



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCION DE LA CUTINASA ANCU1
UTILIZANDO EL SISTEMA DE EXPRESION DE *Pichia pastoris***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Augusto Castro Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Amelia Farrés González Saravia
Facultad de Química, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Dr. Francisco Javier Plasencia De la Parra
Facultad de Química, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/542/2017

Castro Rodríguez José Augusto
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Mejoramiento de la producción de la cutinasa ANCU11 utilizando el sistema de expresión de Pichia pastoris**", dirigida por el/la Dr(a) **Farrés González Saravia Amelia María Guadalupe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Ruiz Terán Francisco
VOCAL	Serrano Carreon Leobardo
VOCAL	Trujillo Roldán Mauricio Alberto
VOCAL	Montiel Pacheco Carmina
SECRETARIO	Coria Ortega Roberto

Sin otro particular por el momento, aproveché la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de febrero de 2017.
COORDINADOR


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química y en la Unidad de Bioprocesos en el Departamento de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT (becario No 661660) y de los proyectos CONACyT (153500) y DGAPA (IN 228316) PAIP (5000-9095).

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Mi enorme agradecimiento a mi amada Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme seguir creciendo dentro de sus instalaciones.
- ❖ Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el apoyo económico para asistir al 8TH INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOCATALYSIS HAMBURG, GERMANY 2016
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, así como también a los proyectos CONACyT 153500, DGAPA (IN 228316) PAIP (5000-9095)
- ❖ A la Dra. Amelia por permitirme desarrollar durante todo este tiempo en el laboratorio, por todo su apoyo, su asesoría, sus consejos y por el tiempo brindado. Muchas gracias doctora.
- ❖ A los miembros del comité tutorial:
Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y Dr. Francisco Javier Plasencia De la Parra.
Por sus valiosos consejos y enseñanzas que me fueron transmitidos durante el transcurso de la maestría, los cuáles fueron una guía para el desarrollo y conclusión de este proyecto.
- ❖ A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz por facilitarme su laboratorio y equipos para la realización de este proyecto.
- ❖ Al Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán por permitirme trabajar en su laboratorio y en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Por sus grandes consejos en ingeniería y el conocimiento transmitido.
- ❖ Un especial agradecimiento a todas las personas que me han hecho crecer como ser humano.

Contenido

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Cutinasas.....	2
1.2 Géneros productores.....	5
1.3 Aplicaciones de las cutinasas	6
1.3.1 Modificación de grasas y aceites	7
1.3.2 Síntesis de aromas.....	7
1.3.3 Lipofilización de antioxidantes naturales.....	8
1.3.4 Detergentes	9
1.3.5 Rol de las cutinasas en biodegradación.....	10
1.3.6 Producción de biodiesel	11
1.4 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas recombinantes	13
1.4.1 Ventajas del uso de <i>P. pastoris</i> como sistema de expresión.....	14
1.4.2 El promotor de la AOX1.....	17
1.4.3 Metabolismo del metanol	17
1.5 Escalamiento	19
1.5.1 Velocidad de transferencia de oxígeno (OTR).....	21
1.5.2 Métodos para medir k_La	22
1.5.3 Métodos para la medición de k_La en ausencia de microorganismo	23
1.5.3.1 Método de oxidación de sulfito de sodio	23
1.5.3.2 Método dinámico	24
1.5.4 Medición de la OTR en un bioproceso	26
1.5.4.1 Método dinámico	26
1.6 Estrategias para el cultivo de <i>P. pastoris</i> en biorreactor.....	28
1.6.1 Cultivo por lote alimentado.....	28
1.6.1.1 Alimentación constante de oxígeno disuelto (OD-stat).....	28
1.6.1.2 Velocidad específica de crecimiento constante (μ -stat).....	29
1.6.1.3 Velocidad constante de alimentación de metanol.....	29
1.6.1.4 Lote alimentado limitado por oxígeno (OLFB)	30
1.6.2 Cultivo continuo	30
II. ANTECEDENTES	32
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	37
V. OBJETIVO GENERAL	37

OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
VI. METODOLOGÍA.....	38
6 PRODUCCIÓN DE ANCUT1 RECOMBINANTE	39
6.1 Reactivación del microorganismo	39
6.2 Crecimiento en glicerol.....	39
6.3 Expresión de la enzima	40
6.4 Cuantificación de proteína en microplaca	40
6.5 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca (con <i>p</i> -nitrofenilbutirato).....	41
6.6 Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida.....	41
6.6.1 Electroforesis.....	41
6.6.2 Zimogramas.....	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
7.1 Determinación del k_La	44
7.2 Efecto del k_La en la velocidad específica de crecimiento utilizando como fuente de carbono glicerol y metanol	46
7.3 Efecto del pH inicial en la producción de la ANCUT1	56
7.4 Efecto de la concentración de inductor	58
7.5 Determinación del k_La en un biorreactor	60
7.6 Escalamiento del bioproceso	60
VIII. CONCLUSIONES.....	70
IX. PERSPECTIVAS.....	71
X. BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Géneros productores de cutinasas.	6
Tabla 2 Sistema de vectores comerciales.	15
Tabla 3 Promotores empleados para la expresión de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	16
Tabla 4 Propiedades bioquímicas de ANCUT1 recombinante.	33
Tabla 5 Productividad de proteínas recombinantes expresadas en <i>P. pastoris</i>	35
Tabla 6 Determinación k_La utilizando correlaciones empíricas.	45
Tabla 7 Efecto del k_La en la velocidad específica de crecimiento utilizando como fuente de carbono metanol o glicerol.	50
Tabla 8 Producción de la proteína recombinante a diferentes pH iniciales en matraz de 250 mL...	57
Tabla 9 Efecto de la concentración de inductor en la producción de la ANCUT1.	59
Tabla 10 Comparación entre el cultivo en matraz y biorreactor	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de <i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i> ,...	3
Figura 2 Principales funciones de la cutícula en las plantas.	4
Figura 3 Reacción de hidrólisis de la cutina	4
Figura 4 Estructura del insecticida malatión.	10
Figura 5 Ejemplo de la reacción de transesterificación entre un TAG y un alcohol para la formación de alquil ésteres.	11
Figura 6 Metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i>	19
Figura 7 Transferencia de oxígeno de la burbuja de aire a la célula.	21
Figura 8 Descripción esquemática del método dinámico desorción-adsorción de oxígeno para la medición en condiciones inertes.	26
Figura 9 Descripción esquemática de la medición directa de OTR en un bioproceso por el método dinámico.	27
Figura 10 Efecto del k_La en el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en glicerol..	47
Figura 11 Efecto del k_La en el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en metanol	48
Figura 12 Perfil de proteínas (A) y Zimograma (B) del efecto del k_La en la producción de la ANCUT1 en <i>Pichia pastoris</i>	51
Figura 13 Expresión de la proteína de interés a diferentes k_La , determinada por la Intensidad de las bandas de la actividad enzimática obtenida por densitometría utilizando el equipo Gel Doc (BioRad) y el programa Image Lab 5.2.1.	51
Figura 14 Efecto del k_La en la actividad de la cutinasa recombinante utilizando como sustrato pNFB a pH 7. Datos obtenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL.	53
Figura 15 Efecto del k_La en la productividad volumétrica de <i>Pichia pastoris</i> , a dos tiempos de cultivo, en matraces de 250 mL utilizando metanol al 0.5 % hasta las 36 h y después metanol al 1.5 % hasta las 60 h a pH 6 y 29°C.	54
Figura 16 Efecto del k_La en la concentración de proteína extracelular medida por el método de Bradford. Determinaciones realizadas a dos tiempos de cultivo en matraces de 250 mL.	54
Figura 17 Cinética de producción donde se muestran valores de DO y Qp de la ANCUT1 a un $k_La = 96 \text{ h}^{-1}$ en matraz de 250 mL y metanol 0.5% y 1.5 %.	55
Figura 18 Efecto del escalamiento en el crecimiento, la proteína total soluble y en la Qp de <i>Pichia pastoris</i> en metanol al 1.5%, pH 6, 29°C y monitoreando la TOD en un biorreactor.	61
Figura 19 Condiciones de cultivo de pH y temperatura en un biorreactor.	62
Figura 20 Efecto del escalamiento en el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor.	63
Figura 21 Efecto del escalamiento en la velocidad específica de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor.	64
Figura 22 Perfil de proteína de la cinética de producción en biorreactor a un k_La de 99 h^{-1} utilizando metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor. Se cargaron en cada pozo 2 μg de proteína.	66
Figura 23 Zimograma de la cinética de producción en biorreactor a un k_La de 99 h^{-1} . Utilizando metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor. Se cargaron en cada pozo 2 μg de proteína.	66
Figura 24 Efecto del kLa en la productividad volumétrica de <i>Pichia pastoris</i> , comparando el cultivo en matraces de 250 mL utilizando metanol al 0.5 % hasta las 36 h y después metanol al 1.5 % hasta las 60 h a pH 6 y 29°C con el cultivo en biorreactor utilizando un k_La de 99 h^{-1} a 1 vvm, 950 rpm, pH 6 y 29°C.	67

Abreviaturas

$k_L a$	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1})
Qp	Productividad volumétrica (U/Lh)
AOX	Alcohol oxidasa
DHAS	Dihidroxiacetona sintasa
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (mg/Lh)
OUR	Velocidad de oxígeno captado (mg/Lh)
C^*	Concentración de saturación en el seno del líquido (%)
C	Concentración de oxígeno en el seno del líquido (%)

RESUMEN

Las potenciales aplicaciones de la cutinasa ANCUT1, producida por *Aspergillus nidulans* y cuyo gene fue clonado en *Pichia pastoris* hace necesario incrementar su producción utilizando esta levadura como sistema de expresión heterólogo. El objetivo de este trabajo fue mejorar los niveles de productividad volumétrica (Q_p) obtenidos en matraz. Inicialmente se determinó el efecto de variar las condiciones de cultivo, como lo son pH, concentración de inductor y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) para ser utilizado como criterio de escalamiento, de manera que la mejor condición encontrada en matraz Erlenmeyer convencional fuera reproducible en un biorreactor. Se encontró que la mejor Q_p en matraz Erlenmeyer de 250 mL se obtiene a un k_La teórico de 96 h^{-1} con una $Q_p = 15989 \pm 2040 \text{ U/L h}$ utilizando como fuente de carbono e inductor metanol al 1.5% y un pH final de 6, se obtuvo una mayor velocidad específica de crecimiento utilizando esta fuente de carbono, por lo que la expresión de la proteína está asociada al crecimiento de la levadura. La concentración de proteína total soluble es muy similar en un intervalo de k_La de 10 a 80 h^{-1} con un promedio de 70 mg/L, a partir de un $k_La = 96 \text{ h}^{-1}$ hay incremento en la concentración de proteína extracelular. La determinación del k_La se realizó tanto en matraces experimentalmente como empleando una correlación empírica para ser utilizado como criterio de escalamiento. Posteriormente se determinó el k_La en un biorreactor (Applikon) para reproducir la Q_p obtenida en matraces, lo que arrojó un valor promedio de 16374 U/L h a partir de las 36 h de cultivo bajo condiciones controladas en el biorreactor por duplicado. De esta forma con esta estrategia de cultivo se mejoró la Q_p en matraz y se llevó a un biorreactor y bajo condiciones controladas mejoró la Q_p de *P. pastoris* para la expresión de la ANCUT1 recombinante. En este trabajo se presenta por primera vez el escalamiento de la producción de una cutinasa recombinante utilizando como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cutinasas

Son enzimas que unen las propiedades catalíticas, bioquímicas y estructurales de las lipasas y las esterases, ya que presentan un plegamiento típico de las carboxilesterasas, que consiste en una estructura tipo α/β (Borreguero *et al.* 2001). Presentan la clásica triada catalítica compuesta por residuos de Ser, His y Asp o Glu; aminoácidos presentes dentro del sitio activo, en el cual el residuo de serina actúa como nucleófilo, por lo que su mecanismo catalítico es similar al que presentan otras hidrolasas como las serín proteasas. Además, de contar con un pentapéptido consenso Gly-Tyr/His-**Ser**-X-Gly presente comúnmente en las lipasas y tener una cavidad oxianiónica preformada y no requerir activación interfacial para la catálisis (Borreguero *et al.* 2001). En el caso de la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi* (figura 1), la tríada catalítica Ser120-Asp175-His188 es accesible al disolvente y se encuentra en un extremo elipsoide de la proteína; está rodeado por los lazos de 80 a 87 y por el lazo más hidrofóbico al 180-188 (Carvalho *et al.*, 1998). El sitio catalítico de la cutinasa no está protegido por una tapa y no presenta actividad interfacial, siendo estas características particulares de las cutinasas. El peso molecular de estas enzimas varía en un intervalo entre 20 y 60 kDa (Chen *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2005; Egmond y De Vlieg, 2000). La producción de cutinasas parece ser altamente regulada por las condiciones de crecimiento del microorganismo empleado. La cutinasa de *F. solani pisi* es reprimida por glucosa y glicerol e inducida por cutina o sus mayores constituyentes. El grupo hidroxilo en la posición ω en el ácido graso es el factor importante para inducir la actividad y por otro lado alcoholes primarios *n*-alifáticos de 14 o más átomos de carbono también son buenos inductores de la enzima (Li *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 1998).

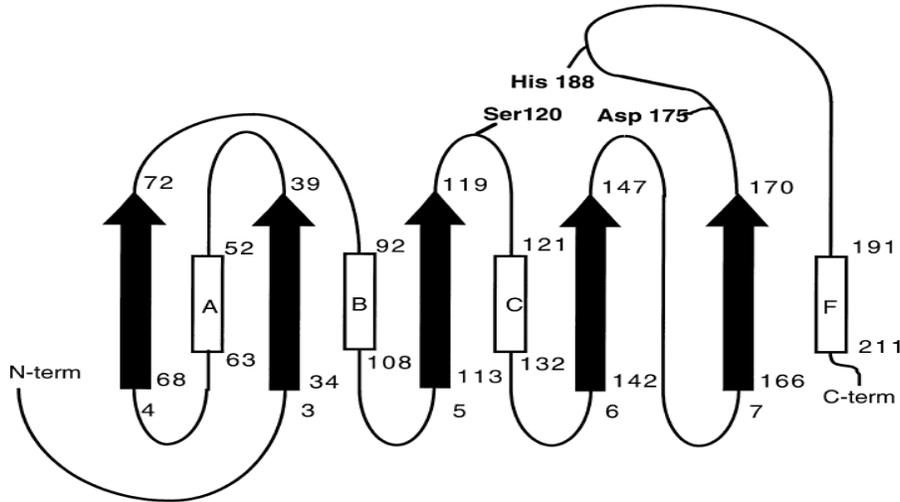


Figura 1. Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi*. Se indica la triada del sitio activo (Ser120-Asp175-His 188), las cinco cadenas beta (flechas negras numeradas del 3-7) y cuatro hélices (marcadas A, B, C y F). Los números en el lado derecho de los elementos de la estructura secundaria señalan el inicio y final de estos elementos. Figura tomada de Egmond & de Vlieg (2000).

Estas serán hidrolasas específicas que catalizan la hidrólisis del polímero cutina. Un polímero que es un componente estructural de la cutícula de las plantas, formado por ácidos grasos de cadena larga principalmente palmítico (16:0) y oleico (18:1) que pueden estar hidroxilados o epoxidados en la parte media de la cadena o al final, en el lado opuesto al grupo carboxilo y se encuentran unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (figura 3) (Kolattukudy et al., 1980). La cutina es el componente principal de la cutícula, la cubierta exterior de la epidermis de las plantas como se observa en la figura 2. Su función primordial de esta capa es proteger a las plantas contra la desecación y el ataque de patógenos (Taiz & Zeiger, 2002). La degradación enzimática de la red es el primer paso de invasión, debido a que algunos microorganismos la utilizan como única fuente de carbono (Egmond & De Vlieg, 2000; Carvalho et al., 1998). La cutinasa del patógeno de chícharo *Fusarium solani pisi* es la más investigada, incluyendo su identificación genética, clonación, expresión, caracterización, elucidación de su estructura y aplicaciones (Egmond & De Vlieg, 2000). Desde entonces se han purificado cutinasas de varios hongos fitopatógenos.

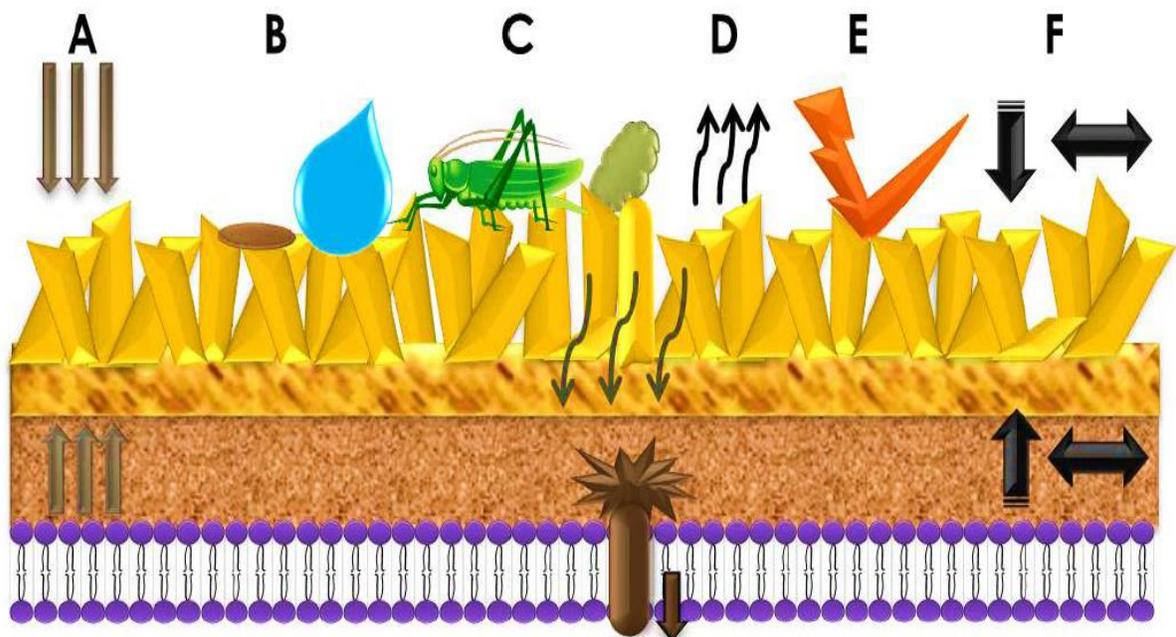


Figura 2 Principales funciones de la cutícula en las plantas. A) Reducción de la pérdida de agua y difusión de gases. B) Evita acumulación de agua y polvo. C) Participa en las interacciones planta-insecto. D) Participa en la traducción de señales para la activación de genes específicos. E) Controla los cambios de temperatura. F) Provee soporte mecánico (Tafolla, *et al.*, 2013).

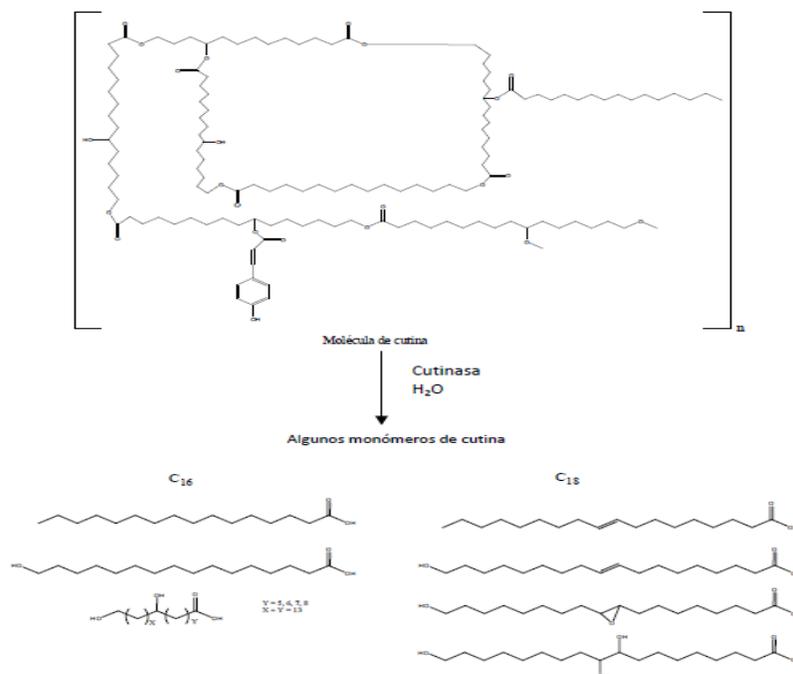


Figura 3 Reacción de hidrólisis de la cutina (Vergara, 2010).

Cabe destacar que las cutinasas no sólo muestran una actividad hidrolítica hacia cutina, sino también hacia ésteres solubles, triglicéridos insolubles, fibras sintéticas, plásticos, entre otros sustratos (Chen *et al.*, 2010). Estas enzimas pueden llevar a cabo reacciones de interés biocatalítico en medios orgánicos, en dónde el equilibrio de la reacción se invierte hacia la síntesis de compuestos por medio de reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación, siempre y cuando la actividad del agua (a_w) se mantenga baja, ya que así se evita que el agua libre pueda competir para realizar la reacción de hidrólisis (Lountos *et al.*, 2004).

1.2 Géneros productores

La producción de cutinasas se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en medios que únicamente contenían cutina como fuente de carbono (Trail & Koller, 1990) y posteriormente se reportó la producción en otros sistemas biológicos, como en polen de plantas, bacterias, levaduras y hongos saprófitos. Algunos de los microorganismos productores se enlistan en la tabla 1. La producción de las cutinasas está influenciada por el tipo y la concentración de fuente de carbono y nitrógeno, el pH del medio, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto. Aunque la mayoría de las cutinasas microbianas se producen por cultivo sumergido, las fermentaciones en estado sólido también se han reportado (Speranza *et al.*, 2011; Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Las cutinasas junto con otras hidrolasas como celulasas, pectinasas y poligalacturonasas se conocen en conjunto como CWDE (Enzimas degradadores de la pared celular) y forman parte de los mecanismos de invasión de organismos fitopatógenos (Kapat *et al.*, 1998; Kikot *et al.*, 2009).

Tabla 1 Géneros productores de cutinasas.

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Alternaria</i>	<i>alteARNta</i>	Tanabe <i>et al.</i> , 1988
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2005
	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	Van Kan <i>et al.</i> , 1997
	<i>Colleotrichum</i>	<i>gloesporioides</i>	Dickman & Suresh, 2009
	<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	Martínez <i>et al.</i> , 1992
	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	Rubio <i>et al.</i> , 2008
	<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	Abu Bakar <i>et al.</i> , 2005
Bacterias	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>	McQueen & Schottel, 1987
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Sebastian & Kolattukudy, 1987
	<i>Thermonospora</i>	<i>fusca</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	sp.	Masaki <i>et al.</i> , 2005
Polen	<i>Tropaelum</i>	<i>majus</i>	Maiti <i>et al.</i> , 1979
	<i>Brassica</i>	napus	Hiscock <i>et al.</i> , 1994

(Dutta *et al.*, 2009)

1.3 Aplicaciones de las cutinasas

Debido a la heterogeneidad de las estructuras que se encuentran en las esterificaciones de cutina, las cutinasas se han propuesto para uso en una amplia variedad de aplicaciones en diferentes procesos industriales como lo son los procesos de limpieza, biodegradación de polímeros, producción de ésteres, incremento de la permeabilidad de la superficie de frutas y vegetales, etc (Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Fontes & Alves, 2009). Además, son enzimas que hidrolizan una variedad de ésteres de cadena corta a larga y con el uso de medios no acuosos o de baja actividad de agua pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos (Bordusa, 2002). Pueden ser utilizadas en aplicaciones como lo son la degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, así como

la producción de biodiesel, en la industria alimentaria, farmacéutica, agricultura y más (Bornscheuer, 2002; Dutta, *et al.*, 2009). A continuación se detallan algunas de las aplicaciones más sobresalientes.

1.3.1 Modificación de grasas y aceites

La estructura básica de grasas y aceites puede ser modificada de diferentes maneras: Hidrogenación, hidrólisis, y reorganización de ácidos grasos en la cadena principal del triglicérido (interesterificación). De esta manera, un aceite de bajo costo puede ser modificado en un producto con aplicaciones importantes y un alto valor para diferentes industrias. En el caso de la industria de alimentos el valor nutricional, sensorial y las propiedades físicas de un triglicérido son aspectos importantes que son influenciados enormemente por factores tales como: La posición estereoespecífica del ácido graso en el triglicérido, el largo de cadena del ácido graso y su grado de insaturación; que pueden ser modificados enzimáticamente empleando cutinasas a bajas a_w (Dutta, *et al.*, 2009).

Regado y colaboradores en el 2000 realizaron un análisis de la hidrólisis parcial de grasas de leche de vaca, ovejas y cabras empleando lipasas microbianas y la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi*. Los ácidos grasos liberados fueron analizados por HPLC. El grado de hidrólisis y el perfil de los ácidos grasos de los productos finales fueron similares a los obtenidos con las lipasas comerciales. Sin embargo, la cutinasa presentó la más alta actividad frente a ácidos grasos de cadena corta con un 34% de hidrólisis.

1.3.2 Síntesis de aromas

Los ésteres terpénicos de ácidos grasos de cadena corta son aceites esenciales con gran campo de aplicación como saborizantes y compuestos que imparten aroma natural que son usados en industrias como la cosmética, farmacéutica y

alimentos. Entre los más importantes están los acetatos, propionatos y butiratos de alcoholes acíclicos; generalmente obtenidos por síntesis química, fermentación y extracción de fuentes naturales. Sin embargo, tales métodos son costosos y con bajos rendimientos de producción. Es por esto que el de la catálisis enzimática puede incrementar los rendimientos a nivel industrial (Klibanov, 2001). Por ejemplo, el butirato de etilo y el acetato de isoamilo son compuestos encontrados en el aroma de fresas y plátanos, respectivamente (MacCabe *et al.*, 2002). La síntesis de ésteres mediante reacciones de síntesis directa en solventes orgánicos o transesterificación catalizadas por enzimas lipolíticas han sido ampliamente reportada (Sharma *et al.*, 2001). La cutinasa recombinante de *F. solani pisi* en micelas reversas fue empleada para catalizar la reacción de transesterificación de butil acetato con hexanol para obtener hexil acetato, un éster de cadena corta con aroma frutal. El empleo de cutinasas en reacciones de transesterificación de etanol y ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) en medio orgánico también ha sido estudiado, obteniéndose buenos rendimientos de los ésteres sintetizados que van del 84 al 97% (de Barros, *et al.*, 2009).

1.3.3 Lipofilización de antioxidantes naturales

La familia de ácidos fenólicos está compuesta por derivados del ácido cinámico y benzoico. Su estructura está caracterizada por la presencia de un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilos, o un grupo metoxilo, junto con un grupo carboxilo. Estos compuestos son antioxidantes hidrofílicos, presentes ubicuamente en frutas, hierbas aromáticas y vegetales. Son de interés particular debido a sus propiedades potenciales como antioxidantes, quelantes, antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y anticarcinógenos. Los ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico, cumárico, etc.) tienen baja solubilidad en aceites y esto no permite su uso en diferentes productos con base lipídica (MacCabe *et al.*, 2002).

Los antioxidantes en alimentos retardan la rancidez causada por la oxidación atmosférica protegiendo así los lípidos y los compuestos liposolubles como vitaminas o carotenoides.

Por lo tanto, la lipofilización o modificación de estos compuestos vía esterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes) se puede emplear como una herramienta para modificar su solubilidad en interfases agua-aceite, aire-aceite manteniendo sus propiedades funcionales originales. La esterificación química y enzimática de compuestos fenólicos ha sido reportada por diversos autores. Stamatis *et al* en 1999 estudiaron la esterificación enzimática de antioxidantes fenólicos naturales como los derivados de ácido benzoico y cinámico con alcoholes alifáticos, monosacáridos y alquilglucósidos empleando varias lipasas con un rendimiento del 97 %, estererasas 59% y cutinasas 67 % en medios no acuosos.

1.3.4 Detergentes

Las cutinasas han sido evaluadas como enzimas lipolíticas en formulaciones de detergentes para lavandería y lavaplatos. La cutinasa presentó buena estabilidad frente a agentes oxidantes como H_2O_2 , frente a la temperatura en un intervalo de 20 a 50°C el cual es ideal desde el punto de vista de limpieza, además son estables en un intervalo de pH de 8 a 11 que está presente en muchos productos de limpieza y también en presencia de otras enzimas como lo son proteasas, lo que las hace útiles para estar mezcladas en una formulación. Por estas razones las cutinasas son más benéficas que la lipasa comercial (LipolaseTM) en la remoción de triacilgliceroles en un solo proceso de lavado, así como en la hidrólisis de grasas en ausencia de calcio (Kolattukudy, 1994).

1.3.5 Rol de las cutinasas en biodegradación

Las cutinasas pueden ser usadas también en el tratamiento de aguas residuales, donde el contenido de grasa bloquea tuberías y disminuye el oxígeno disponible en el agua. Por ejemplo la cutinasa recombinante clonada en *Saccharomyces cerevisiae* fue empleada para degradar residuos sólidos de la industria del cuero mostrando una actividad específica 3 veces mayor que la lipasa comercial Defat 50 (Tales, 2001). También se ha reportado que degradan el malatión (figura 4), que es un insecticida organofosforado para el control de plagas y se sabe que permanece en productos lipídicos por un largo periodo y afecta el sistema nervioso central de invertebrados, sistema inmune de vertebrados y glándulas adrenales (Dutta *et al.*, 2009). Por otro lado, Kim y colaboradores en el 2005 reportó que las cutinasa de *Fussarium oxysporum* degrada el malatión hasta el 60% de la concentración inicial a los 30 minutos de reacción comparado con las estererasas de levaduras que degradan el 35% después de 48 h; además los subproductos de reacción de la hidrólisis por la cutinasa no son tóxicos.

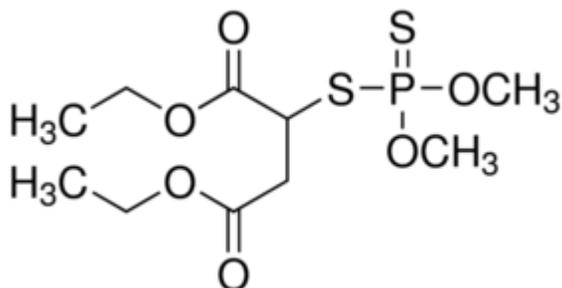


Figura 4 Estructura del insecticida malatión.

Los polímeros son de gran importancia y su producción ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, el excesivo consumo de plásticos sintéticos derivados del petróleo ha tenido un impacto adverso en el medio ambiente debido a que la mayoría de estos plásticos sintéticos no se degrada en el ambiente (Masaki *et al.*, 2005). Por esta razón, el desarrollo de polímeros o compuestos biodegradables, se presenta como una solución a la conservación del medio ambiente y al impulso de nuevas aplicaciones. A la fecha, se han desarrollado algunos tipos de poliésteres biodegradables como el poli-(ácido láctico) (PLA), poli

(butileno succinato) (PBS), poli-(butileno succinato-co-adipato) (PBSA) y poli-(caprolactona) (PCL), sin embargo, su costo de producción sigue siendo elevado comparado con los plásticos sintéticos no degradables. La comprensión de los mecanismos por los cuales los polímeros sintéticos naturales o sintéticos son degradados por las enzimas microbianas sería útil en el diseño de nuevos plásticos degradables. Las cutinasas son enzimas capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres sintéticos. La degradación de plásticos biodegradables ha sido reportada para las cutinasas de los microorganismos *F. solani* f. sp. *pisi*, *Pseudozyma jejuensis* sp., *Aspergillus oryzae* y *Cryptococcus* sp. (Dutta *et al.*, 2009).

1.3.6 Producción de biodiesel

El biodiesel es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales o grasa animal mediante el proceso de transesterificación. Químicamente se describe como una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena corta o larga (Panda & Gowrishankar, 2005). Se obtiene por la transesterificación de triacilgliceroles (TAG) de aceites vírgenes o usados o grasa animal (figura 5), que se hacen reaccionar con alcoholes primarios de cadena corta para formar alquil ésteres de ácido graso y glicerol utilizando un biocatalizador como las cutinasas con condiciones de reacción muy nobles (30 a 50°C) (Enweremadu & Mbarawa, 2009).

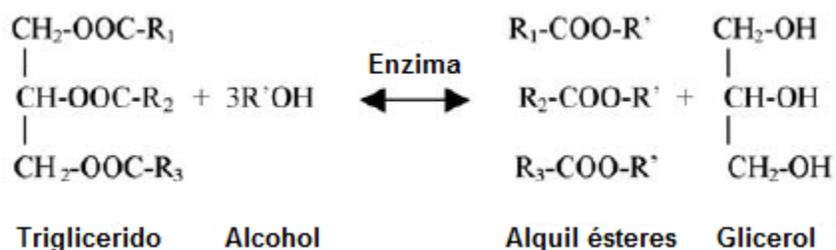


Figura 5 Ejemplo de la reacción de transesterificación entre un TAG y un alcohol para la formación de alquil ésteres (modificada de Enweremadu & Mbarawa, 2009).

Se han reportado diversos estudios que emplean enzimas lipolíticas, principalmente lipasas en reacciones de transesterificación para la producción de biodiesel (Panda & Gowrishankar, 2005). Este tipo de reacción también ha sido evaluado usando esterases y cutinasas empleando varios sistemas. Por ejemplo, la cutinasa de *F. solani f. sp. pisi* fue usada para catalizar la entre una mezcla de triacilglicéridos y metanol en micelas reversas de bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) en isooctanato con el propósito de producir biodiesel (Badenes *et al.*, 2010). Los estudios se realizaron por lotes en pequeña escala y se evaluó la influencia de la concentración inicial de enzima y alcohol, así como la relación molar de sustrato. Se obtuvieron conversiones de 75 % en tiempos de reacción de 24 horas, lo cual hace el proceso enzimático altamente competitivo cuando se compara con reacciones similares catalizadas por lipasas para la producción de biodiesel empleando metanol. La reacción de transesterificación de butil acetato con hexanol en medio orgánico ha sido evaluada usando cutinasas en muchos sistemas (Serralha *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1997). La reacción de metil propionato con propanol se ha estudiado empleando cutinasas a diferentes niveles de hidratación (Lamare & Legoy, 1995).

Como podemos observar las cutinasas tienen un amplio campo de aplicación. Sin embargo, hasta el momento no hay ninguna preparación de cutinasas que se esté comercializado para su uso a escala industrial (Halonen *et al.*, 2009).

Hay muy pocos reportes disponibles en la literatura de bioprocesos para la producción de cutinasas en biorreactores (Parvaresh *et al.*, 1992; Goncalves *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Seman *et al.*, 2014). Por lo que es importante tener estudios del escalamiento de la producción de cutinasas y también pocos estudios de cutinasas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* (Lauwereys *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2004; Seman *et al.*, 2014).

Por lo que el uso de sistemas de expresión de las proteínas recombinantes puede mejorar la producción de cutinasas recombinantes. Estos sistemas de expresión

pueden ser procariontes o eucariontes, la selección depende de las propiedades de la proteína, de esta manera se escoge un hospedero adecuado, que permita obtener una proteína de calidad, funcional, con una velocidad y rendimiento de producción mayor al sistema nativo (Demain & Vaishnav, 2011; Yin *et al.*, 2007). En el mercado hay una gran variedad de sistemas de expresión como se muestra a continuación:

Procarionte:

E. coli, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Ralstonia eutropha*, *Staphylococcus carnosus* y *Streptomyces lividans*.

Eucarionte:

Levaduras (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia mathanolica*, *Arxula adenivorans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida boidinii* y *Schizosaccharomyces pombe*)(Böer *et al.*, 2007; Çelik & Çalik, 2012), Hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Acremonium chrysogenu* y *Chrysosporium lucknowense*), Células de insectos (*Spodoptera frugiperda*), Células de mamíferos (CHO, mielomas de ratón, SF-9, BHK, HEK) y células vegetales (Demain & Vaishnav, 2011).

En el siguiente capítulo nos enfocaremos en aspectos generales del sistema de expresión de la levadura *Pichia pastoris*.

1.4 *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica comúnmente utilizada como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes para la industria biofarmacéutica y enzimática. Investigaciones en SIBIA aislaron el gene y promotor para la alcohol oxidasa, además de la generación de vectores, cepas y protocolos para la manipulación genética (Cereghino & Cregg, 2000). *Pichia pastoris* se caracteriza por (i) un crecimiento rápido; (ii) niveles altos de

productividad de proteínas recombinantes; (iii) eliminación de contaminación por endotoxinas y bacteriófagos; (iv) fácil manipulación genética por vectores de expresión bien caracterizados; (v) ausencia de patogenicidad en humanos; (vi) diversidad de modificaciones post-traduccionales que incluyen plegamiento de polipéptidos, O- y N-glicosilación, metilación, acilación, modificación proteolítica (Rabert *et al.*, 2013). Secreta bajos niveles de proteína endógena comparado con los niveles de proteína recombinante del total presente en los sobrenadantes del cultivo (Athmaram, 2013). *P. pastoris* es una levadura GRAS (Cregg *et al.*, 1993; Ciofalo *et al.*, 2006), y es útil para el escalamiento en la producción de proteínas heterólogas en diferentes tipos de biorreactores (Baumgartner *et al.*, 2002).

1.4.1 Ventajas del uso de *P. pastoris* como sistema de expresión

Dos de los factores más importantes para el éxito de *Pichia pastoris* como sistema de expresión en relación con otras especies de levaduras son:

El primer factor es la preferencia de esta levadura para crecer mediante metabolismo aeróbico (respiración) facilita en gran medida obtener cultivos de alta densidad celular, también previene la acumulación de metabolitos secundarios como etanol y ácido acético (Cereghino *et al.*, 2002). Simplemente, transforma la fuente de carbono en biomasa. Debido a que la productividad volumétrica de un proceso de producción es generalmente proporcional a la densidad de la biomasa generada, la capacidad de este organismo de crecer fácilmente a densidades celulares ultra altas es una gran ventaja.

El segundo factor es un fuerte y eficiente promotor de la alcohol oxidasa (Noseda *et al.*, 2013), que se relaciona con la capacidad de *P. pastoris* de crecer en metanol como única de carbono y fuente de energía. Al igual que muchas vías alternativas para el metabolismo de carbono, el crecimiento en metanol requiere la inducción de un conjunto específico de enzimas metabólicas. Dos de estas enzimas, la alcohol oxidasa (AOX) y la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), aunque están ausentes en las células cultivadas en glucosa o en otras fuentes de carbono, cada uno puede constituir aproximadamente el 30% del total de proteínas en las

células cultivadas en metano (Cereghino & Cregg, 2000). La regulación espectacular de los niveles de las proteínas AOX y DHAS es controlada principalmente a nivel de la transcripción de sus genes, *aox1* y el *das*. Como sistema, el eucarionte es capaz de glicosilar proteínas, aunque no en todos los casos los azúcares que emplea en este proceso son compatibles con los utilizados por otros sistemas eucariontes.

Las ventajas que tiene *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas son el empleo de promotores inducibles y constitutivos para la expresión de proteínas recombinantes, diferentes cepas y vectores, como se muestran las tablas 2 y 3.

Tabla 2 Sistema de vectores comerciales (Ahmad *et al.* 2014).

Proveedor	Promotor	Secuencia señal	Selección en levadura	Selección en bacteria	Comentario
Lifetechnologies	AOX1, FLD1, GAP	α -MF, PHO1	Blasricina, G418, zeocina, HIS4	Zeocina, ampicilina, blasticina	c-myc epitope, V5 epitope, C-terminal 6xHistag
Lifetechnologies Pichia pink	AOX1	α -MF, 8 diferentes secuencias señal	ADE2	Ampicilina	Vectores de alta copia y baja
BioGrammatics	AOX1	α -factor	Zeocina, G418	Ampicilina	Intracelular o extracelular
BioGrammatics	GAP	-	Zeocina, G418, higromicina	Zeocina, ampicilina, kanamicina	Transferasa humana de GlcNAc
DNA2.0	AOX1	10 diferentes secuencias señal	Zeocina, G418	Zeocina, ampicilina	Intracelular o extracelular

Tabla 3 Promotores empleados para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* (Ahmad *et al.* 2014).

Inducible	Gen correspondiente	Regulación	Referencia
AOX1	Alcohol oxidasa 1	Inducible MeOH	Tschopp <i>et al.</i> 1987
DAS	Dihidroxiacetona sintasa	Inducible MeOH	Ellis <i>et al.</i> 1985; Tschopp <i>et al.</i> 1987
FLD1	Formaldehído deshidrogenasa 1	Inducible MeOH o metilamina	Shen <i>et al.</i> 1998
ICL1	Isocitratoliasa	Represión por glucosa Inducción por etanol	Menendez <i>et al.</i> 2003
PHO89	Simportador Na ⁺ / fosfato	Inanición de fosfato	Ahn <i>et al.</i> 2009
THI11	Gen biosíntesis de tiamina	Reprimido por tiamina	Sradlmayr <i>et al.</i> 2010
ADH1	Alcohol deshidrogenasa	Represión por glucosa y metanol; inducido por glicerol y etanol	Cregg & Tolstorukov 2012
ENO1	Enolasa	Reprimido por glucosa, metanol y etanol; inducido por glicerol	Cregg & Tolstorukov 2012
GUT1	Glicerol cinasa	Inducido por glucosa, glicerol o etanol; reprimido por metanol	Cregg & Tolstorukov 2012
Constitutivo	Gen correspondiente	Regulación	
GAP	Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa	Expresión constitutiva por glucosa	Waterham <i>et al.</i> 1997
TEF1	Factor de elongación de traducción	Expresión constitutiva por glicerol y glucosa	Ahn <i>et al.</i> 2007
PGK1	3-fosfoglicerato cinasa	Expresión constitutiva por glucosa	de Almeida <i>et al.</i> 2005
GCW14	GPI	Expresión constitutiva por glicerol glucosa y metanol	Liang <i>et al.</i> 2013
G1	Transportador glucosa de alta afinidad	Limitación de glucosa, reprimido por glicerol	Prielhofer <i>et al.</i> 2013
G6	Aldehído deshidrogenasa	Limitación de glucosa, reprimido por glicerol	Prielhofer <i>et al.</i> 2013

La combinación de promotores y vectores, junto con la variedad de cepas de *P. pastoris* (silvestres, auxotróficas, deficientes en proteasas, glicoingeniería y otros tipos) permiten su manipulación para la producción de proteínas heterólogas.

La productividad de un sistema depende de muchos factores genéticos y fisiológicos, tales como uso de codones, número de copias del gene a expresar, eficiencia de la transcripción por el uso de promotores fuertes, señales de traducción, procesamiento y plegamiento en el retículo endoplasmático y el

aparato de Golgi, secreción por péptidos señal y también de la optimización de la estrategia de cultivo (Cos *et al.*, 2006).

1.4.2 El promotor de la AOX1

Existen 2 genes que codifican para la alcohol oxidasa en *P. pastoris*: AOX1 y AOX2. El AOX1 regula la mayor actividad de la alcohol oxidasa en la célula con un 90% de producción, mientras que el AOX2 el 10% (Cos *et al.*, 2006). La expresión del gen AOX1 es controlada a nivel de transcripción. Su regulación implica dos mecanismos: uno de represión/depresión y otro más de inducción muy similar a la regulación del gen GAL1 en *Saccharomyces cerevisiae*, pero a diferencia del gen GAL1, la ausencia de una fuente de carbono represora en el medio como glucosa no resulta en la transcripción del gen AOX1 y la presencia de metanol es indispensable para inducir altos niveles de transcripción (Cereghino & Cregg, 2000).

El promotor que regula la producción de la enzima alcohol oxidasa es utilizado para llevar a cabo la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*.

1.4.3 Metabolismo del metanol

Hay 3 tipos de cepas disponibles que varían con su habilidad de utilizar el metanol. La cepa silvestre (Mut⁺), y esas que resultan de la delección en el AOX1 (Mut^s) o ambos genes de la AOX (Mut⁻) (Cos *et al.*, 2006). La utilización de *P. pastoris* como sistema de expresión radica en que algunas de las enzimas requeridas para el metabolismo del metanol solo están presentes en niveles observables cuando las células crecen en metanol, es decir, son inducibles. La enzima alcohol oxidasa (AOX) cataliza el primer paso de la vía, la oxidación del metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno utilizando oxígeno molecular. Debido a que la alcohol oxidasa tiene una baja afinidad por el oxígeno, se producen grandes cantidades de esta enzima para compensarlo (Zhang *et al.*, 2000). Dado que el peróxido de hidrógeno es tóxico para la célula, esta vía se lleva a cabo en el peroxisoma que contiene enzimas como la catalasa que

degradan las formas reactivas de oxígeno y evita que las células se intoxiquen. Parte del formaldehído que se genera es liberado en los peroxisomas y es posteriormente oxidado a ácido fórmico y después a dióxido de carbono por dos deshidrogenasas citosólicas en reacciones que generan energía para la célula. El formaldehído restante es asimilado para generar constituyentes celulares mediante una vía cíclica que comienza con la condensación de formaldehído con xilulosa 5-monofosfato, una reacción catalizada por una tercera enzima que se encuentra en el peroxisoma, la dihidroxiacetona sintasa (DHAS). Los productos de esta reacción, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona abandonan el peroxisoma y entran en una vía citosólica que regenera la xilulosa 5-fosfato y por cada tres vueltas del ciclo una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (figura 6). Dos de las enzimas de la vía, la AOX y la DHAS están presentes en altos niveles en células que crecen en metanol, pero no en células que crecen con otras fuentes de carbono como glucosa, glicerol o etanol (Cereghino & Cregg, 2000). Niveles suficientes de metanol son requeridos durante la fase de inducción para asegurar la máxima producción de la proteína recombinante, típicamente en el intervalo de 0.1 a 2.5 % v/v, sin embargo, concentraciones más elevadas pueden causar problemas citotóxicos para la célula inhibiendo el crecimiento (Cunha *et al.*, 2004; Stratton *et al.*, 1998).

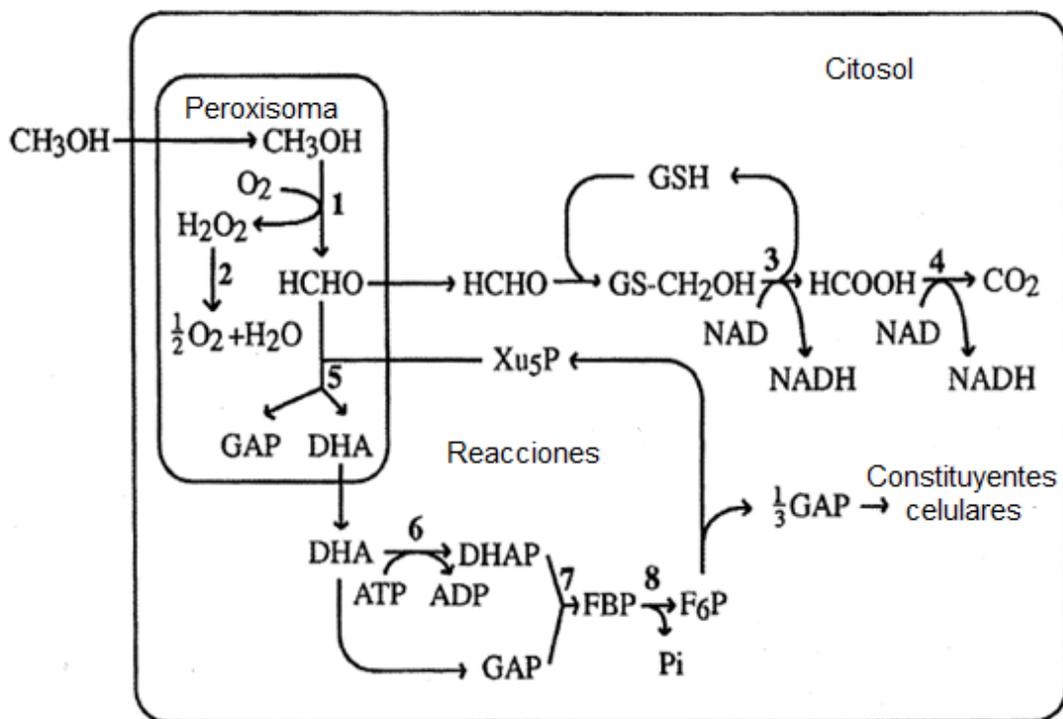


Figura 6 Metabolismo del metanol en *P. pastoris*. Enzimas que intervienen: 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, ácido fórmico deshidrogenasa; 5, dihidroxiacetona sintasa; 6, dihidroxiacetona cinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa; 8, fructosa 1,6-bisfosfatasa (Modificada de Cereghino & Cregg, 2000).

Esta levadura es un organismo útil para el escalamiento en la producción de proteínas heterólogas en diferentes tipos de biorreactores (Noseda *et al.*, 2014).

1.5 Escalamiento

Escalar de un matraz agitado a un biorreactor ha sido complicado por la falta de conocimiento sobre la influencia de las condiciones operacionales sobre los fenómenos de transferencia (masa, calor y momentum). Sin embargo, en años recientes las propiedades de matraces agitados han sido descritas con modelos empíricos. Por ejemplo la caracterización de la transferencia de masa, la caracterización del power input, estrés hidrodinámico y el movimiento del fluido. Una estrategia práctica de escalamiento para cultivos aerobios de matraces agitados a biorreactores en modo batch y continuo, es utilizar la estrategia basada

en correlaciones empíricas del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La (Seletzky *et al.*, 2007). Otra opción es medir el oxígeno suministrado durante el cultivo utilizando un sensor que no altere el patrón de flujo y de esta manera poder ajustar las condiciones de agitación (frecuencia, volumen de llenado, etc). Incluso si ambas aproximaciones se pueden realizar los resultados obtenidos permitirían una mayor eficiencia en la determinación del k_La (Klöckner & Büchs, 2012).

Muchos de los bioprocesos requieren oxígeno como sustrato para el crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos obtenidos de los microorganismos en estudio. Sin embargo, esta molécula es muy poco soluble en los medios de cultivo y su solubilidad es afectada por factores como: sales, temperatura, pH, viscosidad, presión, entre otros; por lo que es necesario un suministro continuo de este gas, debido a esto se debe conocer la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) de la fase gaseosa a la fase líquida y con ello se podría optimizar y escalar el proceso. La máxima velocidad de transferencia de masa del gas al líquido en un biorreactor puede ser estimada del producto k_LaC^* , siendo C^* la concentración de saturación en la fase líquida.

Los bioprocesos son realizados una vez que se ha obtenido una optimización de las condiciones de cultivo (pH, temperatura, presión, mezclado, concentración de nutrientes). En general la velocidad de transferencia de masa es difícil de medir, porque diferentes fenómenos toman lugar de manera simultánea. Por lo tanto esta velocidad es influenciada por un gran número de parámetros (propiedades físicas del gas y el líquido, condiciones operacionales y parámetros geométricos del biorreactor) (García-Ochoa & Gomez, 2009).

Los bioprocesos involucran transportes simultáneos y reacciones bioquímicas. En ocasiones, el transporte de sustratos a la célula ocurre a una velocidad mayor que la velocidad de las reacciones bioquímicas en el metabolismo; en este caso, la velocidad de conversión del sustrato es gobernada sólo por la cinética de las reacciones bioquímicas. Sin embargo, si la velocidad de transferencia de masa es menor que la velocidad de reacción, la velocidad de transporte puede ser el paso que controla la velocidad del proceso, aunque la velocidad de transferencia de

masa podría ser influenciada por la velocidad de las reacciones bioquímicas del bioproceso (Van Swaaij & Versteeg, 1992).

La absorción del oxígeno dentro de un caldo de fermentación puede ser considerado como la absorción de un gas dentro de un líquido, donde esta especie reacciona, el oxígeno es consumido por las células viables, y por lo tanto una mejora de la velocidad de transferencia de oxígeno puede tomar lugar (García-Ochoa & Gomez, 2005)..

1.5.1 Velocidad de transferencia de oxígeno (OTR)

El transporte de oxígeno de una burbuja de aire a la célula puede ser representado en la figura 7. La película del líquido alrededor de las burbujas es la resistencia que controla la velocidad de la transferencia, tomando en cuenta que el oxígeno es poco soluble en agua, es aceptado que la mayor resistencia para la transferencia de masa ocurre del lado del líquido en la interfase gas-líquido, por lo que el coeficiente de transferencia de masa es igual a $k_L a$.

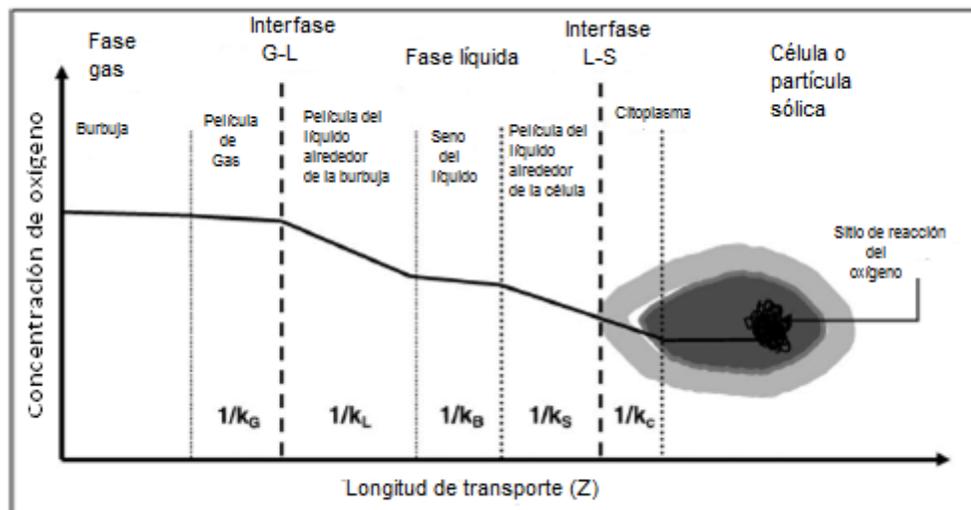


Figura 7 Transferencia de oxígeno de la burbuja de aire a la célula (modificada de Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

La velocidad de transferencia de masa de oxígeno por unidad de volumen del reactor, N_{O_2} , es obtenida multiplicando el flujo general por el área de la interfase gas-líquido por unidad de volumen del líquido:

$$N_{O_2} = k_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Ec 1})$$

Debido a la dificultad de medir k_L y a separadamente, se suele medir el producto $k_L a$ llamado coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno que caracteriza el transporte de la fase gas a la líquida.

La determinación de $k_L a$ en el biorreactor es esencial para establecer la eficiencia de la aireación y para cuantificar los efectos de las variables operacionales sobre el suministro de oxígeno disuelto (Shuler & Kargi, 2002).

1.5.2 Métodos para medir $k_L a$

Cuando se selecciona un método para la medición de $k_L a$ se deben tomar en cuenta los siguientes factores (Novak & Klekner, 1988):

- La aireación y homogenización del sistema empleado.
- El tipo de biorreactor y su sistema mecánico.
- La composición del medio de cultivo.
- El efecto de la presencia del microorganismo.

El balance de materia para el oxígeno disuelto en la fase líquida puede ser establecido por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = (OTR - OUR) \quad (\text{Ec 2})$$

Donde dC/dt es la velocidad de acumulación de oxígeno en la fase líquida, OTR representa la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la líquida y OUR es la velocidad de oxígeno captado por el microorganismo.

Los métodos más comunes aplicados para medir la velocidad de transferencia de oxígeno en un bioproceso pueden ser clasificados dependiendo si la medición se realiza en ausencia de microorganismo o células muertas o si la medición es en presencia de biomasa que consume oxígeno en el tiempo de medición.

1.5.3 Métodos para la medición de $k_L a$ en ausencia de microorganismo

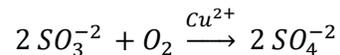
En ausencia de biomasa la OUR=0 ya que no hay consumo de oxígeno.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (\text{Ec 3})$$

Algunos métodos de medición están basados en la ecuación anterior y diferentes técnicas de medición de concentración de oxígeno disuelto puede ser usado.

1.5.3.1 Método de oxidación de sulfito de sodio

Este método está basado en la reacción de sulfito de sodio, un agente reductor que reacciona con el oxígeno disuelto para formar sulfato, la reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador (Cu^{2+} o Co^{2+}), la reacción es la siguiente:

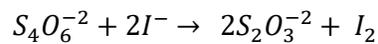
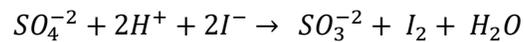


Hay un intervalo de concentración de sulfito de sodio (0.04 a 1 N), para la cual la reacción es tan rápida que la concentración de oxígeno puede ser considerada como cero. La velocidad de la reacción es más rápida que la velocidad de transferencia de oxígeno, así que la velocidad de oxidación es controlada por la velocidad de transferencia de masa (Linek & Vacek, 1981).

El procedimiento experimental consiste en primero llenar el biorreactor con una solución de Na_2SO_3 1 N conteniendo el catalizador en una concentración de 10^{-3} M de los iones antes mencionados, encendiendo el flujo de aire y empezando

el tiempo cuando el aire emerge del aspersor permitiendo la reacción de oxidación por algunos minutos, después de esto, detener el flujo de aire, agitando y tomando muestras de volúmenes conocidos en intervalos de tiempo conocidos.

Mezclando cada muestra con un exceso de Ioduro y finalmente titulando con una solución estándar de tiosulfato de sodio para un indicador de punto final. Las reacciones son:



La cantidad de sulfito residual puede ser también estimada indirectamente por la estequiometría de la reacción con base de la determinación colorimétrica de la concentración de Ioduro (Yang & Wang, 1992).

Una vez que la concentración de sulfito es medida contra el tiempo, la velocidad de consumo de sulfito es determinada y el $k_L a$ podría ser calculado de la siguiente ecuación:

$$-\frac{dC_{Na_2SO_3}}{dt} = (2k_L a C^*) \quad (\text{Ec } 4)$$

Este método de oxidación tiene una limitación, porque algunas de las propiedades fisicoquímicas son muy diferentes dependiendo del medio de cultivo principalmente por la influencia en el tamaño de la burbuja. Esos cambios causan que los valores de $k_L a$ obtenidos lleguen a ser mayores que los obtenidos por otro método (Van't Riet, 1979; García-Ochoa & Gomez, 1998).

1.5.3.2 Método dinámico

El método dinámico está basado en la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el medio por absorción o desorción de oxígeno. Después de un paso

en el cual hay un cambio en la concentración en la entrada del gas, el cambio dinámico en la concentración del oxígeno disuelto es analizado. En este método la ecuación puede ser usada con OUR= 0, integrando la ecuación resulta en:

$$\ln \frac{c^* - c_2}{c^* - c_1} = (-k_L a (t_2 - t_1)) \quad (\text{Ec } 5)$$

La técnica dinámica de adsorción consiste en producir la eliminación del oxígeno en la fase líquida, desplazándolo con otro gas inerte o por la adición de sulfito de sodio, hasta que la concentración de oxígeno sea igual a cero. Después el líquido se pone en contacto con aire, midiendo el incremento de la concentración de oxígeno contra el tiempo. La técnica de desorción consiste en suministrar aire hasta que se alcanza la concentración de saturación de oxígeno en el líquido. Entonces, se inyecta nitrógeno por lo que la concentración de oxígeno disuelto disminuye en función del tiempo como lo muestra la figura 8.

$$\ln \left(\frac{c_{L0}}{c_L} \right) = (k_L a t) \quad (\text{Ec } 6)$$

Por otro lado, cuando el oxígeno ha sido desorbido del medio y el oxígeno es otra vez suministrado ahora es:

$$\ln \left(1 - \frac{c_L}{c^*} \right) = (-k_L a t) \quad (\text{Ec } 7)$$

Estas ecuaciones describen el comportamiento del oxígeno disuelto con respecto al tiempo desde que se reinicia la aireación o cuando es desplazado del medio; sin embargo, es necesario tomar en cuenta que la respuesta temporal del electrodo es un parámetro crucial para la precisión de los valores de la concentración del oxígeno.

Esta técnica es interesante para estudiar la influencia de las condiciones operacionales sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, y es ampliamente empleado en la literatura (García-Ochoa & Gomez, 1998; Sánchez *et al.*, 2000; Puthli *et al.*, 2005; Djelal *et al.*, 2006).

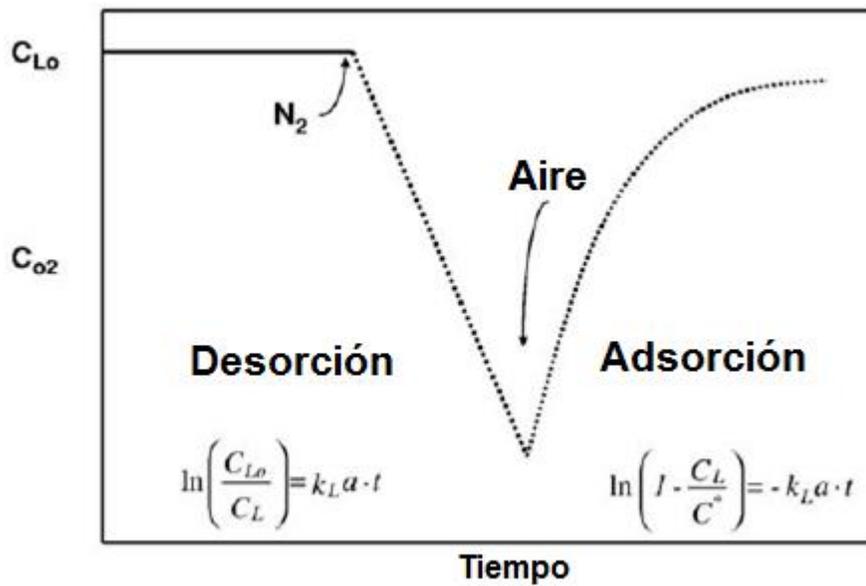


Figura 8 Descripción esquemática del método dinámico desorción-adsorción de oxígeno para la medición en condiciones inertes (modificada de Garcia-Ochoa & Gomez; 2009).

1.5.4 Medición de la OTR en un bioproceso

1.5.4.1 Método dinámico

El método mide la actividad respiratoria del microorganismo, el cual está activamente creciendo en el biorreactor. Si el gas suministrado al biorreactor es apagado, la concentración de oxígeno disuelto disminuirá a una velocidad igual al consumo por el microorganismo que está respirando. Bajo estas condiciones la ecuación puede ser simplificada de esta forma:

$$\frac{dC_L}{dt} = (-q_{O_2} C_x) \quad (\text{Ec } 8)$$

Obteniendo OUR de la pendiente del gráfico de concentración de oxígeno disuelto contra el tiempo; la concentración de la biomasa debe ser conocida en este tiempo.

Cuando la aireación es encendida, la concentración de oxígeno disuelto incrementa hasta alcanzar una concentración de oxígeno estable y con el valor estimado de OUR, $k_L a$ puede ser calculado como lo muestra la figura 9. Bajo estas condiciones, para una concentración de biomasa dada C_x y q_{O_2} conocido, la ecuación puede ser integrada, tomando en cuenta el tiempo en el cual la aireación del medio es restaurada

$$q_{O_2} C_x \Delta t + \Delta C_L = k_L a \int_{t_1}^{t_2} (C^* - C_L) dt \quad (\text{Ec 9})$$

Esta ecuación puede ser usada para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno durante el proceso de producción.

Este método es simple, sin embargo no es aplicable para situaciones donde la OUR no puede ser determinada correctamente cuando el suministro de gas es apagado.

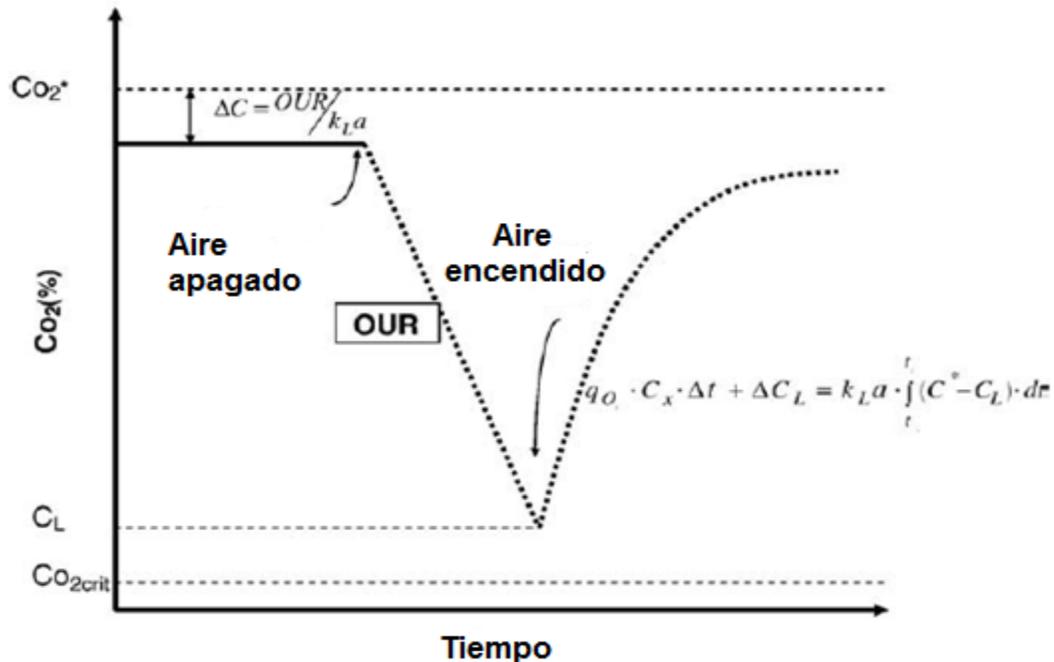


Figura 9 Descripción esquemática de la medición directa de OTR en un bioproceso por el método dinámico (modificada de Garcia-Ochoa & Gomez; 2009).

1.6 Estrategias para el cultivo de *P. pastoris* en biorreactor

1.6.1 Cultivo por lote alimentado

Una estrategia por lote alimentado es preferida sobre una en lote continuo ya que se logran altas densidades celulares y es más fácil de controlar. La regulación del pAOX1 por lote alimentado se hace en 3 fases: una fase de glicerol en lote y otra en lote alimentado y por último una fase de inducción con metanol. Las primeras 2 fases son empleadas para la producción de biomasa, en tanto la fase de inducción para la producción de la proteína recombinante. Esta medida hace posible el desacoplamiento del crecimiento celular de la expresión de la proteína recombinante. Para altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en fermentaciones de *P. pastoris* con alta densidad celular es empleado el Medio de Sales Basales (BSM) suplementado con la solución de elementos traza (PTM1) y una variación en las condiciones de cultivo, pH, agitación- oxígeno disuelto, temperatura; favorecen la optimización del proceso para aumentar la producción de la proteína recombinante de interés (Liu *et al.*, 2013).

Se han propuesto diferentes estrategias con el objetivo de maximizar la producción de proteínas recombinantes y mejorar la reproducibilidad de los procesos. A continuación se van a explicar las siguientes estrategias encontradas en la literatura:

1.6.1.1 Alimentación constante de oxígeno disuelto (OD-stat)

El oxígeno disuelto (OD) se refiere al porcentaje relativo de oxígeno en el medio de cultivo. El oxígeno es requerido en el primer paso de la ruta catabólica del metanol, y por lo tanto el OD debe mantenerse por arriba de un nivel mínimo que es el 20 %. Niveles altos de OD resultan citotóxicos y reducen significativamente la viabilidad celular. Los perfiles medidos de OD proveen información acerca de la fase de crecimiento de los cultivos.

OD-stat controla la alimentación de sustrato para mantener la concentración de OD en un nivel óptimo constante en el medio de cultivo. Esta estrategia de control permite a un cultivo alcanzar densidades celulares altas, mantiene al cultivo en un ambiente altamente productivo por un periodo prolongado durante el estado de inducción y evita la acumulación de sustrato (Lee *et al.*, 2003; Chung, 2000).

1.6.1.2 Velocidad específica de crecimiento constante (μ -stat)

Este método de control ajusta la velocidad de alimentación de metanol basado en ecuaciones de balance de materia para mantener una velocidad específica de crecimiento teórica. Esta simple aproximación puede ser implementada basándose solamente en un simple modelo de crecimiento celular, y no requiere ningún sistema de monitoreo en línea. El control de la velocidad específica de crecimiento es considerado como una estrategia efectiva para la optimización de procesos (producción de proteínas recombinantes) Manteniendo una μ constante mejora la reproducibilidad de los procesos y facilita un estudio sistemático de la velocidad de crecimiento relacionada a los efectos de la producción de proteínas heterólogas (Ren & Yuan, 2005).

1.6.1.3 Velocidad constante de alimentación de metanol

En los procesos OD-stat y μ -stat, la concentración de metanol no es medida en el bioproceso o controlada directamente. Como resultado, desviaciones de la concentración óptima de metanol, agotamiento del metanol o acumulación de esta fuente de carbono en el medio de cultivo puede ocurrir. Asegurar el monitoreo del metanol, y un subsecuente control efectivo son requisitos para la robustez y reproducibilidad de un bioproceso.

El modo de control “on-off” es la más simple estrategia de control por retroalimentación. Sin embargo, sólo es adecuada para sistemas lineales mientras que la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* es más complejo y por

lo tanto es un sistema no lineal. Otra estrategia es la proporcional-integral-derivativo (PID) efectiva para mantener la concentración de metanol. Ajustes óptimos del controlador dependen de la concentración deseada de biomasa y el volumen del medio de cultivo. Debido a la no linealidad y complejidad de la dinámica del proceso de fermentación, que están sujetos a variabilidad inherente e impuesta externamente, los ajustes óptimos del controlador PID se determinan por ajuste de prueba y error o por otros métodos empíricos (Cos *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000).

1.6.1.4 Lote alimentado limitado por oxígeno (OLFB)

En este tipo de cultivos el oxígeno es el nutriente limitante en lugar del metanol. Aunque la limitación de oxígeno debe de ser generalmente evitada durante la fase de inducción, ya que afecta adversamente los rendimientos de proteínas recombinantes, la producción exitosa de proteínas heterólogas han sido logradas bajo condiciones limitantes de oxígeno (Kathri & Hoffman, 2006; Trentmann *et al.*, 2004). Niveles bajos de oxígeno interfieren con la producción de proteínas recombinantes (Lee *et al.*, 2003; Cregg *et al.*, 2000; Bushell *et al.*, 2003), la demanda de oxígeno es reducida operando a bajas densidades celulares o bajas temperaturas, o por cepas Mut^s. En OLFB la concentración residual de metanol es mantenida constante, pero la concentración de OD es permitida para variarse. En esos procesos, el OD siempre cae a 0% debido a la limitación de oxígeno por lo que son sistemas económicamente atractivos ya que minimizan los requerimientos de oxígeno.

1.6.2 Cultivo continuo

Los cultivos continuos son divididos en tres fases: una fase preliminar en lote de glicerol y fases de lote alimentado, idénticos a esos de los cultivos por lote alimentado y la fase de alimentación continua. Debido a los tiempos de producción más largos y a los menores tiempos de inactividad del cultivo, las estrategias de

cultivo continuas a menudo dan como resultado productividades volumétricas más altas que las cultivadas en lotes alimentados.

La velocidad de dilución (D), igual a la μ en estado estacionario, son los parámetros más importantes en cultivos continuos, muchos estudios han evaluado la relación entre la producción de proteína y la D. Para cepas Mut^s (d'Anjou & Daugulis, 2000) y Mut^t (Yamawaki *et al.*, 2007; Jungo *et al.*, 2006). La concentración de proteína recombinante en estado estacionario disminuye y la productividad volumétrica aumenta con un incremento de las D. La producción de proteínas heterólogas es también fuertemente afectada por la densidad celular, y las condiciones que maximizan la Q_p no necesariamente dirigen a óptimas velocidades específicas de producción (Zhang *et al.*, 2004).

Cuando el metanol es usado como única fuente de carbono, el crecimiento celular es lento, específicamente para cepas Mut^s. Una forma para mejorar el crecimiento y la productividad es usar una mezcla de sustratos mediante una estrategia de alimentación de co-sustratos, para incrementar la concentración de la fuente de carbono y suministrar energía a las células recombinantes de *P. pastoris* y reducir los tiempos de inducción (Katatura *et al.*, 1998; Celik *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

II. ANTECEDENTES

La información obtenida a partir del genoma anotado de *A. nidulans* permite predecir que la cutinasa 1 es una proteína de 213 aminoácidos, 22.4 kDa, de localización extracelular, con actividad esterasa putativa, identificada como AN5309 (ANCUT1). El grupo de trabajo ha producido, identificado y caracterizado esta proteína en extractos crudos de *A. nidulans* PW1, usando como inductor cutícula de manzana. El extracto de ANCUT1 logró la transesterificación del antioxidante cumarato de metilo en cumarato de butilo. Esto es de interés, ya que la lipofilización de antioxidantes típicamente se reporta con lipasas como la lipasa B de *Candida antarctica* (Esqueda, 2012).

Debido a que el patrón de proteínas secretadas por *A. nidulans* es muy complejo, y a que varía dependiendo de la composición del medio, resulta difícil obtener la suficiente cantidad de la cutinasa nativa, puesto que no se encuentra en una concentración elevada en el medio de cultivo. Además, la obtención de la cutina que actúa como inductor para su producción es costosa y requiere una inversión de tiempo considerable. Por esto para purificar y caracterizar proteínas que no están en cantidad para comercializarse se han utilizado sistemas de expresión heterólogos.

Hernández en el 2013 clonó la enzima ANCUT1 de *Aspergillus nidulans* en *Pichia pastoris* X-33 usando el vector pPICZαB y posteriormente Solís en el 2014 purificó y caracterizó bioquímicamente la enzima recombinante como se muestra en la tabla 4. La productividad obtenida por Solís fue $Q_p = 2833 \text{ U/Lh}$ y una actividad volumétrica de 68 U/mL a las 24 h de cultivo a pH inicial de 6, 29 °C, utilizando agitación recíproca.

Tabla 4 Propiedades bioquímicas de ANCUT1 recombinante.

Propiedades bioquímicas	
pH óptimo	9
Estabilidad al pH	8 20% AR*
Temperatura óptima	50°C
Estabilidad a la temperatura	50°C 30% AR*
Especificidad de sustrato	Ésteres de p-nitrofenilo de cadena corta
Estabilidad solventes	Acetona e Isopropanol por 3 h
Constante de especificidad	29614.6 mM ⁻¹ min ⁻¹ p-nitrofenil acetato
Constante de afinidad	1.06 mM p-nitrofenil acetato

*AR. Actividad residual. (Solís, 2015)

La obtención de la enzima recombinante ha permitido al grupo de trabajo evaluar diferentes aplicaciones de esta cutinasa. Por ejemplo, Sánchez en el 2015 realizó reacciones de hidrólisis sobre diferentes poliésteres y obtuvo una degradación visible a las 24 h de reacción para los polímeros evaluados.

Por otra parte Castro en el 2014 realizó la producción de biodiesel a partir de desechos de aceite de cocina con diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol y butanol) usando el biocatalizador generado a partir de la inmovilización del extracto de la enzima ANCUT1 recombinante. Se encontró que la cutinasa tiene una mayor afinidad para propanol y butanol produciendo los respectivos ésteres,

en cambio la lipasa b de *Candida antarctica* hacia metanol, etanol y propanol formando los respectivos alquil ésteres.

Una vez demostrada la posibilidad de aplicaciones de interés utilizando esta cutinasa recombinante, es indispensable obtener mayores cantidades de la enzima. Por lo tanto, es necesario mejorar la productividad del sistema de expresión e *Pichia pastoris*, y obtener la enzima en grandes cantidades empleando biorreactores, para lo cual se requiere evaluar estrategias de producción y escalamiento.

A continuación se muestra en la tabla 5 diferentes valores de Q_p que se obtienen al variar condiciones de cultivo mostrando que es posible alcanzar niveles altos de proteína.

Tabla 5 Productividad de proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris*.

Proteína	Cultivo	Productividad g/Lh	Referencia
Cutinasa	Biorreactor	0.16	Seman <i>et al</i> , 2014
h Receptor de adenosina	Biorreactor	0.08	Bawa <i>et al</i> , 2014
Albúmina sérica humana	Biorreactor	0.069	Wu <i>et al</i> , 2014
Quimotripsinógeno B	Biorreactor	0.025	Curvers <i>et al.</i> , 2002
Lisozima	Biorreactor	0.015	Brierley <i>et al.</i> , 1990
H1N1 Hemaglutinina	Biorreactor	0.0135	Athmaram <i>et al</i> , 2012
Endopoligalacturonasa	Biorreactor	0.01	Kars <i>et al.</i> , 2000
Interferon	Biorreactor	0.003	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Proteína anticongelante	Biorreactor	0.002	d'Anjou & Daugulis, 2001
FSH porcina	Biorreactor	0.002	Boze <i>et al.</i> , 2001
Aglutinina	Biorreactor	0.0007	Baumgartner <i>et al</i> , 2003
Fitasa	Biorreactor	0.034	Chen <i>et al.</i> , 2004
Cistatina C	Biorreactor	0.95 U/Lh	Files <i>et al.</i> , 2001
β glucosidasa	Biorreactor	4394 U/Lh	Chiruvolu <i>et al.</i> , 1997
β glucosidasa	Matraz	1.91	Tang <i>et al</i> , 2014
Estafilocinasa	Matraz	0.021	Apte <i>et al</i> , 2009
Cutinasa	Matraz	0.001	Kwon <i>et al</i> , 2009
Endo- β -1,4-xilanasa	Matraz	0.001	Rabert <i>et al</i> , 2013

Elaboración propia.

Como se puede observar, los resultados son muy variables pues aparentemente hay interacciones entre el gen de interés, su mecanismo de regulación y el producto obtenido (Ahmad, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido al potencial biotecnológico mostrado por la cutinasa ANCUT1 recombinante en *Pichia pastoris*, esta proteína es de gran interés para ser producida a gran escala, ya que en el mercado no hay ninguna presentación que se ofrezca a la venta. Este proyecto tiene la finalidad de mejorar la productividad volumétrica de *Pichia pastoris* para la producción de la cutinasa recombinante bajo condiciones controladas, comparado con los valores previamente reportados por Solís en el 2015.

IV. HIPÓTESIS

Si se modifican las condiciones de cultivo (pH, volumen de llenado, agitación y concentración de inductor) mejorará la productividad volumétrica de la enzima ANCUT1 recombinante usando el sistema de expresión de *Pichia pastoris* en matraces y se podrá escalar la mejor condición a un biorreactor utilizando el k_La como criterio de escalamiento.

V. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la productividad volumétrica (Q_p) de *Pichia pastoris* para la producción de la cutinasa ANCUT1 recombinante y reproducir los valores obtenidos en un biorreactor instrumentado.

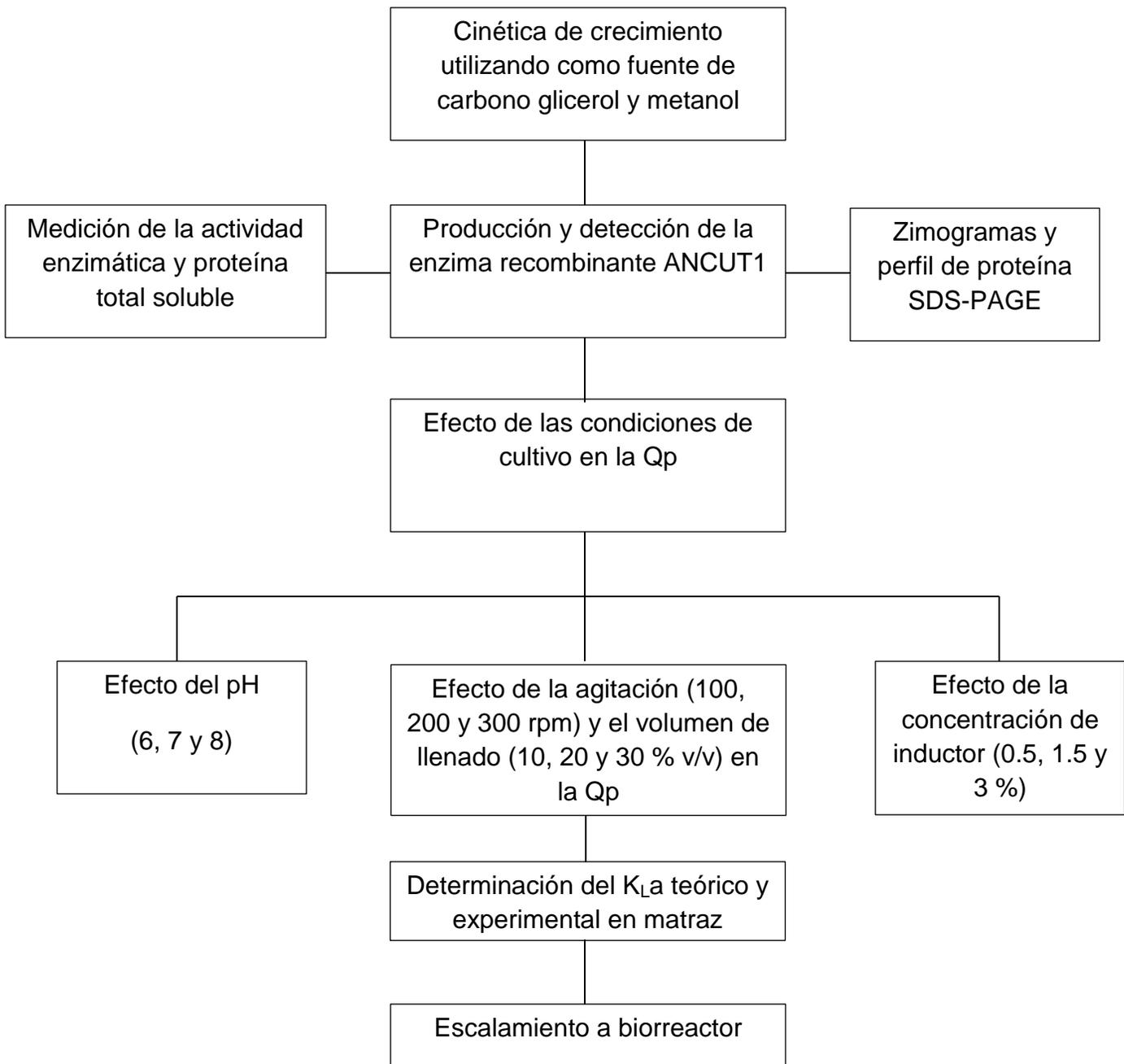
OBJETIVOS PARTICULARES

Explorar los efectos de las variaciones en las condiciones de cultivo (pH, concentración de inductor, volumen de llenado y agitación) en matraz Erlenmeyer que influyen en la productividad volumétrica de la cutinasa recombinante.

Determinar el k_La en matraces Erlenmeyer convencionales y comparar el resultado con una correlación empírica para ser utilizado como criterio de escalamiento.

Escalar las condiciones que favorecen el incremento de la productividad volumétrica en matraces a un biorreactor de 1L usando el k_La como criterio de escalamiento.

VI. METODOLOGÍA



6 PRODUCCIÓN DE ANCUT1 RECOMBINANTE

6.1 Reactivación del microorganismo

Para obtener la enzima ANCUT1 recombinante se utilizó como sistema de expresión a *Pichia pastoris*. Se usó una cepa clonada previamente dentro del grupo de trabajo (Hernández, 2013), que se encontraba almacenada en glicerol a -70°C. Esta fue reactivada en medio YPD (Extracto de levadura 1%, peptona (2%) y dextrosa (2%)) de acuerdo a lo descrito en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen).

La glucosa se esterilizó por filtración y los demás componentes se esterilizaron con autoclave (SM300, Yamamoto) a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados, los componentes se mezclan en las cantidades necesarias para obtener la concentración indicada. Se inocularon 200 µL de la cepa *Pichia pastoris* que se encontraba almacenada a -70°C en tubos Falcon 50 mL estériles con 5 mL de medio YPD estéril y se incubaron por 24 horas a 29 °C y 300 rpm de agitación orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific, USA).

6.2 Crecimiento en glicerol

Se preparó el medio de cultivo BMGY (Extracto de levadura (1%), peptona (2%), buffer de fosfatos 100 mM, YNB (1.34%), biotina (4×10^{-5} %) y glicerol (1%)).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizaron por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclaron en el orden descrito y en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada. Se inocularon las células de *Pichia pastoris* reactivadas por cada volumen de medio de cultivo BMGY hasta una $DO_{600 \text{ nm}} = 0.1$ U.A. y se incubó a 29 °C bajo las diferentes condiciones a evaluar (volumen de llenado de 10, 20 y 30 % de un matraz Erlenmeyer Pyrex con un diámetro 8.5 ± 0.2 cm y una

agitación orbital de 100, 200 y 300 rpm) se realizó un cultivo en una incubadora Innova 40, New Brunswick Scientific con un diámetro de agitación de 1.91 cm.

6.3 Expresión de la enzima

Se preparó el medio de cultivo BMMY (Extracto de levadura (1%), peptona (2%), buffer de fosfatos 100 mM, YNB (1.34%), biotina (4×10^{-5} %) y metanol (0.5%).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizaron por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclaron en el orden descrito en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada. Las células obtenidas de la reactivación, que se usan cuando se llega a una $DO_{600\text{ nm}} = 4$ U.A. se inocularon en matraces que contenían el medio de cultivo BMMY hasta una $DO_{600\text{ nm}} = 0.1$ U.A. Se agregó como inductor de la enzima metanol al 100 % y se incubó a 29 °C bajo las mismas condiciones de volumen de llenado y agitación orbital utilizadas en el punto 6.2. Posteriormente se centrifugó el medio en tubos Falcon de 50 mL estériles a 8500 rpm, 10 minutos a 4 °C en una Centrifuga Biofuge, Heraeus. Se desechan las células y el sobrenadante es utilizado para determinar proteína total soluble por el método de Bradford y actividad enzimática.

6.4 Cuantificación de proteína en microplaca

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford cuya sensibilidad es de 1-100 µg (Bradford, 1977; Whiteley & Lee, 2006). El volumen final de reacción fue de 200 µL. Se colocaron en la microplaca 160 µL de muestra, 40 µL del reactivo de Bradford (Bio Rad) y un blanco con 160 µL de agua destilada y 40 µL de dicho reactivo, todo se mezcló perfectamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El color generado se cuantificó en el lector de microplacas Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, a una absorbancia de 595 nm.

Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entrara en un intervalo confiable de una curva estándar, preparada con albúmina sérica.

6.5 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca (con *p*-nitrofenilbutirato)

La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustrato *p*-nitrofenilbutirato. Se preparó un stock de *p*-nitrofenilbutirato 10 mM en etanol, de este stock se tomaron 100 μ L y se añadieron 900 μ L de etanol para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM, se adicionaron para el blanco 180 μ L de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7 y 20 μ L de *p*-nitrofenilbutirato en etanol a una concentración 1 mM y para el caso de la muestra se colocaron 170 μ L del mismo buffer, 10 μ L del sobrenadante del medio de cultivo BMMY y 20 μ L de sustrato.

La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Nawani *et al.*, 2006; Bornscheuer *et al.*, 2005).

Una unidad de actividad (U) se define como la conversión de 1 μ mol de sustrato a producto por minuto bajo las condiciones de ensayo. La cantidad de ésteres de *p*-nitrofenilo se interpoló en una curva patrón de *p*-NP.

6.6 Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida

6.6.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizó como detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Las muestras de extracto crudo se trataron previamente con un buffer de carga 4x con β -mercaptoetanol y se calentaron a 95 °C durante 5

minutos para desnaturalizar a las proteínas. Como referencia se utilizó un marcador de bajo peso molecular (97 a 14 kDa, Bio Rad) y las muestras se cargaron en los carriles asignados previamente. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis (MiniProtean II y IV, Bio Rad) inicialmente a 80 Volts y después 30 minutos se subió a 120 Volts a 4 °C con buffer de corrida. Para observar el marcador de masa molecular y la masa de la proteína de interés, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

6.6.2 Zimogramas

Para observar la actividad esterasa de las enzimas se realizaron geles de poliacrilamida sin β -mercaptoetanol y sin calentar bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Para observar la actividad se prepararon zimogramas siguiendo la metodología planteada por (Karpushova *et al.*, 2005). Una vez llevada a cabo la electroforesis el gel se incubó en una solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 durante 30 min, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con Tritón X-100 al 5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (*Solución A*) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente y finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red (*Solución B*) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

6.6.2 Preparación de la soluciones A y B:

- ▶ *Solución A.* Se pesaron 10 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 2.5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2
- ▶ *Solución B.* Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 10 μ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo una etapa exploratoria para identificar algunos parámetros críticos que afectan la productividad volumétrica en matraces, como lo son el volumen de llenado y la agitación, la concentración del inductor presente en el cultivo durante la fase de inducción y el pH; condiciones que afectan la producción y estabilidad del producto. En la literatura hay una gran diversidad de estrategias empleadas para incrementar la producción de proteínas recombinantes utilizando en el sistema de expresión *Pichia pastoris*, en donde hay modificaciones desde el medio de cultivo (Liu *et al.*, 2013), alimentación del inductor (Guarna *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000; Katakura *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1997), oxígeno disuelto (Chung, 2000; Lee *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005), control del crecimiento celular (Cos *et al.*, 2006; Ren & Yuan, 2005, Zhang *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2003; Trinh *et al.*, 1997). La productividad resultante será diferente para la expresión de cada gen a una gran diversidad como lo muestra la tabla 5, la estrategia utilizada en el bioproceso va influir en el rendimiento del producto final. Sin embargo también va a depender de la respuesta de la levadura frente al gen exógeno. Para esta cepa de *Pichia pastoris* recombinante el oxígeno desempeña un papel primordial, ya que al haber una disponibilidad de este sustrato en el medio de cultivo e inductor, parece indicar que la levadura está dirigiendo la fuente de carbono y energía en la producción de la cutinasa recombinante en cultivos con matraces agitados. Esta hipótesis se podría resolver estudiando el flujo metabólico a las diferentes condiciones evaluadas de k_La para saber si la fuente de carbono y energía se emplean para el mantenimiento de la célula, generación de biomasa y/o producción de la enzima recombinante. Por otro lado, es importante resaltar que con el simple hecho de modificar volúmenes de llenado de matraces y la agitación se puede incrementar la productividad volumétrica de proteínas recombinantes utilizando este sistema de expresión.

7.1 Determinación del k_La

Se quiere incrementar la productividad volumétrica de *P. pastoris* en la producción de la enzima ANCUT1 y para ello se evaluaron diferentes condiciones de cultivo para conocer qué parámetros impactan en la Qp. Se evaluó el efecto del volumen de llenado y la frecuencia de agitación, estos dos parámetros pueden ser englobados para conocer el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La), lo que va permitir observar el efecto que tiene la transferencia de oxígeno en la expresión de la enzima recombinante en estudio.

Para esto se determinó el k_La y se empleó una correlación empírica que tiene las siguientes características:

$$k_La_{sulfito} = 6.67 \times 10^{-6} n^{1.16} V^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (\text{Ec } 10)$$

n: Frecuencia de agitación (rpm).

V: volumen de llenado (mL).

d_0 : Diámetro de agitación de la incubadora (cm).

d: Diámetro máximo del matraz Erlenmeyer (cm).

Esta correlación es válida para matraces Erlenmeyer estándar, frecuencia de agitación de 50-500 rpm, volumen de llenado de 4-20% (definido como volumen de llenado dividido por el valor nominal del volumen del matraz), diámetros de agitación de la incubadora 1.25-10 cm y matraces con volúmenes nominales entre 50 y 1000 mL (Maier, 2002). Los valores calculados son sólo aplicables para un sistema de sulfito 1M, pero pueden ser transferidos a un medio de cultivo biológico con viscosidad del agua. (Klöckner & Büchs, 2012).

Se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 6:

Tabla 6 Determinación k_La utilizando correlaciones empíricas.

k_La	Vol llenado (%), rpm	
11	30	100
15	20	100
24	30	200
29	10	100
34	20	200
39	30	300
54	20	300
60	10	200
80	12.6	300
96	10	300
121	7.6	300

Una vez calculados estos valores teóricos se procedió a determinar experimentalmente el k_La de los matraces Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex N° 4980) empleados durante las condiciones evaluadas (Anexo C). Se utilizó el método dinámico y se midió la concentración de oxígeno disuelto en agua destilada con un electrodo de oxígeno bajo las siguientes condiciones 18°C, 586 mm Hg y una humedad relativa del 64% para un k_La teórico de 54, 96 y 121 h⁻¹. Se utilizó una agitadora orbital marca Lab-line modelo LED Orbit Shaker con un diámetro de agitación de 1.91 cm.

Los valores experimentales del k_La , los cuales muestran valores similares a los obtenidos teóricamente empleando las correlaciones empíricas. La diferencia puede atribuirse a que el electrodo de oxígeno actúa como barrera física, por lo que provoca que el patrón de flujo se interrumpa y forme muchas gotas, patrón que se presenta tanto en matraces bafleados como en biorreactores con bafles, o simplemente al tiempo de respuesta en la lectura del electrodo (Büchs, 2001).

Con este valor de k_La se puede englobar el efecto del volumen de llenado, la velocidad de agitación, el diámetro de agitación de la incubadora y el diámetro del matraz utilizado en los ensayos, para así poder conocer el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno del aire al medio de cultivo (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016). Una vez determinado el valor del k_La se podrá escalar el bioproceso a un biorreactor con un diseño específico, es decir, que se podrá obtener los valores de Q_p que se tienen en matraz ahora en el biorreactor. Los valores mostrados en la tabla 6 permiten conocer las condiciones del cultivo en el matraz que suministrarán el oxígeno necesario para cubrir las exigencias de *Pichia pastoris* durante todo el cultivo, y de esta forma será posible conocer el efecto que tiene el k_La en la velocidad específica de crecimiento (μ). Cabe resaltar que el espacio de cabeza que se forma en el matraz se comporta como una burbuja que permite la transferencia de masa de la fase gaseosa a la fase líquida.

7.2 Efecto del k_La en la velocidad específica de crecimiento utilizando como fuente de carbono glicerol y metanol

Para esta parte experimental, se probaron dos diferentes fuentes de carbono con el objetivo de obtener una mayor cantidad de biomasa, por lo que la levadura fue sometida a diferentes condiciones de cultivo en este caso diferentes valores de k_La , a un pH inicial de 6 a 29°C.

Como se muestra en la figura 10, en todas las condiciones evaluadas hay un efecto del k_La en la μ y por lo tanto en la generación de biomasa, cuando aumenta el k_La hay un incremento de μ , sin embargo, a k_La menores la transferencia de masa está provocando que la levadura tenga poco crecimiento por la baja transferencia de oxígeno, ya que la falta de este sustrato primordial en el desarrollo de este eucarionte utilizando como fuente de carbono glicerol, el cual es incorporado a la ruta metabólica de la gluconeogénesis cuando hay una velocidad de crecimiento baja, como lo reporta (Jordá, *et al.*, 2014) caso contrario ocurre cuando la μ es mayor en el $k_La > 54 \text{ h}^{-1}$, bajo esta condición como lo Solá, *et*

al.,2007 hay un mayor flujo de carbono hacia la ruta metabólica de las pentosas fosfato, lo cual se refleja en el incremento de biomasa y un incremento en el flujo hacia el ciclo TCA.

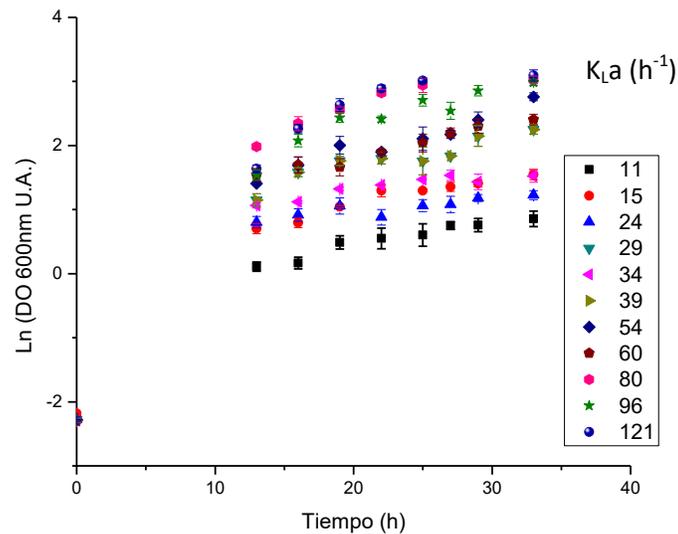


Figura 10 Efecto del k_La en el crecimiento de *Pichia pastoris* en glicerol. Cada condición de k_La fue realizada variando el volumen de llenado y la agitación de un matraz Erlenmeyer de 250 mL, utilizando una incubadora Innova 40 con un diámetro de agitación de 1.91 cm a 29°C y pH 6.

Para el caso del metanol como única fuente de carbono se realizaron diferentes cinéticas de crecimiento usando como fuente de carbono metanol al 0.5 %, a un pH inicial de 6 y 29 °C a diferentes valores de k_La . Se observó el comportamiento mostrado en la figura 11.

El coeficiente de transferencia de oxígeno desempeña un papel importante en el crecimiento celular, a partir de un $k_La > 10 \text{ h}^{-1}$ hay crecimiento celular, incrementando este valor se genera más biomasa sin importar si la fuente de carbono es metanol o glicerol. Esto indica que proveer la demanda de oxígeno que necesita *Pichia pastoris*, contribuye a un buen desarrollo celular y los sustratos se metabolizan adecuadamente para la obtención de una alta densidad celular y para la producción de la enzima recombinante cuando es inducido el pAOX por la

presencia de metanol en el medio de cultivo. El metanol también es utilizado por la célula en la producción de energía (ATP), NADH y NADPH (Solá, *et al.*, 2007).

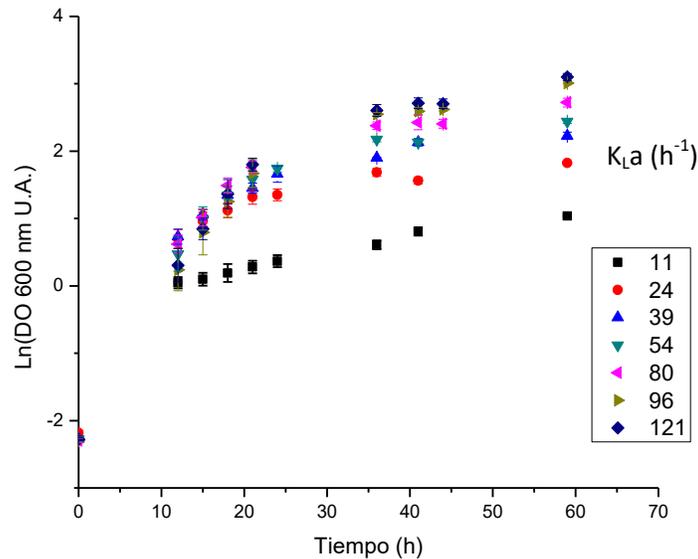


Figura 11 Efecto del k_La en el crecimiento de *Pichia pastoris* en metanol 0.5%, pH 6 a 29 °C, en matraz Erlenmeyer de 250 mL.

La tabla 7 muestra la velocidad específica de crecimiento cuando se utiliza como fuente de carbono metanol (0.5 %) o glicerol (1 %). A partir de un $k_La \geq 24 \text{ h}^{-1}$ se observa una potencial velocidad de crecimiento usando como fuente de carbono metanol para incrementar la Q_p , de acuerdo a lo descrito para algunas cepas recombinantes de *Pichia pastoris* con fenotipo Mut^+ que crecen en un exceso de metanol en un amplio intervalo de μ de 0.028 a 0.154 h^{-1} donde la levadura es más productiva (Looser *et al.*, 2015). Por ejemplo, cepas Mut^+ con más de 12 copias de un gen tienen un bajo consumo de sustrato y baja velocidad específica de crecimiento (0.01 a 0.02 h^{-1}). En el caso de cepas con bajo número de copias la velocidad se incrementa (0.025 a 0.029 h^{-1}) (Zhu *et al.*, 2009). Estos resultados indican que la velocidad depende de las condiciones de cultivo, de la concentración de la fuente de carbono y, también del gen que se quiere expresar y del número de copias del mismo presente. Estas cinéticas de crecimiento permitieron observar que la levadura tiene similares μ en metanol comparado con

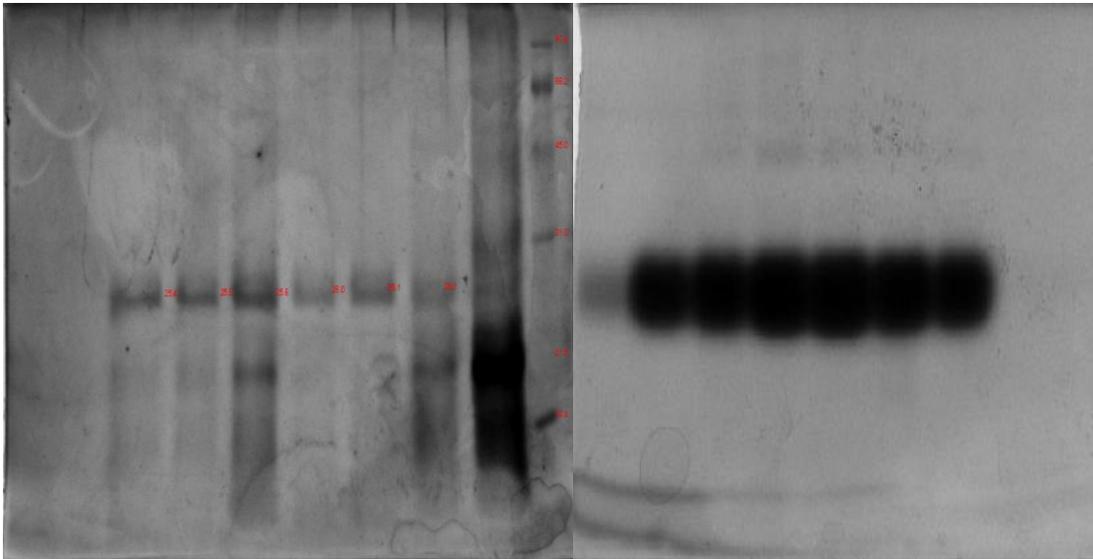
glicerol, lo que nos sugiere que usar metanol para la generación de biomasa y la producción de la enzima recombinante es una opción como estrategia de cultivo. Sin embargo, la literatura indica que la velocidad de crecimiento es de 1.7 a 8 veces más rápido en glicerol y glucosa, comparado con su crecimiento en metanol (Jungo *et al.*, 2007), este comportamiento va a depender de las interacciones entre el gen de interés, su mecanismo de regulación y el producto obtenido (Ahmad, 2014). Con estos resultados se puede afirmar que el incremento en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno favorece la generación de biomasa que es necesaria para tener un posible incremento en la Q_p para la producción de la AN CUT1, ya que hay más células que podrán expresar la enzima recombinante en presencia del inductor. Cabe resaltar que la agitación de los matraces cumple varios propósitos: asegurar una distribución homogénea de los nutrientes y lograr una transferencia adecuada de oxígeno, así como la remoción de CO_2 a través de la interfase gas-líquido. En el caso de los cultivos con viscosidad moderada o baja, la transferencia de gases es el aspecto más importante que incide en la productividad (Henzler, 1991; García, 2010). Además, va a permitir simplificar el procedimiento experimental que se realizaba previamente en el grupo de trabajo, el cual requería de dos medios de cultivos, el medio BMGY para la generación de biomasa y un posterior cambio al medio BMMY para la producción de la cutinasa recombinante. Se realizó un ANOVA para las condiciones de un $k_L a = 96$ y 121 h^{-1} con un nivel de significancia del 5 %, el resultado indica que no hay diferencias significativas para los valores de μ con un 95 % de confiabilidad, por lo tanto se escogió una condición de $k_L a = 96 \text{ h}^{-1}$ para la generación de biomasa utilizando metanol como fuente de carbono e inductor.

Tabla 7 Efecto del k_La en la velocidad específica de crecimiento utilizando como fuente de carbono metanol o glicerol.

$K_La \text{ h}^{-1}$	Metanol $\mu \text{ h}^{-1}$	Glicerol $\mu \text{ h}^{-1}$
10	0.01 ± 0.004	0.046 ± 0.012
24	0.067 ± 0.004	0.063 ± 0.012
39	0.082 ± 0.006	0.102 ± 0.004
54	0.123 ± 0.017	0.1 ± 0.02
80	0.13 ± 0.004	0.091 ± 0.002
96	0.158 ± 0.014	0.149 ± 0.01
121	0.167 ± 0.014	0.138 ± 0.002

7.2.2 Efecto de las condiciones de cultivo a diferentes k_La

Por otro lado, se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford y se hizo un gel SDS-PAGE para observar el perfil de proteínas (figura 12). Los resultados muestran que la enzima se expresa como proteína mayoritaria en todas las condiciones evaluadas, con una intensidad alta a partir de un k_La de 54 hasta 121 h^{-1} . Esta última corresponde a una condición de agitación de 300 rpm y un volumen de llenado del 8% en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Tanto en el perfil de proteínas como en el zimograma se aprecia el efecto del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en la producción de esta cutinasa recombinante. El zimograma muestra el incremento de la actividad enzimática de la ANCUT1 recombinante cuando hay un aumento del k_La y lo podemos corroborar con el análisis de la densitometría de las bandas con actividad del zimograma (figura 13), donde el intervalo de k_La entre 54 a 121 h^{-1} muestra una mayor intensidad. Se infiere que el oxígeno disuelto es un sustrato importante en la producción de la proteína recombinante y que la fuente de carbono (inductor) va dirigida a la producción de la enzima. Se sabe que la alcohol oxidasa tiene una baja afinidad por el oxígeno, por ello se producen grandes cantidades de esta enzima para compensarlo (Cereghino & Cregg, 2000), ya que el pAOX se encuentra más activo y hay una mayor producción de la ANCUT1 recombinante. En el zimograma se observa que la cepa silvestre de *Pichia pastoris* X33 no presenta actividad de esterasa a un k_La de 96 h^{-1} .



A) k_La 121 96 80 54 39 24 10 MM B) 10 24 39 54 80 96 121 X33-96 h⁻¹

Figura 12 Perfil de proteínas (A) y Zimograma (B) del efecto del k_La en la producción de la AN CUT1 en *Pichia pastoris*. Que contiene 2 µg de proteína a las 36 h del cultivo en matraz utilizando 0.5% de metanol.

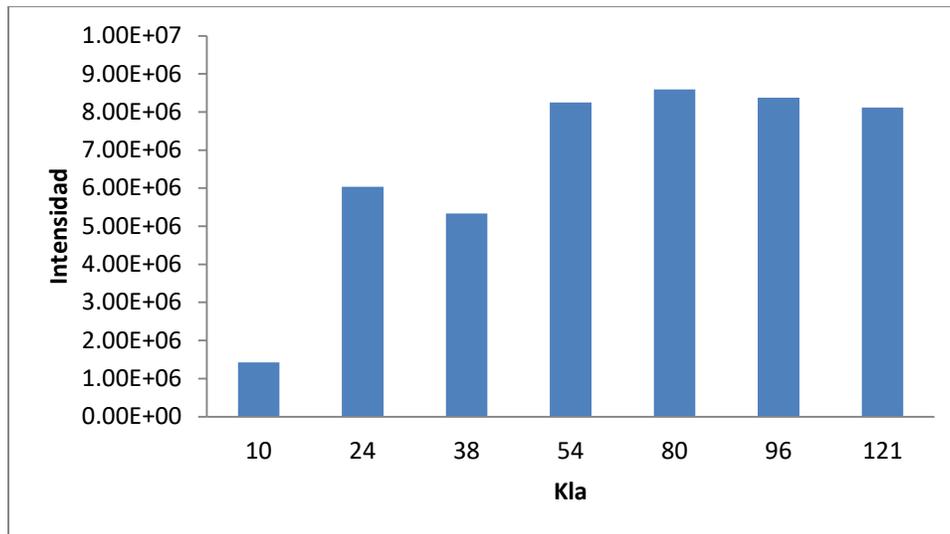


Figura 13 Expresión de la proteína de interés a diferentes k_La , determinada por la Intensidad de las bandas de la actividad enzimática obtenida por densitometría utilizando el equipo Gel Doc (BioRad) y el programa Image Lab 5.2.1 que se evaluó una sola vez.

Las figuras 14, 15 y 16 corroboran que la transferencia de oxígeno es un parámetro crítico que afecta a la productividad volumétrica de la ANCUT1 recombinante. Se siguió una cinética con metanol al 0.5 % alimentando el matraz cada 12 h con metanol al 0.5 % por 36 h. Transcurrido este tiempo se dieron 2 pulsos más de metanol al 1.5 % hasta completar un cultivo de 60 h. En este momento se determinó actividad enzimática y proteína total soluble extracelular por el método de Bradford, como se había hecho a las 36 h. Para las condiciones de un $k_La \leq 80 \text{ h}^{-1}$ la concentración de proteína se mantiene constante durante el cultivo pero hay un aumento del 30% en Q_p y en la actividad enzimática medida frente al sustrato p-nitrofenil butirato. A $k_La \geq 96$ y 121 h^{-1} se observan incrementos en proteína extracelular, menores al 20%, pero en cambio, Q_p se incrementa 100 y 80 %, respectivamente. Se hizo un ANOVA para estas 2 condiciones con un nivel de significancia del 5 %, el resultado indica que no hay diferencias significativas para los valores de Q_p con un 95 % de confiabilidad, por lo tanto se escogió una condición de $k_La = 96 \text{ h}^{-1}$, que es una condición que incrementa la Q_p de *P. pastoris* para producir la enzima recombinante.

La productividad volumétrica para un k_La de 96 h^{-1} es de $15989 \pm 2040 \text{ U/Lh}$, a las 60 h de inducción y una cantidad de proteína de $134 \pm 4 \text{ mg/L}$ (figura 15 y 16). Este valor es más alto (6 veces) que el reportado previamente por Solís (2014) en este mismo grupo de trabajo $Q_p = 2833 \text{ U/Lh}$ y 90 mg/L , a las 24 h de inducción, pues detectaba una pérdida de actividad después de ese momento. Sin embargo, es casi un orden de magnitud menor que el valor reportado por Kwon (2009) para la cutinasa de *F. solani* clonada en *Pichia pastoris*, en la que logra una actividad 286458 U/Lh a las 192 horas de cultivo frente a tributirina y una concentración de proteína de 194 mg/L . Este valor es similar al que Seman reporta para otra cutinasas en el 2014, quien bajo condiciones controladas de un biorreactor de 5 L alcanza una productividad volumétrica de 18083 U/L h y 3.8 g/L de proteína total; esto contrasta con lo obtenido en este estudio que hay una menor cantidad de enzima recombinante, pero hay una mayor actividad. Por otro lado Abdulrachma y colaboradores en el 2017 reportan la producción de una endo-poligalacturonasa con una Q_p en matraz de 10479 U/Lh y 266 mg/L a las 48 h de cultivo y cuando la

producción es en biorreactor la $Q_p=21694$ U/Lh a las 111h de cultivo bajo condiciones controladas. Estos resultados confirman el hecho que la expresión de un gen exógeno y las condiciones de cultivo van a influir en la productividad.

Considerando que la proteína extracelular puede estar relacionada con el crecimiento, se evaluó este parámetro por incremento en densidad óptica, lo que se muestra en la figura 17. Este resultado sugiere que cuando el inductor es adicionado al medio de cultivo desde el inicio, la producción de la proteína se comporta como metabolito primario por lo que está asociada al crecimiento.

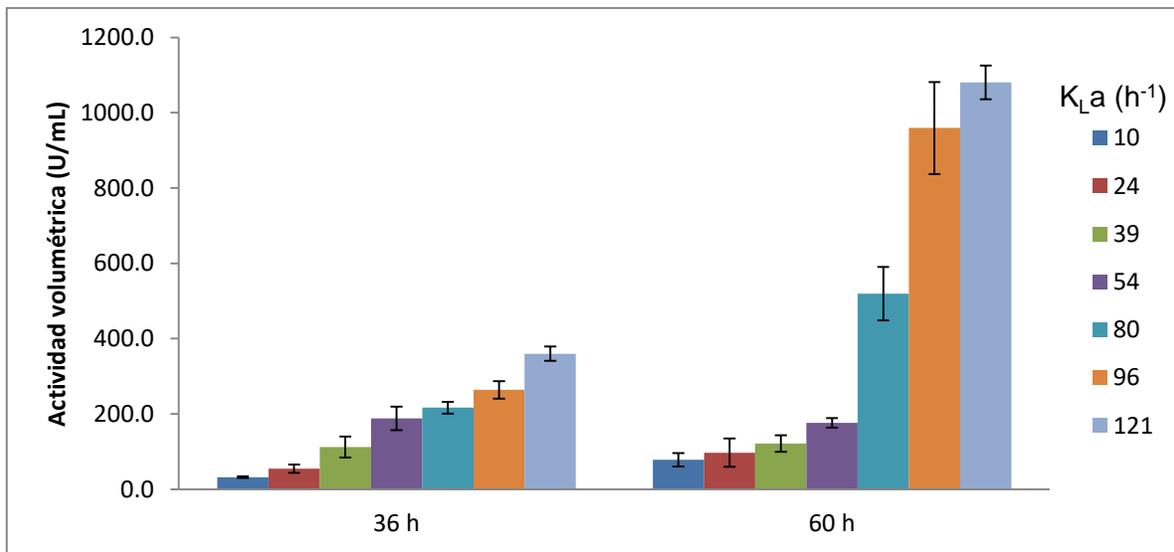


Figura 14 Efecto del $k_L a$ en la actividad de la cutinasa recombinante utilizando como sustrato pNFB a pH 7. Datos obtenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL.

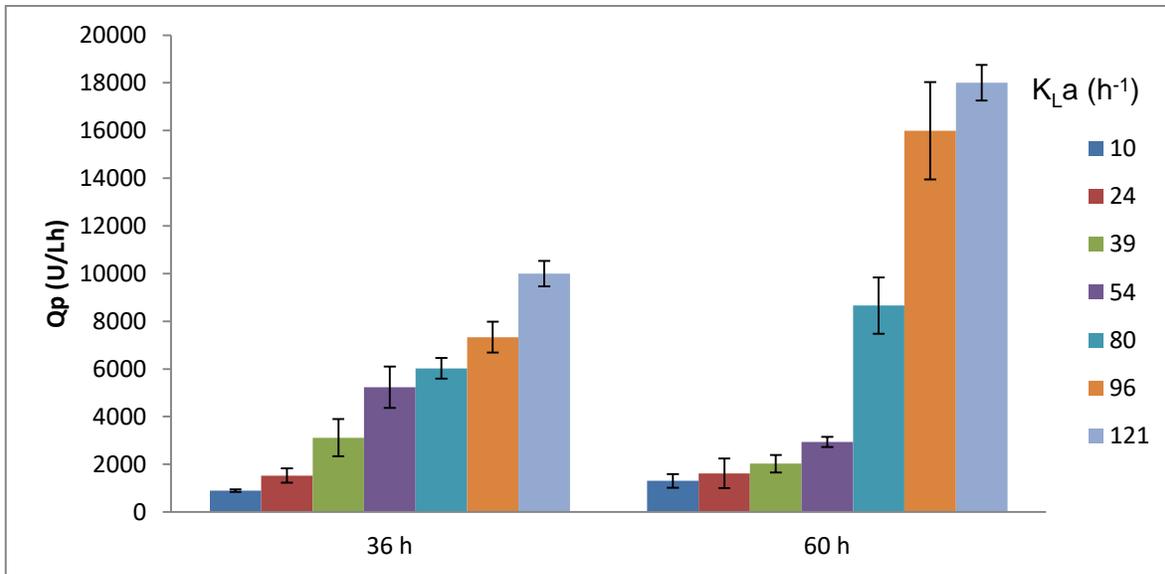


Figura 15 Efecto del $k_L a$ en la productividad volumétrica de *Pichia pastoris*, a dos tiempos de cultivo, en matraces de 250 mL utilizando metanol al 0.5 % hasta las 36 h y después metanol al 1.5 % hasta las 60 h a pH 6 y 29°C.

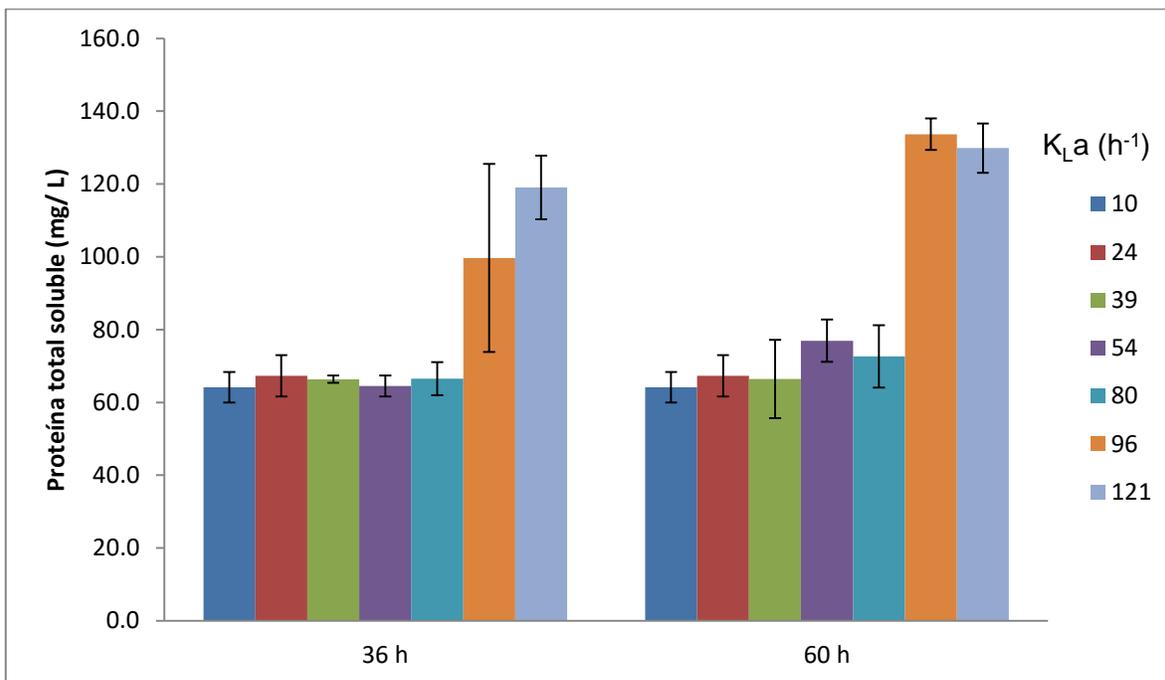


Figura 16 Efecto del $k_L a$ en la concentración de proteína extracelular medida por el método de Bradford. Determinaciones realizadas a dos tiempos de cultivo en matraces de 250 mL.

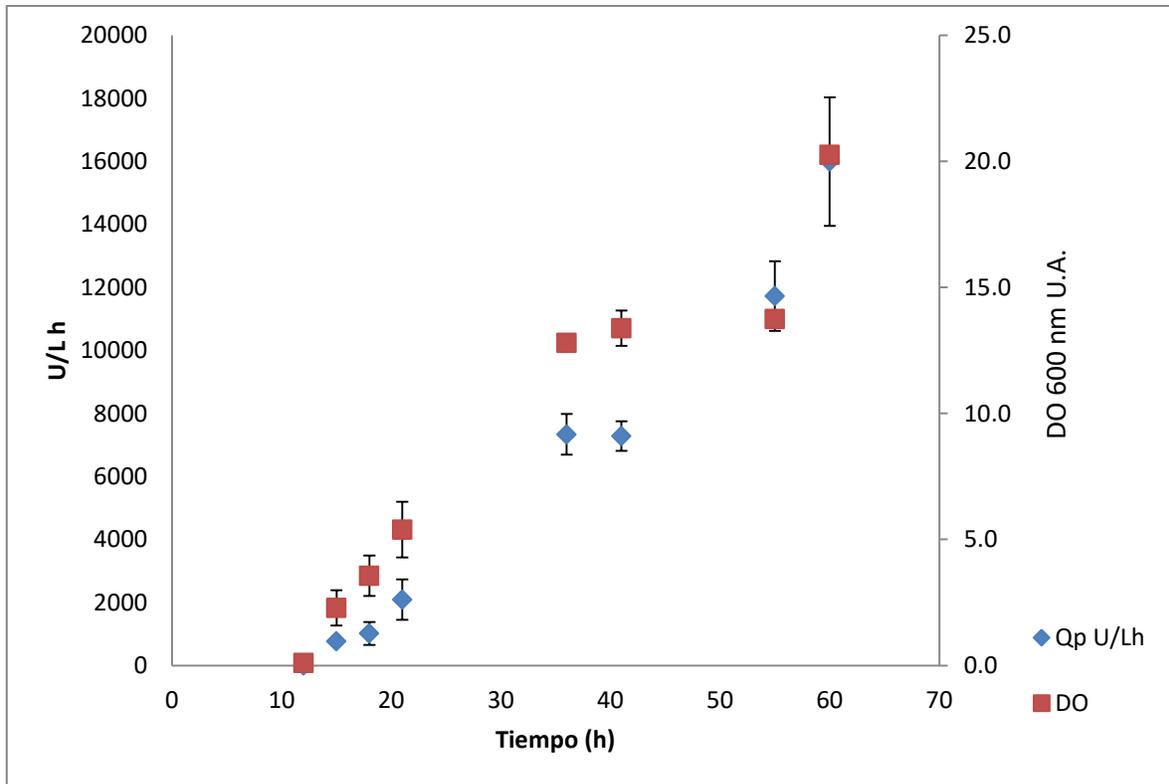


Figura 17 Cinética de producción donde se muestran valores de DO y Qp de la AN CUT1 a un $k_L a = 96 \text{ h}^{-1}$ en matraz de 250 mL y metanol 0.5% y 1.5 %.

Cuando se realiza la inducción para la expresión de la proteína recombinante, la levadura tiene un período de adaptación de algunas horas, en el cual comienza a sintetizar todas las enzimas requeridas para el metabolismo del metanol, que en la fase en que sólo hay glicerol se encuentran en muy baja concentración (Cereghino & Cregg, 2000). La enzima que se va acumulando durante la inducción es la alcohol oxidasa 1, lo que indica que el promotor AOX1 se encuentra activo y expresando la proteína recombinante. La adición de metanol y/o otras fuentes de carbono necesitan ser controladas para minimizar la formación de subproductos, lisis celular, efectos inhibitorios (glucosa, glicerol) y metabolitos desconocidos. Las modificaciones post-traduccionales también se afectan por las condiciones de cultivo.

Kim y colaboradores reportan en el 2013 que la producción de la proteína verde fluorescente (GFP) cuantificando la intensidad relativa de fluorescencia es

significativamente mayor en condiciones donde se mantiene una tensión de oxígeno disuelto del 20% y metanol limitante que en aquella donde la tensión de oxígeno es del 6 %. Sin embargo, cuando expresan la inmunoglobulina G1 (IgG1) hay una mayor lisis celular pero una mejor producción a una tensión de oxígeno del 20% y metanol limitante utilizando un lote alimentado. Este incremento en la producción se debe a que hay un aumento en la biogénesis de peroxisomas organelos responsables del metabolismo del metanol.

7.3 Efecto del pH inicial en la producción de la ANCUT1

Otra condición de cultivo a evaluar es el efecto del pH inicial en la Q_p de *P. pastoris* en la expresión de la ANCUT1 recombinante. Es importante controlar este parámetro fisicoquímico (pH) en la producción con biorreactor, ya que si no se tiene un control puede haber una acidificación del medio de cultivo que afecta la estabilidad de la proteína en estudio (Inan *et al.*, 2001). De acuerdo a la caracterización realizada por Solís, 2014 la enzima ANCUT1 es estable en un intervalo de pH 6 a 9, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto del pH en un intervalo de 6 a 8. Sin embargo, el pH intervalo óptimo de producción usando este sistema de expresión es de 3 a 5, por lo que es un intervalo donde la enzima no es activa de acuerdo a lo reportado en la caracterización bioquímica.

Esta parte experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: k_La 96 h^{-1} que corresponde un volumen de llenado 10% de un matraz Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex N°4980) y una agitación de 300 rpm en una incubadora Innova 40 a 29°C y a diferentes valores de pH y pulsos de metanol al 0.5%. Las velocidades específicas de crecimiento de *P. pastoris* son muy similares a diferentes pH iniciales, por lo que no es un factor que afecte el crecimiento celular. Tampoco incide en la actividad volumétrica, ya que también se obtuvieron valores similares. En todos los casos evaluados el pH descendió una unidad con respecto al valor inicial. Con un ANOVA para estas condiciones con un nivel de significancia del 5 %, el resultado indica que no hay diferencias significativas para los valores de Q_p

con un 95 % de confiabilidad. El valor de pH inicial que se seleccionó como la condición que favorece la mejor $Q_p=13194 \pm 332$ U/Lh fue 7 (Tabla 8). Durante la producción de proteínas recombinantes en levaduras el pH es diferente al óptimo para el crecimiento del microorganismo hospedero. La razón por la que se selecciona un pH diferente es para mejorar la productividad o la estabilidad del producto y disminuir la actividad enzimática de proteasas endógenas. La mayoría de los cultivos se realizan a pH bajo y pocos trabajos se realizan a un pH > 7 (Mattanovich, 2004).

Tabla 8 Producción de la proteína recombinante a diferentes pH iniciales en matraz de 250 mL.

pH	Efecto del pH inicial		
	6	7	8
U/ml	250 ±15	317±8	346±64
U/mg proteína	2475±165	3104±647	3559±385
μ h-1	0.149± 0.01	0.138± 0.023	0.14± 0.0034
Qp U/ Lh	10020± 631	13194± 332	14417± 2668
pH final	5	6	7
DO final	19 ±1	18.7± 0.3	15.5±0.5

P. pastoris es utilizada para producir proteínas recombinantes en intervalo de pH de 3 a 7, por otro lado el pH alcalino hace susceptible a la enzima frente a la actividad proteolítica endógena de la levadura (Cos *et al.*, 2006), dependiendo de las características bioquímicas de la proteína de interés. Por ejemplo, en el estudio de la producción de rHSA, la actividad proteolítica no fue detectada a un pH > 5.6, mientras que se obtuvo sólo la mitad del rendimiento de proteína a pH 4.3. Otros

ejemplos se encuentran en lo reportado para la producción de interferón, en la producción de MSP3 y en la producción de fibrinógeno humano. Basado en estos estudios el valor de pH operacional para muchas proteínas debe estar en el intervalo de 5.5 a 8 para minimizar la proteólisis (Minjie & Zhangping, 2013).

7.4 Efecto de la concentración de inductor

Esta parte experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Un $k_L a$ 96 h^{-1} que es un volumen de llenado 10% de un matraz Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex N°4980) y una agitación de 300 rpm en una incubadora Innova 40 a 29°C y a pH 7. Realizando un ANOVA para estas condiciones con un nivel de significancia del 5 %, el resultado indica que hay diferencias significativas para los valores de Q_p con un 95 % de confiabilidad. Se encontró que la concentración de 1.5 % de metanol en el medio de cultivo mejora la Q_p de la ANCUT1, no se escogió la concentración del 3 % porque aunque se esperaría un incremento del doble en la Q_p comparado con 1.5 %, por lo que sería un gasto de reactivo, además que sería peligroso manejar volúmenes grandes de este alcohol debido a que es inflamable.

La concentración de metanol durante la fase de inducción afecta la producción de proteína. Es indispensable controlar la concentración del metanol durante la fase de inducción convirtiendo esta fase en un punto crítico para la producción exitosa de la proteína recombinante. La concentración óptima de metanol varía en un intervalo de 0.1 a 2.5 % v/v, sin embargo, concentraciones más elevadas pueden causar problemas citotóxicos para la célula inhibiendo el crecimiento (Cunha *et al.*, 2004; Stratton *et al.*, 1998). La mayor producción del anticuerpo A33scFv fue a una concentración de metanol de 0.5% (Minjie & Zhanping, 2013). Con estos resultados se observa que la concentración del inductor es otro parámetro importante a controlar en una fermentación que se realiza en biorreactor.

La velocidad con que se alimenta el metanol en sistemas regulados por el pAOX1 es uno de los factores más importantes para controlar. La concentración de

metanol tiene una influencia directa en la velocidad de producción y degradación de proteínas heterólogas, crecimiento celular, lisis celular y transferencia de oxígeno. Cuando el objetivo del proceso es producir pequeñas cantidades de la proteína heteróloga se sigue la estrategia recomendada por Invitrogen. Sin embargo, cuando el objetivo es maximizar el rendimiento del producto se debe mejorar la estrategia para la alimentación del metanol (Potvin *et al.*, 2012).

Tabla 9 Efecto de la concentración de inductor en la producción de la ANCUT1.

Efecto de la concentración de inductor			
[MeOH]	0.5%	1.5%	3%
U/ml	250 ± 15	658 ± 76	959 ± 140
U/mg proteína	2475 ± 165	6476 ± 1230	9423± 688
Biomasa	19 ± 1	20 ± 2	20± 2
Qp U/ Lh	10020± 631	15989± 2040	19983± 2907

Una vez evaluados los parámetros que favorecen una mayor productividad volumétrica, se quiere llevar el cultivo a condiciones controladas en un Biorreactor para observar si el comportamiento que ocurre en el matraz Erlenmeyer de 250 mL, se reproduce a una mayor escala. La mejor condición para obtener la Qp más alta es en un $k_L a$ de 96 h^{-1} , a 29°C y un pH controlado de 6 y 1.5 % de metanol, por lo que éstas serán las condiciones empleadas para escalar el bioproceso a un biorreactor.

7.5 Determinación del k_La en un biorreactor

Se determinó el k_La por el método dinámico en un biorreactor Applikon de 1.5 L volumen nominal de fondo plano con 2 baffles y con un volumen de llenado de 1 L de agua destilada, 1 vvm, 29 °C a diferentes velocidades de agitación como se muestra en el Anexo D. Se escogió el k_La de 99 h⁻¹ que es el valor más cercano al k_La con las condiciones de interés.

7.6 Escalamiento del bioproceso

La producción de la cutinasa recombinante en *Pichia pastoris* bajo las condiciones de lote alimentado fue realizado en un biorreactor (Applikon, USA) de 1.5 L de fondo plano. La producción fue escalada de un matraz Erlenmeyer de 250 mL convencional al Biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L utilizando el k_La como parámetro de escalamiento a pH de 6, 29°C y se utilizó un pulso de 0.5 % de metanol para adaptar a la levadura a esta fuente de carbono, posteriormente se incrementó la concentración a 1.5 %. El cultivo fue monitoreado por la curva generada a partir de la medición de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), el agotamiento de la fuente carbono fue observado durante el transcurso del cultivo y cuando esta se agota en el medio se alcanzó un nivel crítico, el cual se observa como un incremento en la TOD permitiendo inferir que es necesario adicionar más fuente de carbono (inductor) al medio de cultivo, observándose gráficamente un pico en el oxígeno disuelto figura 18. Las muestras fueron colectadas en intervalos de 3 h hasta las 48 h y se hizo un registro de las condiciones del cultivo utilizando el programa BioXpert Lite (Applikon, USA). Es necesario indicar que el cultivo en biorreactor se hizo por duplicado.

La mayor productividad volumétrica ($Q_p = 16374$ U/Lh) para esta cutinasa recombinante de *A. nidulans* se logró a las 36 h con una actividad volumétrica 590 U/mL y 96 mg/L de proteína total soluble (figura 18), en este punto hay una $DO_{600\text{nm}} = 63$ U.A. Por otro lado, se muestra en la figura 19 que la temperatura se

mantiene a 29 °C y el pH a un valor de 6, por lo que el control continuo de las condiciones del cultivo permite mantener estos parámetros.

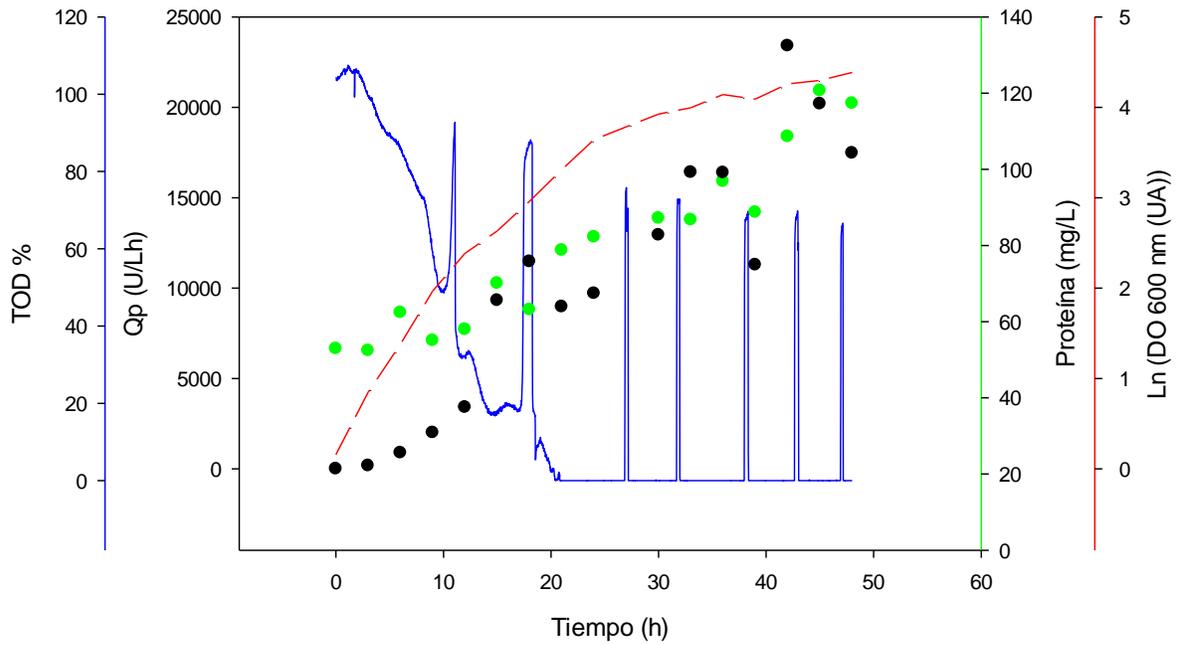


Figura 18 Efecto del escalamiento en el crecimiento, la proteína total soluble y en la Qp de *Pichia pastoris* en metanol al 1.5%, pH 6, 29°C y monitoreando la TOD en un biorreactor.

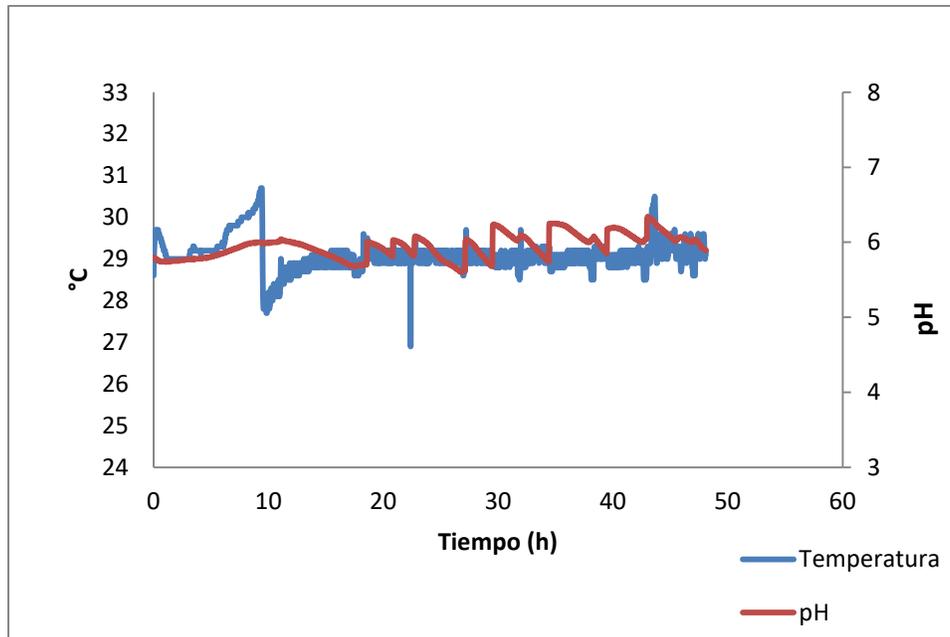


Figura 19 Condiciones de cultivo de pH y temperatura en un biorreactor.

El efecto que tiene el escalamiento usando como criterio el k_La en biorreactor sobre el crecimiento de *Pichia pastoris* se muestra en las figuras 20 y 21, el crecimiento fue monitoreado tomando muestra cada 3 h y midiendo la $DO_{600\text{ nm}}$. Es necesario señalar que el valor de $k_La = 99\text{ h}^{-1}$ es constante durante todo el cultivo. Bajo esta condición hay un aumento en la velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.19\text{ h}^{-1}$ en biorreactor debido a que hay una transferencia de masa eficiente comparado con el cultivo en matraz $\mu = 0.16 \pm 0.014\text{ h}^{-1}$, en el cual factores como lo son la geometría, el tamaño, volumen de llenado, el tapón y propiedades de la superficie (hidrofílica e hidrofóbica) del matraz, la frecuencia y diámetro de agitación de la incubadora y por último las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo (viscosidad, solubilidad del oxígeno y difusividad. Para el caso del biorreactor la transferencia se ve afectada por la coalescencia de las burbujas y el coeficiente de difusión, el cual depende de la concentración de iones y de la viscosidad del líquido (Maier & Büchs, 2001).

Para cepas AOX1 Mut⁺ cultivadas con metanol, la literatura reporta que la velocidad óptima de crecimiento para la formación de producto está en el intervalo

de valores bajos de μ de 0.002 h^{-1} hasta valores $\mu_{\text{máx}}$ de 0.14 h^{-1} . Procesos con valores de μ de 0.004 h^{-1} muestra una relación negativa entre la producción y el crecimiento (Kobayashi et al., 2000; Min et al., 2010), procesos con valores óptimos de μ 0.014 h^{-1} y 0.07 h^{-1} tienden hacia un comportamiento complejo de campana (Hang et al., 2008; Paulova et al., 2012; Potgieter et al., 2010; Yamawaki et al., 2007; Zhang et al., 2005) y procesos con μ 0.08 h^{-1} la formación de producto fue directamente proporcional al crecimiento de biomasa (Curvers et al., 2001; d'Anjou & Daugulis, 2001; Jungo et al., 2006; Schenk et al., 2008).

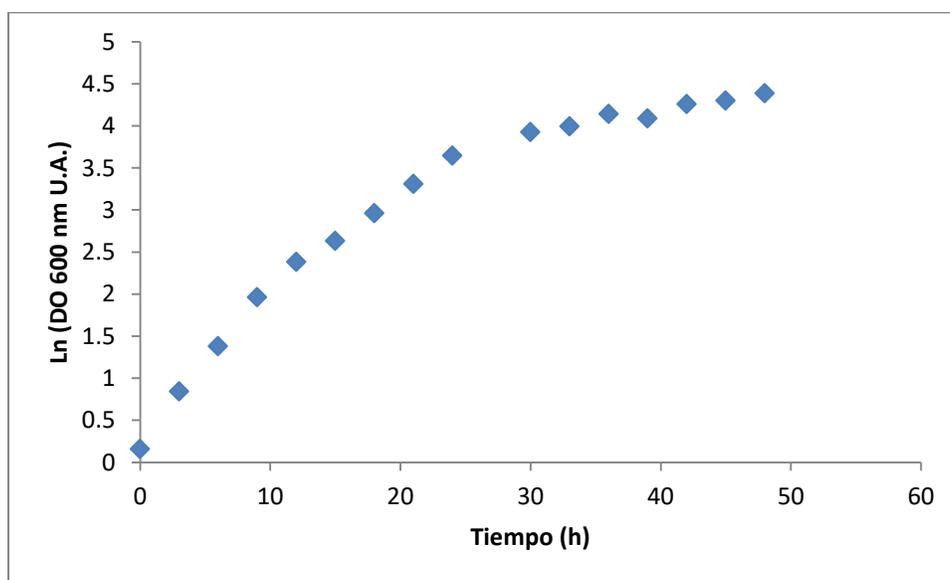


Figura 20 Efecto del escalamiento en el crecimiento de *Pichia pastoris* en metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor.

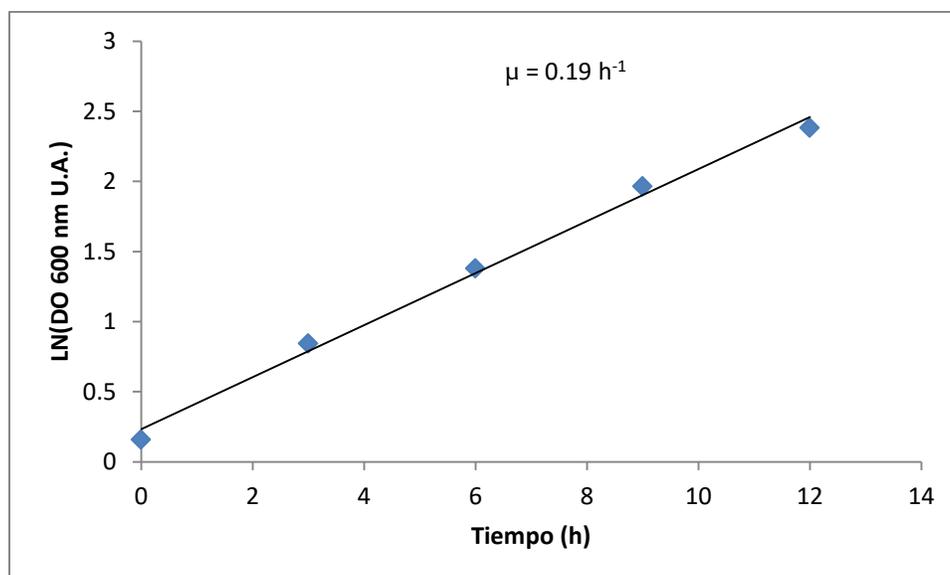


Figura 21 Efecto del escalamiento en la velocidad específica de crecimiento de *Pichia pastoris* en metanol al 1.5 %, pH 6 y 29 °C en un biorreactor.

En la tabla 10 se muestra un resumen de los resultados obtenidos durante este proyecto, se observa que hay un incremento de 6 veces la productividad volumétrica de *Pichia pastoris* expresando la AN CUT1 recombinante tanto en matraz a un $k_L a$ de 96 h^{-1} como en biorreactor a un $k_L a$ de 99 h^{-1} , además se obtuvieron valores parecidos en la concentración de proteína total soluble y con una mayor actividad enzimática comparado con lo reportado con Solís en el 2015, cuya inducción la realizó con metanol al 0.5 % y un pH inicial de 6 a 29 °C en agitación recíproca. Esto indica que las condiciones de cultivo son un parámetro que tiene un efecto en la Q_p .

Tabla 10 Comparación entre el cultivo en matraz y biorreactor

	Biorreactor	Matraz	Matraz (Solís,2015)
Cultivo (h)	36	60	24
Q_p (U/Lh)	16374	15989 ± 2040	2833
Proteína (mg/L)	97	134 ± 4	90
A. V. (U/ml)*	590	959 ± 122	68
μ (h^{-1})	0.18	0.16 ± 0.014	----
Biomasa	63	20 ± 0.2	----

*A. V. actividad volumétrica

El cultivo en biorreactor muestra un incremento en la biomasa producida, que es mayor a la que se produce en biorreactor. Esto puede deberse a que hay una mayor concentración inicial de células o a que el metanol no es solamente utilizado por *Pichia pastoris* como una fuente de energía a través de la oxidación NADH en la cadena respiratoria, sino que también es asimilado para la generación de biomasa. En este caso, el formaldehído generado en el primer paso de oxidación del metanol por la alcohol oxidasa 1, no es convertido a CO₂, en cambio es condensado a xilulosa-5-fosfato por la dihidroxiacetona sintasa (DAS 1) para después formar en la ruta metabólica dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato. La DAS 1 incrementa moderadamente durante la fase de inducción. Un balance de materia revela que el 70-80% del metanol metabolizado es convertido en CO₂ durante la fase de lote alimentado (Vanz *et al*, 2012; Kim *et al.*, 2013).

Por otro lado, en el perfil de proteínas se muestra una ligera degradación o posibles isoformas de la proteína que es observada a partir de las 24 h como lo muestra la figura 22 sin una disminución drástica de la Qp. En el zimograma (figura 23) se nota un incremento en la actividad enzimática conforme se va acumulando la enzima recombinante. Una alta expresión en *Pichia pastoris* depende de un control riguroso en la concentración de metanol y de los niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Las condiciones de aireación y agitación siempre se mantuvieron constantes por lo que la transferencia de oxígeno fue la misma durante el cultivo.

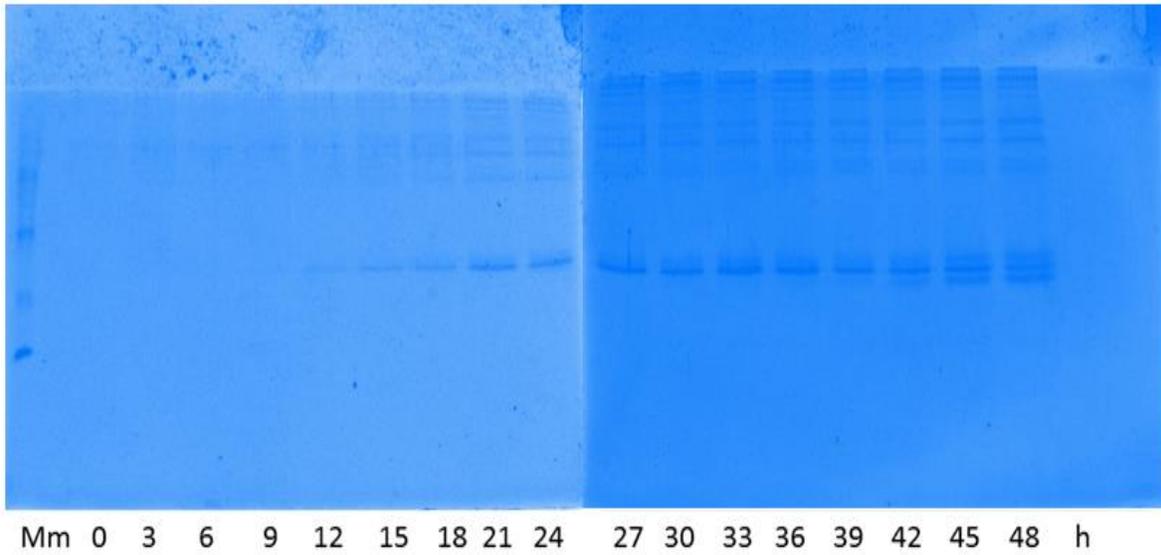


Figura 22 Perfil de proteína de la cinética de producción en biorreactor a un $k_L a$ de 99 h^{-1} utilizando metanol al 1.5 %, pH 6 y $29 \text{ }^\circ\text{C}$ en un biorreactor. Se cargaron en cada pozo 2 μg de proteína.

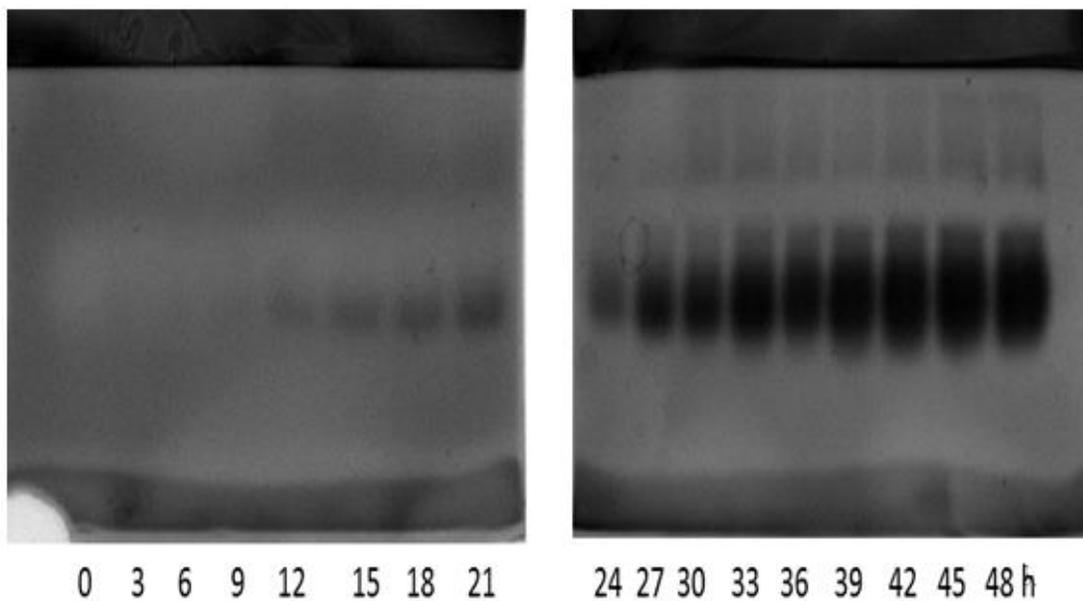


Figura 23 Zimograma de la cinética de producción en biorreactor a un $k_L a$ de 99 h^{-1} . Utilizando metanol al 1.5 %, pH 6 y $29 \text{ }^\circ\text{C}$ en un biorreactor. Se cargaron en cada pozo 2 μg de proteína.

Como lo indica la figura 24 hay un incremento en la Q_p de 6 veces con lo reportado por Solís en el 2015, cabe resaltar que el mejoramiento en las condiciones de cultivo favorecieron este incremento en la productividad volumétrica. Por otro lado se observa que la estrategia de escalamiento utilizando

el k_La permitió obtener un valor similar de Q_p en el biorreactor 16374 U/Lh comparado con el Q_p de matraces 15989 ± 2040 U/Lh, además con estos resultados se tiene una prueba de que el efecto del coeficiente volumétrico de transferencia de masa impacta directamente en la Q_p . Con esta metodología empleando diferentes valores de k_La se puede evaluar rápidamente en matraces si este coeficiente afecta la productividad de este sistema de expresión para cada gene de interés.

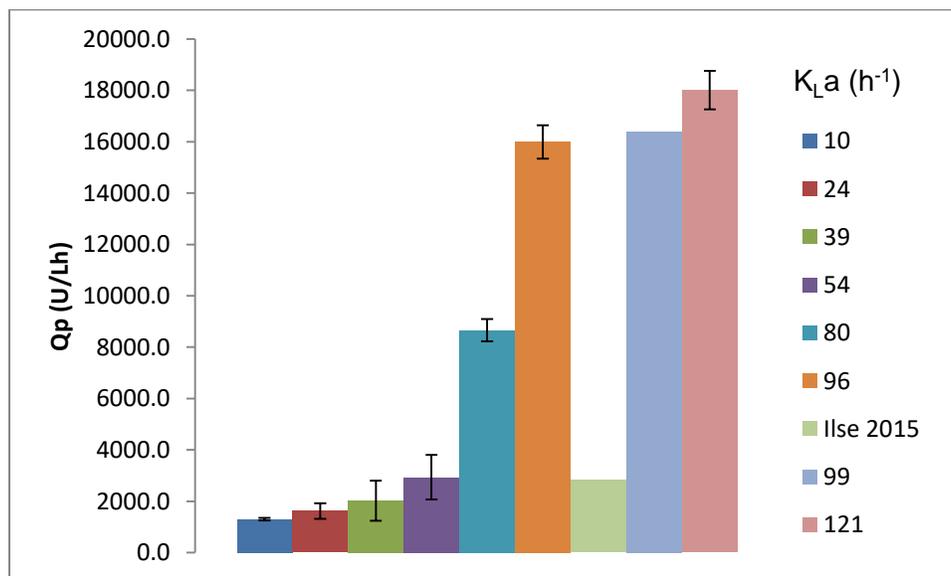


Figura 24 Efecto del k_La en la productividad volumétrica de *Pichia pastoris*, comparando el cultivo en matraces de 250 mL utilizando metanol al 0.5 % hasta las 36 h y después metanol al 1.5 % hasta las 60 h a pH 6 y 29°C con el cultivo en biorreactor utilizando un k_La de 99 h^{-1} a 1 vvm, 950 rpm, pH 6 y 29°C.

En la literatura la estrategia de escalamiento ha sido exitosa como se muestra en los siguientes ejemplos: Fernández y colaboradores en el 2016 reportan el escalamiento de la producción de etanol utilizando como microorganismo de estudio *Escherichia coli* MS04, evalúan diferentes condiciones de aireación y observaron que con un k_La de 7.2 h^{-1} que genera un ambiente microaerófilo que favorece un incremento en la productividad $Q_p = 1.3g/Lh$ para un volumen de 0.75 L. Este valor de k_La lo utilizan para escalar el bioproceso para 9.16 L y 110 L;

como resultados obtienen valores similares en la Q_p , rendimiento, crecimiento y consumo de azúcares.

Por otro lado Pan y colaboradores en el 2016 reportan que la producción de L-eritrosa utilizando *Gluconobacter kondonii* se aumenta cuando hay un incremento en el k_La , sin embargo, la condición más alta de transferencia de oxígeno no favorece un incremento en la biomasa. Es por esto que el cultivo por lote alimentado lo dividen en 2 etapas una para generar biomasa utilizando un k_La de 40.28 h^{-1} y k_La de 86.31 h^{-1} para la producción de este monosacárido. Con esta estrategia obtuvieron un incremento en la $Q_p = 6.5 \text{ g/Lh}$ comparado con su producción en matraces convencionales $Q_p = 1.1 \text{ g/Lh}$ y matraces bafleados $Q_p = 3.35 \text{ g/Lh}$. Resultados similares obtuvieron Zheng y colaboradores en el 2016 para la producción de dihidroxiacetona utilizando subproductos de biodiesel (glicerol) utilizando como microorganismo *Gluconobacter frateurii*. Evaluaron tres condiciones de k_La 18.21 h^{-1} , 46.03 h^{-1} y 82.14 h^{-1} ; encontraron que la condición media de k_La favorece un mejor crecimiento de esta bacteria (2.44 g/L biomasa seca), aunque la condición de un k_La alto favorece un incremento en la productividad 7.96 g/Lh .

Trujillo-Roldán y colaboradores en el 2013 reportaron el escalamiento de *Azospirillum brasilense* para su aplicación como biofertilizante desde cultivos en matraces donde se mejoró el medio para favorecer el crecimiento, hasta biorreactor de tanque agitado de 10 L y de 1000 L y se utilizó un k_La de 31 h^{-1} en las 3 escalas y se utilizó la correlación empírica reportada por (Klöcker & Büchs, 2012) misma que se utilizó en este proyecto como punto de partida para determinar el k_La en matraces. Las velocidades específicas de crecimiento y la viabilidad (UFC/mL) fueron reproducibles en las 3 escalas, y los perfiles de TOD son similares en las 2 escalas donde se emplearon los biorreactores. El uso del k_La como criterio de escalamiento del bioproceso ha constituido una estrategia exitosa para la producción del biofertilizante a diferentes escalas.

Seletzky y colaboradores en 2007 escalaron el bioproceso utilizando como microorganismo de estudio *Corynebacterium glutamicum* donde compararon simulaciones con datos experimentales de crecimiento, consumo de oxígeno y

ácido láctico; así como perfiles de pH en matraces agitados y un biorreactor de tanque agitado. Los parámetros operacionales fueron seleccionados para asegurar una condición que no limite el oxígeno durante todo el cultivo k_La 252 h^{-1} . La estrategia fue exitosa al comparar los parámetros evaluados durante el cultivo como lo son los perfiles de OTR, curvas de crecimiento, pH y concentración de ácido láctico.

Con estos ejemplos se observa que la estrategia del k_La es una herramienta útil para el escalamiento de un bioproceso y también una estrategia para evaluar si la producción de un producto de interés se ve afectado por la transferencia de masa.

VIII. CONCLUSIONES

- Se incrementó 6 veces la Q_p en matraz Erlenmeyer de 250 mL, la cual se obtiene a un $k_L a$ de 96 h^{-1} con una $Q_p=15989 \pm 2040 \text{ U/ L h}$ a las 60 h de cultivo utilizando metanol al 1.5% como única fuente de carbono para el crecimiento de la levadura y para producción de la enzima recombinante. Estas condiciones se escalaron a un biorreactor de 1L utilizando un $k_L a$ de 99 h^{-1} y se obtuvo una $Q_p=16374 \text{ U/ L h}$ a las 36 h de cultivo.
- Modificando las condiciones de cultivo se pudo observar qué parámetros fisicoquímicos y operacionales afectaron la Q_p , tal es el caso del $k_L a$, el pH y la concentración de inductor.
- Se determinó $k_L a$ tanto experimentalmente en matraces como empleando una correlación empírica para ser utilizado como criterio de escalamiento logrando una buena estrategia para obtener la Q_p de matraz en un biorreactor de 1L.
- Se encontró que la mejor condición en matraz Erlenmeyer convencional se pudo reproducir en un biorreactor y se alcanzó un valor similar $Q_p=16374 \text{ U/Lh}$ bajo condiciones controladas.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del pH en la productividad volumétrica de la enzima recombinante ANCUT1 en biorreactor cuando este parámetro no es controlado, ya que se ha observado de acuerdo a la literatura que el pH en los cultivos pueden disminuir a valores entre 3 a 5 y favorecer un incremento en los rendimientos.
- Reducir la temperatura de inducción a 27 °C para incrementar el Qp de la cutinasa recombinante. Cuando se disminuye la temperatura va a provocar una disminución en la velocidad de síntesis de proteínas, lo cual va a generar un menor estrés para la levadura al expresar las proteínas recombinantes
- Escalar el bioproceso utilizando tanques agitados de 10L y 100L utilizando el k_La como criterio de escalamiento con la finalidad de estudiar este criterio cuando se incrementa la escala a diferentes órdenes de magnitud y para conocer si se mantienen los mismos valores de Qp
- Estudiar el flujo metabólico de carbono a diferentes valores de k_La utilizando el inductor (fuente de carbono) con un marcaje radioactivo que permita dar un seguimiento de estos átomos a través de las rutas metabólicas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrachman D, Thongkred P, Kocharin K, Nakpathom M, Somboon B, Narumol N, Champreda V, Eurwilaichitr L, Suwanto A, Nimchua T y Chantasingh D. (2017). Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endo-polygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scpuring. BMC Biotechnol. 17(15):1-9.
- Abu Bakar FD, Abdul Murad AM, Abdul Hamid A, Zamrod Z, Muhammad Mahadi N & Sullivan Patrick (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulate*. Aspac J. Mol. Biol. Biotechnol. 13(2):63-69.
- Ahn J, Hong J, Lee H, Park M, Lee E, Kim C, Choi E, Jung J, Lee H (2007). Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. Appl Microbiol Biotechnol. (74):601–608.
- Ahn J, Hong J, Park M, Lee H, Lee E, Kim C, Lee J, Choi E, Jung J, Lee H (2009). Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter. Appl Environ Microbiol. (75):3528–3534.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H & Schwab H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnol. (98):5301-5317.
- Athmaram, TN, Singh AK, Saraswat S, Srivastava S, Misra P, Kameswara RM, Gopalan N & Rao PV (2013). A simple *Pichia pastoris* fermentation and downstream processing strategy for making recombinant pandemic Swine Origin Influenza A virus Hemagglutinin protein. J Ind Microbiol Biotechnol. (40):245-255.
- Badenes SM, Lemos F & Cabral JMS (2010). Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles, Biotechnol Lett. 32(1):399–403.
- Barrigón J M, Montesinos J L & Valero F. (2014). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol Limited or metanol non limited fed batch cultures. Biochem. Eng. J. (75):47-54.
- Barros DPC, Fonseca LP, Fernandez P, Cabral JMS & Mojovic L (2009). Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. J. Mol. Catal. B: Enzym (60):178–185.
- Baumgartner P, Harper K, Raemaekers RJM, Durieux A, Gatehouse AMR, Davies HV & Taylor MA (2003). Large-scale production and purification of recombinant *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett (25):1281-1285.
- Bawa, Zharain, Routledge SJ, Jamshad M, Clare M, Sarkar D, Dickerson I, Ganzlin M, Porner DR & Bill MR (2014). Functional recombinant protein is present in the pre-induction phases of *Pichia pastoris* cultures when grown in bioreactors, but not shake-flasks. Microb Cell Fact. 13(127):1-13.

- Bordusa F (2002). Proteases in organic synthesis, Chem Rev 102(12):4817-4867
- Bornscheuer, UT (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis, FEMS Microbiol Rev. 26(1):73-81.
- Bornscheuer UT, Rodríguez OG, Hidalgo A, Gollin A, Lyon J, Hitchman TS & Weiner DP. (2005). Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. J. Mol. Catal. B: Enzym. (36):8-13.
- Boze H, Laborde C, Chemardin P, Fabien R, Venturin C, Combarous Y, Moulin G (2001). High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. Process Biochem. (36):907-913.
- Bradford MM. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 248-254.
- Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS(1990). Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. Ann N Y Acad Sci. (589):350-362.
- Büchs J (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. Biochem. Eng. J. (7):91-98.
- Bushell ME, Rowe M, Avignone-Rossa CA, Wardell JN (2003), Cyclic fedbatch culture for production of human serum albumin in *Pichia pastoris*, Biotechnol. Bioeng. (82):678–683.
- Carvalho CML, Serralheiro MLM, Cabral JMS & Aires-Barros MLR (1997). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. Enzyme Microb Technol (21):117–23.
- Carvalho CML, Serralheiro MLM, Cabral JMS & Aires-Barros MLR (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications, Electron J Biotechnol 1(3):160-173.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. Biotechnol. Bioeng. 66(1):17-34.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, & Farrés-González A. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 13(1):16-20.
- Çelik E, Çalik P, Oliver SG (2009). Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. Yeast. (26):473–484.
- Çelik E & Çalik P (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnol Adv. (30):1108-1118.
- Cereghino JL & Cregg JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 24(1):45-66.
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol. (13):329–332.

- Chen CC, Wu PH & Huang CT (2004). A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb. Technol.* 35(4):315-320.
- Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J & Wu J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (63):121-127.
- Chen S, Tong X, Woodward RW, Du G, Wu J y Chen J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem* (283):25854–25862.
- Chen Y H, Chang TC & Chang GC (2004). Functional expression, purification, and characterization of the extra stable human placental alkaline phosphatase in the *Pichia pastoris* system. *Protein Expr Purif.* 36(1):90-99.
- Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb Technol.* (21):277-283.
- Choi D B & Park Y E. (2006). Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* (41):390-397.
- Chung J. (2000). Design of metabolic feed controllers: application to high density fermentations of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* (68):398-307.
- Ciofalo V, Barton N, Kreps J, Coats I, Shanahan D (2006), Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45
- Cos O, Ramón R, Montesinos JL & Valero F (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fac.* 5(17):1-20.
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* (11):905–910
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* (16):23–52.
- Cregg J M. *Pichia* Protocols. (2007). Rational design and optimization of fed batch and continuous fermentations. *Methods Mol Biol.* (389):43-63.
- Cregg J, Tolstorukov I (2012) *P. pastoris* ADH promoter and use there of to direct expression of proteins. United States patent US 8,222,386
- Cunha A E, Clemente JJ, Gomes R, Pinto F, Thomaz M, Miranda S, Pinto R, Moosmayer D, Donner P & Carrondo MJT (2004). Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng* 86(4): 458- 467.
- Curvers S, Linneman J, Klauser T, Wandrey C, Takors R (2001). Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation — kinetic analysis of growth and product formation. *Chem. Ing. Tech.* (73):1615–1621.
- Curvers S, Linnemann J, Klauser T, Wandrey C, Takors R (2002). Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous

fermentation - kinetic analysis of growth and product formation. *Eng Life Sci* 2. (8):229-235.

- Curvers S, Linnenmann J, Klauser C, Wandrey C & Tajors R (2008). Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation- kinetic analysis of growth and product formation. *Eng Life Sci* (8):229-235.
- de Almeida JRM, de Moraes LMP, Torres FAG (2005). Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*. (22):725–737.
- d'Anjou MC, Daugulis A (2001). A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioeng*. (72):1-11.
- Demain AL & Vaishnav P (2011). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. (27):297-306.
- Deshpande AA, Mandal G, Soorapaneni S, Prasad B, Kumar J & Padmanabhan S (2009). High level expression of nonglycosylated and active staphylokinase from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. (31):811-817.
- Dickman M & Suresh P (2009). Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit, *Physiol Mol Plant Path*. 28(2):235-242.
- Djelal H, Larher F, Martin G, Amrane A (2006). Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *J Biotechnol*. (125):95-103.
- Dutta, K, Sen S & Veeranki VD (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem*. 44(2):127–134.
- Egmond V & de Vlieg J (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochem*. 82(11):1015-1021.
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other metanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. (5):1111–1121.
- Enweremadu CC & Mbarawa MM (2009). Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil-A review. *Renew Sust Energ Rev*. (13):2205-2224.
- Esqueda-Domínguez KL. (2012). Producción, Identificación y Caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Ferreira BS, Calado CRC, Van keulen F, Fonseca LP, Cabral JMS & da Fonseca MMR (2004). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. *J Biotechnol*. (109): 159–67.
- Fernández Sandoval MT, Galíndez Mayer J, Moss Acosta C, Gosset G y Martínez A. (2016). Volumetric oxygen transfer coefficient as a means or improving volumetric ethanol productivity and a criterion for scaling up ethanol production with *Escherichia coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 92(5):981-989.

- Fett W, Wijey C, Moreau R & Osman S (1999), Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 31(1):25-29.
- Files D, Ogawa M, Scaman CH, Baldwin SA (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb Technol.* (29):335-340.
- Fontes T & Alves G. (2009) Cutinases: properties and industrial applications. *Adv Appl Microbiol.* (66):77-95.
- Gao M & Shi Z. (2013). Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Chin. J. Chem. Eng.* 21(2):216-226.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (1998). Mass transfer coefficient in stirrer tank reactors for xanthan solutions. *Biochem Eng J.* (1):1-10.
- García-Ochoa F & Gómez E. (2009). Bioreactor scale up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv* (27): 153-176.
- García-Ochoa F, Gómez E, Santos VE & Merchuk J C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem Eng J.* (49):289-307.
- Goncalves AM, Schacht E, Matthijs G, Aire Barros MR, abral JMS & Gil MH (1999). Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme Microb Technol.* (24): 60–6.
- Guarna MM, Lesnicji GJ, Tam BM, Robinson J, Radziminski CZ, Hasenwinkle D, Boraston A, Jervis E, MacGillivray RT, Turner RF & Kilburn DG (1997). On-line monitoring and control metanol concentration in shake flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* 56(3):279-286.
- Hang HF, Chen W, Guo MJ, Chu J, Zhuang YP, Zhang SL (2008). A simple unstructured model-based control for efficient expression of recombinant porcine insulin precursor by *Pichia pastoris*. *Korean J. Chem. Eng.* (25):1065–1069.
- Halonen P, Reinikainen T, Nyssölä A & Buchert JA (2009). High throughput profiling method for cutinolytic esterases. *Enzyme Microb Technol.* (44): 3994-399.
- Henzler, H J & Schedel M. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Eng.* (7):123-131.
- Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD y HG Dickinson. (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta.* (193):377-384.
- Inan Mehmet, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP & Dickerson K (2001). Optimization of temperatura-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma canicum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* 92(4):337-341.
- Jordá, J, de Jesus SS, Peltier S, Ferrer P & Albiol J (2014). Metabolic flux analysis of recombinant *Pichia pastoris* growing on different glycerol/methanol mixtures by iterative fitting of NMR-derived ¹³C-labelling data from proteinogenic amino acids. *N Biotechnol.* 31(1):120-132.

- Jungo C, Rerat C, Marison IW, von Stockar U (2006). Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut+ strain. *Enzym. Microb. Technol.* (39): 936–944.
- Jungo, C, Marison, I, von Stockar, U (2007). Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures. *J. Biotechnol.* (130):236–246.
- Kapat A, Zimand Y & Elad Y (1998), Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*, *Physiol Mol Plant Pathol* 52(1):127-137.
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S & Schmid RD. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (67):59-69.
- Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA & van Kan JA (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* 43(2):213-225.
- Katakura Y, Zhang WH, Zhuang GQ, Omasa T, Kishimoto M, Goto W, Suga KI (1998). Effect of methanol concentration on the production of human beta(2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor. *J. Ferment. Bioeng.* (86):482–487.
- Khatri N K & Hoffman F. (2006). Impact of metanol concentration on secreted protein production in oxygen limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* 93(5):871-879.
- Kikot GE, Hours RA & Alconada TM (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J Basic Microbiol.* 49(3):231-241.
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH & Lee J. (2005). Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* cutinase. *Chemosphere.* 60:1349–55.
- Kim Sehoon, warburton S, Boldogh I, Svensson C, Pon L, d’Anjou M, Stadhein TA & Choi BK (2013). Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* (166):174-181.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* (409):241–246.
- Klöckner Wolf & Büchs Jochen. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends Biotechnol.* 30(6):307-314.
- Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K (2000). High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* based on optimal methanol feeding strategy. *J. Biosci. Bioeng.* (90): 280–288.
- Kolattukudy PE (1980). Cutin, suberin and waxes, In PK Stumpf (ed), *The biochemistry of plants, 4: Lipids: Structure and Function*, Academic Press, NY 571-645.

- Kolattukudy PE, Poulouse AJ (1994). Cutinase cleaning composition. European Patent EP0322429. 94.10.19.
- Kwon MA, Kim HS, Yang TH, Song BK & Song, JK (2009). High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase. *Protein Expr Purif.* (68):104-109.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- Lamare S, Legoy MD (1995). Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution. *Biotechnol Bioeng.* (45):387-97.
- Lauwereys M, De Geus, P., De Meuter, J., Stanssens, P., Matthyssens, G (1991). Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme. In: Alberghina L, Schmid RD, Verger R, editors. *Lipases-structure function and genetic engineering*, vol. 16. Weinheim: VCH. 243-51.
- Lee CY, Nakano A, Shiomi N, Lee EK, Katoh S (2003). Effects of substrate feed rate on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* (33):358-365.
- Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM & Bostock RM. (2010). Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, MfCUT1, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus spp*, *Mol Plant Microbe Interact.* 23(2):176-186.
- Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF & Kolattukudy PE (2002). Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium f. sp. pisi* (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem.* 277(10):7905-7912.
- Li YY, Zhong KX, Hu AH, Liu DN, Chen LZ & Xu SD (2015). High level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* (108):90-96.
- Liang S, Zou C, Lin Y, Zhang X, Ye Y (2013). Identification and characterization of P GCW14: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* (35):1865-1871.
- Lim H K, Choi S, Kin KY & Jung KH (2003). Dissolved oxygen stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed batch. *Appl Microbiol Biotechnol.* (62):324-348.
- Linek V & Vacek V (1981). Chemical engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gas-liquid contactors. *Chem Eng Sci.* (36):1747-1768.
- Liu L, Yang H, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G & Chen J (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes strategies and perspectives. *Bioengineered.* 4(4): 212-223.
- Longhi S, Czjzek M, Lamzin V, Nicolas A & Cambillau C (1996). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol.* 268(4):779-799.

- Lountos GT, Riebel BR, Wellborn WB, Bommarius AS & Orville AM (2004). Crystallization and preliminary analysis of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Acta Crystallogr. D.* 60(11):2044-2047.
- MacCabe AP, Orejas M, Tamayo E N, Villanueva A & Ramón D (2002), Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*, *J Biotechnol.* 96(1):43-54.
- Maeda H, Youhei Y. Keietsu A, Fumihiko H, Masayuki M, Ryoji I, Katsuya G & Tasuku N (2002). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(1):778–788.
- Maier U (2002). Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. Gas-liquid mass transfer in shake flasks. Shaker, Aachen, PhD thesis RWTH Aachen University.
- Maiti IB, Kolattukudy PE, Shaykh M. (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium (Tropaeolum majus)* pollen. *Arch Biochem Biophys.* (196):412–23.
- Martínez, C, de Geus, P, Lauwereys, M, Matthyssens G & Cambillau C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature.* (356): 615-618.
- Masaki K, Kamini R, Hiroko I & Iefuji H (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):7548–7550.
- Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H & Sauer M (2013). Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* (113):121-135.
- McQueen R & Schottel L J (1987). Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J Bacteriol.* 169 (5):1967-1971.
- Menendez J, Valdes I, Cabrera N (2003). The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast.* (20):1097–1108.
- Min CK, Lee JW, Chung KH, Park HW (2010). Control of specific growth rate to enhance the production of a novel disintegrin, saxatilin, in recombinant *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* (110): 314–319.
- Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD & Valero F (2001). Optimization of the high level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology.* (86):59-70.
- Nawani N, Singh R & Kaur J. (2006). Immobilization and stability Studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp.* The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol.* 9(5):559-565.
- Nosedá D, Blasco M, Recúpero M & Galvagno MA (2013). Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under metanol-inducible AOX1 promoter. *Protein Expr Purif.* (104):235-244.
- Nosedá D, Recúpero M, Blasco M, Ortíz GE & Galvagno MA (2013). Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expr Purif.* (92):235-244.

- Novak M & Klekner V (1988). Comparison of various methods of KLa estimation in cultures of filamentous microorganisms. *Biotechnol Technol.* (2):243–248.
- Oliveira R, Clemente JJ, Cunha AE, Carrondo MJT (2005). Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation. *J. Biotechnol.* (116):35–50.
- Pan L, Fang Y K, Zhou P, Jin Kq, Wang G, L Yp. (2016). Strategy of oxygen transfer coefficient control on the L-erythrulose fermentation by newly isolated *Gluconobacter kondonii*. *Electron J Biotechnol.* (24):26-31.
- Panda T & Gowrishankar BS (2005). Production and applications of esterases, *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(2):160-169.
- Parvaresh F, Robert H, Thomas D, Legoy MD. (1992) Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnol Bioeng.* (39):467–73.
- Paulova L, Hyka P, Branska B, Melzoch K, Kovar K (2012). Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut (+). *J. Biotechnol.* (157):180–188.
- Potgieter TI, Kersey SD, Mallem MR, Nysten AC, d'Anjou M (2010). Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* (106): 918–927.
- Potvin G, Ahmad A y Zhang Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J.* (64):91-105.
- Prielhofer R, Maurer M, Klein J, Wenger J, Kiziak C, Gasser B, Mattanovich D (2013). Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Factories.* 12:5.
- Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB (2005). Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochem Eng J.* (23):25–30.
- Rabert, Claudia, *et al.* (2013). Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microbiol.* 44(2):351-356.
- Regado MA, Cristovao BM, Moutinho CG, Balcao VM, Aires-Barros R, Ferreira JPM & Malcata FX (2007), Flavour developmet via lipolysis of milkfats: Changes in free fatty acid pool. *Int J Food Sci Tech.* 42(8):961-968.
- Ren HT, Yuan JQ, Bellgardt KH (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J. Biotechnol.* (106):53–68.
- Ren H & Yuan J. (2005). Model based specific growth rate control for *Pichia pastoris* to improve recombinant protein production. *J Chem Technol Biotechnol.* (80):1268-1272.
- Reynoso-Cereceda GI, García-Cabrera R, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2016). Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing:

Mass transfer coefficient K_La characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem. Eng. J.* (105):379-390.

- Rubio M, Cardoza E, Hermosa R, Gutiérrez S & Monte E (2008). Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34, *Curr Genet.* 54(6):301-312.
- Sanchez A, Garcia F, Contreras A, Molina E, Chisti Y(2000). Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J.* (46):1872–1887.
- Sánchez-Sánchez M. (2015) Aplicación de las cutinas AN CUT1 y AN CUT2 recombinantes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Sarka S, Sreekanth B, Kant S, Banerjee R & Bhattacharyya BC (1998). Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Eng.* 19(1):29-32.
- Schenk J, Marison I W y Von Stockar U. (2007). A simple method to monitor and control methanol feeding of *Pichia pastoris* fermentations using mid-IR spectroscopy. *J Biotechnol.* (128):344-353.
- Schenk J, Balazs K, Jungo C, Urfer J, Wegmann C, Zocchi A (2008). Influence of specific growth rate on specific productivity and glycosylation of a recombinant avidin produced by a *Pichia pastoris* Mut+ strain. *Biotechnol. Bioeng.* (99):368–377.
- Sebastian J, Kolattukudy PE (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch Biochem Biophys.* (263):77–85.
- Seletzky JM, Noak U, Fricke J, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J (2007). Scale up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol Bioeng.* 98(4):800-811.
- Seman WM, Bakar SA, Bukhari NA, Gaspar SM, Othman R, Nathan S, Mahadi NM, Jahim J, Murad AM & Bakar FD (2014). High level expression of *Glomerella cingulate* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed batch conditions. *J Biotechnol.* (184):219-228.
- Serralha FN, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Aires Barros MR, Cabral JMS & Ribero FR (1998). Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *J Mol Catal B Enzyme.* (4):303–11.
- Sharma R, Chisti Y & Banerjee UC (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnol Adv.* 19(8):627-662.
- Shen S, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM (1998). A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 2. (16):93–102.
- Shurler Michael & Kargi Fikret. (2002). *Bioprocess engineering basic concepts.* 2ª ed. Prentice Hall. USA.
- Sinha J, Plantz BA, Zhang W, Gouthro M, Schlegel VL, Liu CP, Meagher MM (2003). Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut+ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile, *Biotechnol. Prog.* (19):794–802.

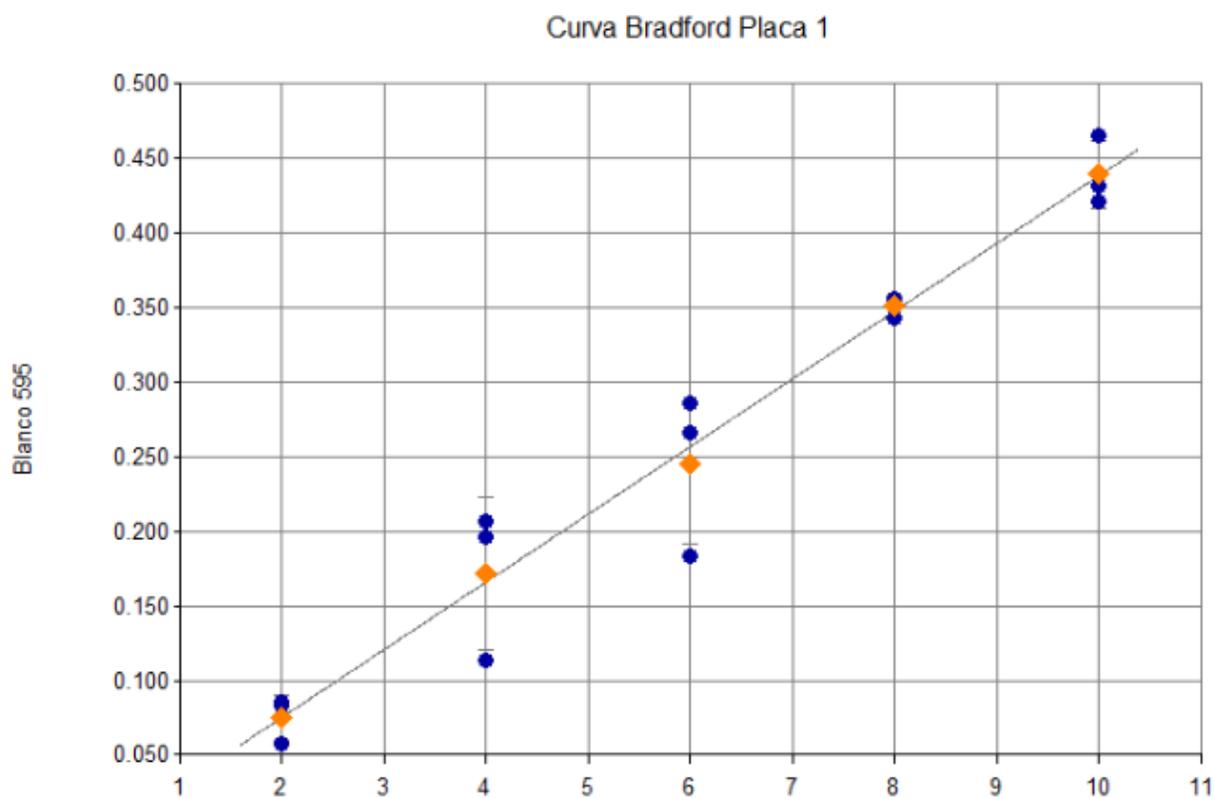
- Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Sánchez-Ferrando F, Szyperski T & Ferrer P (2007). Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. *Microbiology*. (153):281-290.
- Solís-Báez I (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante ANCUT1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Speranza P, Carvalho PDO & MacEdo GA (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *J Mol Catal B: Enzym*. (72):181– 186.
- Stadlmayr G, Mecklenbräuker A, Rothmüller M, Maurer M, Sauer M, Mattanovich D, Gasser B (2010). Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J Biotechnol*. (150):519–529.
- Stamatis H, Sereti V & Kollis F (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*. 76(12):1505-1510.
- Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M., 1998. High cell-density fermentation. In: Higgins, D.R., Cregg, J.M. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.107–120.
- Surribas A, *et al.* (2003). On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis, *Biotechnol letters*. (25):1795-1800.
- Taiz L & Zeiger E (2002). *Plant physiology*, Freeman, 3a ed. USA 320-332.
- Tafolla-Arellan JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, Zacarías-García L, & Báez-Sañudo R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista fitotecnica mexicana*. 36(1): 3-12.
- Tanabe K, Syoyo N & Keisuke K (1988). Pathogenicity of cutinase and pectic enzymes- deficient mutants or *AlteARNria alteARNta*, *Ann Phytopath Soc Japan*. 54(2):552-555.
- Tang, Zizhong *et al.* (2014). Cloning and expression of *A. oryzae* β -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*. 7567-7573.
- Taylor M (2002), Large-scale production, purification, and characterisation of recombinant Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif*. (26):394–405.
- Teles FRR, Cabral JMS, Santos JAL. (2001). Enzymatic degreasing of a solid waste from the leather industry by lipases. *Biotechnol Lett*; 23(1):159–63.
- Trail F & Koller W (1990). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity, *Physiol Mol Plant Pathol*. 36(4):495-508.
- Trentmann O, Khatri NK, Hoffmann F (2004), Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Prog.* (20):1766–1775.

- Trinh LB, Phue JN, Shiloah J (2003). Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* (82):438–444.
- Trujillo-Roldán M A, Valdéz Cruz N A, González Monterrubio C F, Acevedo Sánchez E V, Martínez Salinas C, García Cabrera R I, Gamboa Suasnavart RA, Marín Palacio LD, Villegas J, Blancas Cabrera A. (2013). Scale up from shake flasks to pilot scale production of the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* (97):9665-9674.
- Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR (1987). Expression of the lacZ gene from twomethanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* (15):3859–3876.
- Van Kan JA, van't Klooster JW , Wagemakers CA, Dees DT & van der Vlugt-Bergmans CJ (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato, *Mol Plant Microbe In.* 10(1):30-38.
- Van't Riet K (1979). Review of measuring methods and nonviscous gas–liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Process Des Dev.* (18):357–364.
- Vergara-Barroso AMP. (2010). Inmovilización de esterases a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Wagner LW, Matheson NH, Heisey RF, Schneider K(1997). Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Tech.* (11):791–795.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene.* (186):37–44.
- Whiteley C & Lee D (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Microb Technol.* (38):291-316.
- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD. (2000). Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. *Arch Biochem Biophys.* (382):31–8.
- Wu M, Liu W, Yang G, Yu D, Lin D, Sun H & Chen S (2014). Engineering of a *Pichiapastoris* expression system for high level secretion of HSA/GH fusion protein. *Appl Biochem Biotechnol.* 2400-2411.
- Yamawaki S, Matsumoto T, Ohnishi Y, Kumada Y, Shiomi N, Katsuda T (2007). Production of single-chain variable fragment antibody (scFv) in fed-batch and continuous culture of *Pichia pastoris* by two different methanol feeding methods. *J. Biosci. Bioeng.* (104):403–407.
- Yang JD & Wang NS (1992). Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnol Prog.* (8):244–251.
- Zhang W, Inan M & Meagher (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* (5):275-287.

- Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin serotype A. *Biotechnol. Bioeng.* (70):1–8.
- Zhang W, Smith LA, Plantz BA, Schlegel VL & Meagher MM (2002). Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. *Biotechnol Prog.* (18):1392-1399.
- Zhang WH, Potter KJ, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (30):210–215.
- Zhang WH, Liu CP, Inan M, Meagher MM (2004). Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. *J Ind Microbiol Biotechnol.* (31):330-334.
- Zhang W, Sinha J, Smith LA, Inan M, Meagher MM (2005). Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnol. Prog.* (21):386–393.
- Zheng XJ, Jin Kq, Zhang Lei, Wang G, Liu YP. (2016). Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *Braz J Microbiol.* (47):129-135.
- Zhu, T, Guo M, Tang, Z, Zhang, M, Zhuang, Y, Chu, J (2009). Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* (107):954–963.

ANEXOS

Anexo A: Curva patrón para cuantificación de proteínas por Bradford

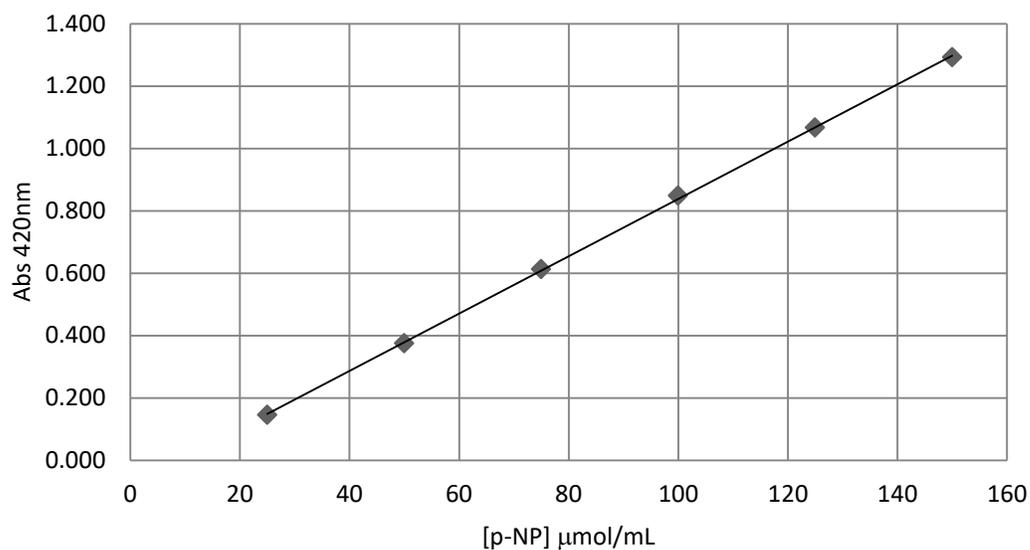


Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y=A*X+B$	0.0454	-0.0158	0.998

*Realizada en el espectrofotómetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).

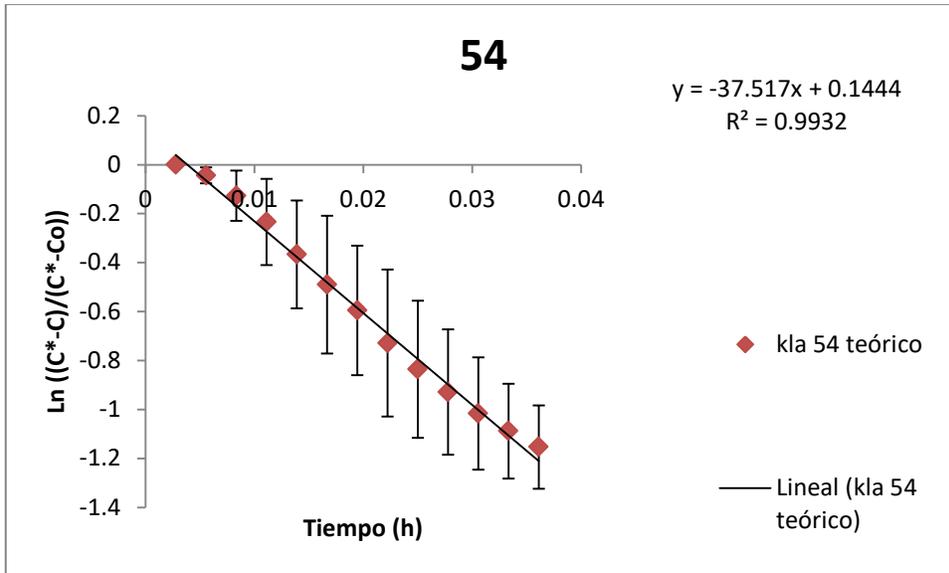
Anexo B: Curva patrón de p-NP para medición de actividad cuantitativa

Curva patrón p-NP

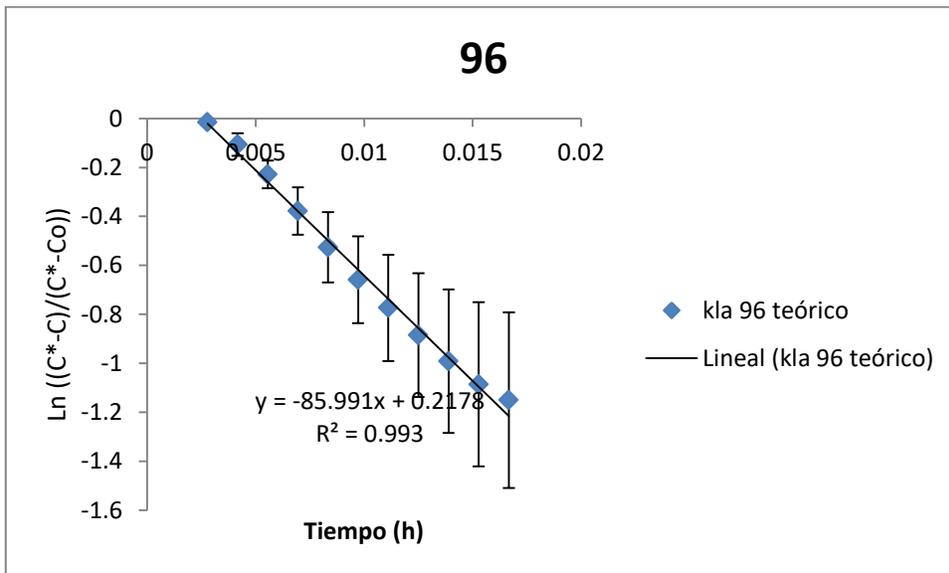


Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
p-NP	$Y=A*X+B$	0.0092	-0.0816	0.999

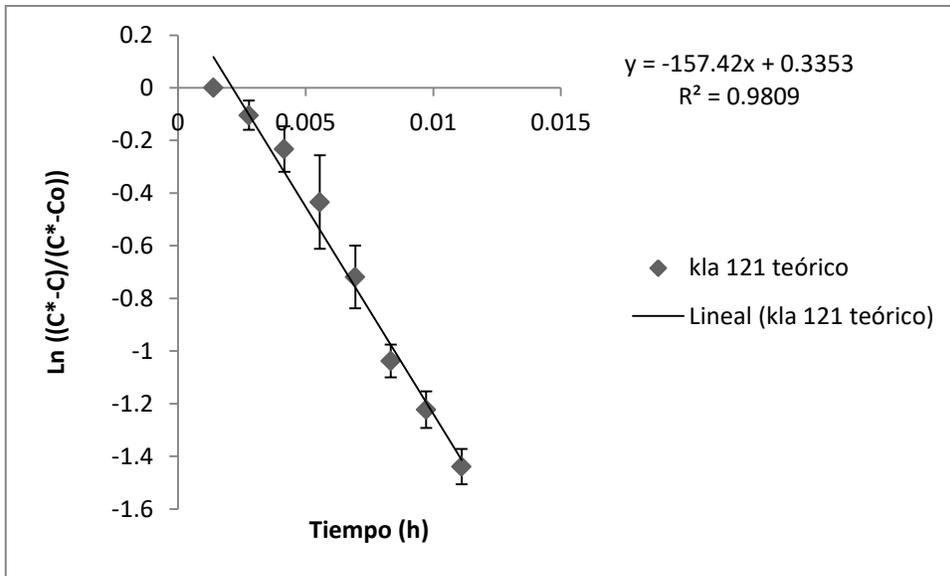
Anexo C: Determinación del K_La en matraz usando el método dinámico.



Determinación del k_La teórico de 54 h^{-1} con un volumen de llenado del 20% y 300 rpm obteniendo un k_La experimental de 63 h^{-1} .

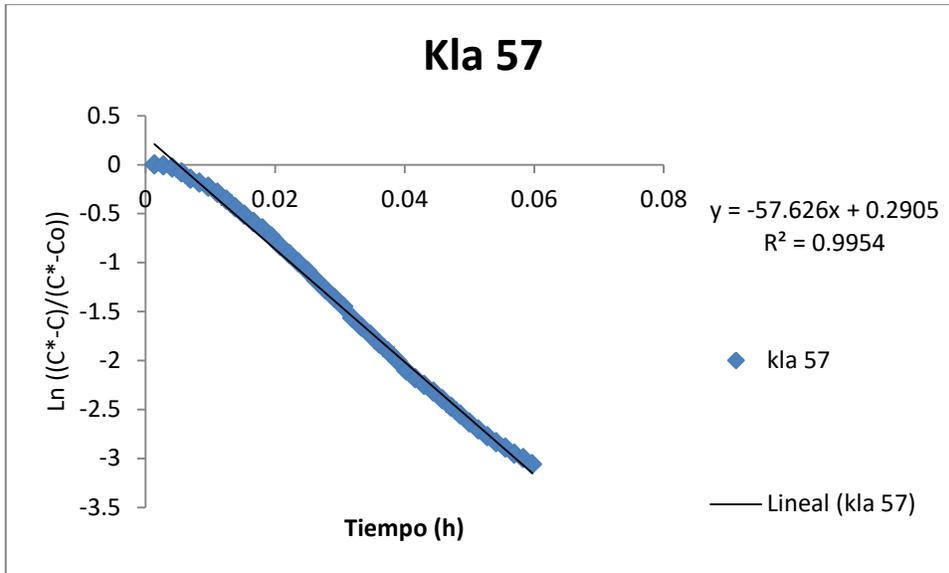


Determinación del k_La teórico de 96 h^{-1} con un volumen de llenado del 10% y 300 rpm obteniendo un k_La experimental de 86 h^{-1} .

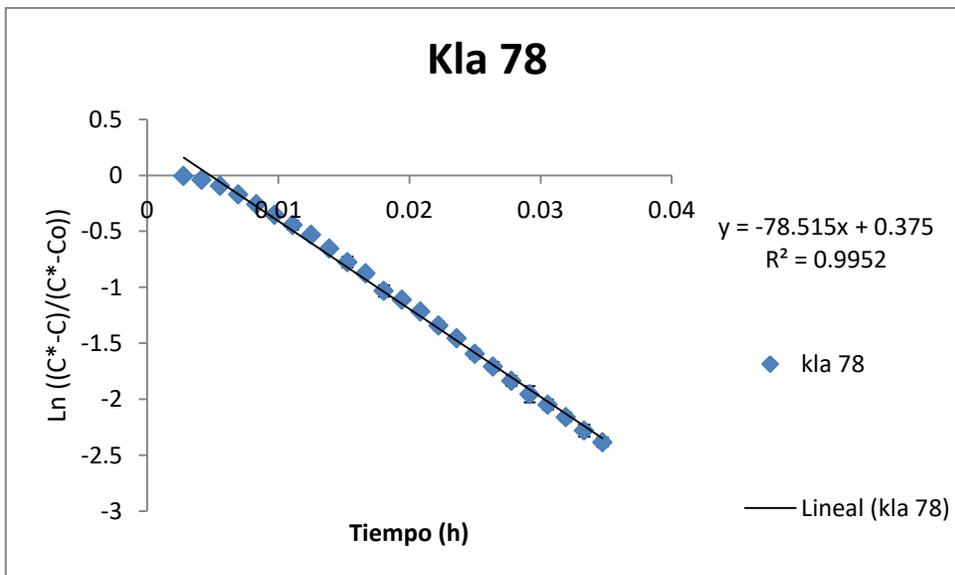


Determinación del $k_L a$ teórico de 121 h^{-1} con un volumen de llenado del 8% y 300 rpm obteniendo un $k_L a$ experimental de 157 h^{-1} .

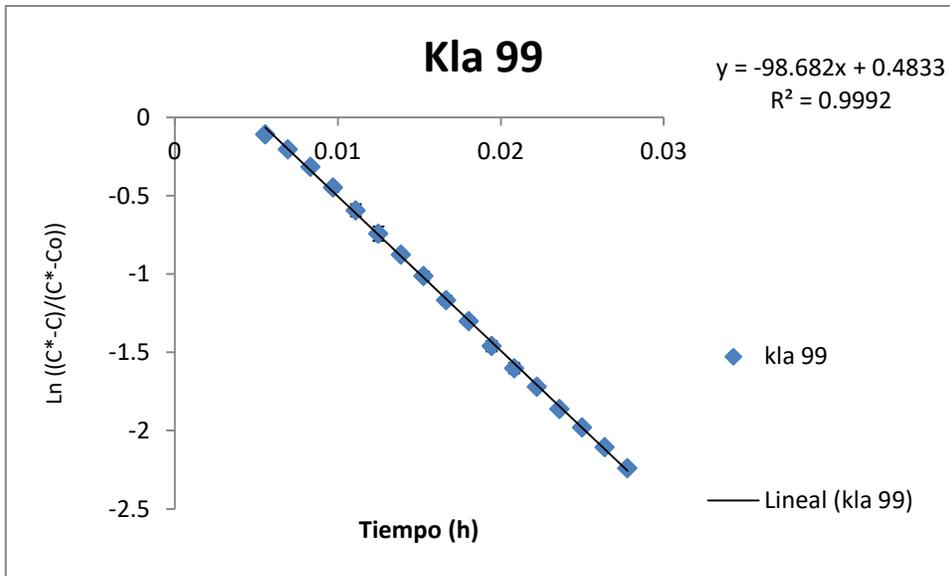
Anexo D: Determinación del K_La en biorreactor usando el método dinámico.



Determinación del k_{La} 57 h^{-1} en un biorreactor Applikon de 1.5L volumen nominal de fondo plano, con un volumen de llenado de 1 L de agua, 1 vvm, 500 rpm, 29 °C.



Determinación del k_{La} 78 h^{-1} en un biorreactor Applikon de 1.5L volumen nominal de fondo plano con un volumen de llenado de 1 L de agua, 1 vvm, 700 rpm, 29 °C



. Determinación del $k_L a$ de 99 h^{-1} en un biorreactor Applikon de 1.5L volumen nominal de fondo plano con un volumen de llenado de 1 L de agua, 1 vvm, 950 rpm, 29°C .