico y pirúvico. En lo que resta del cultivo, estos tres ácidos tienden a estabilizarse en una concentración media aproximada de 0.2 [g/L]. El ácido cítrico aumenta y disminuye en distintos momentos, alcanzando una concentración máxima a las 17 horas. El ácido málico alcanza una máxima de 0.6 [g/], el ácido láctico alcanza 0.3 [g/] y el ácido pirúvico alcanza 0.23 [g/L], cuando ha transcurrido una hora del cultivo.

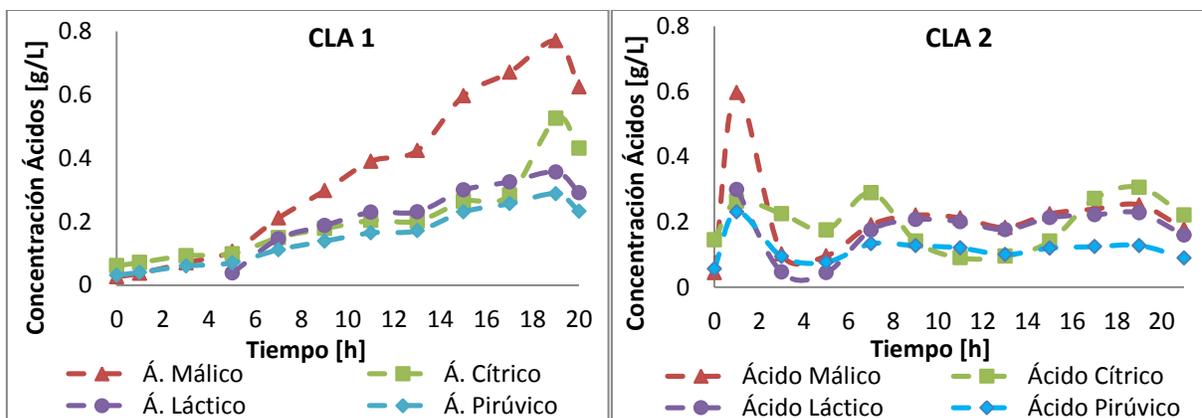


Figura 4.13: Perfil de ácidos orgánicos en ambos cultivos por lote alimentado

4.4.8. Distribución de Carbono del Sustrato Consumido en Cultivos por Lote Alimentado

Con la cuantificación del metanol y glicerol, la biomasa y los ácidos orgánicos, una vez que los cultivos habían finalizado (CLA 1: $t=20$ [h] y CLA 2: $t=21$ [h]), se calculó qué porcentajes de carbono consumido de los sustratos fue destinado a la formación de biomasa y producción de ácidos orgánicos; y éstos se presentan en la Tabla 4.10 (Ver Anexo VI). Al comparar ambos cultivos, se aprecia que en el CLA 2 se destina una mayor cantidad del carbono de los sustratos consumidos a la formación de biomasa, que en el CLA 1. En cuanto a la producción de ácidos orgánicos, el porcentaje de carbono del sustrato consumido destinado a su producción, es mayor en el caso del CLA 1.

Tabla 4.10: Porcentaje de Carbono del Sustrato Consumido para la Producción de Biomasa y Ácidos Orgánicos en el Final del Cultivo

% Carbono del Sustrato Consumido	N° Cultivo	
	CLA 1 ($t=20$ [h])	CLA 2 ($t=21$ [h])
Biomasa	50.61	68.77
Ácidos Orgánicos Total	6.01	3.19
Ácido Málico	2.22	0.83
Ácido Cítrico	1.64	1.07
Ácido Láctico	1.18	0.82
Ácido Pirúvico	0.97	0.47

CAPITULO 5.

DISCUSIÓN

5.1. Análisis de las Superficies de Respuesta

El análisis realizado a las superficies de respuesta para la productividad volumétrica muestra que cuando se fija alguna de las variables del diseño para obtener una gráfica tridimensional, existe una tendencia repetida con respecto a la condición que maximiza el valor de productividad, y esa corresponde a valores de tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación correspondientes al nivel α del diseño, el cual es 0.07 [h^{-1}], 30 [$^{\circ}\text{C}$] y 700 [rpm], respectivamente. Con respecto a la productividad específica, ésta también se aumenta bajo la misma condición operacional. Por lo tanto, la célula se ve favorecida cuando ésta crece a altas velocidades específicas de crecimiento (correspondientes a las tasas de dilución por tratarse de cultivos continuos), con una gran disponibilidad de oxígeno (en términos de oxígeno disuelto), lo cual están relacionado a altas velocidades de agitación, y a su temperatura óptima de crecimiento (30 [$^{\circ}\text{C}$]).

La temperatura de esta tendencia confirma un dato expuesto por Cos *et al.* (2006), en donde señalan que la temperatura óptima de cultivo y producción de proteína son 30[$^{\circ}\text{C}$]. Al comparar este resultado con los reportes de otros investigadores, donde se señala que la disminución de la temperatura tiene un efecto positivo sobre la productividad específica de proteínas heterólogas (Dragosits *et al.*, 2009; Jahic *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001), se deduce que tal estrategia no favorece el incremento de las productividades de esta proteína ROL, y así lo muestra el análisis realizados a las superficies de respuesta.

En el caso de la velocidad de agitación, el resultado muestra que para tener una alta productividad volumétrica y específica de ROL se requieren velocidades sobre las 600 [rpm]. Por ende, se puede deducir que para incrementar ambas productividades se requeriría aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno agitación, mediante un aumento en la agitación. Para asegurar una mayor velocidad de transferencia de oxígeno, se debe maximizar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, o la fuerza impulsora, mediante un aumento en la velocidad de agitación, o a través de

uso de aire enriquecido con oxígeno (Minjie & Shi, 2013). Se espera que hubiera una mayor productividad de proteína si se aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que se podría suplir la alta demanda de oxígeno que caracteriza a este proceso de producción de proteína recombinante al utilizar *P. pastoris* (Potvin *et al.*, 2012). Esta deducción se complementa con los resultados obtenidos en la investigación de Charoenrat *et al.* (2005), donde se señala que al aumentar la VTO, se promueve un incremento en la velocidad de consumo de la fuente de carbono, y como consecuencia se genera más producto por tiempo.

En el caso de la velocidad específica de crecimiento de la célula, la cual puede manipularse en cultivo continuo a través de la tasa de dilución, el resultado muestra que se requieren velocidades específicas de crecimiento entre 0.045 y 0.07 [h⁻¹] para tener mayores productividades. Algunos autores indican que existe una proporcionalidad directa entre la velocidad específica a la cual crece el microorganismo, y el flujo de carbono que es destinado a reacciones anabólicas, correspondiente a la formación de constituyentes celulares (Jahic *et al.*, 2002; Trinh *et al.*, 2003; Solá *et al.*, 2007). En la revisión de Potvin *et al.* (2012), se señala que en la mayoría de las investigaciones que involucran cultivo continuo, se ha observado que a medida que se opera a una mayor tasa de dilución en estado estacionario, la concentración de proteína recombinante disminuye y la productividad volumétrica aumenta. Esta observación se condice con el resultado que muestra la Figura 4.1, a medida que aumenta la tasa de dilución se incrementa la productividad volumétrica de ROL.

5.2. Cultivos Continuos

En base al análisis obtenido en las superficies de respuesta, se esperaba que la segunda condición evaluada (D: 0.07 [h⁻¹], T: 30 [°C], V. Agitación: 700 [rpm]) fuera la que obtuviera la mayor productividad de ROL tanto volumétrica como específica, entre las tres que se evaluaron. Efectivamente, se obtuvo el resultado esperado, ya que bajo esta condición la productividad volumétrica fue un 41% mayor que la condición 3, y un 30% mayor que la de la condición 1. En el caso de la productividad específica bajo esta condición 2, ésta fue un 47% mayor que la condición 3, y un 6% mayor que la condición 1. Por lo tanto, trabajar a una tasa de dilución de 0.045 [h⁻¹], a una temperatura de 25 [°C] y una velocidad de agitación de 500 [rpm], no favorecerían la producción de esta lipasa. Esto se complementa con los resultados de una investigación realizada por D'Anjou &

Daugulis (2001), donde compararon un cultivo continuo en tanque agitado con un cultivo por lote alimentado usando una mezcla de glicerol y metanol en la alimentación para la producción de una proteína recombinante. En el caso de las experiencias en continuo, se estudió la relación existente entre la tasa de dilución (evaluada en un rango entre $0.01 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ y $0.09 \text{ [h}^{-1}\text{]}$), consumo de metanol y la productividad de la proteína. Los resultados obtenidos señalan que para una tasa de dilución de $0.06 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, se obtiene el mayor consumo específico de metanol (alrededor de $0.02 \text{ [g metanol /g biomasa h]}$), y si esta tasa está por sobre el valor de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, el consumo decae. En el caso de la productividad específica de la proteína, ésta aumenta conforme aumenta la tasa de dilución, alcanzando alrededor de $50 \text{ [}\mu\text{g /g biomasa h]}$ para una tasa de $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. En el caso de la concentración de producto, ésta decae conforme aumenta la tasa de dilución hasta $0.05 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, para luego mantenerse constante en un valor aproximado de 15 [mg/L] hasta una tasa de $0.09 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (D'Anjou & Daugulis, 2001).

En la primera condición evaluada se trabajó a una temperatura de $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$, y los resultados muestran que no tuvo las mayores productividades de ROL, sin embargo, sí presentó los mayores consumos (volumétrico y específico) de metanol, en comparación con las otras condiciones evaluadas. Este resultado puede explicarse con los antecedentes expuestos en la investigación de Wang *et al.* (2009), donde se señala que, efectivamente se ha sugerido realizar los cultivos con disminución de temperatura hasta $20 \text{ [}^\circ\text{C]}$ para incrementar la productividad de la proteína recombinante. Sin embargo, para lograr una inducción eficiente del promotor y alcanzar mayores productividades de la proteína recombinante a este valor de temperatura, se requiere de un mayor suplemento de oxígeno para satisfacer el incremento de la velocidad de consumo de oxígeno. Este incremento de la demanda de oxígeno está relacionado con la disminución de la temperatura, y se basa en que: al disminuir la temperatura en un cultivo con metanol, se observa una activación aun mayor del promotor pAOX, por ende, se requiere de una mayor cantidad de oxígeno para oxidar este sustrato (Wang *et al.*, 2009). Relacionando estos antecedentes con los resultados obtenidos se podría deducir que, al obtenerse los mayores consumos de metanol ($0.517 \text{ [g metanol/L h]}$ y $0.198 \text{ [g metanol/g biomasa h]}$) a esta temperatura de $25 \text{ [}^\circ\text{C]}$, el promotor pAOX se encontraría bastante activado, y por ende, aumentaría la velocidad de consumo de oxígeno para oxidar este sustrato. Ante este aumento de la demanda de oxígeno sería necesario tener una mayor velocidad de transferencia de oxígeno, que quizás, no era posible alcanzar a la velocidad de agitación a la cual se estaba trabajando (500 [rpm]).

Al comparar la segunda y la tercera condición evaluada, lo que se buscó fue disminuir la tasa de dilución desde $0.07 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ hasta $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (manteniendo la temperatura en $30 \text{ [}^\circ\text{C]}$ y agitación en 700 [rpm]) para metabolizar el metanol más lentamente, y obtener una mayor productividad de ROL. Sin embargo, se obtuvo una menor productividad, y esto es coherente con el hecho de que el consumo volumétrico y específico de metanol fue menor bajo la tercera condición (Ver Tabla 4.4 y Tabla 4.6). Los consumos de metanol (volumétrico y específico) de la segunda condición fueron un 50% mayor que los de la tercera condición, por ende, era esperable que se indujera más el promotor pAOX bajo la segunda condición, y en consecuencia, hubiera una mayor cantidad de proteína recombinante (Ver Tabla 4.3). Por otra parte, Jahic *et al.* (2002), muestran que a medida que disminuye la velocidad específica de crecimiento se aumenta el rendimiento de metanol en CO_2 , lo cual coincide con el resultado obtenido en la tercera condición al disminuir la tasa de dilución desde 0.07 a $0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, ya que presenta el mayor porcentaje de carbono proveniente del sustrato consumido destinado a dióxido de carbono y la mayor producción volumétrica de CO_2 , si se compara con la tasa de las condiciones 1 y 2 (Ver Tabla 4.7 y Tabla 4.5).

Desde la Tabla 4.7 se puede determinar que la suma de los porcentajes de carbono del sustrato consumido destinado a biomasa y CO_2 resulta en un aproximado de 40% en la condición 1, 58% en la condición 2 y 73% en la condición 3. El resto del porcentaje de carbono consumido podría estar destinándose a producción de otras proteínas y otras moléculas que contengan carbono en su estructura.

Los mayores porcentajes de carbono aportado por el sustrato para la formación de biomasa y generación de CO_2 los presenta la tercera condición (Ver Tabla 4.7), lo cual puede basarse en el hecho de que al haber disminuido la tasa de dilución, y por ende, haber manipulado la tasa de crecimiento, la levadura haya metabolizado el glicerol y el metanol de forma más lenta como se muestra en la Tabla 4.6 con el menor consumo volumétrico y específico de metanol y glicerol para esta condición. En consecuencia, esto resultó en una mayor concentración de biomasa y CO_2 en estado estacionario (Ver Tabla 4.3 y 4.7).

En resumen, la segunda condición es aquella que presenta la mayor productividad volumétrica y específica de ROL, y fue la que se implementó en modalidad de lote alimentado. Además, se

comprobó que una disminución de la temperatura desde 30 [°C] a 25 [°C], o una disminución de la velocidad de agitación de 700 a 500 [rpm] no favorecen la producción de la proteína. Por otra parte, disminuir la velocidad específica de crecimiento desde 0.07 a 0.045 [h⁻¹] propicia el flujo de carbono aportado por los sustratos a CO₂ en vez de biomasa, y disminuye el consumo volumétrico y específico de metanol y glicerol.

5.3. Cultivos por Lote Alimentado con Alimentación Exponencial

5.3.1. Cinéticas de Crecimiento y Consumo de Sustrato en Cultivos por Lote Alimentado

Se logró el resultado esperado en ambos cultivos por lote alimentado, el cual consistía en: mantener un control sobre la velocidad específica de crecimiento con el diseño de alimentación exponencial implementado (Ver Figura 4.8) y alcanzar la concentración de biomasa esperada en ambos cultivos, la cual fue aproximadamente 11 [g/L] (Ver Figura 4.7).

Respecto a la cantidad de metanol en el reactor (en términos de concentración y masa), se observó que hubo una diferencia al disminuir la proporción de este sustrato desde un 60% en el CLA 1 a un 40% en el CLA 2 (Ver Figura 4.7 y Figura VIII.1). En el caso del CLA 1 el metanol llegó a acumularse por sobre la concentración límite a las 11 [h], momento en el que la actividad tuvo un aumento drástico. Esta respuesta en la actividad de ROL no era esperable, ya que se podría haber inhibido el crecimiento del microorganismo con tal concentración de metanol, lo cual hubiera repercutido en la producción de la enzima. En la Figura VIII.1 se observa que para el CLA 1 la simulación de la masa de metanol en el reactor y la masa de metanol real durante la fermentación no se condicen (Ver Anexo VIII), lo cual podría deberse a que se consideró que el mínimo consumo específico de metanol sería de 0.14 [g metanol/g biomasa h] (dato extraído de los cultivos continuos), y por esta razón, se sobreestimó la cantidad de metanol que iba a consumir la levadura. Desde la cinética de consumo de metanol del CLA 1, se determinó que la menor velocidad a la que consumió este sustrato fue de 0.02 [g metanol/g biomasa h] durante la fermentación.

En el caso del CLA 2, se observó que hubo una menor acumulación de metanol en el reactor comparada con el CLA 1, ya que la máxima concentración que se obtuvo fue de 7.53 [g/L], a diferencia del primer cultivo en el que se alcanzó 9.7 [g/L]. Por otra parte, la simulación de la masa de metanol a lo largo del CLA 2 no fue acertada, ya que ésta mostraba que para un tiempo de 22 horas, la masa de este sustrato superaría a la masa límite por un 24%, y en términos reales fue por un 40% (Ver Anexo VIII). Sin embargo, a pesar de esta situación, no se tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, ni una disminución drástica de la actividad de ROL (Ver Figura 4.9).

En cuanto al consumo de glicerol en el CLA 1 y CLA 2, se observa que a medida que avanza el tiempo la concentración de este sustrato en el reactor tiende a disminuir, y no se mantiene en la concentración estipulada en el diseño (aproximadamente 4.62 [g/L]). Esto muestra que, a pesar que hay consumo de metanol y glicerol en simultáneo, el microorganismo tiene mayor afinidad por el sustrato glicerol, a tal punto que no se logra mantener la concentración del diseño y se alcanzan niveles no detectables en el caso del CLA 1 para el término del cultivo. Esto concuerda con el hecho de que la constante de saturación de *P. pastoris* para glicerol ($k_{S \text{ GLICEROL}}=0.178$ [g/L], (Ghosalkar *et al.*, 2008) sea menor que la de metanol ($k_{S \text{ METANOL}}=0.223$ [g/L], (Cos *et al.*, 2006)), mostrando una mayor afinidad por este sustrato.

5.3.2. Cinética de Producción de Proteína Total y Actividad ROL en Cultivos por Lote Alimentado

En la Figura 4.9 se observa que las actividades de ROL del CLA 2 fueron mayores que las del CLA 1, lo que podría relacionarse con el hecho de que en este cultivo la acumulación de metanol fue menor que en el CLA 1. Una posible explicación para justificar esta respuesta de la actividad de ROL se basa en que al trabajar a una velocidad específica de crecimiento equivalente a la mitad de la máxima velocidad determinada desde el cultivo por lote con glicerol, se da la posibilidad de que el microorganismo crezca a una velocidad tal que, aprovecha de metabolizar sus fuentes de carbono en simultáneo, sin permitir que haya acumulación de glicerol y metanol a concentraciones que pudiesen inhibir el crecimiento, y por ende, repercutir en el producción de la enzima. Esto se complementa con la investigación de D'Anjou & Daugulis, quienes recomiendan seleccionar una tasa de dilución lo

suficientemente lejana de $\mu_{M\acute{A}X}$ en un cultivo para asegurar que no haya acumulación de glicerol en el caldo de cultivo, y a su vez, para mantener los niveles de concentración de metanol necesarios para inducir completamente la producción de proteínas recombinantes. Además señalan que, se debe tener la precaución que estos niveles de metanol no lleguen a ser inhibitorios del crecimiento o de la expresión de la proteína recombinante (D'Anjou & Daugulis, 2001).

Al comparar el CLA 1 y CLA 2, se observó que el CLA 1 alcanzó una mayor cantidad de proteína total (en términos máxicos) (Ver Figura 4.9), lo cual podría relacionarse con el hecho de que este cultivo es el que destina una menor cantidad del carbono consumido a biomasa y ácidos orgánicos comparado con el CLA 2 (Ver Tabla 4.10).

5.3.3. Productividad Volumétrica y Específica de ROL en Cultivos por Lote Alimentado

Se determinó que la productividad promedio final volumétrica de ROL del CLA 2 fue un 12% mayor que la del CLA 1, y que sus productividades específicas de ROL son prácticamente las mismas (CLA 1: 0.19 [UI/g biomasa h] y CLA 2: 0.18 [UI/g biomasa h]). Esto indicaría que la capacidad de producción de ROL del microorganismo es la misma, bajo las distintas concentraciones de glicerol y metanol del CLA 1 y 2. Sin embargo, en términos volumétricos, se tiene una mayor cantidad de enzima activa al disminuir la proporción de metanol en la alimentación (CLA 2). Asumiendo que la productividad volumétrica de ROL es el producto entre la productividad específica de ROL y la concentración de biomasa, y que la productividad específica es la misma en CLA 1 y 2, la única forma de obtener una mayor productividad volumétrica de ROL (como es el caso del CLA 2) es aumentar la concentración de biomasa, lo cual coincide con el resultado obtenido ya que en el CLA 2, la concentración final de biomasa fue 6% mayor que en el CLA 1, y se destinó un 18% más del carbono del sustrato consumido a biomasa (Ver Tabla 4.10). Por lo tanto, si se tiene una mayor cantidad de biomasa en el volumen de trabajo, que además puede relacionarse con la disminución del efecto inhibitorio del crecimiento al disminuir la proporción de metanol, se tiene una mayor posibilidad de producir más enzima activa.

La productividad volumétrica y específica decaen drásticamente a medida que avanza el tiempo (Ver Figura 4.10), alcanzándose un promedio final de 1.67 [UI/L h] y 0.19 [UI/g biomasa h] en el CLA 1 (considerando los últimos 6 puntos) y un promedio final de 1.89 [UI/L h] y 0.18 [UI/g biomasa h] en el CLA 2 (considerando los últimos 3 puntos). Al realizar un análisis de la Ecuación 4.10 y 4.11 se puede explicar la tendencia de ambas productividades a disminuir a medida que pasa el tiempo del cultivo. En la Figura 4.9 se observa que la actividad de ROL no muestra aumentos considerables entre un punto y el siguiente, comparados con los aumentos del volumen, o de la biomasa punto a punto. De esta forma, el aumento de la actividad de ROL punto a punto no es suficiente para compensar el aumento del denominador de ambas ecuaciones (biomasa o volumen según sea el caso, junto a un cierto tiempo), y por esta razón, se obtienen productividades que disminuyen en el tiempo.

Las productividades finales del CLA 2 son menores que las que se obtienen en modalidad continua con la condición de 0.07 [h⁻¹], 30 [°C] y 700 [rpm]. La productividad volumétrica y específica de ROL en modalidad continua es un 10% e 72.5% mayor que la productividad volumétrica y específica del CLA2, respectivamente. Las productividades volumétricas son similares, sin embargo las específicas difieren considerablemente, lo cual podría demostrar que el cultivo continuo es una alternativa de producción de proteína recombinante ante el cultivo por lote alimentado. Esto se complementa con la investigación de Curvers *et al.* (2001), quienes compararon la producción heteróloga de quimotripsinógeno B en cultivo por lote alimentado y cultivo continuo en tanque agitado. En sus resultados reportaron que la productividad del cultivo continuo fue un 4.7% mayor que la del cultivo por lote alimentado, trabajando a una tasa de dilución de 0.072 [h⁻¹]. La mayor productividad en modalidad continua podría estar relacionada con la variedad de edad de las células que presenta el cultivo por lote alimentado, y a la extensión de la fase de producción que presenta este tipo de fermentación (Curvers *et al.*, 2001).

5.3.4. Perfil de Tensión de Oxígeno Disuelto, Amonio y Ácidos Orgánicos en Cultivos por Lote Alimentado

Al observar la Figura 4.11 correspondiente al perfil de la tensión de oxígeno disuelto (%TOD) y la Figura 4.12 correspondiente al perfil del amonio, se puede deducir que en ambos CLA hubo consumo

de estos dos sustratos a lo largo de toda la fermentación, ya que en general, el porcentaje de tensión de oxígeno disuelto, que da cuenta de la concentración de oxígeno disuelto en el medio, disminuyó a lo largo del cultivo; y por otra parte, la concentración de amonio siempre estuvo bajo los 5 [g/L] que contenía el medio alimentado (en una concentración promedio de 3.2 [g/L]). El consumo de oxígeno que se vio reflejado en la disminución de la tensión de oxígeno disuelto durante toda la fermentación, dio cuenta de que las células estaban metabolizando el metanol en el primer paso de oxidación de éste (Ver Figura 2.1), y en consecuencia, se podría asumir que el promotor pAOX fue inducido para que posteriormente, se produjera la enzima. En el caso de la concentración de amonio, ésta no fue menor a 2 [g/L] hasta el final de fermentación, por ende se podría deducir que al no haber falta de nitrógeno, no se expuso a la proteína ROL a un aumento de la actividad proteolítica como se señala en la investigación de Kobayashi *et al.* (2000), por lo tanto, ésta no fue degradada.

Cabe destacar que en el CLA 2, al observar las Figuras 4.7 y 4.11, hay un instante de la fermentación, donde comienza a aumentar la concentración de glicerol (después de no haber sido detectado en el instante anterior) y aumenta la tensión de oxígeno disuelto desde 55 hasta 70%. Esto ocurre a las 11 [h] de la fermentación, y una posible explicación es que haya habido una disminución de la viabilidad celular en ese momento, lo cual queda en evidencia al aumentar la concentración de oxígeno disuelto en el reactor (evidenciado por el aumento del %TOD), y la concentración de glicerol en el medio.

Se pudo cuantificar una cantidad significativa de ácidos orgánicos, lo que significa que hay una parte del carbono consumido (entre un 3 y 6%) que está siendo destinado a estos ácidos, y no a la formación de biomasa, ni proteína y otros componentes celulares. El hecho de que se hayan detectado ácidos orgánicos en esta modalidad de cultivo, a diferencia de lo que sucedió en modalidad continua, puede relacionarse con que el cultivo por lote alimentado se caracteriza por ser una operación semicontinua en la que no existe una corriente de salida, por lo tanto, los productos generados se acumulan en el medio del reactor. Quizás en el cultivo continuo, los ácidos no fueron detectables en el medio del reactor porque se encontraban acumulados en el bidón que recibió la descarga.

CAPITULO 6.

CONCLUSIÓN

La estrategia desarrollada corresponde a un cultivo por lote alimentado con régimen de alimentación exponencial, a una temperatura de 30 [°C], velocidad de agitación de 700 [rpm] y con una velocidad específica de crecimiento de 0.07 [h⁻¹]; considerando una etapa lote para la generación de biomasa utilizando glicerol, y una etapa de alimentación de 60 % de glicerol y 40 % de metanol en términos de concentración, utilizando una función escalonada de flujos que simula esta función exponencial.

- Respecto al análisis de superficies de respuesta utilizando los datos generados en el trabajo experimental del proyecto FONDECYT N°11110486, se puede concluir que el rango de condiciones operacionales que maximizan la productividad volumétrica y específica de ROL, corresponde a tasas de dilución o velocidades específicas de crecimiento, según sea el caso, comprendidas entre 0.045 [h⁻¹] y 0.07 [h⁻¹], temperaturas entre los 25 [°C] y 30 [°C] y velocidades de agitación entre 500 y 700 [rpm].
- No obstante, al evaluar tres condiciones comprendidas en estos rangos bajo la modalidad de cultivo continuo, se determinó que la que maximiza ambas productividades es una tasa de dilución de 0.07 [h⁻¹], una temperatura de 30 [°C] y una velocidad de agitación de 700 [rpm].
- Al comparar dos cultivos por lote alimentado con alimentación exponencial, bajo la misma condición operacional (tasa de dilución de 0.07 [h⁻¹], temperatura de 30 [°C] y velocidad de agitación de 700 [rpm]), se determinó que la productividad volumétrica de ROL promedio final de un cultivo alimentado con un medio con 40% metanol - 60% glicerol fue un 12% mayor que la de un cultivo alimentado con un medio 60% metanol-40% glicerol. Además se determinó que las productividades de ROL, tanto volumétrica como específica, fueron mayores en modalidad de cultivo continuo.

CAPITULO 7.

RECOMENDACIONES

En base a la investigación realizada, y a los experimentos llevados a cabo, se recomienda:

- Investigar la razón por la cual se obtienen valores de actividad de ROL considerablemente menores con los que se encuentran reportados en la literatura, considerando que se está usando la misma cepa. Se recomienda analizar si el problema radica en la cepa, es decir, si ésta perdió la capacidad de expresar el gen de interés; o analizar si el problema radica en el procedimiento analítico que se utiliza para cuantificar esta actividad.
- En el caso de los cultivos continuos se recomienda probar una condición operacional de 30 [°C], 700 [rpm] y una tasa de dilución por sobre 0.07 [h⁻¹], para corroborar si un valor fuera de los rangos del diseño que se planteó, favorecería el aumento de ambas productividades.
- En el caso de cultivo por lote alimentado se recomienda probar una velocidad específica de crecimiento por sobre 0.07 [h⁻¹], y tener la precaución de seleccionar cuidadosamente cuál debiese ser la proporción de metanol-glicerol en la alimentación, ante esta nueva condición. Además, habría que replantearse la forma en la que se está utilizando el dato del consumo específico mínimo de metanol, si efectivamente, éste debiese tomarse como un parámetro constante.

CAPITULO 8.

REFERENCIAS

- Acevedo, F. (2002). Transferencia de Masa, Momento y Calor en Fermentaciones. En F. Acevedo, J. C. Gentina, & A. Illanes, *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (págs. 7: 192-194). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Acevedo, F., & Gentina, J. (2002). Cinética de Fermentaciones. En F. Acevedo, J. Gentina, & A. Illanes, *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (págs. 4: 104-132). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Barraza, C. & Guerrero, C. (2015). Desarrollo de un Cultivo por Lote Alimentado de *Piscirickettsia salmonis*. Tesis para postular al título de Ingeniero Civil Bioquímico. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Beer, H. D., Wohlfahrt, G., Schmid, R., & McCarthy, J. (1996). The Folding and Activity of the Extracellular Lipase of *Rhizopus oryzae* are Modulated by a Prosequence. *Biochemical Journal*, 319: 351-359.
- Ben Salah, A., Fendri, K., & Gargoury, Y. (1994). La lipase de *Rhizopus oryzae*: Production, Purification et Caractéristiques Biochimiques. *Revue Francaise des CORPS GRAS*, 41: 133-137.
- Ben Salah, R., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H., & Gargouri, Y. (2007). Production of Butyl acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103: 368-372.
- Ben Salah, R., Mosbah, H., Fendri, A., Gargouri, A., Gargouri, Y., & Mejdoub, H. (2006). Biochemical and Molecular Characterization of a Lipase produced by *Rhizopus oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 260: 241-248.

- Berríos, J. (2002). Extracción de Ácido Giberélico desde Caldos Fermentados mediante Membranas Líquidas en Emulsión. *Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Berríos, J. & Flores, M. O. (2013). *Informe de Avance Proyecto FONDECYT N°11110486: Developing of culture strategy of Pichia pastoris for enhanced productivity of recombinant Rhizopus oryzae lipase*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso.
- Brierley, R., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A., & Siegel, R. (1990). Fermentation Development of Recombinant *Pichia pastoris* Expressing the Heterologous Gene: Bovine Lysozyme. *The New York Academy of Sciences*, 589: 350-362.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 45-66.
- Cereghino, G. P., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of Recombinant Proteins in Fermenter Cultures of the Yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 329-332.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairus, 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 Biosystem Engineering*, 27: 399-406.
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M., & Meagher, M. M. (1997). Recombinant Protein Production in a Alcohol-oxidase Defective Strain of *Pichia pastoris* in Fedbatch Fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 277-283.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* under Different Promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5: 17.

- Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., W. S. Craig, R. G., y otros. (1987). High Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrrophic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 5: 479-485.
- Cregg, J. M. & Madden, K. R. (1988). Development of the Methylotrrophic Yeast, *Pichia pastoris*, as a Host System for the Production of Foreign Proteins. *Developments in Industrial Microbiology*, 29: 33-41.
- Curvers, S., Brixius, P., Klauser, T., Thömmes, J., Weuster-Botz, D., Takors, R., y otros. (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. (2001). A Rational Approach to Improving Productivity in Recombinant *Pichia pastoris* Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72:1-11.
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., y otros. (2009). The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of proteome*, 8: 1380-1392.
- Egli, T., Dijken, J. P., Veenhuis, M., Harder, W., & Fiechter, A. (1980). Methanol Metabolism in yeasts: Regulation of the Synthesis of Catabolic Enzymes. *Archives of Microbiology*, 124: 115-121.
- Faber, K., Harder, W., Ab, G. & Veenhuis, M. (1995). Review: Methylotrrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast*, 14: 1331-1344.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., & Valero, F. (2013). The Potencial Use of Lipases in the Production of Fatty Acid Derivatives for the Food and Nutraceutical Industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 16 no. 3.

- Files, D., Ogawa, M., Scaman, C. H., & Baldwin, S. A. (2001). A *Pichia pastoris* Fermentation Process for Producing High-levels of Recombinant Human Cystatin-C. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 335-340.
- Flores, M. O. (2013). Efecto del uso de sustratos mixtos y temperatura de cultivo sobre la producción heteróloga de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en cultivos continuos de *Pichia pastoris*. Tesis para postular el Grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con Mención en Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Fuenzalida, A. & Gentina, J. (1979). Diseño y Estudio de un Sistema de Alimentación para Cultivos por Lotes Alimentados. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Fukuda, K., Kuwahata, O., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., y otros. (1996). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Isoamyl Acetahydrolyzong Esterase Gene (EST2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 8-15.
- Gancedo, C., Gancedo, J. M., & Sons, A. (1968). Glycerol Metabolism in Yeasts. Pathways of Utilization and Production. *European Journal of Biochemistry*, 5: 165-172.
- Minjie, G. & Shi, Z. (2013). Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21:216-226.
- Ghosalkar, A., Sahai, V., & Srivastava, A. (2008). Optimization of Chemically Defined Medium for Recombinant *Pichia pastoris* for Biomass Production. *Bioresource Technology*, 99: 7906-7910.
- Gleeson, M. A. & Sudbery, P. E. (1988). The Methylophilic Yeasts. *Yeast*, 4: 1-15.

- Guillén, M. (2012). Caracterización, Inmovilización y Aplicación en Biocatálisis de la Lipasa de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*. Memoria para optar al Grado de Doctor. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Hao, M., Jiang, X., Lin, G., & Yang, H. (2010). Patente nº CN101838638 (A). China.
- Hong, F., Meinander, N.Q. & Jönsson, L.J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 79: 438-449.
- Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998). Microbial Lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 9: 396-403.
- Jahic, M., Rotticci-Mulder, J. C., Martinelle, K., Hult, K., & Enfors, S. O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 24: 385-393.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M., & Enfors, S. O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102: 45-53.
- Jones, R. & Anthony, R. (1977). The Relationship between Nutrient Feed Rate and Specific Growth Rate in FedBatch Cultures. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4: 87-92.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., y otros. (2000). High-level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 55-61.
- Lawson, J., Erjavec, J., & Madrigal, J. L. (1992). *Estrategias Experimentales para el Mejoramiento de la Calidad en la Industria*. México, D.F.: Grupo Editorial Iberoamericana.

- Lee, C., Lee, S., Jung, K., Katoh, S., & Lee, E. (2003). High Dissolved Oxygen Tension Enhances Heterologous Protein Expression by Recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 38:1147-1154.
- Li, Z. J., Xiong, F., Lin, Q. S., D'Anjou, M., Daugulis, A., Yang, D. S., y otros. (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.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., y otros. (2001). Yeast Whole-cell Biocatalyst Constructed by Intracellular Overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is Applicable to Biodiesel Fuel Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 515-520.
- 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., Solá, 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., y otros. (2001). Expression and Characterization of Recombinant Human Antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23: 55-65.
- Nakano, A., Lee, C., Yoshida, A., Matsumoto, T., Shiomi, N., & Katoh, S. (2006). Effects of Methanol Feeding Methods on Chimeric α -amylase Expression in Continuous Culture of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 227-231.

- Ogata, K., Nishikawa, H., & Ohsugi, M. (1969). A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33: 1519-1520.
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2004). Enzymatic Resolution of (\pm)-Glycidyl Butyrate in Aqueous Media. Strong Modulation of the Properties of the Lipase from *Rhizopus oryzae* via Immobilization Techniques. *Tetrahedron Asymmetry*, 15: 1157-1161.
- Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 91-105.
- Quishpe, R. (2010). Influencia del porcentaje de oxígeno en el gas de aireación y de la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de lipasa de *Rhizopus oryzae*, en *Pichia pastoris*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Serrano, A. (2001). Estudio de la Producción Heteróloga de una Lipasa del Hongo *Rhizopus oryzae* en la Levadura Metilotrófica *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Solá, A., Jouhten, P., Maaheimo, H., Sánchez-Ferrando, F., Szyperski, T., & Ferrer, P. (2007). Metabolic Flux Profiling of *Pichia pastoris* Grown on Glycerol/Methanol Mixtures in Chemostat Cultures at Low and High Dilution Rates. *Microbiology*, 153: 281-290.
- Trinh, L. B., Phue, J. N., & Shiloach, J. (2003). Effect of Methanol Feeding Strategies on Production and Yield of Recombinant Mouse Endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 438-444.
- Tuttle, D. & Dunn, W. (1995). Divergent Modes of Autophagy in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Cell Science*, 108: 25-35.

- Veenhuis, M., Dijken, J. P., & Harder, W. (1983). The Significance of Peroxisomes in the Metabolism of One-carbon Compounds in Yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, 24: 1-82.
- Wang, Y., Wang, Y., Wang, Z., Xu, Q., Du, G., Hua, Z., y otros. (2009). Lowering Induction Temperature for Enhanced Production of Polygalacturonate Lyase in Recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 44: 949-954.
- Wenzheng, J., Jiani D. & Fengying, L. (2011). *Patente nº CN102206670 (A)*. China.
- Yang, J., Zhou, X. S., & Zhang, Y. X. (2004). Improvement of Recombinant Hirudin Production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology Letters*, 26: 1013-1017.
- Zhang, W., Inan, M., & Meagher, M. M. (2000). Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5: 275-287.
- Zhang, W., Liu, C., Inan, M., & Meagher, M. (2004). Optimization of Cell Density and Diution Rate in *Pichia pastoris* Continuous Fermentations for Production of Recombinant Proteins . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 330-334.

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I.	Composición de Yeast Nitrogen Base (YNB).....	96
ANEXO II.	Diseño Experimental	97
ANEXO III.	Curvas de Calibrado.....	99
ANEXO IV.	Modelos Cuadráticos Obtenidos	110
ANEXO V.	Cálculo de Parámetros en Cultivo Continuo	112
ANEXO VI.	Cálculo de Porcentajes de Carbono Consumido	114
ANEXO VII.	Cálculo de la Concentración de Glicerol en la Alimentación.....	118
ANEXO VIII.	Simulación de la Acumulación de Metanol durante la Fermentación	119
ANEXO IX.	Simulación de Flujos de Alimentación en Cultivos por Lote Alimentado.....	121

ANEXO I. COMPOSICIÓN DE YEAST NITROGEN BASE (YNB)
Tabla I.1: Composición del medio YNB, DIFCO 233520, por litro de solución:

Vitaminas	
Biotina	2 µg
Panteoato de calcio	400 µg
Ácido fólico	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacina	400 µg
Ácido p-Aminobenzoico	400 µg
Clorhidrato de piridoxina	400 µg
Riboflavina	200 µg
Clorhidratode tiamina	400 µg
Elementos traza	
H ₃ BO ₃	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg
FeCl ₂	200 µg
MgSO ₄	400 µg
Na ₂ MoO ₄	200 µg
ZnSO ₄	400 µg
Sales	
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.1 g

ANEXO II. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra en la Tabla II.1 la matriz X con los valores de las variables independientes (los valores de $-\alpha$; -1 ; 0 ; 1 y α que se usaron para cada uno de los experimentos. Cabe destacar que en el trabajo que se desarrolló se hicieron un total de 17 experimentos, y para completar un total de 20 experimentos se hizo adición de tres condiciones de operación que corresponden a la repetición del punto central ($0.045 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, $25\text{[}^\circ\text{C]}$ y 500 [rpm]) (Berríos & Flores., 2013).

Tabla II.1: Tasa de dilución, temperatura y velocidad de agitación para cada uno de los experimentos

N° Cultivo	Variables Operacionales		
	D [1/h]	T [°C]	[rpm]
1	0.045	25	700
2	0.07	25	500
3	0.02	25	500
4	0.045	25	300
5	0.045	30	500
6	0.045	20	500
7	0.031	22	385
8	0.031	27.9	385
9	0.031	22.1	615
10	0.031	27.9	615
11	0.059	22.1	385
12	0.059	27.9	385
13	0.059	22.1	615
14	0.045	25	500
15	0.059	27.9	615
16	0.045	25	500
17	0.045	25	500
18	0.045	25	500
19	0.045	25	500
20	0.045	25	500

Primero se consideró el caso en el que matriz Y corresponde a los valores de las productividades volumétricas de la proteína ROL, y luego, se consideró el caso en el que ésta corresponde a los valores de las productividades específicas de ROL, los cuales fueron datos calculados en el trabajo desarrollado. Cabe destacar que en el caso de estos parámetros también se tuvo que completar un

total de 20 valores, adicionando tres repeticiones del promedio de productividades de los tres puntos centrales del diseño ($\overline{Q_{ROL}} = 1.73$ [UI/L h], $\overline{q_{ROL}} = 0.64$ [UI/g h]). Los valores se muestran a continuación en la Tabla II.2 (Berríos & Flores, 2013).

Tabla II.2: Valores de las variables dependientes: productividad volumétrica y productividad específica para cada uno de los experimentos

N° Cultivo	Productividad Volumétrica de ROL	Productividad Específica de ROL
	Q_{ROL} [UI/L h]	q_{ROL} [UI/g h]
1	1.49	0.6
2	2.66	1.51
3	0.8	0.35
4	1.4	0.55
5	2.07	0.79
6	1.67	0.91
7	1.36	0.39
8	1.21	0.52
9	0.9	0.29
10	0.78	0.28
11	1.53	0.55
12	1.18	0.4
13	1.24	0.44
14	1.89	0.6
15	2.12	0.84
16	1.98	0.77
17	1.31	0.55
18	1.73	0.64
19	1.73	0.64
20	1.73	0.64

ANEXO III. CURVAS DE CALIBRADO

III.1 Curva de Calibrado de Glicerol

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución patrón, y éstas se midieron por HPLC. Estas diluciones corresponden a muestras con distintas concentraciones de glicerol, y se muestran a continuación en la Tabla III.1, junto a sus respectivos valores de área del peak obtenido en el cromatograma.

Tabla III.1: Concentraciones de glicerol y valores de área de peak

Concentración [g/L]	Área peak [UV*sec]
0.5	17672.9
2	69852.7
4	134206
8	263227
12	394936
16	515090
20	647712

En la Figura III.1 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de glicerol y área de los peak, junto a una línea de tendencia lineal.

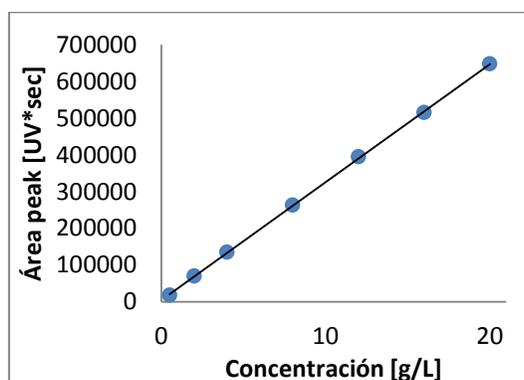


Figura III.1: Curva de Calibrado de Glicerol

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.1.

$$\text{Área peak} = 32150 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 4761.8; R^2 = 0.9999$$

III.2 Curva de Calibrado de Metanol

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución patrón de metanol, las cuales se mezclaron en una proporción 1:1 con un estándar interno. Para la primera curva obtenida se utilizó como estándar interno etanol, y para la segunda, se utilizó propanol. Éstas se midieron en el cromatógrafo de gases. Estas diluciones corresponden a muestras con distintas concentraciones de metanol, y se muestran a continuación en la Tabla III.2, junto a sus respectivas razones de áreas (metanol/estándar interno).

Tabla III.2: Concentraciones de metanol y valores de razón de áreas de peak metanol/etanol

Concentración [g/L]	Razón de Área MetOH/Área Etanol
0.79	0.091
1.58	0.46
3.16	0.942
4.74	1.465

En la Figura III.2 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de metanol y razón de área metanol/área etanol, junto a una línea de tendencia lineal.

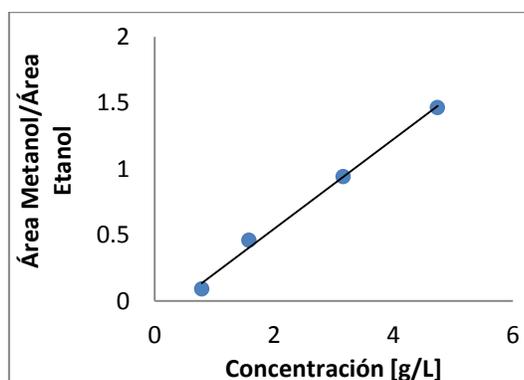


Figura III.2: Curva de Calibrado de Metanol (Estándar Interno: Etanol)

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.2.

$$\frac{\text{Área Metanol}}{\text{Área Etanol}} = 0.3395 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{g}{L} \right] - 0.1321; R^2 = 0.995$$

La segunda curva de calibrado corresponde a la que fue hecha usando como estándar interno el propanol. En la Tabla III.3 se muestran las concentraciones y razones de área metanol/área propanol.

Tabla III.3: Concentraciones de metanol y valores de razón de áreas de peak metanol/propanol

Concentración [g/L]	Razón de Área MetOH/Área Propanol
0.79	0.227
1.58	0.461
3.16	0.899
4.74	1.334

En la Figura III.3 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de metanol y razón entre el área de metanol/área propanol, junto a una línea de tendencia lineal.

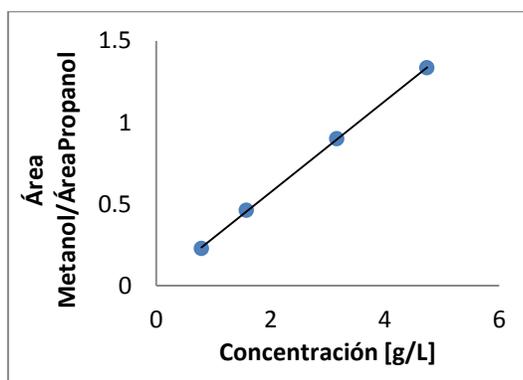


Figura III.3: Curva de Calibrado de Metanol (Estándar Interno: Propanol)

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.2.

$$\frac{\text{Área Metanol}}{\text{Área Propanol}} = 0.2794 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{g}{L} \right] + 0.0129; R^2 = 0.9998$$

III.3 Curva de Calibrado de Amonio

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución patrón de sulfato de amonio, las cuales se hicieron reaccionar con la solución A y la solución B, para luego medirles absorbancia. Estas diluciones corresponden a muestras con distintas concentraciones de amonio, y se muestran a continuación en la Tabla III.4, junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.4: Concentraciones de amonio y valores de absorbancia

Concentración [g/L]	Absorbancia
0.02	0.091
0.04	0.191
0.06	0.287
0.08	0.385
0.1	0.488
0.12	0.561
0.14	0.679
0.16	0.755
0.18	0.854

En la Figura III.4 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de amonio y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

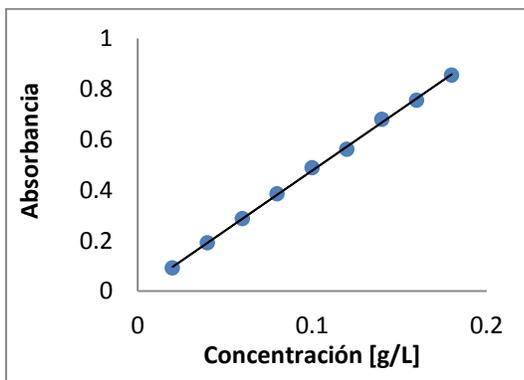


Figura III.4: Curva de Calibrado de Amonio

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.4.

$$\text{Absorbancia} = 4.7533 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 0.0014; R^2 = 0.9991$$

III.4 Curva de Calibrado de Proteína Total

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución patrón de BSA, las cuales reaccionaron con reactivo de Bradford, y luego se les midió absorbancia. Estas diluciones corresponden a muestras con distintas concentraciones de proteína, y se muestran a continuación en la Tabla III.5, junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.5: Concentraciones de proteína y valores de absorbancia

Concentración [g/L]	Absorbancia
0.1	0.046
0.2	0.076
0.3	0.157
0.4	0.207
0.5	0.25
0.6	0.281
0.7	0.319
0.8	0.366
0.9	0.434
1	0.47

En la Figura III.5 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de proteína y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

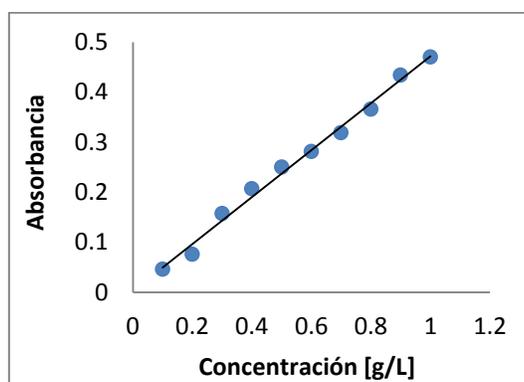


Figura III.5: Curva de Calibrado de Proteína Total

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.5.

$$\text{Absorbancia} = 0.4687 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 0.0028; R^2 = 0.9921$$

III.5 Curva de Calibrado para la Determinación del Coeficiente de Extinción Molar

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución estándar de p-nitrofenol (p-NF), y luego se les midió absorbancia. Estas diluciones corresponden a muestras con distintas concentraciones de p-nitrofenol, y se muestran a continuación en la Tabla III.6, junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.6: Concentraciones de p-nitrofenol y valores de absorbancia

Concentración [mM]	Absorbancia
0.024	0.235
0.036	0.304
0.048	0.345
0.06	0.41
0.073	0.475
0.085	0.571
0.097	0.621
0.109	0.676
0.121	0.767

En la Figura III.6 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de p-nitrofenol y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

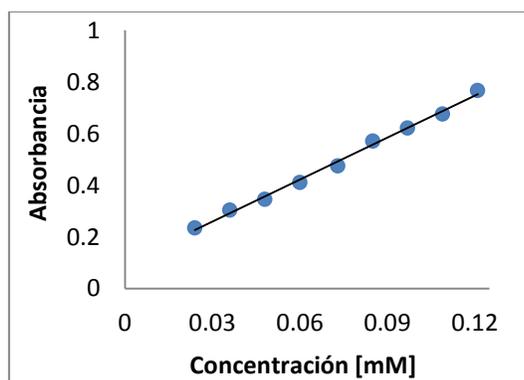


Figura III.6: Curva de Calibrado para la determinación del coeficiente de extinción molar

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.6. La pendiente de la recta que se ajusta a la curva representa el coeficiente de extinción molar, es decir, $\epsilon=5.42$.

$$\text{Absorbancia} = 5.4206 \cdot \text{Concentración [mM]} + 0.096; R^2 = 0.995$$

III.6 Curvas de Calibrado de Biomasa

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones de una muestra proveniente de un cultivo en fase de crecimiento. Se realizaron tres curvas de calibrado de biomasa, en la primera se utilizó sólo glicerol como fuente de carbono, en la segunda se utilizó una mezcla de metanol y glicerol en una proporción 60%-40%, respectivamente; y en la tercera se utilizó una mezcla de metanol y glicerol en una proporción 40%-60%, respectivamente. En la Tabla III.7 se presentan las concentraciones de biomasa de la primera curva, junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.7: Concentraciones de biomasa y valores de absorbancia utilizando glicerol

Concentración [g/L]	Absorbancia
0.02	0.091
0.05	0.176
0.07	0.258
0.1	0.367
0.12	0.471
0.15	0.564
0.17	0.659
0.19	0.722
0.22	0.796
0.24	0.865

En la Figura III.7 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de biomasa y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

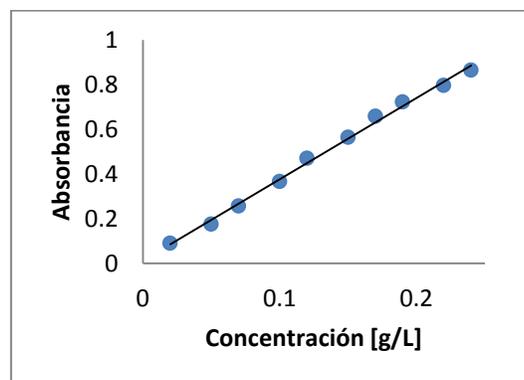


Figura III.7: Curva de Calibrado de Biomasa con Glicerol como Fuente de Carbono

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.7.

$$\text{Absorbancia} = 3.6376 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 0.0131; R^2 = 0.9956$$

En la Tabla III.8 se presentan las concentraciones de biomasa de la segunda curva (60% metanol-40% glicerol), junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.8: Concentraciones de biomasa y valores de absorbancia

Concentración [g/L]	Absorbancia
0.02	0.121
0.04	0.166
0.06	0.238
0.08	0.32
0.1	0.379
0.12	0.47
0.14	0.543
0.16	0.605
0.18	0.685
0.2	0.747
0.22	0.795
0.24	0.846

En la Figura III.8 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de biomasa y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

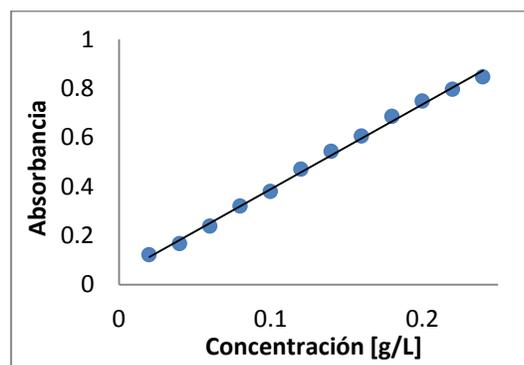


Figura III.8: Curva de Calibrado de Biomasa con 60% Metanol- 40% Glicerol como Fuente de Carbono

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.8.

$$\text{Absorbancia} = 3.4572 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 0.0435; R^2 = 0.9965$$

En la Tabla III.9 se presentan las concentraciones de biomasa de la tercera curva (40% metanol – 60% glicerol), junto a sus respectivos valores de absorbancia.

Tabla III.9: Concentraciones de biomasa y valores de absorbancia

Concentración [g/L]	Absorbancia
0.02	0.046
0.03	0.077
0.05	0.192
0.08	0.277
0.11	0.386
0.14	0.502
0.16	0.616
0.19	0.697
0.22	0.793
0.25	0.865
0.27	0.955

En la Figura III.9 se muestra la curva de calibrado obtenida al correlacionar los datos de concentración de biomasa y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

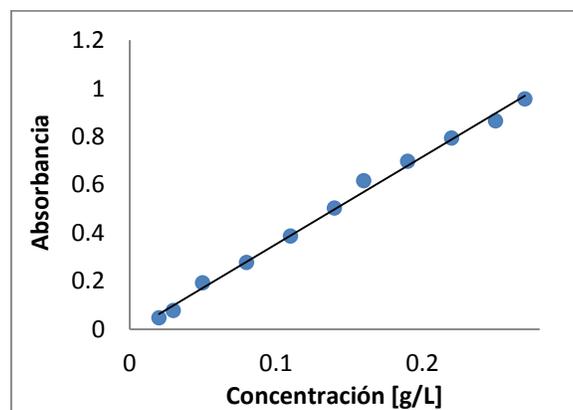


Figura III.9: Curva de Calibrado de Biomasa con 40% Metanol- 60% Glicerol como Fuente de Carbono

A continuación, se presenta la ecuación que describe la línea de tendencia lineal mostrada en la Figura III.9.

$$\text{Absorbancia} = 3.6227 \cdot \text{Concentración} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] - 0.0091; R^2 = 0.9952$$

III.7 Curvas de Calibrado de Ácidos Orgánicos

Para la construcción de la curva de calibrado se hicieron diluciones a partir de una solución patrón de ácido málico, cítrico, láctico y pirúvico, los cuales fueron los obtenidos en mayor medida en los experimentos. Estas muestras con diferentes concentraciones de los ácidos se midieron por HPLC. En la Figura III.10 se presentan las curvas de calibrado obtenidas al correlacionar los datos de concentración del ácido en cuestión y absorbancia, junto a una línea de tendencia lineal.

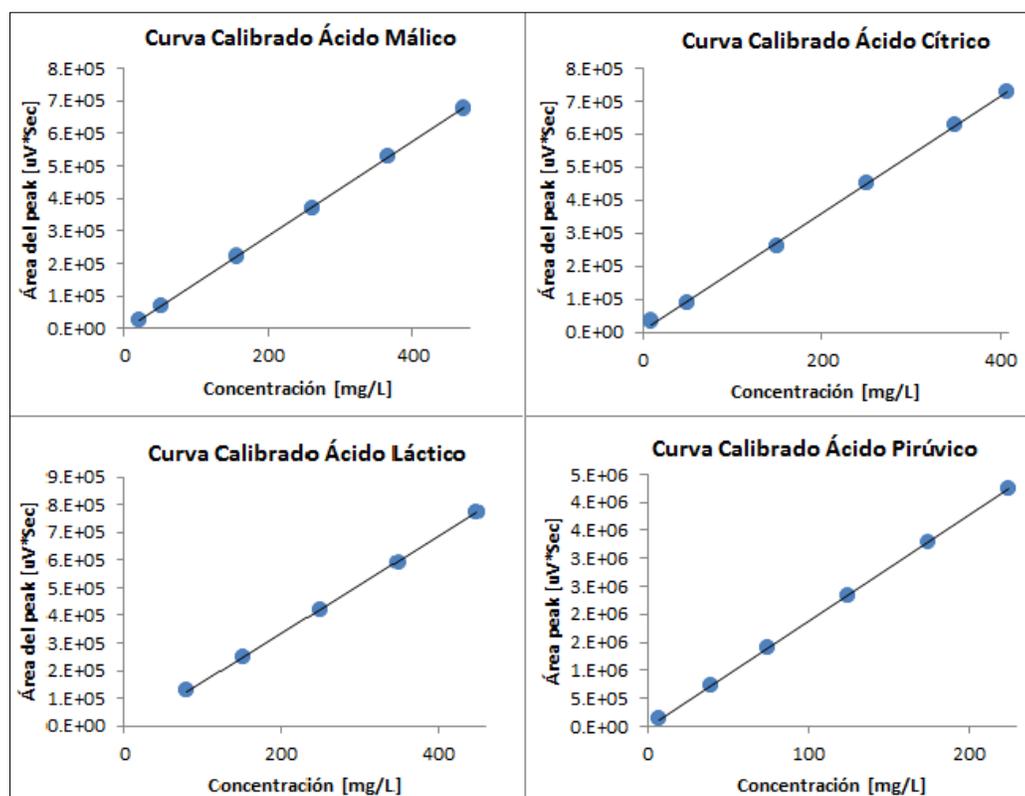


Figura III.10: Curvas de calibrado de ácido málico, cítrico, láctico y pirúvico

A continuación, se presentan las ecuaciones que describen las líneas de tendencia lineal mostradas en la Figura III.10.

$$\text{Ácido Máfico: } \textit{Área peak} = 1448 \cdot \textit{Concentración} \left[\frac{\textit{mg}}{\textit{L}} \right] - 5644.7; R^2 = 0.9999$$

$$\text{Ácido Cítrico: } \textit{Área peak} = 1773.2 \cdot \textit{Concentración} \left[\frac{\textit{mg}}{\textit{L}} \right] + 4547.9; R^2 = 0.9992$$

$$\text{Ácido Láctico: } \textit{Área peak} = 1740.8 \cdot \textit{Concentración} \left[\frac{\textit{mg}}{\textit{L}} \right] - 13177; R^2 = 0.9999$$

$$\text{Ácido Pirúvico: } \textit{Área peak} = 18925 \cdot \textit{Concentración} \left[\frac{\textit{mg}}{\textit{L}} \right] - 22726; R^2 = 0.9999$$

ANEXO IV. MODELOS CUADRÁTICOS OBTENIDOS

IV.1 Modelo Cuadrático de la Productividad Volumétrica

A continuación, se presenta el modelo cuadrático obtenido al utilizar el método de superficies de respuesta detallado en la Sección 3.4, para la productividad volumétrica:

$$Q_{ROL} = 5.2601 - 65.69 \cdot D - 0.1438 \cdot T - 0.0045 \cdot N - 336.43 \cdot D^2 - 0.0036 \cdot T^2 - 1.2797 \cdot 10^{-5} \cdot N^2 + 2.4664 \cdot D \cdot T + 0.1198 \cdot D \cdot N + 0.0005 \cdot T \cdot N$$

Donde:

Q_{ROL} : Productividad Volumétrica de ROL, [UI/L h]

D: Tasa de dilución, [h^{-1}]

T: Temperatura, [°C]

N: Velocidad de Agitación, [rpm]

Esta función se maximizó con la Herramienta Solver de Microsoft Excel 2010, teniendo en cuenta las restricciones expuestas en la Tabla IV.1:

Tabla IV.1: Restricciones para cada una de las Variables ($-\alpha$, α)

Restricciones	Variables		
	Tasa de Dilución [h^{-1}]	Temperatura [°C]	V. de Agitación [rpm]
Mínima	0.02	20	300
Máxima	0.07	30	700

La maximización de la función objetivo Q_{ROL} resulta en 3.59 [UI/L h] con una tasa de dilución de 0.07 [h^{-1}], temperatura de 30 [°C] y velocidad de agitación de 700 [rpm].

IV.2 Modelo Cuadrático de la Productividad Específica

A continuación, se presenta el modelo cuadrático obtenido al utilizar el método de superficies de respuesta detallado en la Sección 3.4, para la productividad específica:

$$q_{ROL} = 2.8459 - 37.6457 \cdot D - 0.1398 \cdot T + 2.4087 \cdot 10^{-5} \cdot N + 195.6406 \cdot D^2 + 0.0011 \cdot T^2 - 6.1481 \cdot 10^{-6} \cdot N^2 + 0.3175 \cdot D \cdot T + 0.0522 \cdot D \cdot N + 0.0002 \cdot T \cdot N$$

Donde:

q_{ROL} : Productividad Específica de ROL, [UI/g biomasa h]

D: Tasa de dilución, [h^{-1}]

T: Temperatura, [°C]

N: Velocidad de Agitación, [rpm]

Esta función se maximizó con la Herramienta Solver de Microsoft Excel 2010, teniendo en cuenta las restricciones expuestas en la Tabla IV.2:

Tabla IV.2: Restricciones para cada una de las Variables ($-\alpha$, α)

Restricciones	Variables		
	Tasa de Dilución [h^{-1}]	Temperatura [°C]	V. de Agitación [rpm]
Mínima	0.02	20	300
Máxima	0.07	30	700

La maximización de la función objetivo q_{ROL} resulta en 2.39 [UI/g h] con una tasa de dilución de 0.07 [h^{-1}], temperatura de 30 [°C] y velocidad de agitación de 700 [rpm].

ANEXO V. CÁLCULO DE PARÁMETROS EN CULTIVO CONTINUO

Como se puede apreciar en las Tablas 4.4, 4.5 y 4.6 se calcularon las productividades volumétricas y específicas de ROL, el rendimiento de sustratos en biomasa, la producción de dióxido de carbono (volumétrica y específica), y los consumos de los sustratos glicerol y metanol (volumétricos y específicos) para cada una de las condiciones evaluadas. Para los cálculos se debe considerar que los parámetros como el peso seco, la actividad de ROL, dióxido de carbono (CO₂), metanol y glicerol se cuantificaron en estado estacionario (EE), en un volumen de trabajo de 1 [L], y que la concentración de glicerol y metanol en la alimentación fue de 4.5 y 10.5 [g/L], respectivamente.

$$\text{Productividad Volumétrica ROL} \left[\frac{UI}{L h} \right] = \text{Actividad ROL}_{EE} \left[\frac{UI}{L} \right] * \text{Tasa Dilución} \left[\frac{1}{h} \right]$$

$$\text{Productividad Específica ROL} \left[\frac{UI}{g \text{ biom} h} \right] = \frac{\text{Actividad ROL}_{EE} \left[\frac{UI}{L} \right] * \text{Tasa Dilución} \left[\frac{1}{h} \right]}{\text{Peso Seco}_{EE} \left[\frac{g \text{ biomasa}}{L} \right]}$$

$$\text{Rendimiento de Sustrato en Biomasa} \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ fuente carbono}} \right] = \frac{\text{Peso Seco}_{EE} \left[\frac{g \text{ biomasa}}{L} \right]}{(4.5 - \text{Glicerol}_{EE}) \left[\frac{g}{L} \right] + (10.5 - \text{Metanol}_{EE}) \left[\frac{g}{L} \right]}$$

Para el cálculo de la producción volumétrica y específica de CO₂, se consideró el dato de la velocidad de producción de CO₂ (VPC), el cual se determina con la Ecuación 3.9 y está expuesto en la Tabla 4.5.

$$\text{Producción Volumétrica CO}_2 \left[\frac{g \text{ CO}_2}{L h} \right] = \text{VPC} \left[\frac{mmol \text{ CO}_2}{L h} \right] * \frac{1 [mol \text{ CO}_2]}{1000 [mmol \text{ CO}_2]} * \frac{44 [g \text{ CO}_2]}{1 [mol \text{ CO}_2]}$$

$$\text{Producción Específica CO}_2 \left[\frac{g \text{ CO}_2}{g \text{ biomasa} h} \right] = \frac{\text{VPC} \left[\frac{mmol \text{ CO}_2}{L h} \right] * \frac{1 [mol \text{ CO}_2]}{1000 [mmol \text{ CO}_2]} * \frac{44 [g \text{ CO}_2]}{1 [mol \text{ CO}_2]}}{\text{Peso Seco}_{EE} \left[\frac{g \text{ biomasa}}{L} \right]}$$

En el caso de los consumos volumétricos y específicos de sustrato, ya sea glicerol o metanol, se utilizaron las siguientes expresiones:

$$C. \text{Volumétrico Sustrato} \left[\frac{g \text{ sustrato}}{L h} \right] = (\text{Conc. Sustrato}_{\text{Alimentación}} - \text{Conc. Sustrato}_{\text{EE}}) \left[\frac{g}{L} \right] * \text{Tasa Dilución} \left[\frac{1}{h} \right]$$

$$C. \text{Específico Sustrato} \left[\frac{g \text{ sustrato}}{g \text{ biomasa h}} \right] = \frac{(\text{Conc. Sustrato}_{\text{Alimentación}} - \text{Conc. Sustrato}_{\text{EE}}) \left[\frac{g}{L} \right] * \text{Tasa Dilución} \left[\frac{1}{h} \right]}{\text{Peso Seco}_{\text{EE}} \left[\frac{g \text{ biomasa}}{L} \right]}$$

Donde:

- Conc. Sustrato_{ALIMENTACIÓN}: concentración del sustrato en la alimentación, [g/L]
- C. Volumétrico Sustrato: consumo volumétrico de sustrato, [g sustrato/L h]
- C. Específico de Sustrato: consumo específico de sustrato, [g sustrato/g biomasa h]

ANEXO VI. CÁLCULO DE PORCENTAJES DE CARBONO CONSUMIDO

A continuación se muestra el cálculo de porcentajes de carbono que representan la fracción de este elemento que es aportada por los sustratos glicerol y metanol para la formación de biomasa, la producción de CO₂, y la formación de ácidos orgánicos. Este ejemplo corresponde a cultivo continuo, por ende, se consideró como volumen de medio 1 [L].

En el caso del cultivo 1.1 se cuantificaron 2.297 [g/L] de metanol y no se detectó glicerol en estado estacionario. Se sabía que la concentración aportada por la alimentación contenía 10.5 [g/L] de metanol y 4.5 [g/L] de glicerol, y se definió el mismo volumen de trabajo de 1 [L]. Por lo tanto, se puede afirmar que el consumo de metanol corresponde a 8.203 [g] y el de glicerol corresponde a 4.5 [g]. Estos consumos son equivalentes a lo que aportó cada una de estas fuentes de carbono durante el cultivo.

Teniendo en cuenta que la masa molar del metanol es 32 [g/mol] y la del glicerol es 92.09 [g/mol], los moles de carbono aportados por cada sustrato se muestran en el siguiente cálculo:

$$\text{mol de C (Metanol)} = \frac{8.203 \text{ [g Metanol]}}{32 \left[\frac{\text{g Metanol}}{\text{mol Metanol}} \right]} * \frac{1 \text{ [mol de C]}}{1 \text{ [mol de Metanol]}} = 0.256 \text{ [mol de C}_{\text{Metanol}}\text{]}$$

$$\text{mol de C (Glicerol)} = \frac{4.5 \text{ [g glicerol]}}{92.09 \left[\frac{\text{g glicerol}}{\text{mol glicerol}} \right]} * \frac{3 \text{ [mol de C]}}{1 \text{ [mol de glicerol]}} = 0.147 \text{ [mol de C}_{\text{Glicerol}}\text{]}$$

$$\text{Moles de Carbono Consumido aportado por sustratos} = 0.256 + 0.147 = 0.403 \text{ [mol de C]}$$

Desde datos obtenidos del proyecto FONDECYT se sabe que la fórmula empírica que representa la composición de esta levadura es CH_{1.767}O_{0.494}N_{0.238} y que su masa molar es de 25.007 [g/mol]. Esto implica que por 1 mol de biomasa se tienen 1 mol de carbono.

En el caso del cultivo 1.1 se obtuvo un peso seco equivalente a 2.62 [g/L], y como se está trabajando con un volumen de 1 [L], se tienen 2.62 [g] de biomasa seca. Para conocer cuántos moles de carbono representa esta masa, se procede a realizar un cálculo similar al que se hizo con los sustratos.

$$\text{mol de C (biomasa)} = \frac{2.62 \text{ [g biomasa]}}{25.003 \left[\frac{\text{g biomasa}}{\text{mol biomasa}} \right]} * \frac{1 \text{ [mol de C]}}{1 \text{ [mol de biomasa]}} = 0.105 \text{ [mol de } C_{\text{biomasa}} \text{]}$$

En este mismo cultivo se obtuvo una velocidad de producción de CO₂ equivalente a 4.087 [mmol CO₂/L h]. Considerando un volumen de 1 [L], se tiene un flujo molar de 4.087 [mmol/h], y para calcular los moles de carbono que corresponden a la generación de CO₂, se debe tener en cuenta que la tasa de dilución de este cultivo fue de 0.07 [h⁻¹].

$$\text{mol de C (CO}_2\text{)} = 4.087 \left[\frac{\text{mmol CO}_2}{\text{h}} \right] * \frac{1 \text{ [mol CO}_2\text{]}}{1000 \text{ [mmol CO}_2\text{]}} * \frac{1}{0.07 \left[\frac{1}{\text{h}} \right]} = 0.058 \text{ [mol de } C_{\text{CO}_2} \text{]}$$

A continuación se procede a calcular qué porcentaje del carbono aportado por los sustratos se destinó a la formación de biomasa y a la generación de CO₂.

$$\% \text{ de Carbono consumido destinado a Biomasa} = \frac{0.105 \text{ [mol de } C_{\text{biomasa}} \text{]}}{0.403 \text{ [mol de } C_{\text{sustratos}} \text{]}} * 100 = 26.05\%$$

$$\% \text{ de Carbono consumido destinado a CO}_2 = \frac{0.058 \text{ [mol de } C_{\text{biomasa}} \text{]}}{0.403 \text{ [mol de } C_{\text{sustratos}} \text{]}} * 100 = 14.39\%$$

Este cálculo se aplica de la misma forma para el caso de los cultivos por lote alimentado, considerando que será para el tiempo final de la fermentación con un volumen final en el reactor de 1.5 [L]. Se debe tener en cuenta que en estos cultivos se reportó una concentración considerable de algunos ácidos orgánicos.

En el caso del CLA 1 se cuantificaron 7.843 [g/L] de metanol y no se detectó glicerol, para un tiempo de 20 [h] y un volumen final de 1.5 [L]. Se sabía que la concentración aportada por la alimentación contenía 54 [g/L] de metanol y 36 [g/L] de glicerol en un volumen de 0.5 [L], y que para el tiempo cero del CLA (inicio de la alimentación) habían quedado 4.906 [g/L] de glicerol y 0.299 [g/L] de metanol en un volumen de 1 [L]. Por lo tanto, se puede afirmar que el consumo de metanol corresponde a 8.203 [g] y el de glicerol corresponde a 4.5 [g]. Teniendo en cuenta que la masa molar del metanol es 32 [g/mol] y la del glicerol es 92.09 [g/mol], los moles de carbono aportados por cada sustrato se muestran en el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} \text{mol de } C_{\text{METANOL}} &= \frac{\left(0.299 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 1[\text{L}] + 54 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 0.5[\text{L}]\right) - \left(7.843 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 1.5[\text{L}]\right)}{32 \left[\frac{\text{g Metanol}}{\text{mol Metanol}}\right]} * \frac{1 [\text{mol de C}]}{1 [\text{mol Metanol}]} \\ &= 0.485 [\text{mol de } C_{\text{METANOL}}] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mol de } C_{\text{GLICEROL}} &= \frac{\left(4.906 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 1[\text{L}] + 36 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 0.5[\text{L}]\right) - \left(0 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 1.5[\text{L}]\right)}{92.09 \left[\frac{\text{g glicerol}}{\text{mol glicerol}}\right]} * \frac{3 [\text{mol de C}]}{1 [\text{mol glicerol}]} \\ &= 0.746 [\text{mol de } C_{\text{GLICEROL}}] \end{aligned}$$

$$\text{Moles de Carbono Consumido aportado por sustratos} = 0.485 + 0.746 = 1.231 [\text{mol de C}]$$

En el CLA 1 se obtuvo una biomasa de 10.387 [g/L] en un volumen de 1.5 [L] para un tiempo de 20 [h]. Para conocer cuántos moles de carbono representa esta biomasa, se procede a realizar un cálculo similar al que se hizo con los sustratos.

$$\text{mol de C (biomasa)} = \frac{10.387 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] * 1.5[\text{L}]}{25.003 \left[\frac{\text{g biomasa}}{\text{mol biomasa}}\right]} * \frac{1 [\text{mol de C}]}{1 [\text{mol de biomasa}]} = 0.623 [\text{mol de } C_{\text{biomasa}}]$$

Se realiza el mismo cálculo para los ácidos orgánicos, sabiendo que se obtuvo 0.624 [g/L] de ácido málico, 0.431 [g/L] de ácido cítrico, 0.291 [g/L] de ácido láctico y 0.233 [g/L] de ácido pirúvico. Los

pesos moleculares utilizados fueron: ácido málico, 134.087 [g/mol]; ácido cítrico, 192.124 [g/mol]; ácido láctico, 90.08 [g/mol] y ácido pirúvico, 88.06 [g/mol]. A continuación, se muestra un ejemplo de cálculo de moles de carbono para uno de los ácidos, y el mismo procedimiento se siguió con los restantes.

$$\text{mol de C (ác. málico)} = \frac{0.624 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] * 1.5[\text{L}]}{134.087 \left[\frac{\text{g á. málico}}{\text{mol á. málico}} \right]} * \frac{4 [\text{mol de C}]}{1 [\text{mol de á. málico}]} = 0.0279 [\text{mol } C_{\text{á.málico}}]$$

A continuación se procede a calcular qué porcentaje del carbono aportado por los sustratos se destinó a la formación de biomasa y a la producción de ácido málico. De la misma forma, se calcula para los ácidos restantes.

$$\% \text{ de Carbono consumido destinado a Biomasa} = \frac{0.623 [\text{mol de } C_{\text{biomasa}}]}{1.231 [\text{mol de } C_{\text{sustratos}}]} * 100 = 50.61\%$$

$$\% \text{ de Carbono consumido destinado a Á. Málico} = \frac{0.0279 [\text{mol de } C_{\text{á.málico}}]}{1.231 [\text{mol de } C_{\text{sustratos}}]} * 100 = 2.27\%$$

ANEXO VII. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL EN LA ALIMENTACIÓN

Primero que todo se calcula la masa de biomasa que se quiere alcanzar para el final de la fermentación:

$$Biomasa\ final\ (g) = 11 \left[\frac{g}{L} \right] * 1.5 [L] = 16.5 [g\ biomasa]$$

Sin embargo, se debe tener en cuenta que para el momento en el que empieza la alimentación ya se disponían de una concentración de biomasa de 2.9 [g/L] en un volumen de 1 [L], es decir, ya había una cantidad de biomasa de 2.9 [g]. Por lo tanto, la biomasa que realmente se necesita generar es 13.6 [g].

Considerando que, el rendimiento es constante y equivale a 0.6 [g biomasa/g glicerol], se calcula la masa de glicerol que se requiere para generar estos 13.6 [g] de biomasa:

$$Masa\ de\ Glicerol\ requerida = \frac{13.6 [g\ biomasa]}{0.6 \left[\frac{g\ biomasa}{g\ glicerol} \right]} = 22.67 [g\ glicerol]$$

En el caso del glicerol también hay que considerar que para el momento en el que se empieza a alimentar se tienen 4.62 [g/L] en un volumen de trabajo de 1 [L], por ende ya se disponía de 4.62 [g]. Por lo tanto, lo que realmente se requiere son 18.05 [g] de glicerol en un volumen de alimentación de 0.5 [L], por ende la concentración de glicerol en el medio es:

$$Concentración\ Glicerol_{Alimentación} = \frac{18.05 [g\ glicerol]}{0.5 [L]} = 36.1 \left[\frac{g}{L} \right] \cong 36 \left[\frac{g}{L} \right]$$

ANEXO VIII. SIMULACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE METANOL DURANTE LA FERMENTACIÓN

La simulación de metanol (MetOH) en el reactor se calculó en términos másicos:

El metanol simulado en el reactor para un tiempo i , se definió como el metanol ingresado al encenderse la bomba en ese tiempo i , menos el metanol consumido hasta ese tiempo i , más el metanol acumulado que queda del instante anterior, en un tiempo $i-1$ (Ver Figura VIII.1):

$$Metanol_{SIMULADO}(i) [g] = (Metanol\ ingresado(i) - Metanol\ consumido(i) + Metanol\ Acumulado(i - 1))[g]$$

- Para el cálculo del metanol ingresado ($MetOH_{INGRESADO}$ [g]) se tuvo que considerar: el tiempo de funcionamiento de la bomba ($t_{FUNCIONAMIENTO\ BOMBA}$), la concentración de metanol en el medio alimentado (en el caso del CLA 1: 54 [g/L], y en el CLA 2: 24 [g/L]), el caudal de la bomba. El cálculo se muestra a continuación:

$$MetOH_{INGRESADO}(i) [g] = MetOH_{Alimentación} \left[\frac{g}{L} \right] * Caudal_{Bomba} \left[\frac{L}{minuto} \right] * t_{funcionamiento\ bomba}$$

- Para el cálculo del metanol consumido ($MetOH_{CONSUMIDO}$ [g]) en un intervalo de tiempo de 2 [h], se tuvo que considerar: la biomasa promedio de mediciones hechas en un tiempo i y un tiempo $i-1$, el consumo específico de metanol de 0.14 [g metanol/g biomasa h] para el primer CLA, el cual fue obtenido desde los datos de cultivos continuos. Una vez que se llevó a cabo el primer CLA se pudo determinar que el mínimo consumo específico real de metanol era 0.02 [g metanol/g biomasa h], y fue el que se utilizó para el diseño del segundo cultivo. El cálculo se muestra a continuación:

$$MetOH_{CONSUMIDO}(i) [g] = 0.14 \left[\frac{g\ MetOH}{g\ biomasa * h} \right] * 2[h] * Biomasa\ promedio_{(i-1,i)} \left[\frac{g}{L} \right]$$

- Para el cálculo del metanol acumulado ($MetOH_{ACUMULADO}$ [g]) se consideró el siguiente cálculo:

$$MetOH_{ACUMULADO}[g] = MetOH_{INGRESADO}(i - 1) [g] - MetOH_{CONSUMIDO}(i - 1) [g]$$

- En la Figura VIII. 1 se muestra la comparación del metanol simulado en el reactor (en azul), el metanol límite que podría haber en el reactor considerando que el volumen varía y la concentración límite de metanol reportado eran 5 [g/L] (en rojo), y el metanol real que se cuantificó en el CLA 1 y 2 (en verde).

$$MetOH_{LÍMITE}(i) [g] = 5 \left[\frac{g}{L} \right] * Volumen\ en\ el\ reactor(i) [L]$$

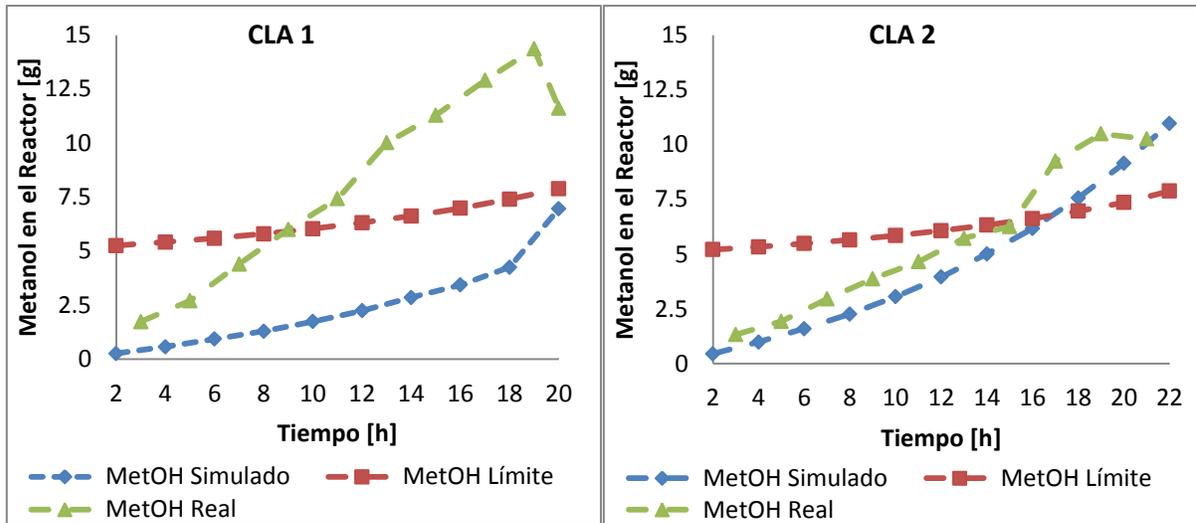


Figura VIII.1: Metanol en el reactor para ambos cultivos por lote alimentado

ANEXO IX. SIMULACIÓN DE FLUJOS DE ALIMENTACIÓN EN CULTIVOS POR LOTE ALIMENTADO

En base a lo descrito en la Sección 4.4.2, se hicieron los cálculos respectivos de los flujos teóricos, volúmenes teóricos, flujos experimentales, y tiempos de funcionamiento de la bomba, y se presentan en la Tabla IX.1 y en la Tabla IX.2.

Tabla IX.1: Simulación de Flujos en Cultivo por Lote Alimentado 1

Tiempo [h]	Flujo Teórico [L/h]	Volumen [L]	Flujo experimental [L/h]	Funcionamiento bomba [min]
0	0.011	1	0	-
2	0.013	1.024	0.012	13.7
4	0.015	1.051	0.014	16
6	0.017	1.082	0.016	18.29
8	0.019	1.118	0.018	20.57
10	0.022	1.159	0.021	24
12	0.025	1.207	0.024	27.43
14	0.029	1.262	0.028	32
16	0.034	1.324	0.031	35.43
18	0.039	1.397	0.037	42.29
20	0.045	1.48	0.042	48

Tabla IX.2: Simulación de Flujos en Cultivo por Lote Alimentado 2

Tiempo [h]	Flujo Teórico [L/h]	Volumen [L]	Flujo experimental [L/h]	Funcionamiento bomba [min]
0	0.011	1	0	-
2	0.013	1.024	0.012	13.7
4	0.015	1.051	0.014	16
6	0.017	1.082	0.016	18.3
8	0.019	1.118	0.018	20.6
10	0.022	1.159	0.021	24
12	0.025	1.207	0.024	27.4
14	0.029	1.262	0.028	32
16	0.034	1.324	0.031	35.4
18	0.039	1.397	0.037	42.3
20	0.045	1.48	0.042	48
22	0.051	1.576	0.048	54.9