



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química**

**Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado**

Tesis que para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias en Ingeniería Química**

Presenta:

**Rodríguez Suárez Brenda**

Director de Tesis: **Dr. Omar González Ortega**  
Codirector de Tesis: **Dr. Sergio Rosales Mendoza**



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



**UASLP-Sistema de Bibliotecas**  
**Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso**  
**DERECHOS RESERVADOS**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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 se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado © 2024 by Brenda Rodríguez Suárez is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto fue realizado en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina adscrito a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre julio de 2023 y julio de 2024, bajo la dirección de Dr. Omar González Ortega y Dr. Sergio Rosales Mendoza y fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (proyecto de Ciencia de Frontera-2019, no. 848290).

El programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000896. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 830926, Número de CVU: 1244482.

Los datos del trabajo titulado Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado están bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

## **Solicitud de Registro de Tesis Maestría**

San Luis Potosí SLP a noviembre/ 24 /2022

### **Comité Académico**

#### **En atención a: Coordinador/a del Posgrado**

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado

que desarrollará el/la estudiante: Brenda Rodríguez Suárez

bajo la dirección y/o Co-dirección de: Dr. Omar González Ortega y Dr. Sergio Rosales Mendoza

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

( ) Sí debido a que:

( ) No

(X) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

**A T E N T A M E N T E**

---

Brenda Rodríguez Suárez

---

Dr. Omar González Ortega



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química**

**Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un  
biorreactor de tanque agitado**

Tesis que para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias en Ciencias Ingeniería Química**

Presenta:

**Rodríguez Suárez Brenda**

**SINODALES:**

**Presidente: Dr. Mariano de Jesús García Soto**

**Secretario: Dr. Omar González Ortega**

**Vocal: Dr. Raúl Ocampo Pérez**

**Suplente: Dr. Sergio Rosales Mendoza**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: JULIO 2024

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

Dr. Omar González Ortega: Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Sergio Rosales Mendoza: Codirector de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Mariano de Jesús García Soto: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Raúl Ocampo Pérez: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química

Programa de Maestría

Formato M5

## Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a junio/ 24 /2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 24 del mes de junio del año 2024 El que suscribe Brenda Rodríguez Suárez Alumno(a) del programa de posgrado en Ciencias en Ingeniería Química adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Omar González Ortega y Dr. Sergio Rosales Mendoza y cede los derechos del trabajo titulado Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección brenda970515@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Brenda Rodríguez Suárez

## **Carta de Análisis de Similitud**

San Luis Potosí SLP a junio/28 /2024

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
**Biblioteca de Posgrado FCQ**

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada **Producción de candidatos vacunales contra SARS-**

**CoV-2 en un biorreactor de tanque agitado** presentada por el autor **Brenda Rodríguez Suárez**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **18%** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una revisión exhaustiva de forma de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

---

Dr. Erik César Herrera Hernández  
Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias en Ingeniería Química



*A mis padres por darme la vida y el aliento para cumplir con mis metas.*

*A mi esposo que me ha entregado tanto amor.*

## Agradecimientos académicos

Al Dr. Omar González, por permitirme ser su alumna y darme la oportunidad de conocer y explorar este tema de investigación que tanto me ha apasionado desde la licenciatura. Por sus correcciones, asesorías y apoyo durante la realización del proyecto.

Al Dr. Sergio Rosales, por permitirme formar parte del equipo de investigación del laboratorio de Biotecnología del CICSaB y tener la confianza en mí para desarrollar este proyecto.

Al Dr. Mariano de Jesús García por sus correcciones, asesorías, conocimientos y, principalmente, por haberme enseñado y apoyado en los procesos de montaje, estabilización y limpieza del biorreactor. Su ayuda fue significativa durante el proyecto.

Al Dr. Raúl Ocampo por su colaboración, asesoría, correcciones y evaluaciones durante el proyecto. Además, agradecerle eternamente por haberme dado la oportunidad, como coordinador del posgrado, de iniciar esta valiosa etapa de mi vida y poder llegar hasta aquí.

A la Dr. Lourdes Betancourt y la MC. Andrea Romero, por haberme instruido y apoyado durante mis inicios y estancia en el laboratorio de biotecnología del CICSaB. A los compañeros con los que colaboré durante mi proyecto en especial a Arleth Miranda y Dr. Alejandra Wong las cuales me enseñaron pacientemente las habilidades que necesitaba en el laboratorio. Al resto de estudiantes que trabajan en el laboratorio por su amistad y apoyo durante mi estancia.

A todos los profesores, académicos y administrativos que contribuyeron a mi formación durante la maestría.

A CONAHCYT por brindarme los fondos para poder realizar el posgrado y titularme.

## Agradecimientos personales

A mis padres, mi hermana y mis abuelos que me han apoyado incondicionalmente en todos mis sueños y proyectos y que, desde la distancia, continúan haciéndolo.

A mi esposo, por siempre creer en mí y darme ánimos para lograr más de lo que me creo capaz. Por ser mi compañero de vida y acompañarme durante este gran reto.

A mis suegros que han sido como padres para mí y me han apoyado en todas mis aspiraciones.

A mis compañeras, Elizabeth y Leidis, que fueron un gran apoyo emocional y académico durante el tiempo que compartimos juntas y continúan siéndolo.

A mis compañeros, Alejandro y Roxana, que siempre mostraron disposición en ayudarme, principalmente durante las primeras etapas del posgrado.

A mis compañeros del posgrado, Mariana, Jitzell, Antonio y Víctor, que fueron de gran apoyo durante las materias y una mina de conocimientos y experiencias de la cual aprendí mucho.

A mi gran amiga Nadia, por el amor, cariño y maravillosos consejos que me entregó. Por ayudarme con las dudas que tenía y por regalarme minutos de paz junto al café que disfrutábamos juntas.

A mi Manola, quien me enseñó lo que significa el amor incondicional y cuánto me queda aún por aprender de este mundo.

## Resumen

La proteína recombinante LTB-p50 previamente expresada en *E. coli* es un candidato vacunal contra el SARS-CoV-2 que ha tenido importantes resultados. Sin embargo, la tendencia a formar cuerpos de inclusión de este sistema de expresión es contraproducente. En este estudio fue evaluada la expresión de la proteína LTB-p50 en el sistema de expresión de la levadura *Pichia pastoris* X33 con el objetivo de obtener la proteína soluble y secretada al medio. Tres cepas modificadas fueron obtenidas con el vector de expresión pPICZ $\alpha$ -LTB-p50, cuya expresión en matraz evidenció cuál tuvo mejor respuesta en la expresión extracelular de la proteína recombinante. La cepa seleccionada fue cultivada en un biorreactor, evaluado dos estrategias para la expresión de la proteína. Cinco ensayos experimentales fueron desarrollados a escala de 1.2 L de volumen efectivo. Los resultados mostraron poca presencia de la proteína recombinante en el sobrenadante. Los ensayos de Dot Blot reportaron bajas concentraciones de la proteína principalmente expresada de manera intracelular. Los Western Blot desarrollados fueron negativos en todos los casos. La fermentación fue establecida a 30 °C, con 30% de concentración de oxígeno disuelto y agitación entre 500-1000 rpm. El sistema no fue capaz de garantizar la concentración de OD requerida. Finalmente, la estrategia de inducción incluyó la etapa de adaptación a metanol que debe ser optimizada.

Palabras claves:

*Pichia pastoris*, fermentación, expresión, inducción

## Abstract

The LTB-p50 recombinant protein previously expressed in *E. coli* is a vaccine candidate against SARS-CoV-2 that has had important results. However, the tendency of this expression system to form inclusion bodies is counterproductive. In this study, the expression of the LTB-p50 protein was evaluated in the expression system of the yeast *Pichia pastoris* X33 with the objective of obtaining the soluble protein secreted into the medium. Three strains modified with the pPICZ $\alpha$ -LTB-p50 expression vector were obtained, whose expression in flasks showed which had the best response in the extracellular expression of the recombinant protein. The selected strain was brought to bioreactor format and two strategies for protein expression were evaluated. Five experimental runs were developed at a scale of 1.2 L of effective volume. The results showed incipient presence of the recombinant protein in the supernatant. Dot Blot assays reported low concentrations of the protein mainly expressed intracellularly. The Western Blot developed was negative in all cases. Fermentation was established at 30 °C, 30% dissolved oxygen concentration and stirring between 500 -1000 rpm. The system was not able to guarantee the required OD concentration. Finally, the induction strategy included the adaptation stage to methanol, which must be optimized.

Key words:

*Pichia pastoris*, fermentation, expression, induction

## Contenido

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Introducción.....  | 1  |
| 2.    | Antecedentes .....   | 3  |
| 2.1   | SARS-CoV-2: estructura y mecanismo de entrada a las células .....  | 3  |
| 2.2   | Desarrollo de candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2.....       | 5  |
| 2.2.1 | Vacunas de subunidad.....  | 5  |
| 2.3   | Levaduras: Pichia pastoris .....                                   | 7  |
| 2.3.1 | Cepas y vector de expresión.....                                   | 8  |
| 2.4   | Expresión en biorreactor .....                                     | 9  |
| 2.4.1 | Influencia de la composición del medio .....                       | 10 |
| 2.4.2 | Influencia de la temperatura de fermentación.....                  | 11 |
| 2.4.3 | Influencia del pH .....  | 12 |
| 2.4.4 | Influencia de la concentración de oxígeno disuelto.....            | 13 |
| 2.5   | Operación Fed-Batch. Estrategias de inducción y control.....       | 14 |
| 2.5.1 | Control OD-stat (alimentación limitante de metanol).....           | 15 |
| 2.5.2 | Control $\mu$ -stat (alimentación limitante de metanol).....       | 16 |
| 2.5.3 | Control Metanol-stat (alimentación no limitante de metanol) .....  | 18 |
| 2.6   | Cinética de crecimiento.....                                       | 21 |
| 2.6.1 | Fases del cultivo en lote .....                                    | 21 |
| 2.6.2 | Modelos cinéticos de crecimiento microbiano. Modelo de Monod ..... | 23 |
| 3.    | Justificación.....   | 25 |
| 4.    | Hipótesis .....  | 26 |
| 5.    | Objetivos .....  | 26 |
| 5.1   | Objetivo General .....   | 26 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.2   | Objetivos específicos .....  | 26 |
| 6.    | Materiales y métodos .....   | 27 |
| 6.1   | Crecimiento en matraz .....  | 27 |
| 6.2   | Generación del banco de trabajo .....  | 27 |
| 6.3   | Expresión en biorreactor de tanque agitado .....   | 28 |
| 6.3.1 | Estrategia A.....  | 30 |
| 6.3.2 | Estrategia B .....   | 30 |
| 6.4   | Modificaciones realizadas al biorreactor .....   | 31 |
| 6.5   | Análisis de las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ..... | 32 |
| 6.6   | Análisis de las muestras mediante Dot Blot y Western Blot.....                             | 33 |
| 6.7   | Cinética de crecimiento.....   | 34 |
| 6.7.1 | Crecimiento celular .....  | 35 |
| 6.7.2 | Cuantificación de concentración de metanol y glicerol por HPLC.....                        | 36 |
| 7.    | Resultados y Discusión .....   | 37 |
| 7.1   | Crecimiento en matraz.....   | 37 |
| 7.2   | Detección de la proteína expresada en matraz.....  | 38 |
| 7.3   | Expresión en biorreactor. Estrategia A.....  | 43 |
| 7.3.1 | Resultados obtenidos en el Ensayo 1 – Estrategia A.....                                    | 44 |
| 7.3.2 | Resultados obtenidos en el Ensayo 2 – Estrategia A.....                                    | 47 |
| 7.3.3 | Resultados obtenidos en el Ensayo 3 – Estrategia A.....                                    | 50 |
| 7.4   | Crecimiento en biorreactor. Estrategia B.....  | 54 |
| 7.4.1 | Resultados obtenidos en el Ensayo 1 – Estrategia B .....                                   | 55 |
| 7.4.2 | Resultados obtenidos en el Ensayo 2 – Estrategia B .....                                   | 60 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 7.4.3 | Resultados obtenidos en el Ensayo 3 – Estrategia B .....  | 63 |
| 7.5   | Detección de la proteína expresada en el biorreactor..... | 67 |
| 7.5.1 | Ensayo 1A .....   | 67 |
| 7.5.2 | Ensayo 2A .....   | 68 |
| 7.5.3 | Ensayo 3A .....   | 70 |
| 7.5.4 | Ensayo 1B .....   | 72 |
| 7.5.5 | Ensayo 2B .....   | 73 |
| 7.5.6 | Detección de la proteína Dibloque (Ensayo 3B) .....       | 75 |
| 7.6   | Cinética Microbiana.....                                  | 75 |
| 7.7   | Discusión de los resultados .....                         | 79 |
| 8.    | Conclusiones.....   | 83 |
| 9.    | Bibliografía .....  | 84 |
| 10.   | Anexos.....   | 93 |



## 1. Introducción

En el año 2020 la pandemia de COVID-19 afectó al mundo y logró extenderse a todos los rincones del planeta, infectando a millones de personas. La enfermedad de COVID-19 (coronavirus disease 2019) es causada por un virus proveniente de la familia de los coronavirus denominado SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) causando problemas respiratorios y síntomas como fiebre, escalofríos y dolor de garganta, entre otros (*World Health Organization, 2023b*). Desde diciembre de 2019 han sido registrados en todo el mundo más de 760 millones de casos y 6.9 millones de fallecimientos. No obstante, el consenso entre organizaciones es que la cifra real es mayor (*World Health Organization, 2023b*).

Esta alarmante situación demostró la necesidad de tener en el país mecanismos de respuestas rápidas y efectivas. Como consecuencia del cambio climático y otras muchas realidades, no estamos exentos de que llegue una nueva oleada de COVID-19 o que surjan nuevas pandemias cada vez más mortíferas y contagiosas. Es necesario lograr una autosuficiencia en la producción de fármacos de manera rápida y eficaz para dar respuesta inmediata a estas posibles situaciones y disminuir sus consecuencias.

El desarrollo de vacunas de alta eficacia no es tarea sencilla. Sin embargo, gracias a los avances de la ciencia, el desarrollo de candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2 ha sido uno de los más rápidos de la historia. Rápidamente, a inicios de 2020, más de 200 candidatos vacunales estaban en estudios preclínicos y clínicos por todo el mundo (Saleh et al., 2021). Para finales de 2020 e inicios de 2021 la OMS había autorizado de manera extraordinaria el uso de vacunas de emergencia como las vacunas de ARNm de Pfizer y Moderna y las vacunas de vector de adenovirus de AstraZeneca/Oxford y de Johnson & Johnson (Heidary et al., 2022; Saleh et al., 2021).

También fueron desarrolladas vacunas de subunidad de proteína basadas principalmente en las proteínas espícula (S) y nucleocápside (N) y en el dominio RBD por su importancia en el mecanismo de infección del virus a la célula (Shahcheraghi et

al., 2021). De esta última alternativa han sido reportados varios candidatos que han llegado a ensayos clínicos. El candidato ZF2001 producido en células CHO y aluminio como adyuvante (Yang et al., 2021), Abdala (CIGB-66) (Hernández-Bernal et al., 2022) y BEVOC2 (Corbevax) (Pollet et al., 2021), ambos producidos en *P. pastoris*.

Wong-Arce et al. (2024) reportaron recientemente la obtención de un candidato vacunal multi-epítopo a partir de la proteína quimera LTB-p50 producida en *E. coli* encausada a los epítomos S1 y S2 altamente conservados y con el uso de la subunidad B de la enterotoxina LT de *E. coli* como acarreador. Sin embargo, la tendencia de *E. coli* para la formación de antígenos en forma de cuerpos de inclusión es un problema que implica establecer procesos de solubilización y replegado que resultan laboriosos y que no garantizan el éxito en la obtención de un antígeno soluble y funcional (Basu et al., 2011).

## **2. Antecedentes**

La pandemia de COVID-19 ha tenido alto impacto en la humanidad afectando las esferas económica, social, política, de salud e incluso medioambiental. No todas las partes del mundo lograron enfrentar dicha pandemia con las mejores herramientas e infraestructura. América Latina y el Caribe es un ejemplo de esto donde la pandemia llegó a un entorno desfavorecido para su control y contención (Vega & Morales, 2021). En México, la pandemia irrumpió en un momento en el que el sistema de salud del país no estaba preparado. El presupuesto en salud mostraba para 2020 un estancamiento, disminuyendo su presupuesto desde 2014 a 2018 (Vega & Morales, 2021). Sumado a esto, a finales de 2019 ocurría un proceso de sustitución del Seguro Popular por el Instituto de Salud y Bienestar (INSABI), lo cual acarrea desestabilización en el sistema. A pesar de emitir las disposiciones necesarias para disminuir el riesgo de contagio, no ha sido posible evitar que para mayo de 2024 haya un registro de 7,692,397 de casos positivos a la COVID-19 y un total de 334,699 fallecidos producto de la enfermedad (*World Health Organization, 2023a*).

### **2.1 SARS-CoV-2: estructura y mecanismo de entrada a las células**

El SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario de la familia de los coronavirus que contiene glicoproteínas en su superficie en forma de espiga que simulan una corona al ser observados en el microscopio electrónico, de ahí la clasificación de coronavirus (Mittal et al., 2020). El genoma de los coronavirus es capaz de codificar cuatro proteínas estructurales: membrana (M), envoltura (E), nucleocápside (N) y la proteína espícula (S) y dieciséis proteínas no estructurales (nsp1 – 16). Un número amplio de proteínas glicosiladas S sobresale de la envoltura del virus y son piezas clave en los mecanismos de entrada del virus a la célula huésped (Lu et al., 2020; Mittal et al., 2020).

La proteína S tiene un peso molecular de entre 180 y 200 kDa (Huang et al., 2020). Está compuesta por tres segmentos: un gran ectodominio, una transmembrana de un solo paso y una cola intracelular. El ectodominio de la proteína S está formado por las subunidades S1 y S2. La subunidad S1 consiste en un dominio N-terminal y el dominio

de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés). La subunidad S2 contiene un péptido de fusión (FP), HR1, la hélice central (CH), el dominio del conector (CD), HR2, el dominio de transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (CT) (Wang et al., 2020). La proteína S está en un estado metaestable antes de la fusión; una vez que el virus interactúa con la célula huésped ocurre un reajuste estructural de la proteína permitiendo la fusión del virus a la membrana de la célula huésped (Huang et al., 2020; Mittal et al., 2020).

El SARS-CoV-2 se une mediante la proteína S a su receptor obligatorio, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de membrana celular para infectar a las células. La ACE2 es un componente importante del sistema renina-angiotensina (SRA) y cataliza la hidrólisis de angiotensina II a angiotensina 1-7 (Zhang et al., 2021). El proceso de entrada de las partículas virales a las células comienza por la formación de la interfaz RBD-ACE2 mediante la transición de la conformación abajo a la conformación arriba del RBD permitiendo un completo acoplamiento. Seguidamente ocurre el corte de la proteína S por la enzima furina en la zona donde se unen las subunidades S1 y S2. Acto seguido ocurre el corte en el sitio S2' por la proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2) o por catepsina L en el compartimento endosomático (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2021).

La escisión en el sitio S2' libera las restricciones estructurales en el péptido de fusión e inicia una cascada de eventos de replegamiento en S2, probablemente acompañada por una disociación completa de S1. La formación de una espiral larga central de tres hebras y el plegado hacia atrás de la repetición de la HR2 conduce a la estructura posfusión de S2 que une las dos membranas, facilitando la formación de poros de fusión y la liberación del gRNA viral en el citoplasma de la célula (Brant et al., 2021; Jackson et al., 2022). Seguidamente, comienza el proceso de transcripción y síntesis de nuevas moléculas de RNA, las cuales comienzan a codificar proteínas estructurales y no estructurales. Finalmente, la nueva molécula de RNA es encapsidada por proteínas N, encerrada por la envoltura viral y liberada de la célula infectada (Brant et al., 2021).

## **2.2 Desarrollo de candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2**

Una vacuna es una suspensión de microorganismos vivos atenuados, inactivos, de una de sus partes o de un producto derivado de ellos que es administrada para producir una infección similar a la infección natural. El objetivo es producir una respuesta inmunitaria que proteja al paciente frente a posteriores contactos con el germen del que se le ha vacunado sin provocar daños en su salud (Martínez-Mateo et al., 2012).

La estructura bien elucidada del SARS-CoV-2 y el completo entendimiento de los mecanismos de infección han permitido el desarrollo de diversas estrategias para la creación de candidatos vacunales capaces de inducir una respuesta inmune favorable. El papel importante que tiene la proteína S en el proceso de infección la convierte en un potencial objetivo para el desarrollo de vacunas, además, en pacientes con COVID-19, es más probable que sean producidos anticuerpos en contra de esta proteína (Fathizadeh et al., 2021).

Existen diferentes candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2. Desde 2021, cerca de 56 candidatos efectivos han sido presentados y producidos en todas partes del mundo. Algunas de estas vacunas son basadas en virus inactivados, subunidades de proteína y ácidos nucleicos como RNA y DNA; cada una con sus ventajas y limitaciones.

### **2.2.1 Vacunas de subunidad**

Las vacunas de subunidad contienen fragmentos de microorganismos (antígeno) que cuentan con la capacidad de desencadenar una respuesta inmunológica en el organismo (Vartak & Sucheck, 2016) acompañado de un adyuvante. El antígeno puede ser un polisacárido, ácido nucleico o una proteína. Estas proteínas pueden ser obtenidas y purificadas a partir de un patógeno causante de una enfermedad, un péptido sintetizado o una proteína recombinante sintetizada (Bill, 2014).

Las vacunas de subunidad son obtenidas mediante la inserción de los genes que expresan las partes más predominantes del virus en sistemas de expresión como bacterias, levaduras, células de mamíferos y células de insectos (Fathizadeh et al., 2021; Nascimento & Leite, 2012). En su diseño es esencial la selección del vector de

expresión y el promotor, la selección del marcador y la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales por el vector recombinante, entre otras, para lograr la eficiencia en el proceso de obtención del antígeno.

El sistema de expresión en bacterias ha sido, a lo largo de los años, uno de los más usados con este fin, principalmente en *E. coli* por su crecimiento rápido a altas densidades en medios poco costosos, la posibilidad de lograr la transformación con ADN exógeno de manera rápida y sencilla y su alta capacidad de clonación. Sin embargo, es bien conocido que a menudo la expresión de antígenos en células procariotas puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión, por lo que muchas veces el emigrar a sistemas de expresión en células eucariotas puede resultar una alternativa ventajosa en busca de minimizar estos problemas.

Las levaduras son microorganismos que ofrecen muchos beneficios como sistemas de expresión eucariota, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. La Tabla 1 muestra un resumen de algunas de las vacunas obtenidas mediante la expresión del antígeno en *P. pastoris*.

Tabla 1: Vacunas de subunidad expresadas en *P. pastoris*

| Nombre de la proteína | Enfermedad                               | Referencia               |
|-----------------------|--|--------------------------|
| AhpC                  | Infección por <i>Helicobacter pylori</i> | (O’Riordan et al., 2012) |
| PIMP-V1 y PIMP-V2     | Malaria                                  | (Naully et al., 2020)    |
| DENV-3 E              | Dengue                                   | (Tripathi et al., 2015)  |
| CHIKV-C-E3-E2-6K-E1   | Chikunguña                               | (Saraswat et al., 2016)  |
| HBHA                  | Tuberculosis                             | (Teng et al., 2018)      |

La Tabla 2 presenta algunas de las vacunas desarrolladas contra el SARS-CoV-2 en *P. pastoris*.

Tabla 2: Vacunas de subunidad contra SARS-CoV-2 expresadas en *P. pastoris*

| Nombre de la proteína | Desarrollador   | Referencia                      |
|-----------------------|---|---------------------------------|
| SARS-CoV-2-RBDN1C1    | Biological E/BCM  | (Pollet et al., 2021)           |
| RBD203-N1             | Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development, Texas | (Chen et al., 2022)             |
| Abdala (CIGB-66)      | CIGB-Cuba   | (Hernández-Bernal et al., 2022) |

### 2.3 Levaduras: *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris*, perteneciente a la familia de las levaduras, es un microorganismo unicelular ampliamente usado como sistema de expresión. Es fácil de manipular y presenta un crecimiento rápido en cultivos de bajo costo. *P. pastoris* es una de las aproximadamente 30 especies de levaduras capaces de usar metanol como fuente de carbono (Cregg et al., 2000). A diferencia de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* prefiere el metabolismo respiratorio antes que el fermentativo por lo que no genera grandes cantidades de productos fermentativos que podrían ser tóxicos como el etanol (Cregg & Higgins, 2007).

Entre las muchas ventajas que posiciona a *P. pastoris* entre los sistemas de expresión más ampliamente usados está su rápida velocidad de crecimiento celular a muy altas densidades sin requerir medios de cultivos y condiciones de cultivo complejos. Es capaz de producir de manera extracelular altas concentraciones de proteínas recombinantes correctamente plegadas y, a diferencia de *S. cerevisiae*, no hiperglicosiladas (Ergün et al., 2021).

Otro factor es su capacidad de crecer en presencia de metanol. El uso de metanol como fuente alternativa de carbono desencadena vías metabólicas que requieren la inducción de enzimas específicas. La enzima alcohol oxidasa (AOX) y la dihidroxiacetona sintasa (DHAS) llegan a componer el 30% de la proteína total en el cultivo con metanol. En cambio, estas enzimas están completamente ausentes en

células que han crecido en presencia de otras fuentes de carbono como glucosa o glicerol. Considerando esto existe un sistema muy bien regulado donde la producción de estas enzimas es controlada por los niveles de transcripción de sus respectivos genes (Couderc & Baratti, 1980; Cregg & Higgins, 2007). Esta enzima purificada aparece en una banda a los 75 kDa (Zhang et al., 2009)

La enzima está en un organelo especializado denominado peroxisoma, donde ocurre el primer paso de la ruta metabólica del metanol que es su oxidación para formar formaldehído y peróxido de hidrógeno, ambos componentes altamente tóxicos (Cregg et al., 2000; Sahm, 1977). El peróxido de hidrógeno queda secuestrado del peroxisoma mientras que el formaldehído pasa a ser un intermediario central situado en el punto de bifurcación entre las vías de asimilación y disimilación (Yurimoto et al., 2011).

AOX es sintetizada en grandes cantidades para compensar su baja afinidad por el oxígeno. El promotor de AOX es uno de los más estrictamente regulados conocido y por lo tanto muy atractivo en la expresión de proteínas recombinantes. *P. pastoris* cuenta con dos genes que codifican a la alcohol oxidasa, *AOX1* y *AOX2*. Sin embargo, hay reportes que evidencian que el primero es capaz de producir mayor cantidad de la enzima (Karbalaeei et al., 2020; Kuruti et al., 2020).

*P. pastoris* es capaz de expresar proteínas de manera intracelular o secretadas al medio. Al ser muy baja la cantidad de proteínas endógenas que secreta esto facilita los procesos de purificación de las proteínas heterólogas expresadas en ella.

### **2.3.1 Cepas y vector de expresión**

La expresión de un gen externo en *P. pastoris* consta de tres etapas básicas: la inserción del gen en el vector de expresión, la integración del vector en el genoma de *P. pastoris* y la selección de las posibles cepas para la expresión del gen (Li et al., 2007).

Todas las cepas de expresión de *P. pastoris* son derivados de NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) (Cregg et al., 2000). Existen tres cepas principales que varían según su capacidad de utilizar metanol como fuente de carbono.



La cepa con uso de metanol positiva o Mut<sup>+</sup> (methanol utilization positive) posee los dos genes que codifican la enzima (AOX1 y AOX2) y es capaz de crecer rápidamente en metanol y de expresar a mayor velocidad proteínas heterólogas en comparación con las que no cuentan con estos genes. La cepa con uso de metanol lento o Mut<sup>S</sup> (methanol utilization slow) solo cuenta con el gen AOX2 que es más débil en la expresión de la enzima y por tanto su crecimiento es más lento. La cepa con uso de metanol negativo o Mut<sup>-</sup> (methanol utilization negative) carece de ambos genes por lo que no es capaz de metabolizar metanol (Julien, 2006; Karbalaeei et al., 2020).

Los vectores de expresión de *P. pastoris* tienen un casete de expresión que consta de la secuencia del promotor (usualmente el promotor AOX1) y un sitio de clonación múltiple (MCS) para la inserción de una secuencia codificante extraña, flanqueado por secuencias de terminación derivadas de AOX1 (Cregg et al., 2000; Cregg & Higgins, 2007). A los vectores desarrollados para la expresión de proteínas recombinantes secretadas al medio les es añadida una secuencia señal en las proteínas foráneas para que se incorporen a la vía de secreción. El péptido factor  $\alpha$  prepro proveniente de *S. cerevisiae* (Safder et al., 2018; Wang et al., 2016) ha sido muy usado para este fin, aunque también existen vectores que contienen la secuencia de la señal proveniente del gen de la fosfatasa ácida proveniente de *P. pastoris* (Cregg et al., 2000). Hay vectores desarrollados con una alta resistencia a ciertas drogas como marcador para así lograr la selección de cepas con alto número de copias del casete de expresión del gen externo como es la serie pPICZ que contienen genes que le garantizan una alta resistencia al antibiótico zeocina (Cregg et al., 2000; Cregg & Higgins, 2007).

## **2.4 Expresión en biorreactor**

*Pichia pastoris* es capaz de crecer en cultivos de altas densidades y expresar una gran cantidad de proteínas recombinantes. En algunos casos, los niveles de expresión en matraz son menores que en un biorreactor donde es posible alcanzar un rendimiento hasta 10 veces mayor. La expresión en un biorreactor presenta muchas ventajas sobre el matraz ya que garantiza un ambiente más controlado, lo cual permite al microorganismo crecer en condiciones óptimas. Así es posible lograr niveles de

transcripción de 3 a 5 veces mayores a través de diferentes estrategias de inducción en Fed-Batch (Cregg et al., 2000).

En la fermentación de *P. pastoris* existen varios factores que influyen significativamente en el rendimiento de la producción como el tipo de cepa, la selección y composición del medio de cultivo, el pH del medio, temperatura, oxígeno disuelto, agitación y estrategia de inducción.

#### **2.4.1 Influencia de la composición del medio**

*P. pastoris* es capaz de crecer en variadas fuentes de carbono como glicerol, glucosa y metanol además de varias fuentes de nitrógeno como peptona, extracto de levadura y base nitrogenada de levaduras (Li et al., 2007; Looser et al., 2015). Para el crecimiento en placa los medios más utilizados son MGY (Minimal Glycerol Medium) y YPD (Yeast-Extract Peptone Dextrose Medium). Para el crecimiento en matraz es muy implementado el medio BMGY (Buffered Glycerol-Complex Medium) que favorece la secreción de la proteína ya que contiene peptona y extracto de levadura y permite controlar el pH del medio (Invitrogen, 2010; Julien, 2006). No obstante, al momento de implementar la expresión de proteínas recombinantes en biorreactor, uno de los medios más recomendados y con muy buenos resultados es el medio rico en sales denominado BSM (Basal Salts Medium) (Chen et al., 2014; Hanga et al., 2009; Tolner et al., 2006). Sin embargo, es común que exista precipitación de estas sales en cultivos de alta densidad (Brady et al., 2001). Como alternativa hay medios desarrollados con concentraciones de sales más bajas denominados LSM (Low Salt Medium) (Brady et al., 2001; Chen et al., 2022; Chen et al., 2021).

Joseph et al. (2022) reportaron que la fermentación de *P. pastoris* en BSM exhibe una menor densidad de células viables a pH 6.0 después de 96 h de fermentación en comparación con el resto de los medios estudiados (FM22, Medio de Sales Basales Modificadas MBSM, d'Anjou, BMGY y MGY). En otro estudio, encontraron que los mejores rendimientos de la proteína recombinante taumatina II son logrados con los medios FM22, BSM y BMGY, a pesar de que éstos no resultaron con los mayores

crecimientos celulares. La expresión en el medio BMGY mostró el mayor rendimiento de la proteína de interés (Joseph et al., 2023).

La selección de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno ha mostrado ser una variable importante en el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes. El glicerol es uno de los más ampliamente usados como fuente de carbono. Sin embargo, es bien conocida su capacidad para reprimir por completo el gen AOX que en última instancia dificulta la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Prabhu et al. (2017) evaluaron la influencia de las fuentes de carbono sorbitol, manitol, gluconato, lactosa, glicerol, suero, galactosa y maltosa en concentraciones de 40 g/L con 1% de metanol como inductor en la expresión del interferón gamma humano (hIFN- $\gamma$ ). La mayor velocidad de crecimiento celular fue con la presencia de maltosa, glicerol y galactosa mientras que el gluconato exhibió la mayor expresión del interferón gamma humano. El uso de la glicina como fuente de carbono aumentó en 9.5 mg/L la producción de hIFN- $\gamma$ . De manera similar, hubo un efecto significativo cuando al usar ácido glutámico como fuente de nitrógeno, logrando alrededor de 7 mg/l de producción de hIFN- $\gamma$ . El uso del sulfato de amonio mostró un mayor crecimiento celular. No obstante, reportó muy baja expresión de hIFN- $\gamma$ .

#### **2.4.2 Influencia de la temperatura de fermentación**

La temperatura del cultivo es un parámetro crítico en la expresión de la proteína de interés. *P. pastoris* crece en un intervalo óptimo de temperatura de 28 a 30 °C. Temperaturas superiores a 32 °C podrían ser perjudiciales para la inducción de la expresión de proteínas e incluso provocar la muerte celular. Hay protocolos de fermentación implementados a bajas temperaturas para disminuir la actividad proteolítica extracelular y disminuir la formación de agregados de proteína (Cereghino et al., 2002) (Karbalaei et al., 2020). Zhong et al. (2014) encontraron que la formación de agregados de proteína es proporcional al estrés del retículo endoplasmático (RE). A bajas temperaturas este estrés disminuye, lo cual preserva la capacidad de plegamiento de la proteína y la viabilidad de las células, además de disminuir la actividad proteolítica contra la proteína diana. En cambio, los cultivos a altas

temperaturas presentaban una acumulación prolongada de la proteína recombinante de interés en forma incompleta en el retículo endoplásmico, lo que conduce a un alto estrés en este orgánulo y posterior muerte celular.

Li et al. (2001) analizaron la influencia de la temperatura en la viabilidad de las células y el rendimiento en la producción de la proteína anticongelante de arenque (hAFP). Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de prácticamente 10 veces en la producción de la proteína recombinante a 23 °C en comparación con la expresión a 30 °C. Dragosits et al. (2009) encontraron que una reducción de la temperatura de 30 a 25 °C dio como resultado un aumento de 2 veces de la productividad específica del fragmento Fab 3H6 y una reducción de 30 a 20 °C produjo un aumento de 3 veces. En cambio, la actividad proteolítica no sufrió cambio significativo entre las tres temperaturas. Por el contrario, Joseph et al. (2022) determinaron que 30 °C es la temperatura óptima para la generación de biomasa y expresión de la proteína taumatina II, encontrando que a temperatura de 20 °C ocurre la degradación de la proteína en el medio, comportamiento que no observado a 25 y 30 °C.

### **2.4.3 Influencia del pH**

*P. pastoris* es capaz de crecer en un amplio intervalo de pH de 3.0 a 7.0 lo que facilita el ajuste según las necesidades del protocolo por implementar. Un pH óptimo es crucial para garantizar el crecimiento celular y la correcta formación y estabilización de las proteínas. La actividad proteolítica tanto en presencia como ausencia de células está altamente influenciada por el pH (Li et al., 2007). Determinar el pH óptimo depende de la proteína a expresar y del medio de cultivo para ello. Además, son necesarios numerosos ensayos de fermentación a diferentes valores de pH que ayuden a determinar cuánto puede influir el pH en la generación de biomasa y en la expresión de la proteína de interés.

Algunos protocolos reportados incorporan un ajuste de pH al inicio de la fase de inducción. Zou et al. (2003) desarrollaron la etapa de generación de biomasa a pH 5 y

luego disminuyeron el pH a 3.5 para comenzar la inducción del antígeno del parásito de la malaria Pfs25. Zhu et al. (2021) usaron el medio BSM, pero disminuyendo la concentración de las sales a 1/2 y 1/4 de la concentración inicial y, en la etapa de Glicerol-Fed-Batch, fijaron el pH a 5 para evitar la precipitación de sales. Chen et al. (2022) en su protocolo de expresión desarrollaron la etapa de crecimiento celular a pH 5 en medio BMG (Buffered Minimal Glycerol) y en la etapa de inducción aumentaron el pH a 6.5 para obtener antígeno RBD203-N1.

Çalık et al. (2010) reportaron que la disminución del pH de 6 a 5 provoca un aumento de la actividad de AOX y por lo tanto un mayor rendimiento en la producción de la proteína rhGH. También encontraron que la concentración total de proteasas aumentó a lo largo del tiempo de fermentación y disminuyó con el incremento del pH. Sin embargo, a pH 6 detectaron un repunte en la concentración de proteasas. Un estudio estadístico multifactorial llevado a cabo por Chagas et al. (2014) reveló que no existe diferencia significativa en la velocidad de crecimiento celular en el intervalo de pH de 3 a 6. Joseph et al. (2022) analizaron la influencia del pH de diferentes medios de cultivos en el crecimiento celular de *P. pastoris* y en la expresión de la proteína taumatina II, reportando a pH 5 un menor rendimiento de la proteína recombinante y menor crecimiento celular que a pH 6.

#### **2.4.4 Influencia de la concentración de oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno disuelto (OD) es otro factor que influye significativamente en el crecimiento celular y la expresión eficiente de proteínas heterólogas. El oxígeno es importante en el primer paso de la reacción de catabolismo del metanol.

Farinha et al. (2022) llevaron a cabo experimentos a diferentes niveles de concentraciones de oxígeno disuelto (5, 10, 15, 30 y 50%) por 42 h. Obtuvieron la máxima concentración de biomasa con una concentración de oxígeno disuelto de 15% y la menor con 5%, donde observaron una disminución en el consumo de glicerol. Un aumento del nivel de OD de 15 a 50% ocasionó la disminución de la biomasa producida

en un 15%, probablemente producto de la oxidación del sustrato. No detectaron diferencia significativa en los resultados a 10, 15 y 30% de OD.

En la mayoría de las fermentaciones de *P. pastoris* es favorable mantener la concentración de oxígeno disuelto entre 20 y 30%, pero la expresión de cada proteína requiere de estudios preliminares para determinar el intervalo óptimo para la expresión. Lee et al. (2003) establecieron puntos de control de concentración de OD entre 10% y 30% y entre 30% y 50% para la etapa de inducción. Encontraron que 30% como límite inferior de concentración de oxígeno disuelto provoca un aumento en la expresión de la proteína de interés (péptido inhibidor de elastasa) y en el consumo de metanol. Estos resultados pueden indicar que una mayor concentración de OD estimula la vía de utilización del metanol y mejora la eficiencia de expresión. Sin embargo, Trentmann et al. (2004) comentan que la alta demanda de oxígeno en el metabolismo de metanol requiere un estudio para evaluar si la cepa tolera mejor el crecimiento a concentraciones limitantes de metanol o de oxígeno. En su estudio encontraron que una concentración limitante de metanol en el cultivo perjudica la integridad celular y la calidad del producto, observando un aumento en la degradación y una nula concentración de la proteína de interés producida. En condiciones de saturación de metanol y oxígeno limitante obtuvieron los mejores rendimientos de expresión.

## **2.5 Operación Fed-Batch. Estrategias de inducción y control.**

La gran mayoría de las estrategias de cultivo de *Pichia pastoris* con la cepa Mut<sup>+</sup> están basadas en el protocolo presentado por Invitrogen (2002) y cuentan con cuatro etapas.

Las dos primeras etapas tienen como objetivo la generación de biomasa. La etapa inicial denominada Glicerol-Batch ocurre hasta el completo consumo de glicerol en el medio, caracterizado por un marcado aumento en la concentración de oxígeno disuelto. Normalmente los medios de cultivo tienen concentraciones glicerol de alrededor de 40 g/L; concentraciones superiores inhiben el crecimiento (Potvin et al., 2012). La segunda etapa, Glicerol-Fed-Batch, es el inicio de la fase de adaptación donde comienza la alimentación de glicerol durante 1 a 3 h para mantener la

generación de biomasa y eliminar gradualmente la represión del gen AOX debido a la presencia de glicerol. Posteriormente inicia la fase de transición con la etapa tres donde volúmenes pequeños de metanol son añadidos, aumentándolos progresivamente durante 4 a 8 h. La cuarta etapa denominada Metanol-Fed-Batch comienza una vez que el cultivo está completamente adaptado al metanol, alimentando un flujo continuo de metanol durante el resto de la fase de inducción.

Es importante tener en cuenta que las concentraciones excesivas de metanol, que normalmente oscilan entre 3.7 y 20 g/L, son citotóxicas y provocan una inhibición del crecimiento. Las concentraciones entre 2 y 3.5 g/L son óptimas para la producción de proteínas (Potvin et al., 2012).

### **2.5.1 Control OD-stat (alimentación limitante de metanol)**

Los perfiles de OD proporcionan información valiosa sobre la fase de crecimiento y la salud de un cultivo (Potvin et al., 2012). Concentraciones limitantes de metanol ocasionan un bajo consumo de oxígeno mientras que valores de concentraciones de metanol cercanos a las inhibitorias provocan alto consumo de oxígeno. Una de las estrategias de control implementadas es OD-stat donde la alimentación de metanol está subordinada a la tasa de consumo de oxígeno del cultivo. Estableciendo un valor deseado de control de oxígeno disuelto el metanol solo será alimentado, de manera automática, cuando las concentraciones de OD alcancen valores superiores al valor deseado, bajo estas condiciones es factible trabajar a concentraciones limitantes de metanol.

Zhu et al. (2018) establecieron una comparación entre dos estrategias con control de oxígeno disuelto. En la primera estrategia la alimentación de metanol fue constante. En la segunda estrategia implementaron el OD-stat con una concentración de OD de 20% controlada con la adición automática de metanol cuando la concentración de OD alcanza valores mayores al deseado. Bajo la primera estrategia obtuvieron mayor cantidad de biomasa y mayor concentración de rHSA, pero a las 96 h disminuyó bruscamente la concentración de la proteína y aumentó la presencia de fragmentos de

degradación y otras fracciones no deseadas en el sobrenadante, evidencia de haber alcanzado niveles citotóxicos de metanol en el cultivo. La implementación de la estrategia de OD-stat permitió evitar las altas concentraciones de metanol, pero obteniendo menores rendimientos de la proteína de interés además de un menor consumo de metanol.

Otros reportes muestran resultados importantes bajo esta estrategia de control debido a su simpleza tecnológica y operacional. Muñoz et al. (2019) desarrollaron un escalado para la cepa Mut<sup>s</sup> bajo la estrategia de OD-stat donde solo es añadido metanol cuando la concentración de oxígeno disuelto llega a 30%. Esta estrategia evitó alcanzar concentraciones inhibitorias de metanol y la producción de dextranasa tuvo el doble del rendimiento que en estudios reportados para la cepa Mut<sup>+</sup>. Martínez-Hernández et al. (2020) desarrollaron la misma estrategia de inducción para la cepa GS115 en el escalado de matraz a un biorreactor de 3 L para la obtención de una vacuna recombinante contra *Entamoeba histolytica*. Bajo este protocolo mantuvieron condiciones limitantes de oxígeno y metanol y obtuvieron rendimientos comparables a otros protocolos con cepas Mut<sup>+</sup>, por lo que fundamentan que condiciones saturadas de metanol no son necesarias para compensar las condiciones limitadas de oxígeno.

La estrategia OD-stat propuesta por Lim et al. (2003) mantuvo la concentración de OD entre 40 y 45% mediante dos lazos de control interrelacionados que controlan la presión parcial de O<sub>2</sub> puro en la corriente de entrada de aire y el flujo de alimentación de metanol. Bajo esta estrategia el flujo de metanol disminuyó un 0.5% cuando los niveles de OD alcanzaron valores menores al límite y aumentó un 1% cuando superaron estos valores. A pesar de que esta estrategia no facilita establecer un perfil óptimo de alimentación de metanol sí evita la muerte celular tanto por la acumulación de metanol como por la deficiencia de oxígeno.

### **2.5.2 Control $\mu$ -stat (alimentación limitante de metanol)**

Otra estrategia de inducción muy estudiada es el control  $\mu$ -stat en el que, mediante el aumento exponencial de la alimentación de metanol, el objetivo es mantener constante



la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). En respuesta, el rendimiento de biomasa por sustrato debería ser constante con una acumulación cuasi-exponencial de biomasa (Liu et al., 2019). Una de las ventajas de este modelo es que puede ser implementado sin el uso de sistemas de monitoreo de alta tecnología ya que están basados en modelos matemáticos. Además, debido a que la acumulación de metanol en el medio es cercana a cero, esta estrategia considera alimentación limitante de metanol en lote (Barrigón et al., 2013).

Zhang et al. (2000) investigaron dos estrategias de inducción. La primera es la alimentación de metanol no limitante en lote evaluando concentraciones entre 2.0 g/L y 30.0 g/L con el objetivo de mantener la velocidad de crecimiento celular en su valor máximo ( $\mu = \mu_{\max}$ ). La segunda estrategia implementa el control  $\mu$ -stat, con alimentación limitante de metanol a velocidad de crecimiento celular constante e inferior a la máxima ( $\mu < \mu_{\max}$ ). Encontraron que altas concentraciones de metanol provocan un efecto inhibitorio en el crecimiento celular, con una velocidad máxima de crecimiento de  $0.0709 \text{ h}^{-1}$  con 2.1 g/L de metanol. Los mejores rendimientos fueron bajo la estrategia de control  $\mu$ -stat para  $\mu = 0.0267 \text{ h}^{-1}$ .

Sinha et al. (2003) encontraron el mayor rendimiento del interferón- $\tau$  ovino recombinante a  $\mu = 0.025 \text{ h}^{-1}$ . Para otras velocidades específicas de crecimiento, mayores o menores a la óptima encontrada, los rendimientos de la proteína de interés fueron menores. La estrategia de inducción óptima encontrada bajo el control  $\mu$ -stat fue mantener  $\mu = 0.025 \text{ h}^{-1}$  durante las primeras 38 h de inducción para luego disminuirla a  $0.02 \text{ h}^{-1}$  hasta el final de la fermentación. Sin embargo, los investigadores comentan que controlar dicha estrategia de inducción mediante la variación de  $\mu$  requiere un modelo de crecimiento efectivo para lograrlo. En investigaciones posteriores Zhang et al. (2005), basados en los modelos previamente reportados por Sinha et al. (2003), desarrollaron estudios de optimización para la R-galactosidasa recombinante del grano de café mediante métodos matemáticos aplicando la estrategia de inducción con base al control  $\mu$ -stat.

Barrigón et al. (2013) implementando la estrategia de  $\mu$ -stat obtuvieron los mejores rendimientos para la producción de la lipasa de *Rhizopus oryzae* para  $\mu = 0.015 \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, observaron una acumulación de producto lenta pero continua durante la fase de inducción.

### **2.5.3 Control Metanol-stat (alimentación no limitante de metanol)**

En las estrategias de control antes mencionadas (OD y  $\mu$ -stat) no hay un control exacto de las concentraciones de metanol en el medio. Como resultado, pueden haber desviaciones de la concentración óptima de metanol, agotamiento de metanol o acumulación de metanol en el medio (Potvin et al., 2012). La estrategia de control Metanol-stat está diseñada para mantener la concentración de metanol en el medio de manera constante, denominándole alimentación no limitada de metanol en lote. Esta estrategia requiere de instrumentación necesaria para tomar lecturas en tiempo real de tales concentraciones de metanol y para implementar lazos de control eficientes.

Barrigón et al. (2013), luego de valorar los rendimientos en condiciones limitantes de metanol bajo el control  $\mu$ -stat, evaluaron trabajar bajo Metanol-stat. Estudiaron cinco concentraciones: 1, 2, 3, 5 y 10 g/L. La mayor producción total que obtuvieron fue con una concentración constante de metanol de 3 g/L. Obtuvieron menores rendimientos con menores concentraciones de metanol y a concentraciones de 10 g/L detectaron efectos inhibitorios en el crecimiento celular. En comparación con la estrategia con base al control  $\mu$ -stat, la implementación de condiciones no limitantes de metanol produjo mejores rendimientos para la proteína de interés.

Ponte et al. (2018) compararon dos propuestas de optimización con base a los resultados obtenidos por Barrigón et al. (2013). Ambas propuestas implementan un régimen de alimentación no limitante de metanol. Esas dos estrategias tenían como objetivo alcanzar los valores máximos de cada índice de rendimiento según el perfil S obtenido mediante optimización matemática. Para el primer caso, optimizaron la concentración final del producto mediante Metanol-stat y en la segunda optimizaron la productividad volumétrica mediante un perfil de alimentación gradual de metanol.

Existen reportes de buenos resultados en la fermentación de *P. pastoris* sustituyendo el medio de cultivo justo antes de la inducción. Esto permite eliminar cualquier remanente de glicerol. Chen et al. (2004) argumentan que esta estrategia mejora significativamente la expresión de la fitasa recombinante y su actividad.

La Tabla 3 presenta un resumen de algunas de las estrategias y parámetros reportados para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

Tabla 3: Parámetros de fermentación y estrategias de inducción reportados para la expresión de proteína recombinantes en *P. pastoris*

| Referencia           | Expresión  | Medio/Condiciones   | Estrategia de inducción  |
|----------------------|--|---|--|
| (Brady et al., 2001) | P30P2MSP1<br>(Antígeno para una vacuna contra la malaria)<br>GS115 | - Preinóculo:<br>BMG<br>- Fermentación:<br>LS + 6,5 g/L hexametafosfato de sodio + 4,35 g/L PTM1 Trace Salt       | - Adición de preinóculo con DO <sub>600</sub> de 5-6.<br>- Crecimiento del cultivo en BR hasta agotamiento de glicerol (pico en DO).<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 50% glicerol a 20.2 mL/L/h por 1.5 h.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 1.5 mL/L de metanol.<br>- Alcanzado 180 g/L de biomasa húmeda, adición de 1 mL/L de metanol.<br>- La inducción continua por 64 h con metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 manteniendo la concentración de metanol a 1 g/L.                |
|                      |  | Parámetros:<br>-pH 5<br>-30 °C<br>-OD 30%<br>-Agitación variable entre 360 – 1000 rpm                             |  |
| (Zou et al., 2003)   | Pfs25<br>(Antígeno contra la Malaria)<br>GS115                     | - Preinóculo:<br>BMG<br>- Fermentación<br>BSM modificado + 1 mL/L PTM4 trace salts solution                       | - Adición de preinóculo con DO <sub>600</sub> de 5-15.<br>- Crecimiento del cultivo en BR hasta agotamiento de glicerol (20-25 h) (pH básico).<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 50% de glicerol a 19.3 mL/h/L de cultivo (v/v) con 4 mL/L de PTM4 trace salts por 2 h.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>- Adición de 1.875 mL/L de metanol + 4mL/L de PTM4 trace salts<br>- Disminución del flujo de glicerol hasta llegar a 0 en 3 h.<br>- Adición de 0.3 mL/L de metanol + 4mL/L de PTM4 trace salts. |
|                      |  | Parámetros:<br>-pH 5 GB, GFB<br>-pH 3.5 Inducción<br>-30 °C<br>-OD 30%<br>-Agitación variable entre 360 – 550 rpm |  |

|                       |  |  |   |
|-----------------------|--|--|---|
|                       |  |  | Alimentación continua de metanol + 4mL/L de PTM4 trace salts a 5.4 mL/h/L de cultivo durante 35 h.  |
| (Tolner et al., 2006) | Mut <sup>+</sup>   | - Preinóculo: YEPD-glucosa<br>- Fermentación BSM + (167 mL/L hexametáfosfato trace elements) + 4 mL/L de PTM1 Trace Salt                             | - Adición de preinóculo con DO <sub>600</sub> de 4-6<br>- Crecimiento del cultivo hasta agotamiento de glicerol (pico de oxígeno 22-24h).<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 50% de glicerol a 20 mL/h/L de cultivo con 4 mL/L de PTM1 trace salts por 1 h y añadir 2mL/L de metanol. Continuar glicerol por media hora más.<br>- Disminuir glicerol hasta llegar a flujo de 0 en 3 horas.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 2 mL/h/L de metanol + 12 mL/L de PTM1 trace salts por 2 h.<br>- Aumentar flujo de metanol a 3 mL/h/L por 2 h. Luego a 5 mL/h/L por 2 h y finalmente a 7.5 mL/h/L hasta el final del proceso (72 horas de inducción). |
|                       |  | Parámetros:<br>-pH 5 (GB, GFB)<br>-pH 6.5 (Inducción)<br>-30 °C<br>-OD 40%<br>-Agitación variable entre 500 – 1000 rpm<br>-Aireación 1.6 vvm         |   |
| (Hanga et al., 2009)  | Fitasa recombinante GS115-YY113 (Mut <sup>s</sup> )          | - Preinóculo: BMGY<br>- Fermentación BSM modificado + 12 mL/L de PTM1 Trace Salt   | - Adición de preinóculo luego de 24 h.<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de 70% (w/v) glucosa + 12 mL/L de PTM1 trace salts hasta DO <sub>600</sub> de 400.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de metanol + 12 mL/L de PTM1 trace salts para mantener en 0.9% (v/v) la concentración de metanol durante 100 h de inducción.   |
|                       |  | Parámetros:<br>-pH 5.5<br>-30 °C<br>-Aeración 1 – 3 vvm<br>-800 rpm  |   |
| (Chen et al., 2014)   | RBD de SARS-CoV-2 como candidato vacunal contra COVID-19 X33 | - Preinóculo: BMG<br>- Fermentación BSM + 3.5 mL/L PTM1 + 3.5 mL/L de 0.02% d - Biotina  | - Adición de preinóculo con DO <sub>600</sub> =10.<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>- Consumo de glicerol hasta pico de OD.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>- Alimentación de metanol desde 0.8 mL/L/h hasta 10 mL/L/h durante 6-8 h.<br>- La etapa de inducción demoró 75 h.   |
|                       |  | Parámetros:<br>-pH 5 (GB, GFB)<br>-pH 6 (Inducción)<br>-30 °C (GB, GFB)<br>-26 °C (Inducción)<br>-OD 30%<br>-Agitación según aeración 500 – 1000 rpm |   |

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
| (Chen et al., 2021)<br>(Chen et al., 2022) | RBD de SARS-CoV-2 como candidato vacunal contra COVID-19 X33    | - Preinóculo:<br>BMG   | Adición de preinóculo con DO <sub>600</sub> =5-15.<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>Consumo de glicerol hasta pico de OD, luego la temperatura disminuyó a 25 °C y el pH quedó establecido en 6.5 durante 1 h.<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>Alimentación de metanol desde 0.8 mL/L/h hasta 11 mL/L/h durante 6-8 h.<br>Ajuste del pH a 6 y temperatura a 25 °C<br>Inducción por 70 h |
|  |   | - Fermentación<br>LS + 3.5 mL/L PTM1 + 3.5 mL/L de 0.02% d - Biotina   |   |
| (Li et al., 2006)<br>(Liu et al., 2022)    | RBD de la proteína S como candidato vacunal contra COVID-19 X33 | Parámetros:<br>-pH 5 (inicial)<br>-30 °C<br>-OD 30%<br>-Agitación según aeración   | <b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>Luego del consumo de glicerol inicial alimentan con 50% de glicerol + 12 mL/L de PTM1 a 8 mL/L/h hasta alcanzar 250 g <sub>wc</sub> /L<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>Luego de 10 – 30 min de agotado el glicerol añaden metanol con 12 mL/L de PTM1 durante 45 – 50 h con un flujo exponencial desde 3 g/L/h hasta llegar a 0.01 g/L/h                  |
|  |   | - Preinóculo:<br>YPD<br>- Fermentación<br>BMGY   |   |
| (Kalyoncu et al., 2023)                    | RBD-DP candidato vacunal contra COVID-19 X33                    | Parámetros:<br>-pH 6<br>-28 °C (GB, GFB)<br>-25 °C (Inducción)<br>-OD 30% (controlado por aeración) 0 – 1 vvm<br>-Agitación 800rpm | Adición de preinóculo (19 h, DO <sub>600</sub> =18-22)<br><b>Glicerol-Fed-Batch</b><br>Luego del consumo de glicerol inicial añadieron al recipiente 250 mL de una solución 10 x YES (10 % de extracto de levadura, 20 % de tono de soja)<br><b>Metanol-Fed-Batch</b><br>Adición de metanol con 12 mL/L de PTM1 desde 3 mL/L/h hasta llegar a 8 mL/L/h de manera lineal en 72 h.      |
|  |   | - Preinóculo:<br>BMGY<br>- Fermentación<br>BMGY  |   |

## 2.6 Cinética de crecimiento.

### 2.6.1 Fases del cultivo en lote

La adición de un pequeño número de células a un cultivo rico en nutrientes y con condiciones favorables siempre conlleva a que, primeramente, las células deban adaptarse al nuevo ambiente antes de comenzar su crecimiento. El cultivo en lote (batch) es un sistema cerrado que contiene una cantidad limitante de nutrientes, esto conlleva a que el cultivo pase por distintas etapas de crecimiento hasta alcanzar el

consumo total de los nutrientes. La Figura 1 muestra una curva típica de crecimiento e identifica dichas fases.

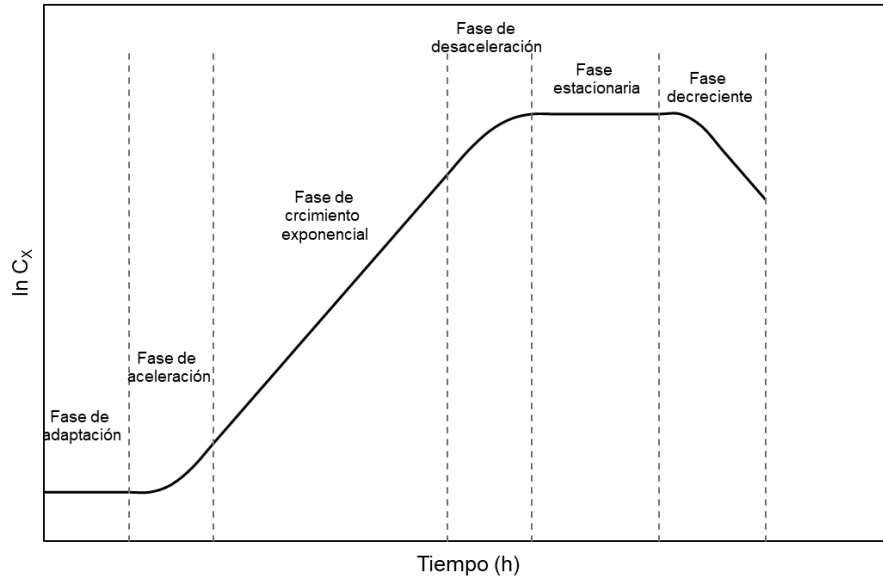


Figura 1. Curva típica de crecimiento microbiano en condiciones de crecimiento en lote (Katoh & Yoshida, 2009)

Durante la fase de adaptación el cultivo sufre un proceso de ajuste a las nuevas condiciones del medio por tanto no existe crecimiento celular. La duración de este periodo depende en gran medida del tipo de células, el tiempo de crecimiento del preinóculo y la adaptabilidad de éstas a las nuevas condiciones, entre otros factores (Katoh & Yoshida, 2009; Stanbury et al., 2003). Una vez que las células están completamente adaptadas inicia el crecimiento celular mediante un incremento gradual de la velocidad de crecimiento. Esta etapa es denominada fase de aceleración.

A partir de este momento la velocidad específica de crecimiento comienza a aumentar hasta que alcanza su valor máximo  $\mu_{max}$  donde inicia la fase exponencial de crecimiento. En esta etapa los nutrientes están en exceso en el cultivo lo que favorece el crecimiento. Con el tiempo, disminuye la cantidad de sustrato disponible y existe una acumulación de productos de desechos del metabolismo que provocan la disminución de la velocidad de crecimiento y el cultivo entra en la fase de desaceleración. Finalmente, el cultivo entra en la fase estacionaria donde el crecimiento no continúa,

provocado por la carencia de un sustrato, por la presencia de componentes tóxicos en el medio o por la combinación de ambos. El inicio de la última etapa de crecimiento, fase decreciente, sucede cuando las células comienzan a morir o autodestruirse mediante la lisis, resultando en una disminución de la concentración celular (Katoh & Yoshida, 2009; Stanbury et al., 2003).

### **2.6.2 Modelos cinéticos de crecimiento microbiano. Modelo de Monod**

Los modelos cinéticos son expresiones matemáticas que correlacionan velocidades y concentraciones de reactantes y productos que, insertados en balances de masa, permiten predecir variables no medibles y condiciones de operación. Estos permiten simular procesos fermentativos con el objetivo de encontrar condiciones óptimas de operación.

Entre los modelos de crecimiento microbiano existen los modelos estructurados que consideran algunos aspectos básicos de la estructura celular e identifican una o dos especies químicas claves dentro de la célula, quizás aquellas que pueden extraerse a escala comercial, y agrupan los demás componentes de la célula, en una o dos clases generales tales como proteínas y lípidos (Katoh & Yoshida, 2009). Sin embargo, en los modelos no estructurados todos los componentes celulares son englobados en la concentración total de biomasa ( $X$ ) y están basados en una sola reacción que describe la conversión de sustrato en biomasa y su cinética está descrita mediante la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  (Nielsen et al., 2003).

El modelo de Monod (Ecuación 1) es un modelo no estructurado donde todas las reacciones celulares están encerradas en una única ecuación y es el más simple y uno de los más usados para describir cinéticas. Este modelo describe que la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  es proporcional a la concentración de sustrato limitante  $S$  y que, a concentraciones altas de este sustrato,  $\mu$  alcanza un valor máximo.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \quad \text{Ecuación 1}$$

En esta ecuación  $\mu_{max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la velocidad máxima de crecimiento alcanzada cuando  $S \gg K_S$  y la concentración del resto de los nutrientes esenciales no cambia,  $S$  es la concentración del sustrato limitante ( $\text{kmol}/\text{m}^3$ ),  $K_S$  ( $\text{kmol}/\text{m}^3$ ) es la constante de utilización de sustrato numéricamente igual a la concentración de sustrato cuando  $\mu$  es la mitad de  $\mu_{max}$  y es medida de la afinidad del organismo por el sustrato.

Si el organismo tiene alta afinidad por el sustrato (bajo valor  $K_S$ ) la velocidad de crecimiento no será afectada hasta que la concentración de sustrato haya llegado a valores muy bajos por tanto la fase de desaceleración para este cultivo será corta. Sin embargo, si el cultivo presenta baja afinidad por el sustrato (alto valor  $K_S$ ) la velocidad de crecimiento comenzará a afectarse a valores relativamente altos de concentración de sustrato por tanto la fase de desaceleración será larga (Stanbury et al., 2003).



### 3. Justificación

La reciente pandemia de COVID-19 provocada por el virus SARS-CoV-2 evidenció la importancia del desarrollo de candidatos vacunales efectivos de rápida respuesta. Nuevas alternativas de vacunas en base a ARN y ADN han sido propuestas con importantes resultados, pero presentan limitaciones en su producción a gran escala (Fathizadeh et al., 2021). Sin embargo, las vacunas de subunidad han sido ampliamente desarrolladas y existe mayor cantidad de instalaciones para su producción en muchos países (Cid & Bolívar, 2021). Las vacunas de subunidad son, en consecuencia, una alternativa rápida y efectiva para el enfrentamiento de enfermedades altamente contagiosas.

*P. pastoris* como sistema de expresión, es una alternativa atractiva a evaluar en la expresión de la proteína recombinante LTB-p50. Esta proteína fue expresada previamente en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión que requirieron largos procesos de solubilización y replegado (Wong-Arce et al., 2024). *P. pastoris* es capaz de plegar y glicosilar proteínas complejas, así como secretarlas de forma soluble (Ergün et al., 2021). Lograr la expresión de una proteína recombinante de manera soluble y expulsada al medio de cultivo es un objetivo que puede ser alcanzado mediante el uso de este sistema de expresión. No obstante, es necesario establecer correctamente el protocolo de expresión, tanto en formato de matraz como a escala de biorreactor. La selección de condiciones de proceso en este último como aireación, agitación, pH y temperatura no es de manera arbitraria y cada proteína precisa de condiciones específicas.

Es necesario entonces evaluar el potencial de *P. pastoris* para la expresión de antígenos recombinantes a escala de biorreactor para establecer condiciones de operación que favorezcan su producción.

#### **4. Hipótesis**

Las condiciones de cultivo en un biorreactor de tanque agitado permitirán la expresión de una proteína inmunogénica recombinante contra SARS-CoV-2 utilizando *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo General**

Establecer condiciones de cultivo en un biorreactor de tanque agitado para la producción de una proteína inmunogénica recombinante contra SARS-CoV-2 utilizando *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Generar preinóculos de una clona de *Pichia pastoris* portadora de un casete de expresión para una proteína antigénica.
2. Establecer condiciones de agitación y aireación que favorezcan el crecimiento de *P. pastoris* en un biorreactor de tanque agitado.
3. Establecer condiciones pH y estrategia de inducción que favorezcan la producción de proteína inmunogénica recombinante en un biorreactor de tanque agitado por lote alimentado.
4. Ajustar a un modelo de Monod a los datos experimentales de biomasa y sustrato y obtener la cinética microbiana para la etapa de crecimiento en lote.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Crecimiento en matraz**

La cepa X33 de *P. pastoris* fue transformada con el vector de expresión pPICZ $\alpha$  que contiene el ADN codificador para LTB-p50. Tres de estas colonias transformadas con mayor expresión de la proteína recombinante LTB-p50 fueron seleccionadas y cultivadas en placas de YPD que contenían 100  $\mu$ g/mL del antibiótico zeocina para su selección, incubándolas a 30 °C durante tres días.

La expresión en matraz inició con una única colonia de *P. pastoris* X-33 modificada genéticamente tomada de la placa de YPD y cultivada en 25 mL de BMGY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada para levaduras,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina y 1% de glicerol) en un matraz de 250 mL previamente esterilizado. El cultivo fue incubado durante 24 h a 250 rpm y 28 °C. A continuación, la biomasa fue recuperada mediante centrifugación a  $2500 \times g$  por 5 min y resuspendida en 100 mL de BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada para levaduras,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina y 0.5% de metanol) en un matraz de 1000 mL para el inicio de la inducción. Esta fue incubada durante 24 h a 28 °C con una velocidad de agitación de 250 rpm. La adición de 500  $\mu$ L de metanol cada 24 h fue para continuar el proceso de inducción hasta llegar a 96 h. Las muestras fueron colectadas cada 24 h a partir del momento de la inducción.

### **6.2 Generación del banco de trabajo**

La generación del banco de células de trabajo inició con una única colonia de *P. pastoris* X-33 modificada genéticamente tomada de la placa de YPD y cultivada en 10 mL de medio YEPD-glucosa (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) en un matraz de 100 mL. Esta fue incubada por 24 h a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) entre 4 y 6. El cultivo fue utilizado para inocular 100 mL de YEPD-glucosa en un matraz de 1000 mL, incubando durante 24 h a las mismas condiciones hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de entre 10 y 15. Una vez alcanzada la

densidad óptica requerida el cultivo fue separado en 5 tubos de 50 mL añadiendo a cada uno 20 mL del cultivo, para centrifugar a 2000 × g por 10 min a temperatura ambiente y decantar el sobrenadante. La biomasa obtenida fue resuspendida en 4 mL de YEPD-glucosa estéril y este cultivo fue usado para resuspender el siguiente pellet y así sucesivamente hasta obtener un cultivo concentrado con la biomasa recolectada de los 5 tubos. Finalmente, el volumen del cultivo fue completado a 12.5 mL con YEPD-glucosa estéril, adicionando después 12.5 mL de glicerol estéril. Esta mezcla fue homogenizada con movimientos suaves y separada en alícuotas de 1 mL para obtener 25 alícuotas de 1 mL como stock para los estudios en el biorreactor. Dichas alícuotas fueron almacenadas a -80 °C.

### **6.3 Expresión en biorreactor de tanque agitado**

La fermentación fue en un biorreactor Applikon de tanque agitado en lote de 1.2 L de volumen efectivo adjunto al sistema de control eZ-Control Applikon. El sistema cuenta con sensores de pH, oxígeno disuelto, temperatura y nivel, los cuales permiten controlar las correspondientes variables del proceso. El sistema de control cuenta con tres bombas peristálticas, dos de ellas para la adición de soluciones controladoras de pH (ácido y base) y una para la adición de antiespumante.

Para el control de la temperatura tiene incorporado una cámara de enfriamiento por la que pasa agua fría y una mantilla que cubre el frasco de vidrio cuya función es calentar. Ambas funcionalidades están sujetas a un lazo de control PID. De igual forma cuenta con un condensador y un tubo en forma de L para introducir aire filtrado desde el fondo del frasco de vidrio. Cuenta con capacidad máxima de 2000 rpm y tres bafles sujetos a la tapa del biorreactor para garantizar el correcto mezclado durante la fermentación  
Figura 2.

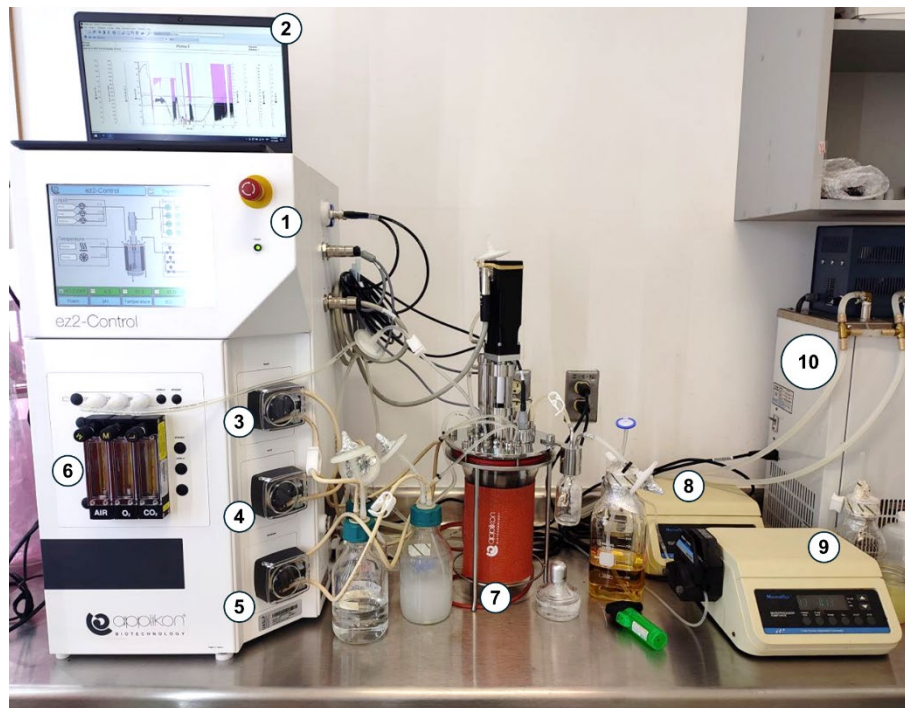


Figura 2. Sistema usado para la fermentación. 1) dispositivo de control ez-Control, 2) software recolector de datos Lucullus, 3) bomba de solución base, 4) bomba de solución ácida, 5) bomba de solución antiespumante, 6) válvulas de aire, 7) frasco de 1.5 L, 8) bomba de adición de preinóculo y medio, 9) bomba de adición de glicerol y metanol, 10) sistema de enfriamiento de agua.

La preparación del preinóculo comenzó tomando 500  $\mu$ L de una de las alícuotas del banco de trabajo para inocular 50 mL de medio BMGY en un matraz de 500 mL. Este fue incubado durante 24 a 28 h a 250 rpm y 30 °C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 4 y 6. Este preinóculo fue empleado en su totalidad para inocular 500 mL de medio en el biorreactor. Dos medios de cultivo fueron evaluados, el medio BMGY (descrito previamente) y el medio bajo en sales LSM (Low Salt Medium: 4.55 g/L de sulfato de potasio, 3.73 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 1.03 g/L de hidróxido de potasio, 0.29 g/L de sulfato de calcio dihidratado, 10.9 mL/L de ácido fosfórico 85% y 40 g/L de glicerol) que contiene 3.5 mL/L de PTM1 Trace Salt (6.0 g/L de sulfato cúprico pentahidratado, 0.08 g/L de yoduro de sodio, 3.0 g/L de sulfato de manganeso hidratado, 0.2 g/L molibdato de sodio dihidratado, 0.02 g/L de ácido bórico, 0.5 g/L de cloruro de cobalto, 20.0 g/L de cloruro de zinc, 65.0 g/L sulfato de hierro

heptahidratado, 0.2 g/L de biotina y 5.0 mL/L de ácido sulfúrico) y 3.5 mL/L de 0.02 % de biotina.

Antes de inocular el medio fue saturado a 100% de concentración de oxígeno durante 6-12 horas a 500 rpm con un flujo de 0.5 L/min de aire, estableciendo el pH y la temperatura a los valores deseados. Dos valores de pH fueron estudiados, 5 para el medio LS y 6 para el medio BMGY. La temperatura en ambos casos fue controlada en 30 °C. Justo después de inocular, la concentración de oxígeno disuelto (OD) fue ajustada al valor deseado y controlada mediante agitación en un rango entre 500 y 1400 rpm y la alimentación de aire entre 0.5 y 2 L/min usando un control ON/OFF. El pH fue controlado mediante la adición de 14 % de hidróxido de amonio y 10 % de ácido sulfúrico cuando era necesario. La espuma fue controlada mediante la adición de una solución de 5 % de antiespumante.

Una vez comenzada la primera etapa de fermentación Glicerol-Batch los parámetros previamente descritos fueron controlados con el sistema de control ez-Control. Esta etapa fue prolongada hasta detectar un consumo total de glicerol mediante una señal marcada en la concentración de oxígeno disuelto o mediante los análisis de concentración de glicerol en el sobrenadante.

### **6.3.1 Estrategia A**

El inicio de la etapa de Glicerol-Fed-Batch (GFB) comenzó con la alimentación de una solución de 50% (w/v) de glicerol conteniendo 12 mL de PTM1 trace salt por litro de cultivo a un flujo de 18.15 mL/h/L de cultivo durante 3 h. A continuación, inició la etapa de Metanol-Fed-Batch (MFB) con la alimentación de 3.6 mL/h/L de cultivo de metanol con 12 mL/L de PTM1 trace salt durante 2 h. Luego el flujo fue aumentado a 7 mL/h/L de cultivo durante 2 h, para finalmente incrementar el flujo de metanol a 10.9 mL/h/L de cultivo y mantenerlo en dicho valor hasta el final de la fermentación.

### **6.3.2 Estrategia B**

La segunda estrategia de inducción evaluada inició la etapa GFB con la adición de 20 mL/h/L de cultivo de una solución de 50% (w/v) de glicerol conteniendo 12 mL de PTM1

trace salt por litro de cultivo. Luego de transcurrida 1 h el flujo de glicerol fue disminuido durante 2 h de manera lineal hasta llegar a cero, añadiendo un volumen completo de metanol con 12 mL/L de PTM1 trace salt para lograr una concentración deseada. A las 3 h de iniciada la etapa de GFB la alimentación de glicerol fue detenida completamente para iniciar la etapa de MFB con la alimentación de metanol.

Varias muestras fueron colectadas de manera regular durante la fermentación para determinar densidad óptica, peso húmedo, peso seco y las concentraciones de glicerol y metanol en el cultivo. Dichas muestras fueron separadas en alícuotas de 1 mL y centrifugadas a 13500 x g durante 15 min a 4 °C, conservando tanto el sobrenadante como el pellet a -80 °C.

#### 6.4 Modificaciones realizadas al biorreactor

La implementación de la operación Fed-Batch requirió de modificaciones en el sistema de fermentación. El tapón de la tapa del recipiente fue sustituido por una pieza de tres boquillas para la alimentación del preinóculo, metanol y glicerol de manera aséptica (Figura 3)

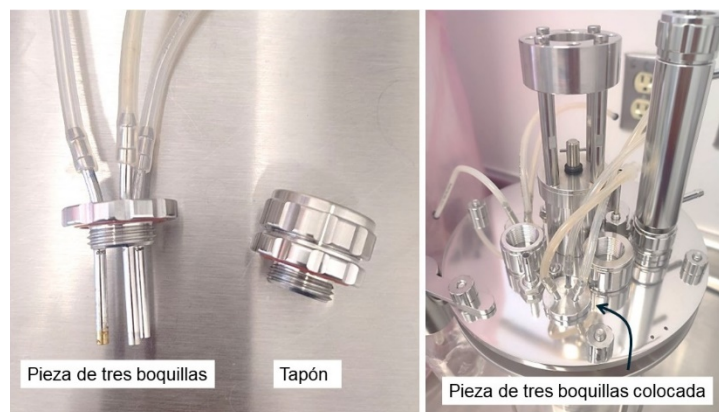


Figura 3. Tapón sustituido por la pieza de tres boquillas en la tapa del frasco de fermentación para la alimentación aséptica de preinóculo, medio y sustratos.

Para la alimentación Fed-Batch fueron preparados cuatro frascos: uno de 50 mL para la adición del preinóculo, dos de 500 mL para la adición de medio de cultivo y glicerol y uno de 1 L para la adición de metanol. Estos frascos fueron modificados para insertar mangueras de 13 y 14 pulgadas en función de los requerimientos de flujo e incluyeron

un pequeño filtro estéril para facilitar el flujo. Una vez preparados con las soluciones necesarias estos frascos fueron esterilizados previo a la conexión al sistema. Además, para impulsar los fluidos, dos bombas peristálticas Masterflex de flujo modificable fueron empleadas.



Figura 4. Bomba peristáltica añadida y ejemplo de frasco modificado para la adición de preinóculo, medio de cultivo y sustrato en la operación Fed-Batch.

## 6.5 Análisis de las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tanto la expresión intracelular como extracelular de la proteína de interés fueron analizadas. Para determinar la presencia de la proteína de forma intracelular los pellets fueron resuspendidos en una solución amortiguadora de rotura (50 mM de fosfato de sodio pH 7.4, 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA y 5% de glicerol) para obtener una  $DO_{600}$  entre 50 y 100. Seguidamente para su ruptura fueron necesarios 7 ciclos de sonicación a 70% de amplitud de 30 s con 30 s de incubación en hielo. Después de centrifugar a  $13\ 500 \times g$  durante 15 min a  $4\ ^\circ C$ , el extracto de proteína total fue recuperado.

Las muestras de sobrenadante y extracto de proteína total fueron mezclados con una solución amortiguadora de carga 5x (500 mM DTT, 250 mM Tris-HCl, 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) glicerol, 0.1% azul de bromofenol y pH 6.8) y 2x, respectivamente. Las mezclas fueron calentadas a  $95\ ^\circ C$  durante 10 min. Las proteínas fueron separadas



utilizando gel de 12 % de poliacrilamida desnaturalizante a 160 V durante 1.33 h y después visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie siguiendo el protocolo reportado por Wong et al. (2000).

## **6.6 Análisis de las muestras mediante Dot Blot y Western Blot**

Para la detección de la proteína de interés mediante Dot blot fueron colocadas en este orden: 6  $\mu$ L de las muestras en una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 1  $\mu$ L de CTB (1 ng/mL) como muestra de control positiva y 6  $\mu$ L de BSA como muestra de control negativa. Después de secar la membrana fue bloqueada con una solución amortiguadora de bloqueo (5% (w/v) de leche libre de grasas disuelta en PBS) durante 3 h a temperatura ambiente, continuando con tres lavados de 5 min cada uno con PBS + 0.05% Tween 20.

La membrana fue incubada toda la noche a 4 °C con una dilución en PBS 1 $\times$  (1:500) del antisuero de ratón en contra de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) que es un suero hiperinmune de ratón obtenido internamente utilizando adyuvante completo de Freund y CTB comercial de Sigma (cat. no. C9903). Después de realizar otros 3 lavados con PBS + 0.05% Tween 20 de 5 min cada uno, la membrana fue incubada por 2 h a temperatura ambiente con una dilución en PBS 1 $\times$  (1:2000) de un anticuerpo de ratón anti-IgG secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante de cabra (Sigma, Livonia, MI). La detección del antígeno procedió tras incubar la membrana con el sustrato luminiscente Super Signal West Picochemi (Pierce, Rockford, IL).

Para la detección de la proteína de interés mediante Western blot, las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) por 1 h a 500 mA usando electroforesis de transferencia celular (Bio-Rad, Hercules, CA). La proteína LTB-p50 purificada a una concentración de 91  $\mu$ g/mL fue usada como control positivo. La membrana fue incubada durante toda la noche a 4 °C con la solución amortiguadora de bloqueo (5% (w/v) de leche libre de grasas disuelta en PBS).

A continuación, la membrana fue lavada con PBS + 0.05% Tween 20 tres veces por 5 min cada lavado. La detección procedió mediante el mismo procedimiento que el Dot Blot. Esta fue incubada toda la noche a 4 °C con una dilución en PBS 1× (1:800) del antisuero de ratón en contra de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) que es un suero hiperinmune de ratón obtenido internamente utilizando adyuvante completo de Freund y CTB comercial de Sigma (cat. no. C9903). Después de realizar otros 3 lavados con PBS + 0.05% Tween 20 de 5 min cada uno, la membrana fue incubada por 2 h a temperatura ambiente con una dilución en PBS 1× (1:2000) de un anticuerpo de ratón anti-IgG secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante de cabra (Sigma, Livonia, MI). La detección del antígeno procedió tras incubar la membrana con el sustrato luminiscente Super Signal West Picochemi (Pierce, Rockford, IL.).

## **6.7 Cinética de crecimiento**

La cinética de crecimiento microbiana fue evaluada solo para la etapa de crecimiento en lote, es decir, durante la fase de crecimiento en glicerol o Glicerol-Batch. Las muestras fueron colectadas de manera continua para medir su densidad óptica en el espectrofotómetro a 600 nm, determinando así la  $DO_{600}$ . La medición del peso húmedo consistió en tomar una muestra de 1 mL de cultivo en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL previamente pesado para centrifugar a 13 500 × g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue almacenado a -80 °C y el pellet de biomasa fue lavado dos veces con agua desionizada dejando secar durante unos minutos a temperatura ambiente para luego pesar el tubo y determinar el peso húmedo de la muestra, luego fue secado durante 72 h a 50 °C para determinar el peso seco.

El modelo de Monod fue seleccionado para hacer el ajuste cinético debido a su simple implementación y la fuerte dependencia del crecimiento con el sustrato limitante que presenta el cultivo. Las concentraciones de glicerol durante el cultivo en lote fueron determinadas a partir de las muestras de sobrenadante mediante cromatografía líquida HPLC. Los datos fueron recolectados para los ensayos 3A, 1B, 2B y 3B.

### 6.7.1 Crecimiento celular

El balance de masa en un biorreactor de lote donde el volumen del reactor es constante y está uniformemente mezclado viene dado por la Ecuación 2.

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $X$  representa la concentración celular ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $r_X$  expresa la velocidad de crecimiento celular con base a peso seco ( $\text{kg de biomasa}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ ) y  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) la velocidad específica de crecimiento, una medida de la rapidez de crecimiento. Suponiendo que el modelo de Monod describe las fases exponencial del crecimiento microbiano, de desaceleración y estacionaria la Ecuación 3 es útil, obtenida a partir de la combinación de la Ecuación 1 y la Ecuación 2.

$$\frac{dX}{dt} = X \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ecuación 3}$$

Como el rendimiento celular es constante durante estas fases entonces es posible obtener la Ecuación 4.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{XS}} \frac{dX}{dt} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $Y_{XS}$  es el factor de rendimiento y viene dado por la relación entre la masa de células formadas y la masa de substrato consumido.

Mediante la integración de las ecuaciones 3 y 4 es posible obtener la Ecuación 5.

$$t = \frac{(X_0 + Y_{XS}(S_0 + K_S)) \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) - K_S Y_{XS} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right)}{\mu_{max}(S_0 Y_{XS} + X_0)} \quad \text{Ecuación 5}$$

### **6.7.2 Cuantificación de concentración de metanol y glicerol por HPLC**

Las concentraciones de etanol y glicerol en el medio de cultivo fueron determinadas mediante cromatografía líquida. Para esto fue empleada una columna de exclusión iónica Aminex® HPX-87H (300 mm x 7.8 mm) con un método isocrático empleando una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvil. Fueron inyectados 20 µL de muestra (o estándar), el flujo fue de 0.6 ml/min y la temperatura de la columna fue de 50 °C. La detección fue utilizando un detector de índice de refracción a 35 °C. El tiempo de análisis fue de 21 min.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Crecimiento en matraz

La variante X-33, fenotipo Mut<sup>+</sup>, fue modificada con el vector de expresión pPICZα-LTB-p50. Este vector le confiere a la cepa resistencia a la zeocina lo que permitió seleccionar las cepas modificadas correctamente. Las clonas 15, 22 y 24 resultaron candidatas y fueron cultivadas en matraz. También fue cultivada la cepa *wild-type* (WT) con el objetivo de evaluar su comportamiento y establecer dichos resultados como referencia.

La toma de muestras ocurrió cada 24 h. El perfil de crecimiento celular de las tres clonas modificadas fue similar principalmente en el caso de las clonas 22 y 24, las cuales alcanzaron mayores densidades ópticas al final de la etapa de inducción (Figura 5).

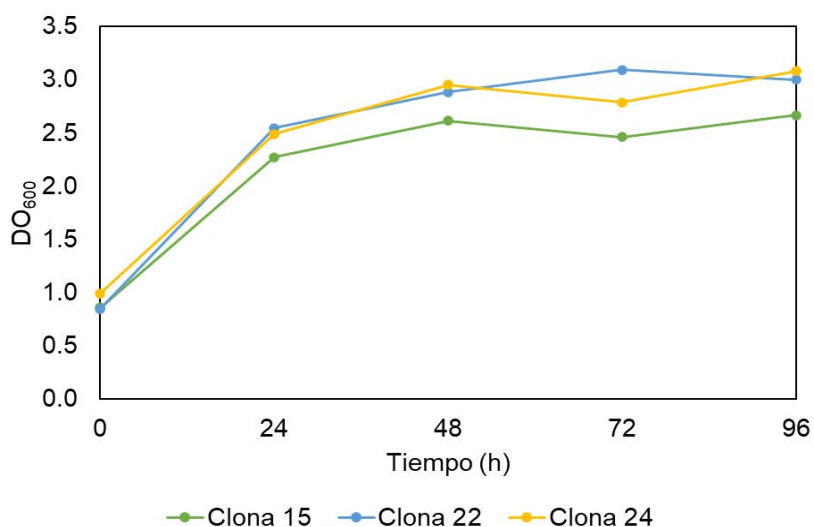


Figura 5. Densidad óptica en 600 nm del cultivo en matraz de clonas modificadas 15, 22 y 24 durante la etapa de inducción en medio BMMY en función del tiempo de inducción.

La cepa *wild-type* presentó un mayor crecimiento en comparación con las cepas modificadas, alcanzando, a las 24 h de inducción, la máxima densidad óptica, similar a la alcanzada por las cepas modificadas. La inducción duró 72 h en total y durante este tiempo el cultivo alcanzó una densidad óptica de 10.87 (Figura 6). La diferencia

en el comportamiento del crecimiento entre las cepas modificadas y la cepa sin modificar puede estar asociada a la presencia del vector de expresión que provoca un estrés adicional que la cepa *wild-type* no sufre.

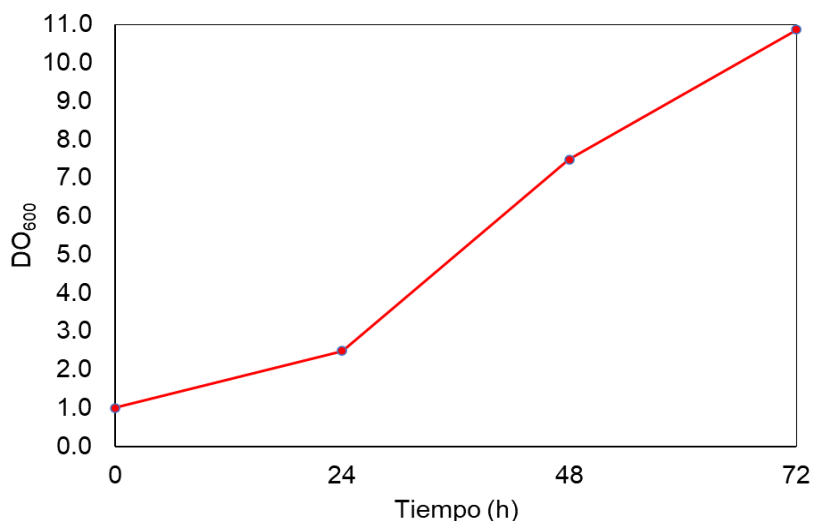


Figura 6. Densidad óptica 600 nm del cultivo en matraz de la cepa *wild-type* durante la etapa de inducción en medio BMMY en función del tiempo de inducción (h).

## 7.2 Detección de la proteína expresada en matraz

La expresión de la proteína de manera extracelular e intracelular fue evaluada a partir de las muestras de sobrenadante y extracto de proteína total obtenidas mediante los protocolos previamente expuestos en la sección 6.5. Las muestras procesadas fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Dot blot.

Las electroforesis obtenidas a partir de las muestras de sobrenadante de las clonas estudiadas aparecen en la Figura 7. No existen bandas definidas a la altura de los 26 kDa (el peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es 25.4 kDa) por lo que posiblemente exista nula o muy poca expresión de la proteína de manera extracelular.

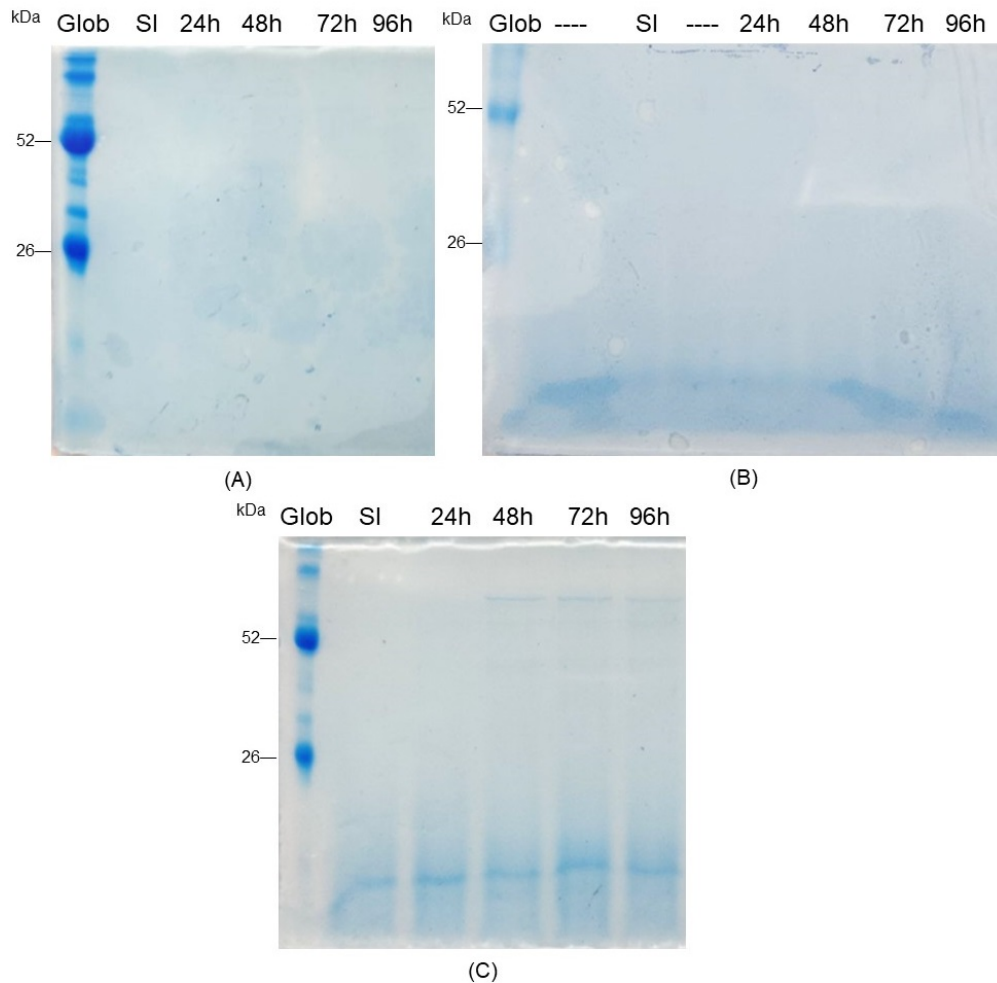


Figura 7. Análisis mediante SDS-PAGE del sobrenadante obtenido a diferentes tiempos de inducción durante la expresión de la proteína LTB-p50 en medio BMMY en matraz. (A) sobrenadante de la clona 15, (B) sobrenadante de la clona 22, (C) sobrenadante de la clona 24, Glob: globulina usada como marcador de peso molecular, SI: muestra sin inducir, 24h, 48h, 72h, 96h: muestras de sobrenadante a las 24, 48, 72 y 96 h de inducción respectivamente. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

En la Figura 8 aparecen las electroforesis del extracto de proteína total obtenido a partir de las muestras.

La electroforesis de la clona 15, Figura 8A, presenta bandas muy tenues a la altura de los 26 kDa, las cuales no están en la muestra sin inducir. Sin embargo, todas tienen una intensidad muy similar. En el caso de la clona 22, Figura 8B, no existen bandas de interés. La electroforesis de la clona 24, Figura 8C, exhibe bandas muy ligeras a la altura de los 26 kDa cuya intensidad aumenta levemente conforme aumenta el tiempo

de inducción y no aparece en la muestra sin inducir, por lo que podría pertenecer a la proteína de interés expresada de manera intracelular.

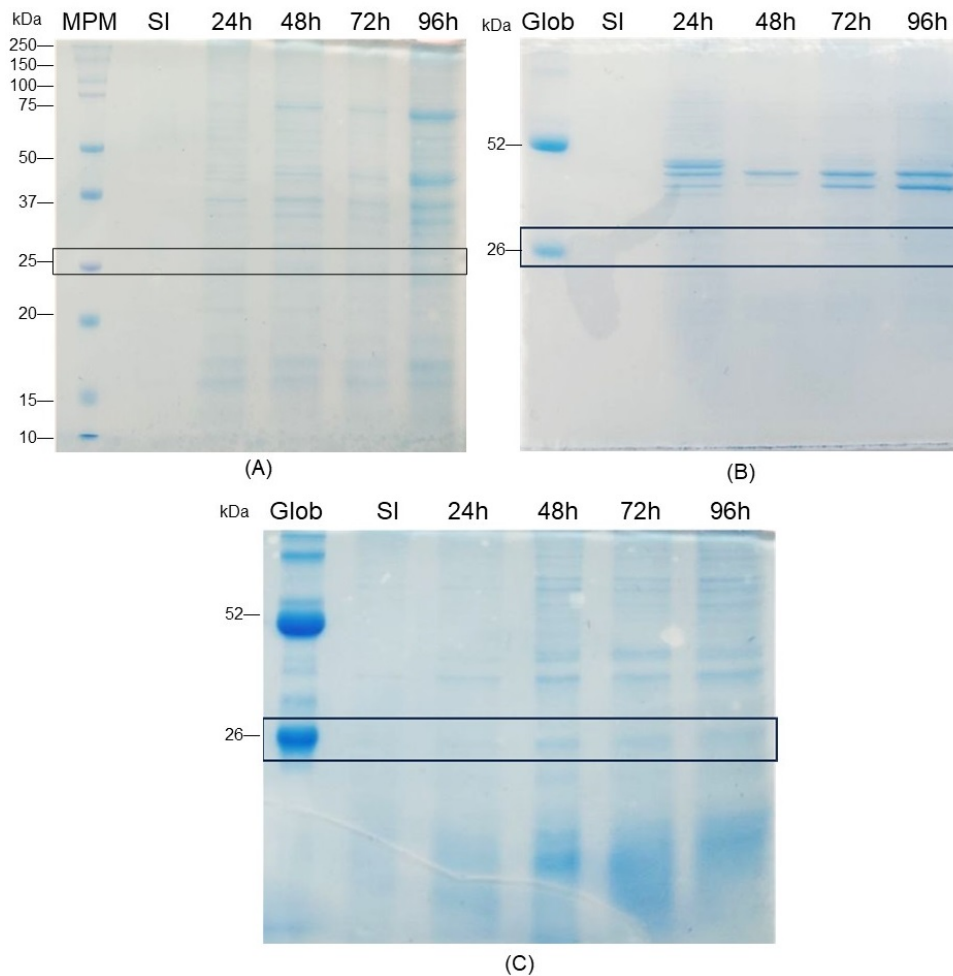


Figura 8. Análisis mediante SDS-PAGE del extracto de proteína total obtenido a diferentes tiempos de inducción durante la expresión de la proteína LTB-p50 en medio BMMY en matraz. (A) extracto de proteína total de la clona 15, (B) extracto de proteína total de la clona 22, (C) extracto de proteína total de la clona 24, Glob: globulina usada como marcador de peso molecular, MPM: marcador de peso molecular, SI: muestra sin inducir, 24h, 48h, 72h, 96h: muestras de extracto de proteína total a las 24, 48, 72 y 96 h de inducción respectivamente. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

La electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras de sobrenadante y extracto de proteína total obtenidas a partir de la expresión en matraz para la cepa *wild-type* son mostradas en la Figura 9.



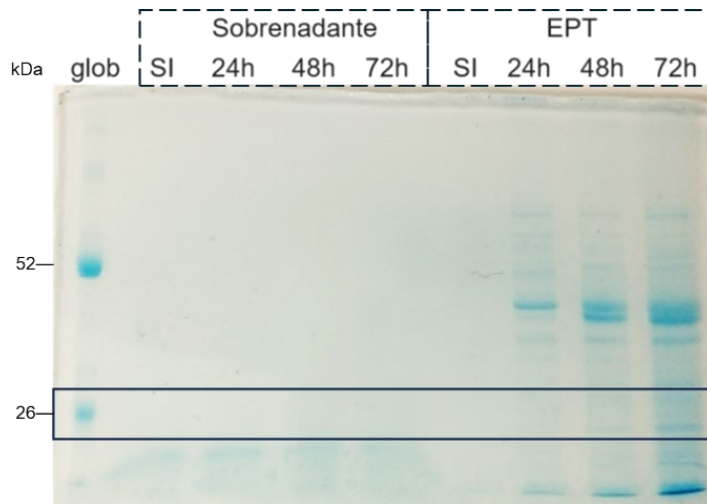


Figura 9. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de proteínas de la cepa *wild-type* a diferentes tiempos de inducción en medio BMMY en matraz. glob: globulina usada como marcador de peso molecular, EPT: extracto de proteína total, SI: muestra sin inducir, 24h, 48h, 72h, 96h: muestras obtenidas a las 24, 48, 72 y 96 h de inducción respectivamente. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

En las muestras de sobrenadante no hay presencia de ninguna banda, lo cual está dado por la baja cantidad de proteína que secreta *P. pastoris* al medio (Brady et al., 2001). En el caso de las muestras de extracto de proteína total aparecen bandas muy similares a las observadas en las clonas modificadas principalmente a la altura de los 26 kDa.

El ensayo Dot Blot permitió confirmar la expresión o no de la proteína de interés. Los resultados aparecen en la Figura 10

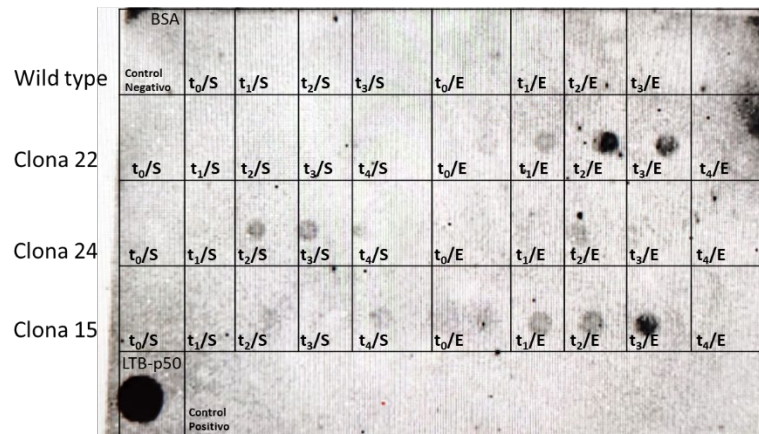


Figura 10. Análisis mediante Dot Blot de la expresión de la proteína LTB-p50 en medio BMMY en matraz. BSA: seroalbúmina bovina como control negativo, S: sobrenadante, E: extracto de proteína total, t<sub>0</sub>: muestra sin inducir, t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>4</sub>: muestras obtenidas a las 24, 48, 72 y 96 h de inducción respectivamente, LTB-p50: proteína LTB-p50 purificada (91 µg/mL) como control positivo.

Las muestras de la cepa *wild-type* resultaron negativas y los resultados fueron tomados como control para el análisis de las cepas modificadas. La clona 22 presenta señales negativas en el sobrenadante lo que significa que no hubo expresión extracelular de la proteína. Las muestras del extracto de proteína total para las 24, 48 y 72 h de inducción resultaron positivas, y su intensidad aumenta desde las 24 hasta las 48 h de inducción. Sin embargo, a las 72 h disminuye dicha intensidad para desaparecer por completo a las 96 h de inducción.

Las muestras de sobrenadante obtenidas con la expresión de la clona 15 resultaron ser negativas al ensayo hasta las 72 h de inducción. La muestra de las 96 h de inducción presenta una señal casi imperceptible que podría corresponder a una baja secreción de la proteína de interés. La muestra sin inducir del extracto de proteína total resultó ser negativa como era de esperar, mientras que las muestras de 24, 48 y 72 h de inducción si tuvieron respuestas positivas y su intensidad fue directamente proporcional al tiempo de inducción. La muestra de las 96 h de inducción resultó ser negativa.

Las muestras de sobrenadante sin inducir y 24 h de inducción pertenecientes a la clona 24 resultaron negativas. Las muestras de las 48 y 72 h de inducción fueron positivas

con intensidades similares lo que significa que hubo expresión extracelular de la proteína de interés. La señal positiva de la muestra a las 96 h de inducción es prácticamente imperceptible.

La ausencia de proteína a las 96 h para todas las clonas tanto en las muestras de sobrenadante como de extracto de proteína total podría corresponder a la acción de proteasas. La degradación proteolítica de las proteínas recombinantes puede ser causado por la degradación de la membrana celular debido a la lisis celular en cultivos de alta densidad. Además, bajo niveles de estrés provocados por inanición, cambio de sustrato, temperatura, pH o elementos tóxicos es muy probable que exista este tipo de respuesta (Sinha et al., 2005).

Luego de estos análisis fue seleccionada la clona 24 para comenzar los estudios de expresión en el biorreactor ya que fue la que resultó mejor en la expresión extracelular de la proteína de interés. Además, los niveles de expresión en matraz son menores que en un biorreactor donde es posible alcanzar un rendimiento hasta 10 veces mayor (Cregg et al., 2000).

### **7.3 Expresión en biorreactor. Estrategia A**

El banco de trabajo para los estudios en el biorreactor consistió en 25 alícuotas de 1 mL de cultivo de la clona 24 en glicerol con una  $DO_{600}$  de 10.2, obtenidas mediante el protocolo establecido en la sección 6.2.

Los parámetros establecidos para la fermentación implementando la estrategia A aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros de los ensayos desarrollados con la estrategia de expresión A

| Ensayo | $DO_{600}$ | Preinóculo | pH | %OD | Temp (°C)  | Agitación (rpm) | Flujo de aire (L/min) |
|--------|------------|------------|----|-----|------------|-----------------|-----------------------|
| 1A     | 4.2        | 6.5        | 40 | 30  | 400 – 1000 | 0.5 – 2         |                       |
| 2A     | 4.8        | 6.5        | 30 | 30  | 300 – 1200 | 0.5 – 2         |                       |
| 3A     | 4.7        | 6.5        | 30 | 30  | 500 – 1000 | 0.5 – 2         |                       |

EL medio BMGY tiene una concentración de 1% de glicerol. El consumo total del mismo ocurrió entre las 12 y las 14 horas luego de haber inoculado el biorreactor. Este punto fue determinado en algunos casos por un pico radical en la concentración de oxígeno disuelto. La Tabla 5 muestra algunos de los resultados de estos tres ensayos.

Tabla 5: Resultados de los ensayos de la estrategia A

| Ensayo | Tiempo GB (h) | Tiempo MFB (h) | Máxima biomasa húmeda obtenida (g/L) | Máxima DO <sub>600</sub> alcanzada |
|--------|---------------|----------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1A     | 14            | 48             | 112.0                                | 37.4                               |
| 2A     | 12            | 54             | 148.6                                | 42.3                               |
| 3A     | 14            | 96             | 192.2                                | 68.8                               |

### 7.3.1 Resultados obtenidos en el Ensayo 1 – Estrategia A

El ensayo 1 de la estrategia A inició con un volumen de 700 mL de medio BMGY y la adición de 70 mL de preinóculo obtenido luego de 26 h de crecimiento en medio BMGY con una densidad óptica de 4.2. La densidad óptica del cultivo al momento de inocular fue de 1.1.

El perfil de concentración de oxígeno disuelto obtenido es mostrado en la Figura 11. Justo en el momento de inocular ocurrió una caída drástica en la concentración de oxígeno disuelto, y en este momento inició el control de dicho parámetro a 40%. A las 11 h de fermentación ocurrió un pico radical en el perfil, señal del agotamiento de glicerol. El cultivo estuvo en inanición hasta las 14 h de fermentación. Durante este tiempo el perfil de concentración de oxígeno disuelto presentó un comportamiento errático que podría estar relacionado a la fase de adaptación del crecimiento.

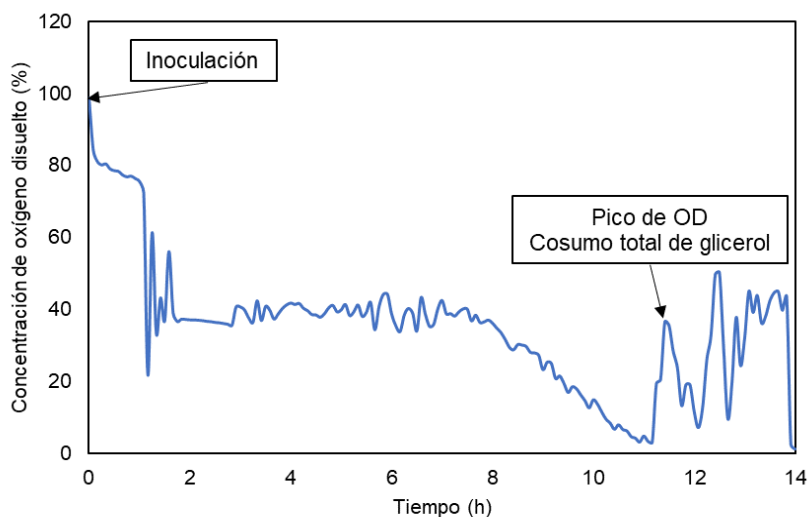


Figura 11. Perfil de concentración de oxígeno disuelto (%) en función del tiempo durante la etapa de Glicerol-Batch en la fermentación con medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote (E1A). Condiciones establecidas: agitación variable de 400 a 600 rpm, aireación de 0.5 a 1 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C.

Llegadas las 14 h de fermentación, inició la alimentación de una solución de 50 % de glicerol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salts a un flujo de 0.21 mL/min. Esto provocó un aumento rápido de los requerimientos de oxígeno y así estuvo durante las 2.5 h que tuvo lugar la etapa de Glicerol-Fed-Batch (GFB). A las 18.4 h de fermentación inició la etapa de Metanol-Fed-Batch (MFB) con la alimentación de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salts a un flujo de 0.06 mL/min durante 2 h. Seguidamente, aumentó el flujo de metanol a 0.08 mL/min durante 1 h. Finalmente, aumentó el flujo de metanol a 0.10 mL/min y persistió hasta el final del proceso.

La Figura 12 representa el perfil de concentración de oxígeno disuelto para las etapas de alimentación por lote descritas anteriormente.

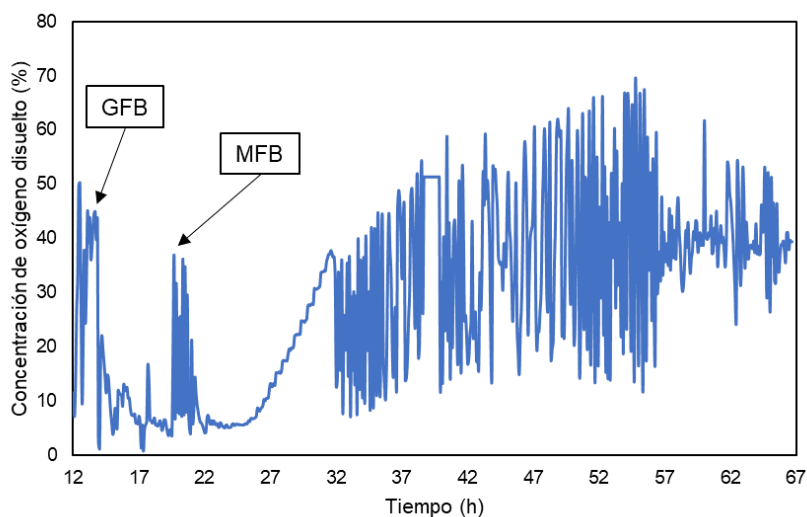


Figura 12. Perfil de concentración de oxígeno disuelto (%) en función del tiempo durante las etapas de Glicerol-Fed-Batch (GFB) y Metanol-Fed-Batch (MFB) en la fermentación con medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote (E1A). Condiciones establecidas: agitación variable de 400 a 1000 rpm, flujo de aire de 1 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C. GFB inició luego de 14 h, MFB inició luego de 19 h.

Durante las dos primeras horas de inducción (MFB) hubo mucha fluctuación en la concentración de oxígeno disuelto. Esto puede corresponder a una acumulación inicial de metanol en el medio durante el proceso de adaptación (Invitrogen, 2002). Cerca de las 22 h de fermentación, la concentración de oxígeno disuelto alcanzó una mayor estabilidad debido a la completa adaptación del cultivo al nuevo sustrato (Invitrogen, 2002). Sobre las 26 h de fermentación comenzó un aumento progresivo de la concentración de oxígeno disuelto, lo cual viene dado por una disminución en los requerimientos de oxígeno. El resto del perfil continuó con una alta fluctuación aumentando desde rangos de 10% – 40% a 10% – 70%. Esto fue producto de los límites de agitación establecidos (de 300 a 1000 rpm) sumado a las bajas demandas de oxígeno que provocaron alta variabilidad.

El comportamiento del crecimiento celular es observado en la Figura 13. Durante las primeras 14 h es posible que tuvieron lugar las fases de adaptación, aceleramiento y exponencial, y al momento de la toma de muestra ya estaba en la fase estacionaria.

Al comenzar la alimentación de glicerol ocurrió un aumento exponencial en el crecimiento celular llegando a duplicarse la biomasa durante esta etapa.

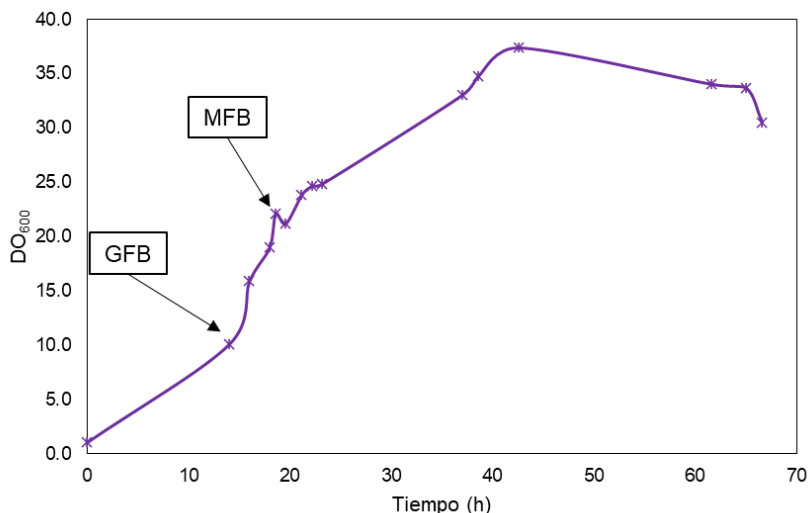


Figura 13. Densidad óptica 600 nm en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado (E1A). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 400 a 1000 rpm, flujo de aire de 1 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C, Volumen inicial 700 mL ( $DO_{600} = 1.1$ ), GFB inició luego de 14 h ( $DO_{600} = 10.1$ ), MFB inició luego de 19 h ( $DO_{600} = 22.1$ ).

Con el inicio de la fase de inducción continuó el crecimiento celular hasta alcanzar un valor máximo de densidad óptica de 37.4. A partir de entonces comenzó la muerte celular en el cultivo hasta la culminación de proceso a las 48 h de inducción. Es posible que la muerte celular haya sido provocada por la acumulación de metanol llegando a concentraciones citotóxicas en el cultivo.

El resto de las variables operacionales es presentado en el Anexo 5.

### 7.3.2 Resultados obtenidos en el Ensayo 2 – Estrategia A

El segundo ensayo inició con un volumen de 500 mL de medio BMGY, ajuste hecho debido a las capacidades del sistema y al aumento progresivo del volumen del cultivo durante la estrategia de alimentación por lote. El biorreactor fue alimentado con 50 mL de preinóculo en medio BMGY a una densidad óptica de 4.8. La Figura 14 muestra el comportamiento de la concentración de oxígeno disuelto para este caso.

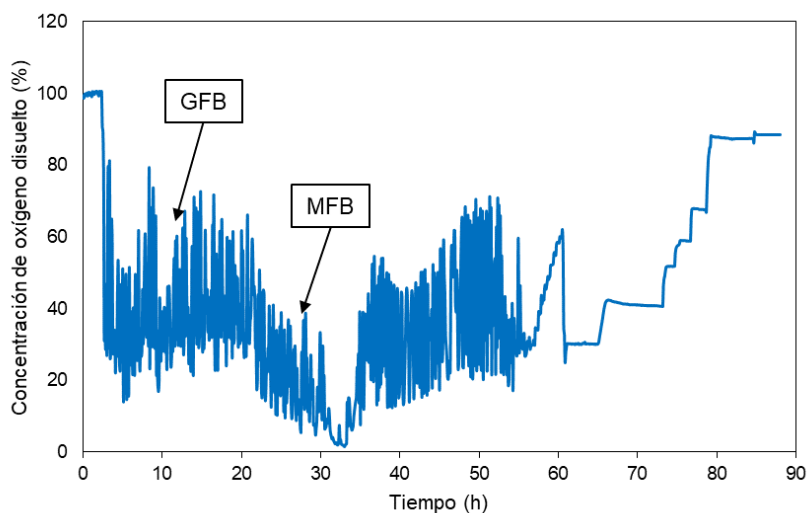


Figura 14. Perfil de concentración de oxígeno disuelto (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado (E2A). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: volumen inicial de 500 mL, agitación variable de 300 a 1200 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C. GFB inició luego de 12 h, MFB inició luego de 28 h.

Al momento de inocular, la concentración de oxígeno disuelto cayó súbitamente hasta valores cercanos a 30% y a partir de este momento inició el control. La etapa de crecimiento en glicerol tuvo una duración de 12 h y durante esta etapa el cultivo alcanzó 15 g/L de biomasa húmeda. A continuación, inició la etapa Glicerol-Fed-Batch con la alimentación de una solución de 50 % de glicerol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salts a un flujo de 0.06 mL/min durante 11 h para un volumen final añadido de 39.6 mL de glicerol. Es importante destacar que estas condiciones permitieron alimentar aproximadamente la misma cantidad de glicerol que al flujo reportado por (Invitrogen, 2002) durante 4 h. Esta modificación en la estrategia sucedió con el objetivo de aumentar la concentración de biomasa antes de inducir.

Durante esta etapa el rendimiento de biomasa llegó a duplicarse alcanzando 36.3 g/L de biomasa húmeda. A pesar de que el cultivo estuvo sin alimentación de sustratos durante las siguientes 5 h, continuó el crecimiento celular de manera exponencial hasta alcanzar 90 g/L de biomasa húmeda, concentración suficiente para comenzar la inducción. Esta tendencia sucede tanto en el perfil de crecimiento celular obtenido



mediante densidad óptica como en el obtenido mediante la medición del peso húmedo (Figura 15).

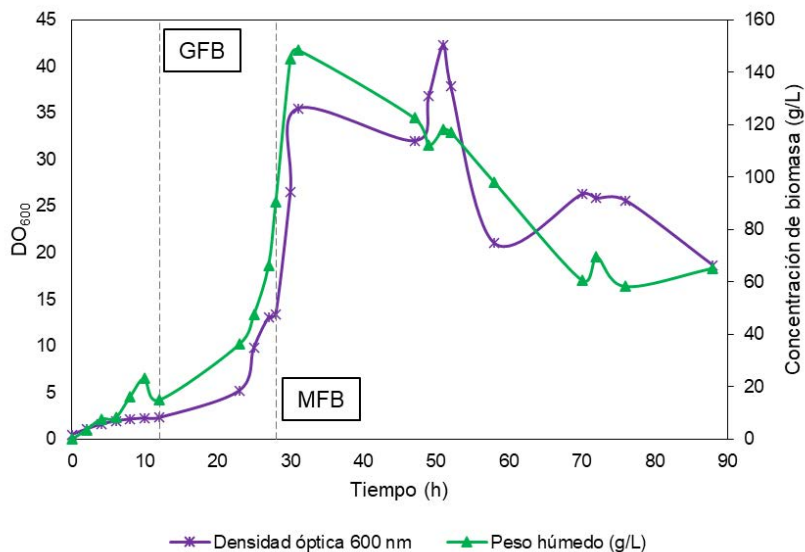


Figura 15. Crecimiento celular en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado (E2A). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 300 a 1200 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C, Volumen inicial de 500 mL ( $DO_{600} = 0.5$ ), GFB inició luego de 12 h ( $DO_{600} = 2.3$ , 15 g/L de biomasa húmeda), MFB inició luego de 28 h ( $DO_{600} = 13.3$ , 91.5 g/L de biomasa húmeda).

A las 28 h de fermentación inició la etapa de Metanol-Fed-Batch con la adición de 0.06 mL/min de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt durante 2 h. Posteriormente, el flujo de metanol aumentó a 0.08 mL/min durante 1 h para finalmente establecerlo en 0.10 mL/min hasta el final de la etapa de inducción. La adición de metanol provocó un aumento en los requerimientos de oxígeno del cultivo (Figura 14). Transcurridas 30 h de inducción, el consumo de oxígeno disminuyó drásticamente y a partir de entonces la concentración de biomasa estuvo afectada (Figura 15).

La muerte celular detectada justo luego del inicio de la inducción mostró que la etapa de adaptación al metanol no fue exitosa. También es importante destacar que el flujo final de inducción (0.10 mL/min de metanol) fue demasiado alto para el cultivo provocando la acumulación excesiva de metanol, llegando a niveles citotóxicos y provocando la disminución de la biomasa. A las 30 h de inducción el cultivo ya estaba

en una situación crítica y a partir de este punto el consumo de oxígeno llegó a ser prácticamente nulo.

El resto de las variables operacionales es presentado en el Anexo 6.

### 7.3.3 Resultados obtenidos en el Ensayo 3 – Estrategia A

El tercer ensayo para la estrategia A inició con un volumen de 500 mL de medio BMGY e inoculado con 50 mL de preinóculo en medio BMGY con una densidad óptica de 4.8. La densidad óptica inicial del cultivo luego de inocular fue de 1.0 y durante 14 h transcurrió la etapa de Glicerol-Batch que permitió llegar a 71 g WCW/L.

En este ensayo no existió la etapa de alimentación por lote, Glicerol-Fed-Batch, con el fin de evaluar la repercusión de la ausencia de esta etapa en el cultivo. La inducción ocurrió diferente, al añadir volúmenes completos de metanol y en otros momentos manteniendo un flujo de alimentación por lote. Esta estrategia sucedió de manera empírica y mediante la evaluación de los perfiles de concentración de oxígeno disuelto.

El perfil de concentración de oxígeno disuelto para la etapa GB es presentado en la Figura 16.

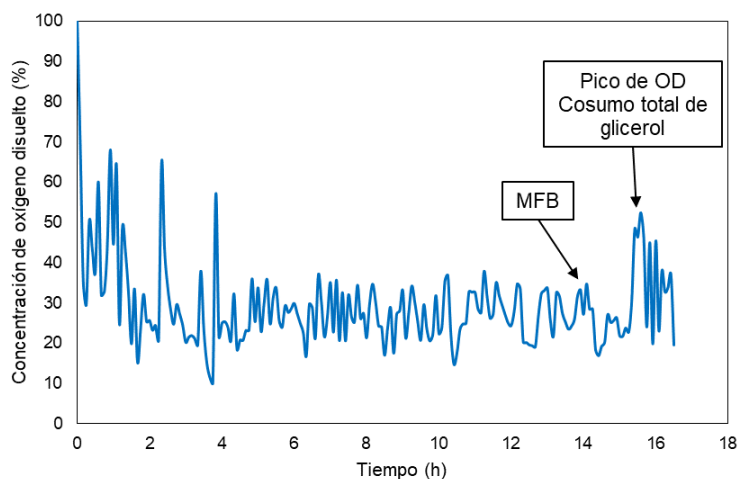


Figura 16. Perfil de concentración de oxígeno disuelto (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado para la etapa de Glicerol-Batch e inicios de la etapa de Metanol-Fed-Batch (E3A). MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 1 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C.

La etapa de crecimiento en glicerol (GB) presentó un alto consumo de oxígeno, pero estuvo controlado en valores cercanos a 30%. La inducción comenzó a las 14 h con la adición de 2.5 mL de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt para una concentración en el medio de 0.5% de metanol. El pico en el perfil de oxígeno disuelto que marca el consumo total de glicerol ocurrió a las 15.5 h.

El resto del perfil de concentración de oxígeno disuelto y sustratos es mostrado en la Figura 17. Las concentraciones de los sustratos aparecen detalladas en el Anexo 1. Las líneas azules discontinuas representan los puntos donde ocurrió la adición metanol en volúmenes completos, mientras que las líneas rojas discontinuas a la etapa de adición de metanol a flujo constante de 0.06 mL/min.

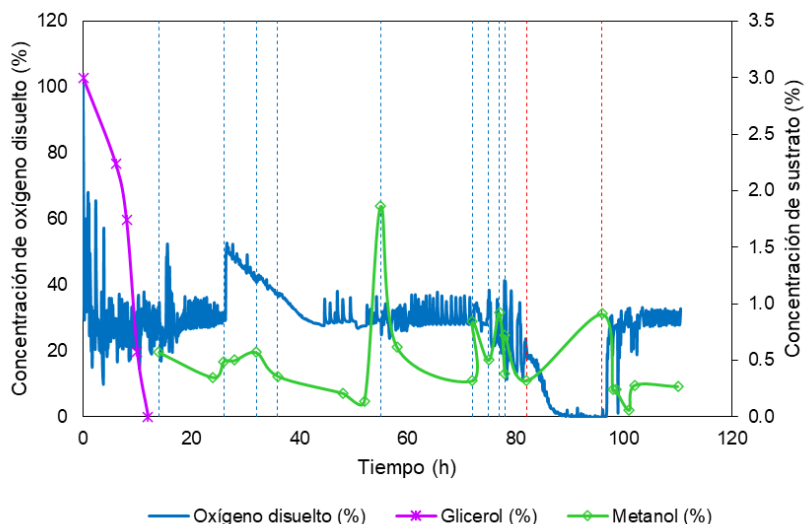


Figura 17. Perfiles de concentración de oxígeno disuelto (%), glicerol (%) y metanol (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado (E3A). Líneas azules discontinuas: adición de metanol en volúmenes completos. Líneas rojas discontinuas: alimentación Fed-Batch a 0.06 mL/min. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C. Inducción después de 14 horas.

Los volúmenes añadidos de metanol aparecen en la Tabla 6

Tabla 6: Adición de metanol durante la etapa de inducción del ensayo 3A.

| Tiempo (h) | Volumen (mL) | Tiempo (h) | Volumen (mL)           |
|------------|--------------|------------|------------------------|
| 14         | 2.5          | 75         | 2                      |
| 26         | 2.5          | 77         | 1                      |
| 32         | 2.5          | 78         | 1                      |
| 36         | 2.5          | 82         | 0.06                   |
| 55         | 2.5          | 96         | 50.4 (Total acumulado) |
| 72         | 2.5          |            |                        |

Luego de la adición inicial de metanol, el consumo de oxígeno del cultivo permaneció alto, demandando altas velocidades de agitación (de 800 a 1000 rpm) con poca inyección de aire. Transcurridas aproximadamente 10 h de inducción comenzó a disminuir el consumo de oxígeno y la agitación bajó a valores cercanos a 500 rpm (valor mínimo establecido para el sistema), lo cual pudiera corresponder a concentraciones limitantes de metanol.

A las 26, 32 y 36 h de fermentación fue la adición de 2.5 mL de metanol, respectivamente. Durante este tiempo el consumo de oxígeno fue bajo. Pasadas las 40 h aumentaron los requerimientos de oxígeno disuelto, producto de la alta actividad metabólica. La alimentación de metanol a las 55, 72, 75, 77 y 78 h fue esperando encontrar correlación en el comportamiento de la concentración de oxígeno disuelto y la adición de metanol.

Con la adición de metanol ocurrió una disminución puntual de la concentración de oxígeno disuelto y un ligero aumento en el consumo de oxígeno, pero pasados algunos minutos el sistema volvió a estabilizarse.

Transcurridas 82 h de fermentación comenzó la alimentación de metanol a un flujo constante de 0.06 mL/min durante 14 h. A los pocos minutos de iniciada la alimentación por lote ocurrió la disminución de oxígeno disuelto en el medio hasta llegar a valores muy cercanos a 0%, los límites de agitación aumentaron a 1200 rpm para suplir las condiciones de fermentación, pero no fue suficiente.

La Figura 18 ilustra los perfiles de crecimiento celular obtenidos mediante las mediciones de la densidad óptica del cultivo, peso húmedo y peso seco de la biomasa.

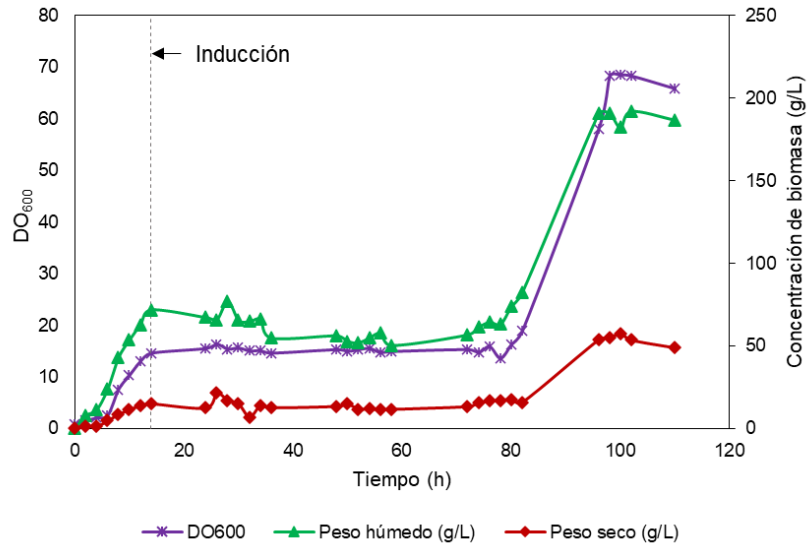


Figura 18. Crecimiento celular en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en BMGY en un biorreactor de tanque agitado (E3A). Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 6.4, Temperatura de 30 °C. Inducción después de 14 horas ( $DO_{600} = 14.7$ , 72 g/L de biomasa húmeda, 15.1 g/L de biomasa seca).

Los tres perfiles presentan tendencias similares. Durante la etapa de crecimiento en glicerol fueron identificadas claramente las etapas iniciales de la cinética microbiana. Llegadas las 14 h comienza la etapa de desaceleramiento producto del agotamiento del glicerol como sustrato y, horas después, surgió el fenómeno diaúxico debido al cambio de sustrato. Durante las siguientes 68 h de cultivo, la concentración de biomasa fue prácticamente constante, lo cual podría corresponder a concentraciones limitantes de metanol que impiden la expresión correcta de la proteína y la generación de biomasa. Las bajas demandas de oxígeno del sistema durante este tiempo corroboran dicha suposición.

Con el inicio de la alimentación de metanol a flujo constante, la generación de biomasa aumentó aproximadamente 3 veces. Esto muestra que la alimentación de metanol de manera constante es importante en el rendimiento del cultivo. A pesar de haber

mantenido el oxígeno disuelto en valores muy bajos, el cultivo fue capaz de triplicar su rendimiento. Es importante destacar que la detención de la adición de metanol redujo el crecimiento y durante las siguientes 14 h solo hubo una ligera disminución de la biomasa, señal de una ausencia completa de metanol en el medio.

El flujo de 0.06 mL/min no produce concentraciones de metanol citotóxicas para el cultivo y es de vital importancia para la generación de biomasa, la cual podría incrementarse entre 350 y 400 g/L de biomasa húmeda para el final de la etapa de inducción (Invitrogen, 2002). La concentración máxima del cultivo fue de 192 g/L de biomasa húmeda, la mayor obtenida para el estudio del medio BMGY a pH 6.

El resto de las variables operacionales son mostradas en el Anexo 7.

#### 7.4 Crecimiento en biorreactor. Estrategia B

La estrategia B contó con tres ensayos para evaluar la expresión de la proteína y el comportamiento del cultivo en el medio LS conteniendo 4% de glicerol (w/v) inicial y pH 5, el resto de los parámetros fueron iguales a la estrategia A. Dos de los ensayos fueron con la clona 24 y el tercero con una clona modificada con el vector de expresión pPICZ $\alpha$ -Dibloque proveniente de la Universidad Nacional Autónoma de México, previamente analizada en un biorreactor como estudio de referencia.

En la Tabla 7 y en la Tabla 8 aparece un resumen de los parámetros establecidos para la fermentación mediante la estrategia B y los resultados obtenidos respectivamente.

Tabla 7: Parámetros de los ensayos desarrollados con la estrategia de expresión B

| Ensayo  | DO <sub>600</sub> Preinóculo | pH | %OD | Temp (°C) | Agitación (rpm) | Flujo de aire (L/min) |
|---------|------------------------------|----|-----|-----------|-----------------|-----------------------|
| 1B      | 5.0                          | 5  | 30  | 30        | 500 – 1400      | 0.5 – 2               |
| 2B      | 4.8                          | 5  | 30  | 30        | 500 – 1000      | 0.5 – 2               |
| 3B (DB) | 7.0                          | 5  | 30  | 30        | 500 – 1000      | 0.5 – 2               |

Tabla 8: Resultados de los ensayos desarrollados con la estrategia de expresión B

| Ensayo  | Tiempo GB (h) | Tiempo MFB (h) | Máximo rendimiento biomasa húmeda (g/L) | Máxima DO <sub>600</sub> |
|---------|---------------|----------------|---|--------------------------|
| 1B      | 24            | 63             | 285.7                                   | 108.7                    |
| 2B      | 20            | 48             | 132.9                                   | 63.0                     |
| 3B (DB) | 22            | 72             | 211.0                                   | 93.8                     |

### 7.4.1 Resultados obtenidos en el Ensayo 1 – Estrategia B

El primer ensayo de la estrategia B comenzó con 500 mL de medio LS conteniendo 3.5 mL/L de PTM1 Trace Salt y 3.5 mL/L de 0.02% de biotina y pH 5. Fueron añadidos 50 mL de preinóculo crecido en medio BMGY durante 24 h con una densidad óptica de 5.0. La densidad óptica del cultivo al momento de inocular fue de 1.0. La Figura 19 ilustra los perfiles de concentración de oxígeno disuelto, glicerol y metanol para el ensayo 1B. Las concentraciones de los sustratos están en el Anexo 2.

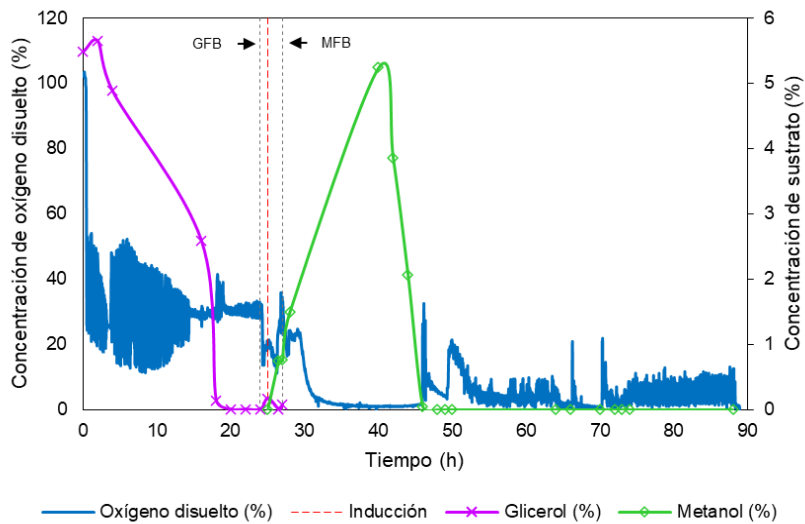


Figura 19. Perfiles de concentración de oxígeno disuelto (%), glicerol (%) y metanol (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E1B). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1400 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. GFB después de 24 horas, Inducción después de 25 horas, MFB después de 27 horas.

Al momento de inocular el biorreactor la concentración de oxígeno disminuyó drásticamente desde 100% hasta valores cercanos a 20%. A partir de este momento la concentración de oxígeno comenzó a fluctuar debido al aumento progresivo de la demanda de oxígeno a causa del crecimiento del celular; también comenzó a disminuir la concentración de glicerol en el cultivo. Sobre las 15 h de fermentación, la demanda de oxígeno estuvo considerablemente alta debido a la generación de biomasa característica de la fase exponencial del crecimiento microbiano. El cultivo llegó al máximo de 113 g/L de biomasa húmeda durante las 20 h que duró la etapa de GB; en

este punto la concentración de glicerol en el medio fue nula (Figura 19). El cultivo estuvo en inanición durante las próximas 4 horas y, debido a la ausencia de sustrato, la velocidad de crecimiento microbiano fue afectada y comenzó a disminuir la concentración celular (Figura 20).

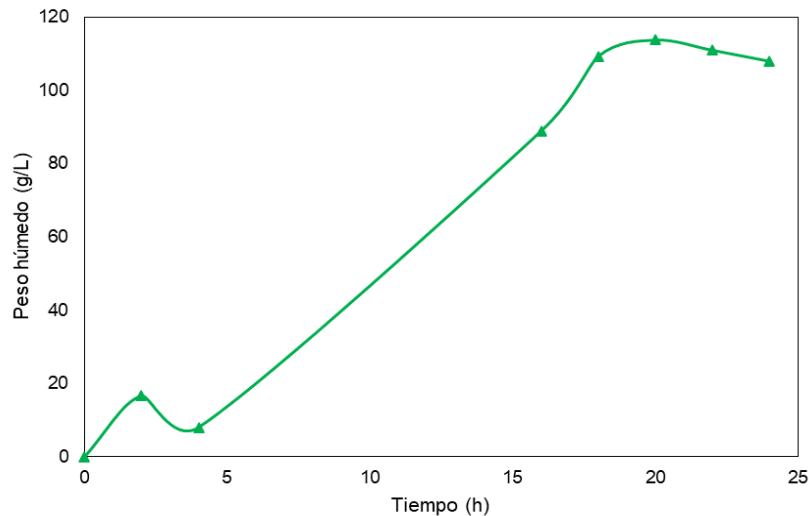


Figura 20. Crecimiento celular (peso húmedo) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado para la etapa de Glicerol-Batch (E1B). Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 1 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. Concentración final de la etapa: 108 g/L de biomasa húmeda.

Transcurridas 24 h de fermentación inició la etapa de Glicerol-Fed-Batch con la alimentación de glicerol 50% (w/v) conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt a 0.15 mL/min. La etapa de GFB provocó una disminución drástica en la concentración de oxígeno disuelto, lo que confirmó el previo estado de inanición del cultivo. Luego de una hora el flujo de glicerol disminuyó a 0.1 mL/min e inició la inducción con metanol a un flujo de 0.06 mL/min. Transcurrida una hora cesó el flujo de metanol e inició el flujo de glicerol a 0.06 mL/min. Pasados 30 min finalizó la alimentación de glicerol. Durante las 3 horas que tomó la etapa de Glicerol-Fed-Batch la demanda de oxígeno llegó a niveles críticos y fue necesario aumentar el flujo de aire a 1.5 L/min.

A las 27 h de fermentación inició la fase de Metanol-Fed-Batch con la alimentación de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt a un flujo de 0.08 mL/min provocando un aumento considerable en el consumo de oxígeno disuelto por lo que



fue necesario aumentar el límite máximo de agitación a 1200 rpm. Durante 13.5 h la concentración de oxígeno disuelto disminuyó hasta alcanzar valores cercanos a cero.

La Figura 21 muestra el crecimiento celular para las etapas GFB e inicios de MFB. A las 25 h ocurrió el fenómeno diaúxico producto al agotamiento del glicerol y la nueva alimentación de éste.

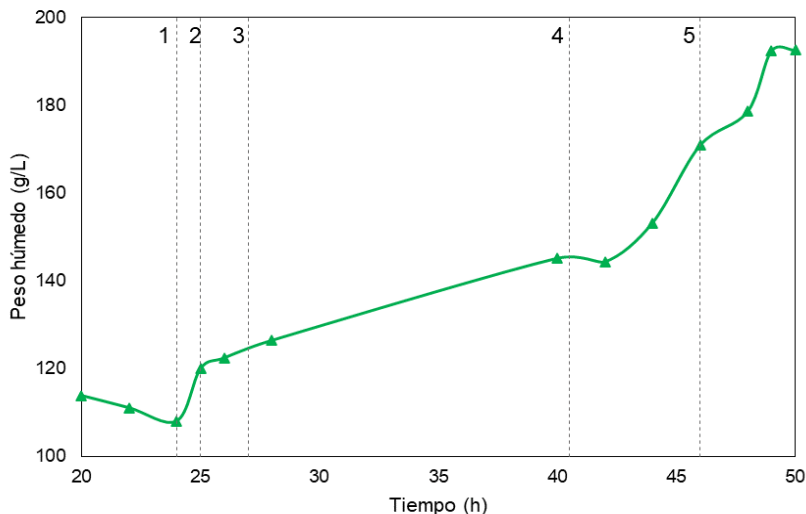


Figura 21. Crecimiento celular (peso húmedo) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E1B). Línea 1 (24 h): etapa Glicerol-Fed-Batch (108 g/L de biomasa húmeda), línea 2 (25 h): Inducción 0.06 mL/min de metanol por 1 h (120 g/L de biomasa húmeda), línea 3 (27 h): etapa Metanol-Fed-Batch 0.08 mL/min de metanol (126 g/L de biomasa húmeda), línea 4 (40.5 h): interrupción de flujo de metanol (145 g/L de biomasa húmeda), línea 5 (46 h): reactivación de flujo de metanol 0.06 mL/min (171 g/L de biomasa húmeda). Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1200 rpm, flujo de aire de 1 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C.

A partir de dicho punto existe una tendencia al aumento de la biomasa llegando a 145 g/L de biomasa húmeda luego de 13.5 h de inducción. La concentración de metanol en el medio aumentó considerablemente hasta llegar a 5.24%, lo que demuestra que el flujo de 0.08 mL/min, al menos a inicios de la etapa de inducción, es perjudicial para el cultivo. Esta alta concentración de metanol provocó efectos inhibitorios en el crecimiento celular situación que ha sido reportada para concentraciones superiores de 3.7 g/L de metanol en el medio (Potvin et al., 2012).

La alta demanda de oxígeno durante las 40 h de fermentación señala que podrían existir concentraciones tóxicas e inhibitorias de metanol (Potvin et al., 2012), lo cual fue posible confirmar más tarde mediante HPLC. En este punto la concentración de metanol en el medio era de 5.3%. La alimentación de metanol finalizó a las 40.5 h de fermentación y la aireación aumentó a 2 L/min con el fin de cumplir la demanda de oxígeno, pero no fue suficiente. Resultados posteriores mostraron que, a partir de este punto, la concentración de metanol comenzó a disminuir drásticamente hasta llegar a cero a las 48 h de fermentación.

Llegadas las 48 h ocurrió un pico en la concentración de oxígeno disuelto y a las 49 h disminuyó la velocidad de crecimiento. Ambas son señales de agotamiento de sustrato por lo que reinició la alimentación de metanol a 0.06 mL/min.

Al momento de reactivar la alimentación de metanol los requerimientos de oxígeno volvieron a ser extremadamente altos por lo que la aireación estuvo en 2 L/min y el límite superior de agitación en 1400 rpm. Sin embargo, fueron insuficientes para mantener los requisitos del proceso.

La Figura 22 ilustra el perfil de crecimiento para el resto de la etapa de inducción que tuvo una duración de 63 h. Durante las próximas 16 h la concentración de oxígeno disuelto estuvo muy baja a pesar de los ajustes en el sistema, pero con mucha fluctuación. Sin embargo, continuó el crecimiento celular, esta vez con mayor velocidad llegando a un máximo de 264 g/L de biomasa húmeda.

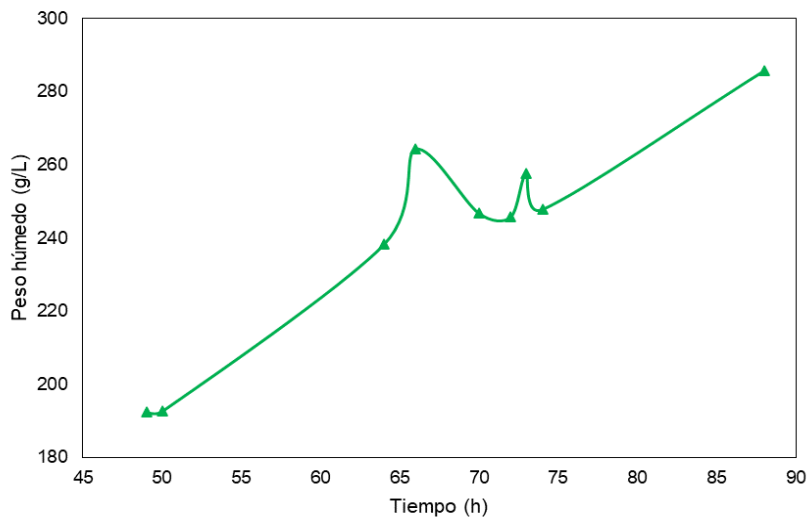


Figura 22. Crecimiento celular (peso húmedo) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado para el final de la etapa de Metanol-Fed-Batch (E1B). Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1400 rpm, flujo de aire de 1 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. Concentración final: 285.7 g/L de biomasa húmeda.

La concentración de metanol durante el resto del proceso fue nula por lo que la alimentación de 0.06 mL/min resultó ser insuficiente para el cultivo. A las 66 y 70 h de inducción cesó la alimentación de metanol por algunos segundos y ocurrió rápidamente un aumento del oxígeno disuelto. Esto permitió detectar que el cultivo estaba bajo condiciones limitantes de metanol y que el comportamiento errático del perfil de concentración del oxígeno disuelto podría corresponder a eso (Invitrogen, 2002).

La espuma comenzó a ser un problema a causa de la alta agitación y la aireación, provocando la adición de aproximadamente 10 mL de una solución con 5 % de antiespumante por lo que la agitación aumentó a 1200 rpm.

En la Figura 23 aparecen representados los perfiles de crecimiento celular para todo el proceso, estos obtenidos mediante las mediciones de la densidad óptica del cultivo, peso húmedo y peso seco de la biomasa. A pesar de posibles errores de medición e imprecisiones en las mismas, los tres perfiles presentan tendencias similares.

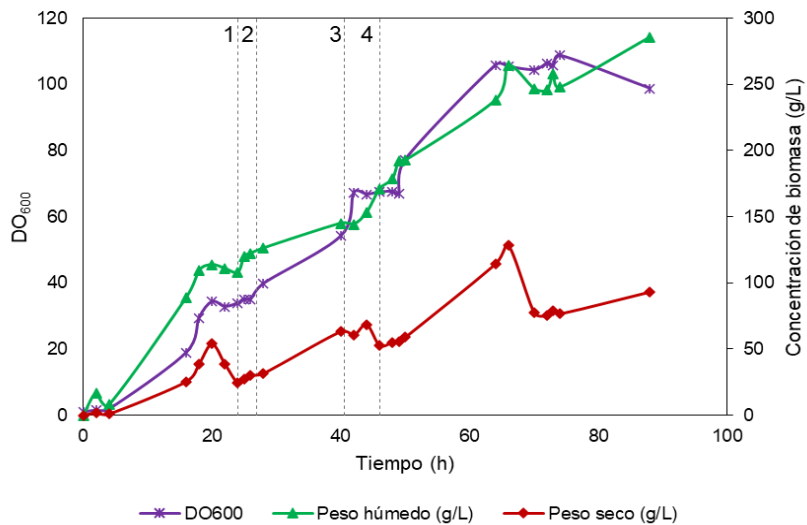


Figura 23. Crecimiento celular en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E1B). Línea 1 (24 h): etapa Glicerol-Fed-Batch, línea 2 (27 h): etapa Metanol-Fed-Batch 0.08 mL/min de metanol, línea 3 (40.5 h): interrupción de flujo de metanol, línea 4 (46 h): reactivación de flujo de metanol 0.06 mL/min. Condiciones establecidas: agitación variable 500 – 1400 rpm, flujo de aire 0.5 – 2 L/min, pH 5, Temp 30 °C.

El resto de las variables operacionales están detalladas en el Anexo 8.

#### 7.4.2 Resultados obtenidos en el Ensayo 2 – Estrategia B

El segundo ensayo de la estrategia B comenzó con 500 mL de medio LS conteniendo 3.5 mL/L de PTM1 Trace Salt y 3.5 mL/L de 0.02% biotina, pH 5. El preinóculo añadido alcanzó una densidad óptica de 4.8 luego de crecer durante 28 h en medio BMGY para una densidad óptica inicial en el biorreactor de 1. La adición de preinóculo provocó una caída radical de la concentración de oxígeno disuelto hasta alcanzar valores cercanos a 30%. En la Figura 24 aparecen los perfiles de concentración de oxígeno disuelto y de los sustratos glicerol y metanol. Las concentraciones de los sustratos están en el Anexo 3.

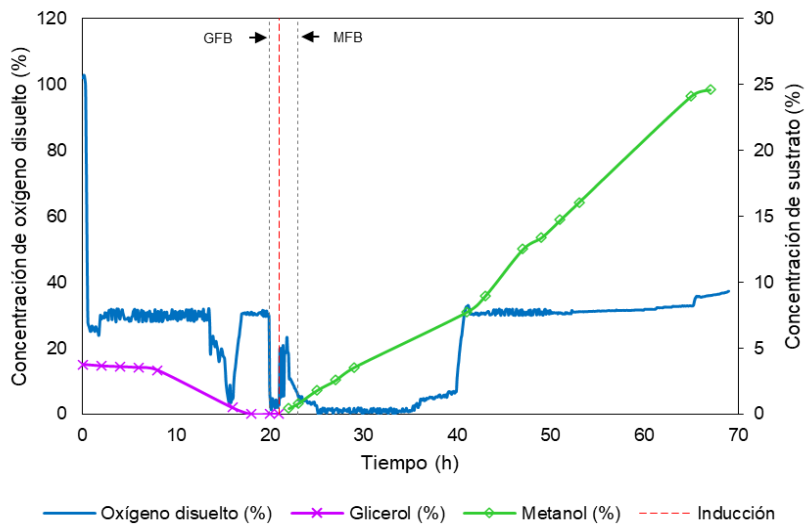


Figura 24. Perfiles de concentración de oxígeno disuelto (%), glicerol (%) y metanol (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E2B). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. GFB después de 20 horas, Inducción después de 21 horas, MFB después de 23 horas.

Durante las primeras horas de fermentación aumentó la demanda de oxígeno debido a la generación de biomasa. Durante 6 h transcurrió la fase de adaptación del cultivo con muy poco crecimiento. Alcanzadas las 8 h inició la fase de aceleración en el crecimiento y para las 16 h de fermentación el cultivo llegó a la etapa exponencial de crecimiento (Figura 25).

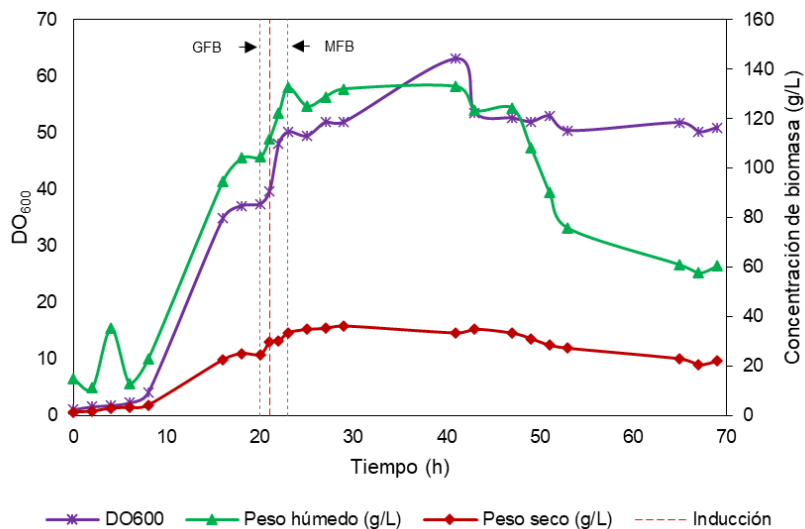


Figura 25. Crecimiento celular en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E2B). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. GFB después de 20 horas, Inducción después de 21 horas, MFB después de 23 horas.

A las 16 h de fermentación, existía solo 0.5% de concentración de glicerol en el medio y llegadas las 18 h el cultivo entró en la fase de desaceleración. A las 20 h de fermentación, la concentración de glicerol en el medio fue indetectable y el crecimiento celular entró en la fase estacionaria. En este punto la concentración de biomasa alcanzó 104 g/L de biomasa húmeda.

La etapa de Glicerol-Fed-Batch inició con la alimentación de 0.15 mL/L de una solución de 50% de glicerol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt durante una hora. En este punto hubo una caída drástica en la concentración de oxígeno disuelto. A continuación, el flujo de glicerol disminuyó a 0.10 mL/min durante una hora y comenzó la adición de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt a un flujo de 0.06 mL/min durante 50 min como paso de adaptación al nuevo sustrato. Posteriormente, el flujo de glicerol disminuyó a 0.06 mL/min, manteniéndole durante 50 min. Al finalizar la etapa de GFB la concentración celular fue de 133 g/L de biomasa húmeda e inició la etapa de Metanol-Fed-Batch con la adición de metanol a 0.10 mL/min.

A las 20 h de fermentación ocurrió el fenómeno diaúxico debido al cambio de sustrato. Sin embargo, el crecimiento celular a partir de este momento disminuyó. Un alto consumo de oxígeno por parte del cultivo caracterizó las siguientes horas de fermentación y a pesar de mantener la agitación en 1000 rpm y la aireación en 2 L/min no fue posible mantener la concentración de oxígeno disuelto en el medio por encima de 20% como está reportado (Invitrogen, 2002). El alto flujo de metanol y las bajas concentraciones de oxígeno conllevaron a una muerte celular prematura y a partir de las 20 h de inducción comenzó a disminuir la concentración de biomasa.

Esa situación también sucede en el perfil de oxígeno disuelto mostrado en la Figura 24. A partir de las 40 h de fermentación ocurrió un fuerte aumento en la concentración de oxígeno disuelto y partir de entonces los requerimientos para el control fueron disminuyendo hasta no necesitar aire y mantener la agitación en 500 rpm. En este punto la concentración de metanol fue de 7.74%, valor extremadamente tóxico para el cultivo. Las siguientes horas no dejaron de ser críticas y la acumulación de metanol continuó casi de manera lineal hasta llegar a un valor de 24.6%.

#### **7.4.3 Resultados obtenidos en el Ensayo 3 – Estrategia B**

El tercer ensayo estudió el comportamiento de una clona de referencia que expresa la proteína Dibloque. La estrategia implementada fue la B y el volumen inicial de 500 mL de medio LS conteniendo 3.5 mL/L de PTM1 Trace Salt y 3.5 mL/L de 0.02% biotina, pH 5.

El biorreactor fue inoculado con 50 mL de preinóculo con una densidad óptica de 7.0, alcanzada a las 24 h. El medio estaba completamente saturado de oxígeno a 500 rpm y 0.5 L/min de aireación. Con la adición del preinóculo la concentración de oxígeno disuelto disminuyó bruscamente, momento a partir del cual inició el lazo de control para 30% de concentración de oxígeno disuelto.

La Figura 26 muestra los perfiles de concentración de oxígeno disuelto y de los sustratos (glicerol y metanol) para este ensayo. Durante etapa de Glicerol-Batch, la

concentración de oxígeno disuelto estuvo controlada alrededor de 30 % con poca fluctuación. Las concentraciones de los sustratos están en el Anexo 4.

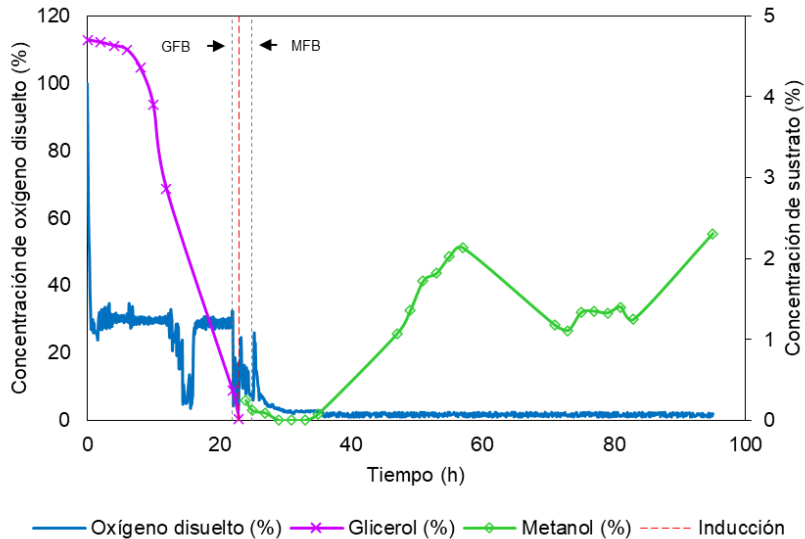


Figura 26. Perfiles de concentración de oxígeno disuelto (%), glicerol (%) y metanol (%) en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E3B). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. GFB después de 22 horas, Inducción después de 23 horas, MFB después de 25 horas.

A las 22 h de fermentación, la concentración de glicerol en el medio fue de 0.37 %, muy cercana a cero. En este punto inició la etapa de Glicerol-Fed-Batch con la adición de 0.15 mL/L de una solución de 50% de glicerol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt durante una hora provocando la disminución súbita en la concentración de oxígeno disuelto y un aumento en los requerimientos de proceso.

Transcurrida 1 hora, el flujo de glicerol disminuyó a 0.10 mL/min y continuó por 1 hora. Fueron añadidos 2.1 mL de metanol conteniendo 12 mL/L de PTM1 Trace Salt para una concentración en el cultivo de 0.42% como parte de la estrategia de adaptación al metanol del cultivo. Finalmente, el flujo de glicerol disminuyó a 0.06 mL/min durante 50 min para así culminar con esta etapa. A las 25 h de fermentación inició la alimentación de metanol a un flujo mínimo de 0.06 mL/min, el cual continuó por 4 h. Bajo este flujo no ocurrió acumulación de metanol en el medio y la concentración de



este permaneció entre 0 y 0.09%. El consumo de oxígeno aumentó con el inicio de la etapa de Metanol-Fed-Batch siendo necesario el aumento de la aireación a 1.5 L/min.

A las 29 h de fermentación aumentó el flujo de metanol a 0.07 mL/min y continuó durante 18 h. Durante este tiempo sucedió una ligera acumulación de metanol llegando a 1.07% de concentración en el medio. A las 47 h de fermentación aumentó el flujo de metanol a 0.08 mL/min y la concentración de metanol en el medio aumentó a 2.13%, valor muy cercano a concentraciones citotóxicas para el cultivo.

Una vez más el sistema mostró incapacidad de suplir las necesidades de aeración del cultivo manteniendo durante toda la etapa de inducción valores inferiores a 10% de concentración de oxígeno y en muchos casos cercanos a 0%. Las altas velocidades de agitación y el alto flujo de aire provocaron un aumento en la cantidad de espuma y fue necesario añadir en repetidas ocasiones altos volúmenes de antiespumante. Debido a esto, 80 mL de cultivo fueron extraídos a las 57 h de fermentación y la alimentación de metanol disminuyó a 0.06 mL/min durante 14 h.

Con el ajuste del flujo de metanol, la acumulación del sustrato comenzó a disminuir hasta llegar a 1.17%. Llegadas las 71 h de fermentación aumentó el flujo de metanol a 0.07 mL/min por 10 h. Durante este tiempo la concentración de metanol en el medio fue casi constante en valores entre 1.34 y 1.4%. Fue necesaria una segunda extracción de 150 mL de cultivo a las 74 h de fermentación debido al aumento de la espuma. A las 83 h de fermentación el flujo de metanol a 0.08 mL/min aumentó durante 12 h y nuevamente ocurrió la acumulación de metanol en el medio llegando a 2.31% para el final del proceso a las 95 h de fermentación. Es importante destacar que debido a la gran cantidad de espuma que exhibió el cultivo, fue necesario añadir 400 mL de antiespumante 5% durante todo el proceso lo que, como fue visto anteriormente, es perjudicial para el cultivo.

El comportamiento del crecimiento de la biomasa en este ensayo fue muy similar a la anteriores. Los perfiles obtenidos aparecen en la Figura 27.

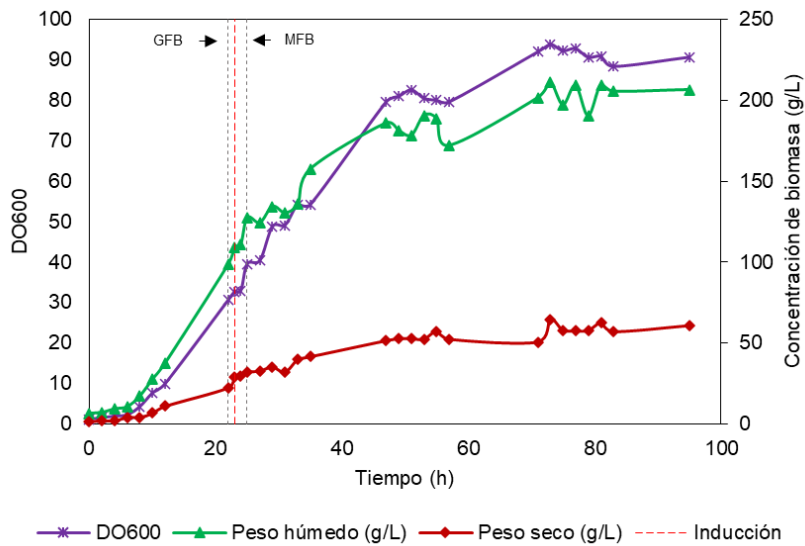


Figura 27. Crecimiento celular en función del tiempo de fermentación del cultivo de *P. pastoris* en LS en un biorreactor de tanque agitado (E3B). GFB: Glicerol-Fed-Batch, MFB: Metanol-Fed-Batch. Condiciones establecidas: agitación variable de 500 a 1000 rpm, flujo de aire de 0.5 a 2 L/min, pH 5, Temperatura de 30 °C. GFB después de 22 horas, Inducción después de 23 horas, MFB después de 25 horas.

Existe una tendencia muy estable al crecimiento durante las primeras 26 h de inducción donde la mayor parte del tiempo la alimentación de metanol estuvo en 0.07 mL/min y las concentraciones fueron inferiores a 1%. Al aumentar el flujo a 0.08 mL/min de alimentación y comenzar la acumulación de éste en el medio, el crecimiento quedó estancado por varias horas probablemente por los efectos inhibitorios provocados por el aumento de la concentración de metanol en el medio.

Al disminuir la alimentación de metanol nuevamente a 0.06 mL/min hubo nuevamente un aumento en la generación de biomasa, pero con una menor velocidad de generación lo que muestra que el flujo de 0.07 mL/min fue favorecedor en el rendimiento del proceso.

A las 71 h de fermentación volvió a disminuir la generación de biomasa con la alimentación de metanol a 0.07 mL/min. Sin embargo, durante este tiempo la concentración de metanol fue superior a 1%.

## 7.5 Detección de la proteína expresada en el biorreactor.

### 7.5.1 Ensayo 1A

La Figura 28 muestra los resultados de las electroforesis y el Dot Blot desarrollados para detectar la expresión de la proteína en el primer ensayo.

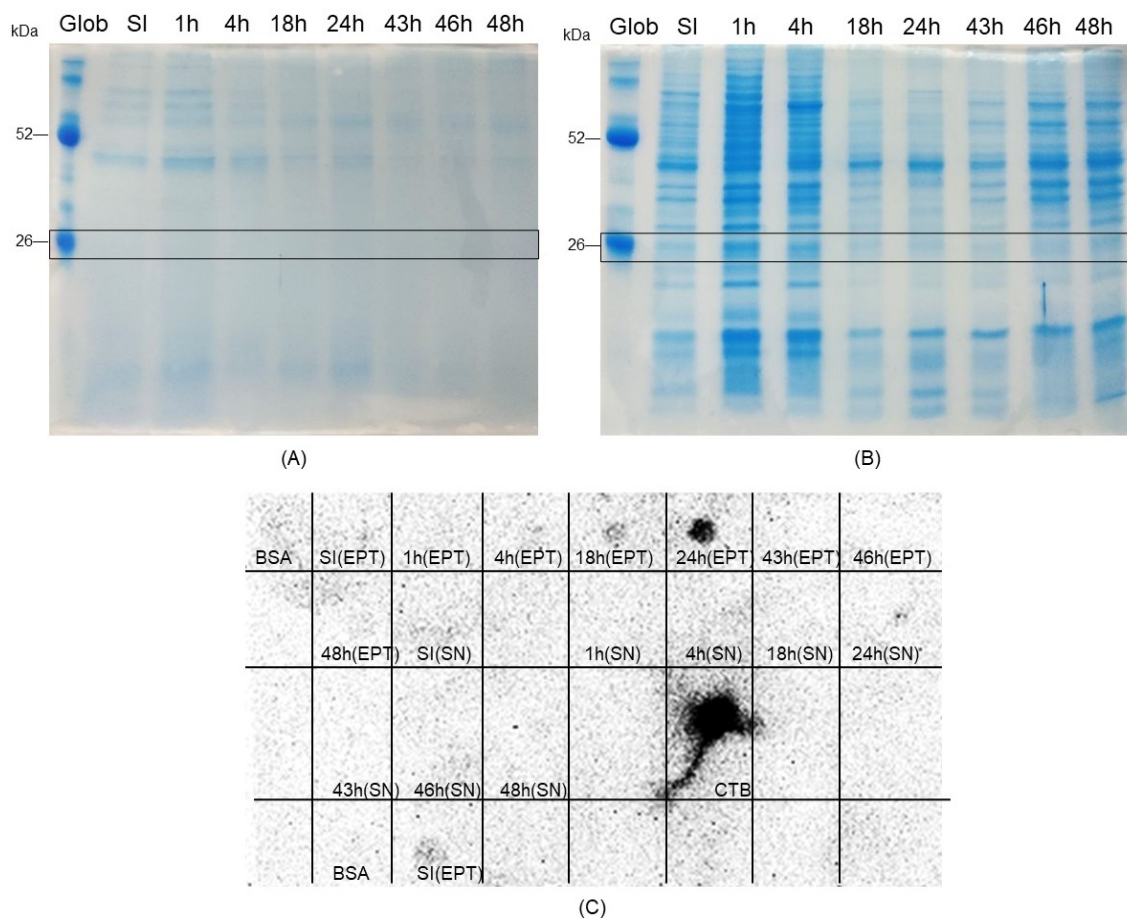


Figura 28. Análisis de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E1A). (A) SDS-PAGE de sobrenadante; (B) SDS-PAGE de extracto de proteína total; (C) Dot Blot. Glob: globulina usada como marcador de peso molecular, SN: Sobrenadante, EPT: extracto de proteína total, SI: muestra sin inducir, 1h, 4h, 18h, 24h, 43h, 46h, 48h: muestras obtenidas a 1, 4, 18, 24, 43, 46, 48 h de inducción respectivamente, BSA: seroalbúmina bovina como control negativo, CTB: subunidad B de la toxina del cólera como control positivo. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

Para el caso del sobrenadante, Figura 28A, no aparecen bandas a la altura de los 26 kDa y no existen señales positivas en ningunas de las muestras en el Dot Blot. En el

caso del extracto de proteína total, Figura 28B, hay presencia de una banda a la altura de los 26 kDa en la muestra sin inducir y más intensa en las muestras de 1 h y 4 h de inducción. En el resto de las muestras esta banda aparece con menor intensidad. El Dot Blot, Figura 28C, muestra señales positivas para las muestras de 18 y 24 h de inducción siendo esta última de mayor intensidad.

Es probable que exista expresión de la proteína, pero a bajas concentraciones y que la banda a la altura de los 26 kDa en el gel del extracto de proteína celular pertenezca a otras proteínas provenientes de la lisis celular. A pesar de obtener la señal más intensa para las 24 h de inducción en el extracto de proteína total, la banda correspondiente en la electroforesis es mucho menos intensa que en otras muestras.

### 7.5.2 Ensayo 2A

La Figura 29 muestra los resultados de las electroforesis de las muestras de sobrenadante y extracto de proteína total.

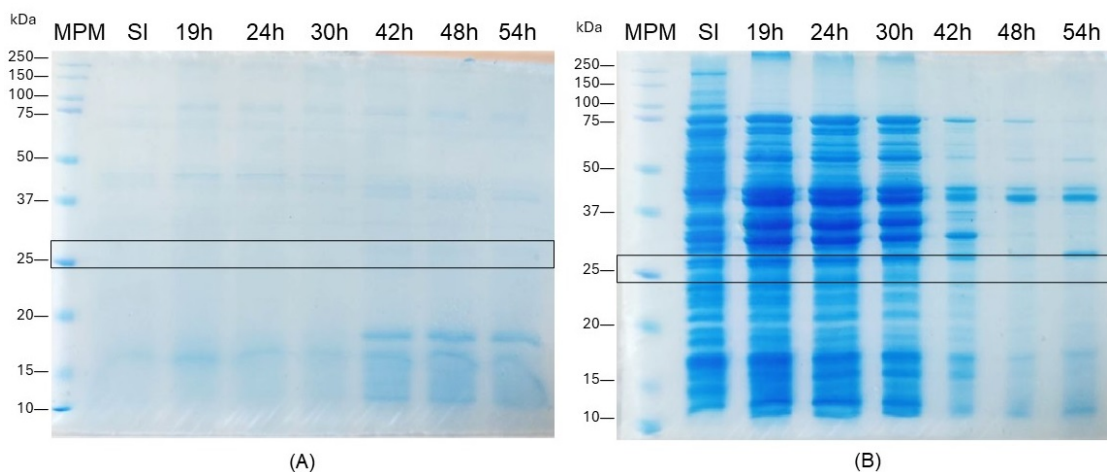


Figura 29. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E2A). (A) sobrenadante; (B) extracto de proteína total. MPM: marcador de peso molecular, SI: muestra sin inducir, 19h, 24h, 30h, 42h, 48h, 54h: muestras obtenidas a 19, 24, 30, 42, 48, 54 h de inducción respectivamente. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

Existen bandas sutiles cercanas a los 26 kDa, principalmente en las muestras de sobrenadante de 42, 48 y 54 h de inducción. En la Figura 29B hay bandas intensas a la altura de los 26 kDa para todas las muestras incluyendo la muestra sin inducir.

En la Figura 30 aparecen los resultados del Dot Blot y Western Blot desarrollados con el fin de confirmar la expresión de la proteína durante la etapa de inducción.

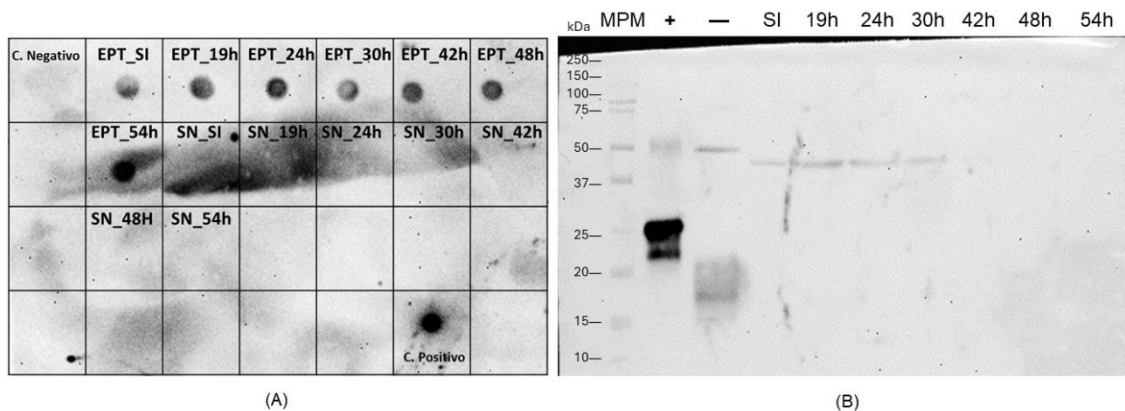


Figura 30. Análisis de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E2A). (A) Dot Blot; (B) Western Blot para las muestras de extracto de proteína total. SN: Sobrenadante, EPT: extracto de proteína total, MPM: marcador de peso molecular, SI: muestra sin inducir, 19h, 24h, 30h, 42h, 48h, 54h: muestras obtenidas a 19, 24, 30, 42, 48, 54 h de inducción respectivamente. (+): control positivo LTB-p50 91 µg/mL, (-): control negativo sobrenadante *wild-type* 96 h de inducción. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

Todas las muestras del extracto de proteína total resultaron positivas al Dot Blot. En cambio, ninguna de las muestras de sobrenadante mostró señal en este ensayo (Figura 30A). La intensidad de estas señales en las muestras sin inducir y de 19, 24, 30, 42 y 48 h de inducción son muy similares. En cambio, la muestra de 54 h de inducción tiene una señal más fuerte que las anteriores.

El Western Blot de la Figura 30B presenta solo las muestras de extracto de proteína total. Aparecen algunas bandas muy ligeras cercanas a los 37 kDa en la muestra sin inducir y en las muestras de 19, 24 y 30 h de inducción que no corresponden con la proteína de interés. Por otro lado, la muestra de 54 h de inducción no mostró ser positiva al ensayo a pesar de haber obtenido la señal más fuerte el Dot Blot. Es posible

que sí haya ocurrido la expresión de la proteína de forma intracelular, pero a concentraciones muy bajas.

### 7.5.3 Ensayo 3A

La Figura 31 muestra los resultados de las electroforesis realizadas para detectar la expresión de la proteína de manera secretada e intracelular.

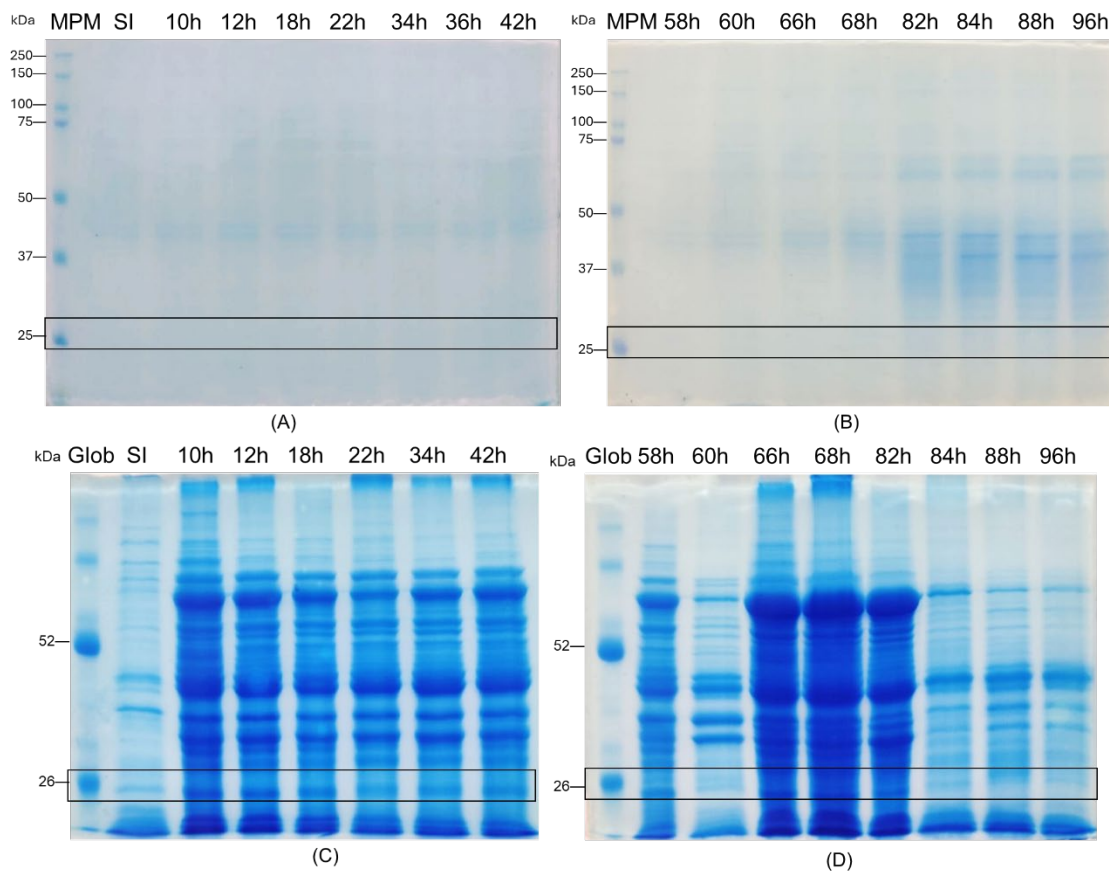


Figura 31. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E3A). (A) y (B) sobrenadante; (C) y (D) extracto de proteína total. MPM: marcador de peso molecular, Glob: globulina, SI: muestra sin inducir, 10h, 12h, 18h, 22h, 34h, 36h, 42h, 58h, 60h, 66h, 82h, 84h, 88h, 96h muestras obtenidas a 10, 12, 18, 22, 34, 36, 42, 58, 60, 66, 82, 84, 88, 96 h de inducción. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

En la Figura 31A y en la Figura 31B, que presentan las electroforesis de las muestras de sobrenadante, aparecen bandas ligeras entre los 37 y 100 kDa, principalmente en

las muestras de las últimas 14 h de fermentación. Sin embargo, a la altura de los 26 kDa no es posible detectar bandas en ninguna de las etapas de inducción.

Por otro lado, en la Figura 31C hay bandas visibles cercanas a los 26 kDa en todas las muestras de extracto de proteína total incluyendo la muestra sin inducir. Resultados similares fueron obtenidos en el segundo ensayo de la estrategia A. En Figura 31D aparecen estas bandas, pero con menos intensidad.

El resultado del Dot Blot presentado en la Figura 32A reveló señales positivas muy intensas en las muestras de sobrenadante de 82, 84, 88 y 96 h de inducción con un ligero aumento en la intensidad. También mostró señal para las muestras del extracto de proteína total de las 84, 88 y 96 h de inducción, pero más sutiles que las de sobrenadante.

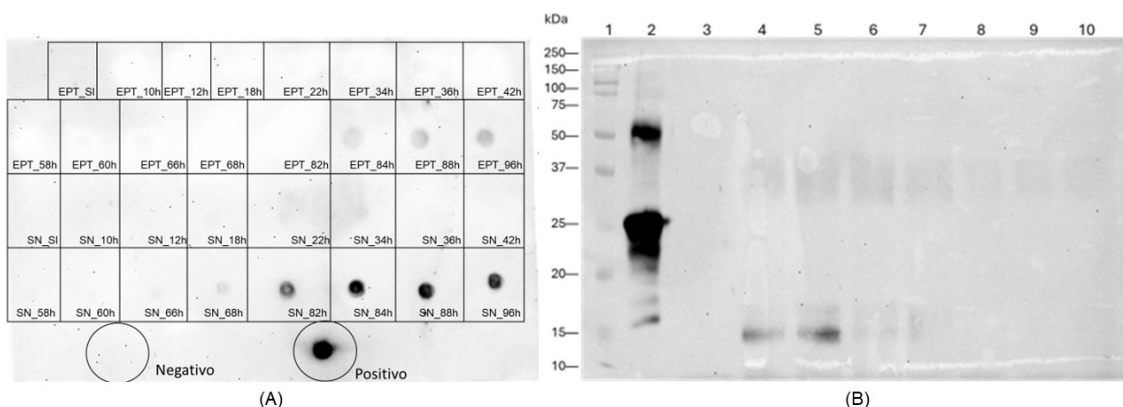


Figura 32. Análisis de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E3A). (A) Dot Blot. EPT: Extracto de proteína total; SN: Sobrenadante, SI: Sin inducir. (B) Western Blot. Líneas: 1- marcador de peso molecular, 2: Positivo, 3: Negativo, 4: SN\_82h, 5: SN\_84h 6: SN\_88h, 7: SN\_96h, 8: EPT\_84h, 9: EPT\_88h, 10: EPT\_96h. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

Las muestras positivas en el ensayo Dot Blot fueron evaluadas mediante Western Blot y los resultados aparecen en la Figura 32B. Solo aparecen dos bandas positivas alrededor de los 15 kDa para las muestras de 82 y 84 h de inducción. Estas señales podrían corresponder a la acción de las proteasas y podrían pertenecer a la porción

inmunogénica de la proteína, el fragmento LTB, cuyo peso molecular es de 11.6 kDa (Moravec et al., 2007)

### 7.5.4 Ensayo 1B

La implementación de las nuevas condiciones de expresión no condujo a mejores resultados en la expresión de la proteína. Los resultados de la electroforesis y el Dot Blot para el ensayo 1B están presentados en la Figura 33.

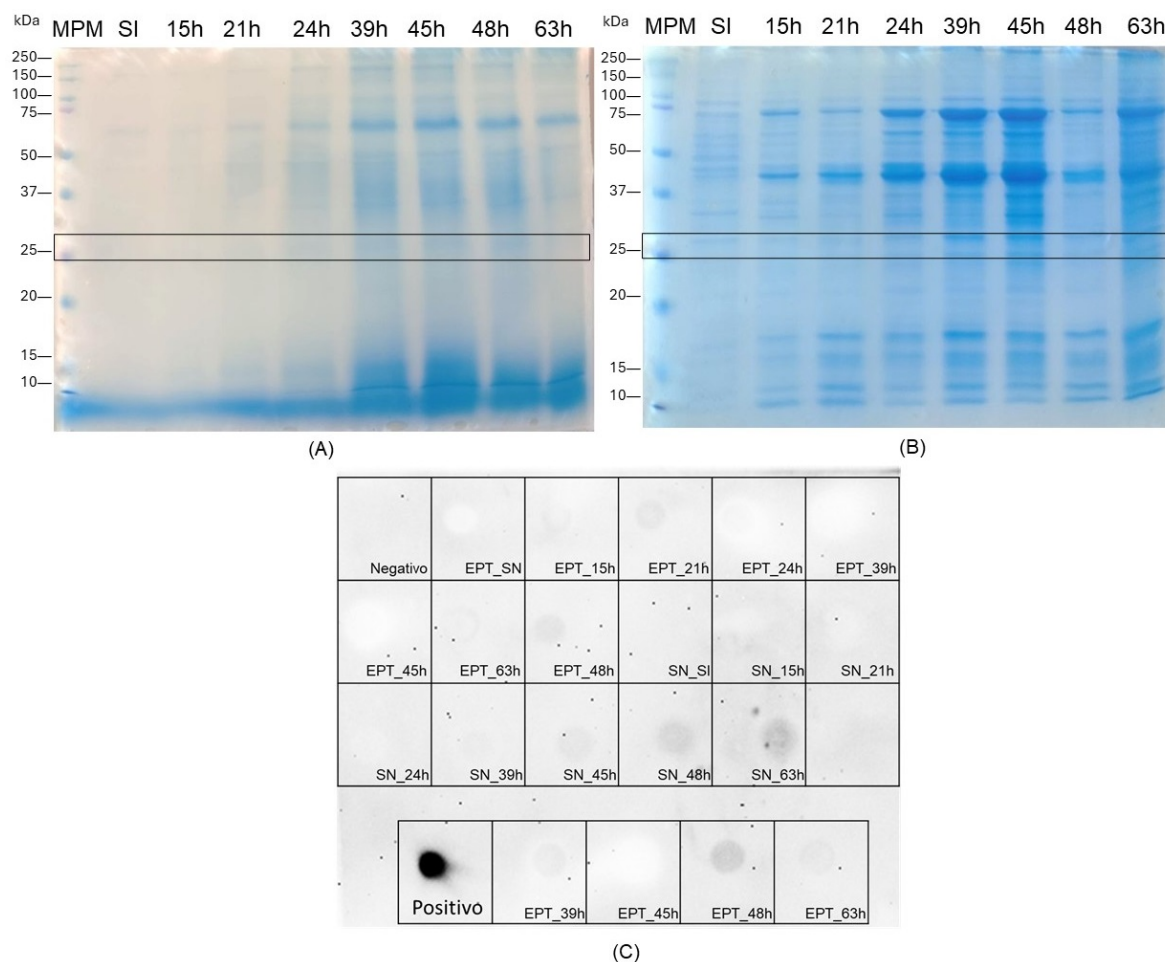


Figura 33. Análisis de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio LS en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E1B). (A) SDS-PAGE sobrenadante; (B) SDS-PAGE extracto de proteína total; (C) Dot Blot. MPM: marcador de peso molecular, SN: Sobrenadante, EPT: extracto de proteína total, SI: muestra sin inducir, 15h, 21h, 24h, 39h, 45h, 48h, 63h: muestras obtenidas a 15, 21, 24, 39, 45, 48, 63 h de inducción respectivamente, control negativo buffer de lisis, control positivo CTB. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.



Los resultados de la electroforesis presentados en la Figura 33A y Figura 33B muestran bandas a la altura de los 26 kDa tanto para el sobrenadante como para el extracto de proteína total. En el caso del sobrenadante estas bandas son más visibles a partir de las 39 h de inducción. En la Figura 33B la banda que posiblemente pertenezca a la proteína debido a su peso molecular también está presente en la muestra sin inducir.

El Dot Blot en la Figura 33C ayuda a esclarecer los resultados de las electroforesis. La muestra de las 48 h de inducción del extracto de proteína total y las de 48 y 63 h de inducción del sobrenadante fueron las únicas positivas al Dot Blot con señales tenues. Esto puede indicar que, al menos en el gel del extracto de proteína total, estas bandas no pertenecen a la proteína. Además, la expresión de esta resultó ser escasa.

#### **7.5.5 Ensayo 2B**

La Figura 34 presenta los resultados de las electroforesis de las muestras de sobrenadante y extracto de proteína total tomadas durante el segundo ensayo implementando la estrategia B, de igual manera, presenta los resultados del Dot Blot.

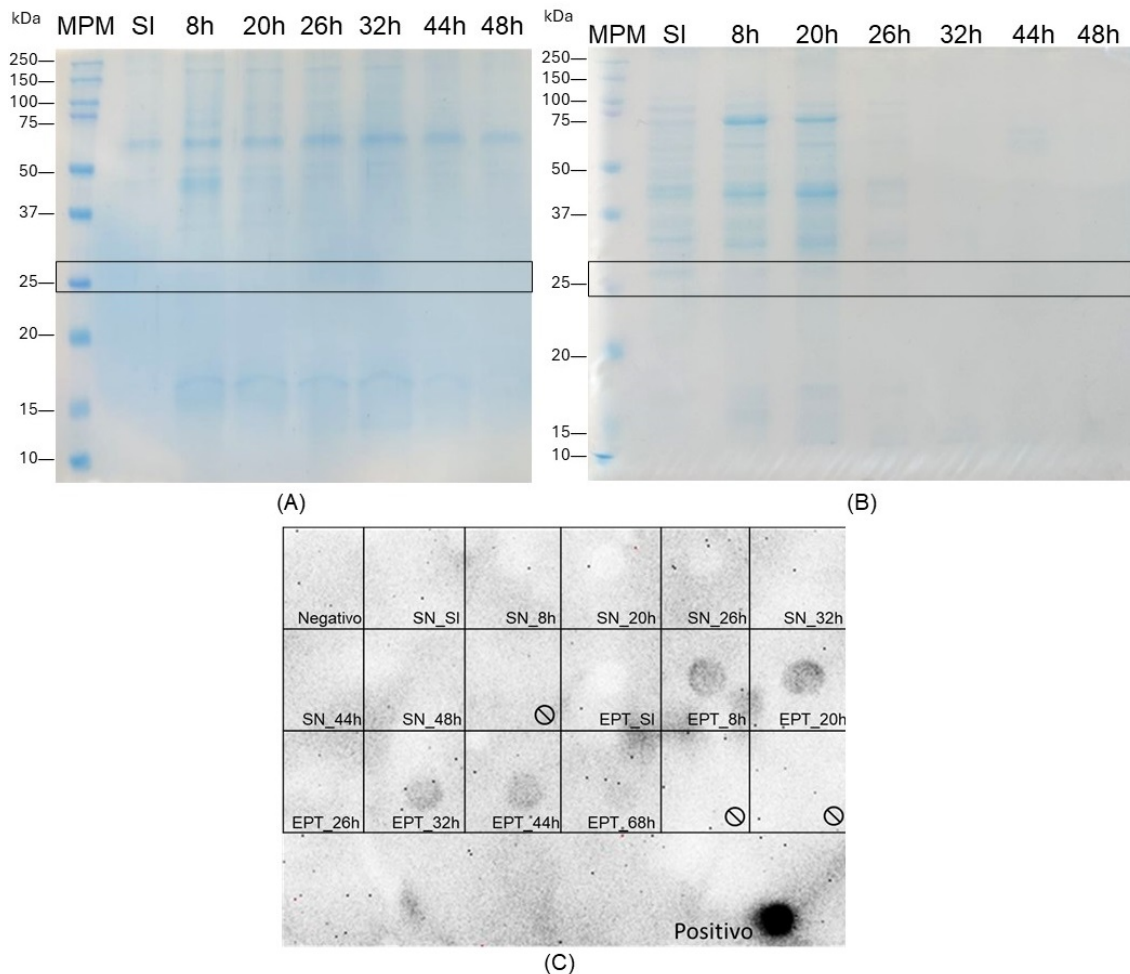


Figura 34. Análisis de la expresión de la proteína recombinante LTB-p50 en medio LS en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E2B). (A) SDS-PAGE sobrenadante; (B) SDS-PAGE extracto de proteína total; (C) Dot Blot. MPM: marcador de peso molecular, SN: Sobrenadante, EPT: extracto de proteína total, SI: muestra sin inducir, 8h, 20h, 26h, 32h, 44h, 48h: muestras obtenidas a 8, 20, 26, 32, 44, 48 h de inducción respectivamente, control negativo buffer de lisis, control positivo CTB. El peso molecular teórico de la proteína LTB-p50 es de 25.4 kDa.

En la Figura 34A las muestras de sobrenadante no exhiben ninguna banda cercana a los 26 kDa y los resultados de estas muestras en el Dot Blot, Figura 34C, fueron negativos por lo que la expresión de la proteína de manera extracelular fue muy baja o nula para este caso.

Solo las muestras de extracto de proteína total sin inducir, 8 y 20 horas de inducción, Figura 34B, exhibieron bandas de interés muy ligeras y pierden intensidad con el

aumento del tiempo de inducción. El Dot Blot mostró resultados positivos para prácticamente todas las muestras de extracto de proteína total. Sin embargo, una vez más estas señales son delicadas, signo de baja expresión de la proteína.

### 7.5.6 Detección de la proteína Dibloque (Ensayo 3B)

Los resultados de la expresión de la proteína Dibloque cuyo peso molecular es de 38.4 kDa aparecen en la Figura 35.

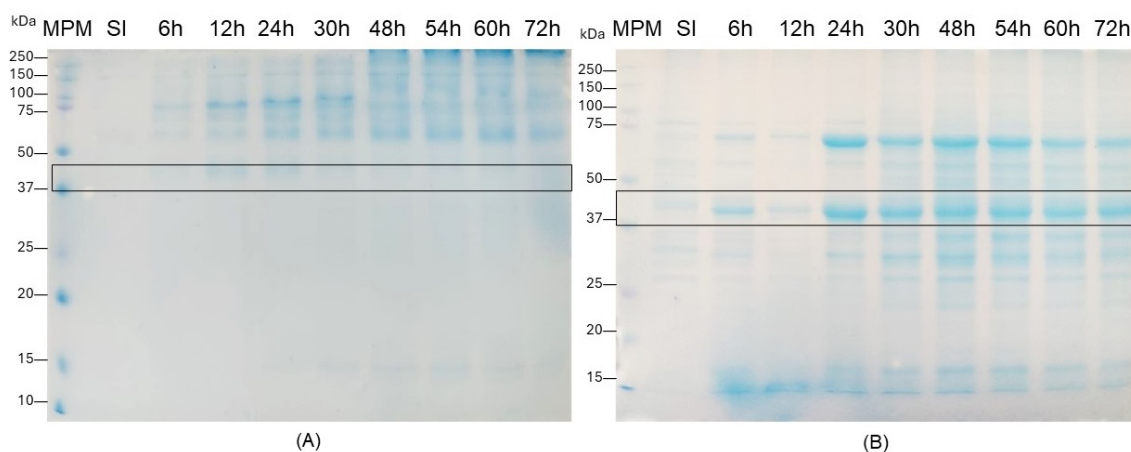


Figura 35. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de la proteína recombinante Dibloque en medio BMGY en un biorreactor de tanque agitado en lote a diferentes tiempos de inducción (E3B). (A) sobrenadante; (B) extracto de proteína total. MPM: marcador de peso molecular, SI: muestra sin inducir, 6h, 12h, 24h, 30h, 48h, 54h, 60h, 72h muestras obtenidas a 6, 12, 24, 30, 48, 54, 60 y 72 h de inducción.

La expresión de la proteína Dibloque mediante la estrategia B resultó ser muy provechosa para comparar los resultados obtenidos con la cepa en estudio. La expresión extracelular de dicha proteína fue positiva a partir de las 6 h de expresión aumentando la intensidad de la banda hasta las 24 h de inducción. Para el caso del extracto de proteína total existen bandas intensas cercanas a los 37 kDa que pueden ser candidatas para pertenecer a la proteína en cuestión, además dicha banda no aparece en la muestra sin inducir por lo que refuerza dicha suposición.

### 7.6 Cinética Microbiana

Los datos de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato durante la etapa de Glicerol-Batch fueron colectados para el tercer ensayo de la estrategia A y los tres

ensayos de la estrategia B con el fin de realizar el ajuste del modelo de Monod a estos datos.

Para el ajuste de los parámetros de las ecuaciones 3, 4 y 5 ( $K_S$ ,  $Y_{XS}$  y  $\mu_{max}$ ) fue empleado el complemento Solver de Microsoft Excel minimizando la Ecuación 6. Los resultados de los parámetros ajustados y el modelo están en la Tabla 9 y Figura 36.

$$error = \sum (t_{calc} - t_{real})^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

Tabla 9. Valores de los parámetros estimados del modelo de crecimiento microbiano

| Parámetro | $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> ) | $Y_{X/S}$ (g/g)* | $K_S$ (g/L) | R2 (Sustrato) | R2 (Biomasa) |
|-----------|--------------------------------|------------------|-------------|---------------|--------------|
| Ensayo 3A | 0.59                           | 0.49             | 3.85        | 0.97          | 0.93         |
| Ensayo 1B | 0.34                           | 0.89             | 13.63       | 0.92          | 0.88         |
| Ensayo 2B | 0.18                           | 0.66             | 1.88        | 0.99          | 0.98         |
| Ensayo 3B | 0.17                           | 0.56             | 3.92        | 0.98          | 0.97         |

\* El rendimiento está expresado en gramos de biomasa seca por gramo de glicerol.

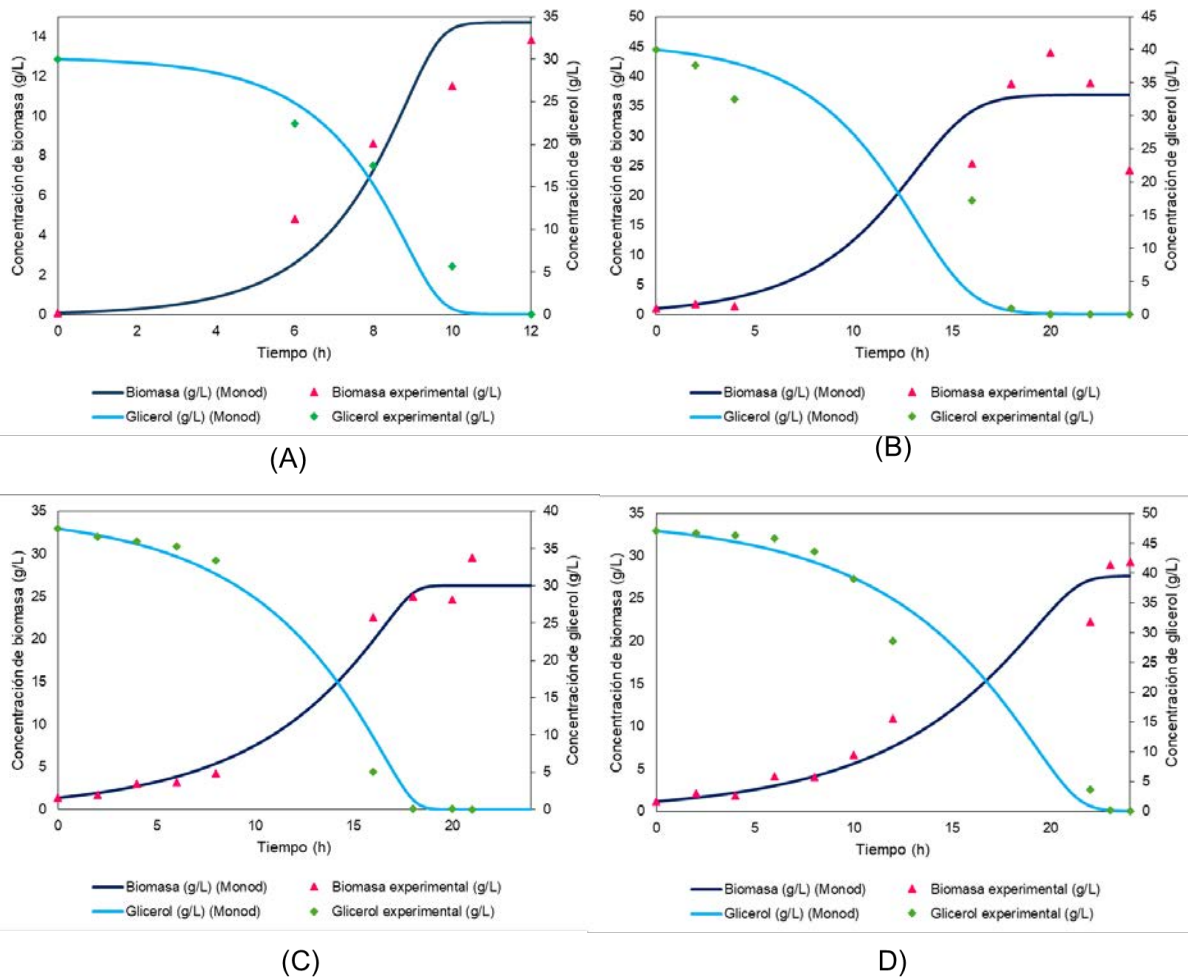


Figura 36. Ajuste del modelo cinético de Monod a los datos experimentales recolectados en la etapa de Glicerol-Batch. (A) Ensayo 3A; (B) Ensayo 1B; (C) Ensayo 2B; (D) Ensayo 3B.

Los mejores ajustes del modelo ( $R^2 > 0.97$ ) resultaron para los ensayos 2B y 3B. Los resultados de  $\mu_{max}$  para estas ensayos son muy similares con valores de 0.17 y 0.18  $h^{-1}$  respectivamente y concuerdan con el resultado de  $\mu_{max}$  de 0.17  $h^{-1}$  reportado por Zhang et al. (2003). El resultado de  $\mu_{max}$  obtenido para la ensayo 1B fue superior a los anteriores y similar al reportado por Katla et al. (2019) de 0.32  $h^{-1}$  para el medio BSM optimizado. Estos resultados podrían inferir que el medio LS, a pesar de tener menor concentración de sales, garantiza las condiciones necesarias para que el cultivo de alta densidad de desarrolle.

El ajuste del modelo a los datos del ensayo 3A, estudiada en medio BMGY, reportó el valor de  $\mu_{max}$  de  $0.59 \text{ h}^{-1}$ , el cual fue el mayor en comparación con los demás ensayos. A pesar de haber recolectado pocos datos debido a la corta durabilidad de la etapa Glicerol-Batch, el ajuste del modelo fue bastante bueno con  $R^2 > 90$ . En referencias no hay un valor tan elevado como este, pero Matthews et al. (2018) reportaron en su estudio de optimización de medio de cultivo, que la velocidad de crecimiento de *P. pastoris* es superior en el medio BMGY que en el medio BSM con valores de  $0.18$  y  $0.24 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. Estos resultados son de esperar ya que el medio BMGY es un medio enriquecido con peptona y extracto de levadura que es obtenida a partir de la autólisis de levaduras de panadería o cervecería y contiene una amplia variedad de metabolitos beneficiosos para el crecimiento del cultivo (Invitrogen, 2010; Matthews et al., 2018).

El rendimiento de biomasa (base seca) relativo a glicerol,  $Y_{X/S}$  de  $0.49 \text{ g/g}$ , obtenido en el ajuste del modelo para la ensayo 3A es muy cercano al valor de  $0.4 \text{ g/g}$  reportado por D'anjou and Daugulis (2001) para el medio BMGY y por Bhattacharya et al. (2007) para el medio BSM. En forma similar coincide con el valor reportado por Ren et al. (2003) de  $0.45 \text{ g/g}$  para la fermentación en el medio BSM.

La ensayo 1B mostró el mayor rendimiento de biomasa con un valor de  $0.89 \text{ g/g}$ , muy similar al valor de  $0.86 \text{ g/g}$  reportado por Katla et al. (2019) para medio BSM modificado. En el caso de los ensayos 2B y 3B, los rendimientos fueron de  $0.66$  y  $0.56 \text{ g/g}$ , respectivamente; ligeramente inferiores a los obtenidos en el primer ensayo. Sin embargo, Tomàs-Gamisans et al. (2019) reportaron un rendimiento de  $0.7 \text{ g/g}$  semejante al obtenido en la ensayo 2B mientras que Ghosalkar et al. (2008) reportaron un rendimiento de  $0.55 \text{ g/g}$  similar al obtenido en la ensayo 3B, ambos en medio BSM.

Estos resultados apuntan que, para los casos estudiados, el crecimiento durante la etapa de Glicerol-Batch fue satisfactorio y, a pesar de la variabilidad de los resultados, hay reportes de valores similares a los obtenidos.

Los valores de  $K_s$  obtenidos en los ajustes fueron muy altos, en especial el resultado obtenido para el ensayo 1B de 13.63 g/L que podría estar sujeto a la alta velocidad de crecimiento obtenida para este ajuste. Esto provoca que el cultivo llegue a concentraciones inhibitorias del sustrato más rápidamente debido a una posible tasa de consumo mayor. El resto de los resultados de este parámetro estuvieron entre 1.8 y 4 g/L, ligeramente más cercanos al resultado de 5.72 reportado por Katla et al. (2019) en el ajuste del modelo de Monod para los datos recolectados en medio BSM. Sin embargo, varios autores (Barrigón et al., 2012; Ghosalkar et al., 2008; Ren et al., 2003) reportan valores de  $K_s$  entre 0.17 y 0.3 g/L, muy inferiores a los obtenidos.

## **7.7 Discusión de los resultados**

Ambas estrategias de fermentación mostraron tener resultados prometedores. La estrategia A incorpora el uso del medio BMGY, un medio rico en nutrientes diseñado para favorecer la expresión extracelular, reducir la actividad de las proteasas y generar grandes cantidades de biomasa. Sin embargo, su baja concentración de glicerol (1%) provoca que la concentración de biomasa alcanzada durante la etapa GB sea baja. En los ensayos realizados con este medio la concentración de biomasa no superó los 30 g/L de biomasa húmeda y el consumo total de glicerol fue entre las 10 y 12 horas de fermentación. Una alternativa razonable sería aumentar la concentración de glicerol del medio. Liu et al. (2022) reportaron el uso del medio BMGY, pero enriquecido con glicerol, a una concentración de 4%, lo cual garantizó una mayor concentración de biomasa al culminar esta etapa.

El medio LS tiene una mayor concentración de glicerol (4%) y permitió alargar la etapa inicial de crecimiento entre 20 y 24 horas logrando, en promedio, 100 g/L de biomasa húmeda durante este tiempo. Por otro lado, son bien conocidos los problemas de precipitación de sales que pueden tener este tipo de medios (Brady et al., 2001). A pesar de que los ensayos no mostraron dicho comportamiento, es importante evaluarlo detenidamente.

La concentración de oxígeno disuelto fue mejor controlada a 30% mediante la incorporación de límites de emergencia entre 20 y 32% y el control en cascada con agitación entre 500 y 1000 rpm como actor primario y la alimentación de aire como actor secundario. Durante las primeras horas de la etapa de generación de biomasa (GB) es suficiente con un flujo de 0.5 a 1 L/min, pero, iniciadas las etapas de GFB y MFB y el aumento consecuente de la biomasa en el cultivo fue necesario aumentar el flujo de aire a 2 L/min.

Durante las etapas de inducción, el sistema fue incapaz de mantener las condiciones de aireación requeridas para la expresión. Debido a que el oxígeno es necesario en el primer paso del catabolismo de metanol, su baja concentración en esta etapa provocó una disminución en la velocidad de consumo de metanol lo cual desencadenó la acumulación de metanol en el medio observado en los ensayos 1B, 2B y 3B. Esta situación acarrió condiciones operacionales de oxígeno limitante. Trentmann et al. (2004) encontraron que la adición de metanol bajo estas condiciones perturba el cultivo provocando la pérdida de la actividad de la enzima alcohol oxidasa y la consecuente muerte celular. El ensayo 2B presentó dicho comportamiento, en parte provocado por las altas concentraciones de metanol, pero también las bajas concentraciones de oxígeno pudieron haber sumado a la muerte celular.

La estrategia de inducción mostró ser decisiva en la vitalidad del cultivo. Es de suma importancia contar con una alta concentración de biomasa antes de comenzar la inducción.

En la estrategia A, la etapa de adaptación al metanol está mejor definida. Sin embargo, los flujos de metanol en estas primeras etapas son definitorios para lograr su éxito. Durante los ensayos de la estrategia A la generación de biomasa en la etapa de GB fue menor y la etapa de crecimiento bajo condiciones limitantes de glicerol (GFB) permitió alcanzar mayores concentraciones en el cultivo para iniciar la inducción. En el caso del ensayo 1B, la etapa de adaptación al nuevo sustrato fue exitosa pues evidenció crecimiento celular y buena salud del cultivo durante gran parte de la etapa de inducción. El ensayo 3A no tuvo etapa definida de adaptación, pero los bajos



volúmenes de metanol añadidos permitieron que las concentraciones en el medio fueran menores de 1% lo que posibilitó al cultivo la transición progresiva al nuevo sustrato.

El ensayo 2A no tuvo una etapa de adaptación eficiente. En primera instancia, durante la etapa de GB el cultivo creció lentamente en comparación con los demás casos por lo que es posible que al momento de la inducción el cultivo ya existía estrés metabólico. El cambio de sustrato, a pesar de hacerlo progresivamente, provocó perturbaciones en el cultivo desencadenando la muerte celular.

La estrategia B propone la adición de un volumen muy bajo de metanol durante la etapa de GFB como inicio de este proceso de adaptación. En cambio, no hace un aumento progresivo del flujo de metanol. Los cultivos de los ensayos 1B y 3B donde la inducción inició con 126 y 127 g/L de biomasa húmeda, respectivamente, mostraron mejores respuestas a la incorporación de metanol.

La ausencia de una etapa adaptativa en el ensayo 1B provocó una acumulación desenfrenada durante varias horas llegando a valores de 5.2% de concentración de metanol bajo el flujo de 0.08 mL/min. En cambio, el flujo de 0.06 mL/min demostró ser muy bajo y la concentración de metanol en el medio fue nula.

La acumulación de metanol en el medio conllevó a altas concentraciones del sustrato, lo cual resultó en un escenario inhibitorio para el crecimiento celular; dicho comportamiento apareció en los ensayos 1B y 3B. Zhang et al. (2003) reportaron inhibición en sus cultivos a concentraciones superiores a 3.6% de metanol.

El ensayo 2B mostró que el flujo de 0.10 mL/min (12 mL/h/L de cultivo) es demasiado alto para el cultivo y, al no haberle detenido, la acumulación de metanol fue incesante, alcanzando valores críticos de 24.6% de concentración de metanol y provocando la muerte del cultivo de manera drástica a las pocas horas de iniciada la inducción. El ensayo 3B mostró que el flujo de 0.07 mL/min (8.4 mL/h/L de cultivo) podría ser el correcto para el proceso de inducción a esta escala ya que, durante las 10 h que estuvo activo, la concentración de metanol estuvo casi invariable.

La generación de espuma resultó ser un problema en el proceso. La cantidad de espuma generada fue directamente proporcional a la salud del cultivo, mientras mayor era el crecimiento y el consumo de oxígeno, había mayor cantidad de espuma. Esto provocó que en cultivos de larga duración y alta generación de biomasa fuera necesario la adición de grandes volúmenes de antiespumante provocando un aumento no considerado del volumen y limitando los parámetros operacionales.

El frasco de 1.5 L presentó limitaciones operacionales. Los ensayos de larga duración presentaron un aumento significativo del volumen provocado por la adición de metanol principalmente en el régimen Fed-Batch. Este aumento disminuía el espacio para el crecimiento de la espuma y provocaba la adición de antiespumante muy frecuentemente. Por otro lado, *P. pastoris* puede crecer en cultivos con agitación hasta 1500 rpm (Invitrogen, 2002). Sin embargo, al aumentar la agitación a 1200 o 1400 rpm durante los procesos, la espuma aumentó demasiado, siendo necesaria la disminución de la agitación. Una situación similar sucedió con el flujo de aire, debiendo limitarle a 2 L/min como máximo.

Finalmente, la expresión de la proteína no fue perturbada en ningún sentido por las condiciones evaluadas como pH y composición del medio. En ninguno de los ensayos fue posible obtener evidencia exacta de la expresión de la proteína de manera cuantificable por lo que fue imposible optimizar o estudiar estos parámetros a fondo.

## 8. Conclusiones

1. El estudio de las clonas modificadas con el casete de expresión mediante la generación de los preinóculos permitió seleccionar la clona 24 como mejor candidata para la expresión extracelular de la proteína de interés.
2. Los parámetros de agitación y aireación demostraron estar completamente relacionados. Las mejores condiciones fueron la aireación entre 1 y 3 vvm y la agitación entre 500 y 1000 rpm bajo un lazo de control en cascada con límites definidos entre 20 y 32% para mantener la concentración de oxígeno disuelto en 30%.
3. El pH no mostró ninguna influencia en la expresión de la proteína. Al ser *P. pastoris* una levadura capaz de crecer en un amplio intervalo de pH (de 3 a 7), su crecimiento tampoco fue afectado por este parámetro.
4. La estrategia de inducción es una etapa crítica del proceso. El flujo de 0.06 mL/min resultó ser favorable en el inicio de etapa de adaptación, pero no durante el resto de la etapa. El flujo de 0.07 mL/min mantuvo la concentración de metanol en el medio constante. Los flujos de 0.08 y 0.10 mL/min provocaron acumulación de metanol en el medio y altas concentraciones superiores a 5%.
5. La concentración de oxígeno disuelto demostró ser un parámetro crítico en el control del proceso fermentativo durante la etapa de Metanol-Fed-Batch y en la rapidez de consumo de metanol. Los parámetros establecidos no fueron suficientes para garantizar los requerimientos.
6. El frasco de 1.5 L de volumen limitó operacionalmente el proceso debido a la excesiva generación de espuma.
7. El ajuste del modelo de Monod a los datos experimentales fue mejor para los ensayos con mayor cantidad de datos 2B y 3B con  $R^2 > 97$ . Los parámetros obtenidos mostraron que el crecimiento en la etapa de GB fue muy similar a los reportados en referencias.

## 9. Bibliografía

- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal*, 75, 47-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.018>
- Barrigón, J. M., Ramon, R., Rocha, I., Valero, F., Ferreira, E. C., & Montesinos, J. L. (2012). State and specific growth estimation in heterologous protein production by *Pichia pastoris*. *AIChE Journal*, 58(10), 2966-2979. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aic.12810>
- Basu, A., Li, X., & Leong, S. S. J. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 241-251. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3513-y>
- Bhattacharya, P., Pandey, G., & Mukherjee, K. J. (2007). Production and purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) from high cell density cultures of *Pichia pastoris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(5), 305-312. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0124-1>
- Bill, R. M. (2014). Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 319-328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jphp.12353>
- Brady, C. P., Shimp, R. L., Miles, A. P., Whitmore, M., & Stowers, A. W. (2001). High-Level Production and Purification of P30P2MSP11 an Important Vaccine Antigen for Malaria, Expressed in the Methylotropic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23, 468-475. <https://doi.org/10.1006/prev.2001.1526>
- Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z. M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & Bioscience*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>
- Çalık, P., Bayraktar, E., İnankur, B., Soyaslan, E. Ş., Şahin, M., Taşpınar, H., Açıık, E., Yılmaz, R., & Özdamar, T. H. (2010). Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(12), 1628-1635. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.2474>
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329-332. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0)
- Chagas, B., Farinha, I., Galinha, C. F., Freitas, F., & Reis, M. A. M. (2014). Chitin-glucan complex production by *Komagataella (Pichia) pastoris*: impact of cultivation pH and temperature on polymer content and composition. *New Biotechnology*, 31(5), 468-474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.005>

- Chen, C.-C., Wu, P.-H., Huang, C.-T., & Cheng, K.-J. (2004). A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 315-320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzymitec.2004.05.007>
- Chen, W.-H., Du, L., Chag, S. M., Ma, C., Tricoche, N., Tao, X., Seid, C. A., Hudspeth, E. M., Lustigman, S., Tseng, C.-T. K., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., Zhan, B., & Jiang, S. (2014). Yeast-expressed recombinant protein of the receptor-binding domain in SARS-CoV spike protein with deglycosylated forms as a SARS vaccine candidate. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10, 648–658. <https://doi.org/10.4161/hv.27464>
- Chen, W.-H., Pollet, J., Strych, U., Lee, J., Liu, Z., Kundu, R. T., Versteeg, L., Villar, M. J., Adhikari, R., Wei, J., Poveda, C., Keegan, B., Bailey, A. O., Chen, Y.-L., Gillespie, P. M., Kimata, J. T., Zhan, B., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2022). Yeast-expressed recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain RBD203-N1 as a COVID-19 protein vaccine candidate. *Protein Expression and Purification*, 190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106003>
- Chen, W.-H., Wei, J., Kundu, R. T., Adhikari, R., Liu, Z., Lee, J., Versteeg, L., Poveda, C., Keegan, B., Villar, M. J., Leao, A. C. d. A., Rivera, J. A., Gillespie, P. M., Pollet, J., Strych, U., Zhan, B., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2021). Genetic modification to design a stable yeast-expressed recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain as a COVID-19 vaccine candidate. *BBA - General Subjects*, 1865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129893>
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules*, 11(8), 1072. <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/8/1072>
- Couderc, R., & Baratti, J. (1980). Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(10), 2279-2289. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864320> %J Agricultural and Biological Chemistry
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. J. M. b. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. 16, 23-52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Cregg, J. M., & Higgins, D. R. (2007). *Pichia protocols* (Vol. 268). Springer.
- D'anjou, M. C., & Daugulis, A. J. (2001). A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 1-11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010105\)72:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010105)72:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-T)
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P., & Mattanovich, D. (2009). The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1380-1392. <https://doi.org/10.1021/pr8007623>
- Ergün, B. G., Berrios, J., Binay, B., & Fickers, P. (2021). Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to

- bioprocess optimization and metabolic modelling. *FEMS Yeast Research*, 21(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab057>
- Farinha, I., Baptista, S., Reis, M. A. M., & Freitas, F. (2022). Influence of Dissolved Oxygen Level on Chitin&ndash;Glucan Complex and Mannans Production by the Yeast *Pichia pastoris*. *Life*, 12(2), 161. <https://doi.org/10.3390/life12020161>
- Fathizadeh, H., Afshar, S., Masoudi, M. R., Gholizadeh, P., Asgharzadeh, M., Ganbarov, K., K'ose, S. ü., Yousefi, M., & Kafil, H. S. (2021). SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 740–750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.076>
- Ghosalkar, A., Sahai, V., & Srivastava, A. (2008). Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource technology*, 99(16), 7906-7910. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.059>
- Hanga, H., Yea, X., Guoa, M., Chua, J., Zhuanga, Y., Zhanga, M., & Zhanga, S. (2009). A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 185–188. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.12.002>
- Heidary, M., Kaviar, V. H., Shirani, M., Ghanavati, R., Motahar, M., Sholeh, M., Ghahramanpour, H., & Khoshnood, S. (2022). A Comprehensive Review of the Protein Subunit Vaccines Against COVID-19 [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
- Hernández-Bernal, F., Ricardo-Cobas, M. C., Martín-Bauta, Y., Navarro-Rodríguez, Z., Piñera-Martínez, M., Quintana-Guerra, J., Urrutia-Pérez, K., Urrutia-Pérez, K., Chávez-Chong, C. O., Azor-Hernández, J. L., Rodríguez-Reinoso, J. L., Lobaina-Lambert, L., Colina-Ávila, E., Bizet-Almeida, J., Rodríguez-Nuviola, J., del Valle-Piñera, S., Ramírez-Domínguez, M., Tablada-Ferreiro, E., Alonso-Valdés, M., . . . Muzio-González, V. L. (2022). Safety, tolerability, and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant spike RBD protein vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1-2 clinical trial (ABDALA Study). *eClinicalMedicine*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101383>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X.-f., Xu, W., & Liu, S.-w. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40, 1141–1149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Invitrogen. (2002). *Pichia Fermentation Process Guidelines Overview* In.
- Invitrogen. (2010). *EasySelect Pichia Expression Kit*. In.
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS- CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews*, 23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Joseph, J. A., Akkermans, S., Cornillie, E., Deberlanger, J., & Van Impe, J. F. M. (2023). Optimal culture medium selection and supplementation for recombinant thaumatin II production by *Komagataella phaffii*. *Food and Bioprocess Processing*, 139, 190-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.04.001>

- Joseph, J. A., Akkermans, S., & Van Impe, J. F. M. (2022). Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*. *Foods*, 11(10), 1438. <https://doi.org/10.3390/foods11101438>
- Julien, C. (2006). Production of humanlike recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Technical*, 22-30.
- Kalyoncu, S., Yilmaz, S., Kuyucu, A. Z., Sayili, D., Mert, O., Soyturk, H., Gullu, S., Akinturk, H., Citak, E., Arslan, M., Taskinarda, M. G., Tarman, I. O., Altun, G. Y., Ozer, C., Orkut, R., Demirtas, A., Tilmensagir, I., Keles, U., Ulker, C., . . . Inan, M. (2023). Process development for an effective COVID-19 vaccine candidate harboring recombinant SARS-CoV-2 delta plus receptor binding domain produced by *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, 13(1), 5224. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32021-9>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. J. J. o. c. p. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. 235(9), 5867-5881. <https://doi.org/> <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Katla, S., Karmakar, B., Tadi, S. R. R., Mohan, N., Anand, B., Pal, U., & Sivaprakasam, S. (2019). High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered *Pichia pastoris*: culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1438-1453. <https://doi.org/10.1111/jam.14227>
- Katoh, S., & Yoshida, F. (2009). *Biochemical Engineering: A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. Wiley-VCH.
- Kuruti, K., Vittaladevaram, V., Urity, S. V., Palaniappan, P., & Bhaskar, R. U. (2020). Evolution of *Pichia pastoris* as a model organism for vaccines production in healthcare industry. *Gene Reports*, 21, 100937. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100937>
- Lee, C. Y., Lee, S. J., Jung, K. H., Katoh, S., & Lee, E. K. (2003). High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 38(8), 1147-1154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00280-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00280-7)
- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T. A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B.-K., Cook, W. J., Cukan, M., Houston-Cummings, N. R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S. R., Hoopes, J. P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, R., Nett, J. H., . . . Gerngross, T. U. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 24, 210-215. <https://doi.org/10.1038/nbt1178>
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142, 105-124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>
- Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., d'Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S. C., & Hew, C. L. (2001). Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(3), 438-445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/prev.2001.1395>

- Lim, H. K., Choi, S. J., Kim, K. Y., & Jung, K. H. (2003). Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4), 342-348. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1307-6>
- Liu, B., Yin, Y., Liu, Y., Wanga, T., Sun, P., Oud, Y., Gong, X., Hou, X., Zhang, J., Ren, H., Luo, S., Ke, Q., Yao, Y., Xu, J., & Wua, J. (2022). A Vaccine Based on the Receptor-Binding Domain of the Spike Protein Expressed in Glycoengineered *Pichia pastoris* Targeting SARS-CoV-2 Stimulates Neutralizing and Protective Antibody Responses. *Engineering*, 13, 107–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.06.012>
- Liu, W.-C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.-Y., & Zhu, P. (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 258-271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1177-1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wenling Wang, Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., . . . Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395, 565-574. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Martínez-Hernández, S., Marín-Muñoz, M., Ventura-Juarez, J., & Jauregui, J. (2020). Fed-batch cultivation and operational conditions for the production of a recombinant anti-amoebic vaccine in *Pichia pastoris* system. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(2), 691-705. <https://doi.org/https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio725>
- Martínez-Mateo, P., Bustos-Fonseca, M., & Gil-Díaz, M. J. S.-M. d. F. (2012). Actualización en vacunas. Teoría, realidades y mitos (I). 38(3), 160-166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semerng.2011.10.021>
- Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., & Love, J. C. (2018). Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(1), 103-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.26440>
- Mittal, A., Manjunath, K., Ranjan, R. K., Kaushik, S., Kumar, S., & Verma, V. (2020). COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLOS PATHOGENS*, 16(8), e1008762. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008762>
- Moravec, T., Schmidt, M. A., Herman, E. M., & Woodford-Thomas, T. (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*, 25(9), 1647-1657. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.010>
- Muñoz, M. A. M., Jáuregui Rincón, J., Carreón, L. S., & Chávez Vela, N. A. (2019). Dextranase production by recombinant *Pichia pastoris* under operational



- volumetric mass transfer coefficient (kLa) and volumetric gassed power input (Pg/V) attainable at commercial large scale. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(6), 606-615. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591992>
- Nascimento, I., & Leite, L. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian journal of medical and biological research*, 45, 1102-1111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- Naully, P. G., Nurainy, N., Restiawaty, E., Natalia, D., Retnoningrum, D. S., Niloperbowo, W., & Giri-Rachman, E. A. (2020). Integration stability of sHBsAg-multi expression cassettes in *Pichia pastoris* GS115 during methanol induction. *HAYATI Journal of Biosciences*, 27(4), 283-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.4308/hjb.27.4.283>
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). Modeling of Growth Kinetics. In J. Nielsen, J. Villadsen, & G. Lidén (Eds.), *Bioreaction Engineering Principles: Second Edition* (pp. 235-314). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3_7)
- O'Riordan, A. A., Morales, V. A., Mulligan, L., Faheem, N., Windle, H. J., & Kelleher, D. P. (2012). Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine*, 30(26), 3876-3884. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.002>
- Pollet, J., Chen, W.-H., Versteeg, L., Keegan, B., Zhan, B., Wei, J., Liu, Z., Lee, J., Kundu, R., Adhikari, R., Poveda, C., Villar, M. J., de Araujo Leao, A. C., Altieri Rivera, J., Momin, Z., Gillespie, P. M., Kimata, J. T., Strych, U., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2021). SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(8), 2356-2366. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1901545>
- Ponte, X., Barrigón, J. M., Maurer, M., Mattanovich, D., Valero, F., & Montesinos-Seguí, J. L. (2018). Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) fed-batch processes under PAOX1 control: a modeling aided approach. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(11), 3208-3218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.5677>
- Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.017>
- Prabhu, A. A., Mandal, B., & Dasu, V. V. (2017). Medium optimization for high yield production of extracellular human interferon- $\gamma$  from *Pichia pastoris*: A statistical optimization and neural network-based approach. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34, 1109-1121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11814-016-0358-1>

- Ren, H. T., Yuan, J. Q., & Bellgardt, K. H. (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *Journal of Biotechnology*, 106(1), 53-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.08.003>
- Safder, I., Khan, S., Islam, I.-U., Kazim, M., Bibi, Z., & Waqas, M. (2018). *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomedical Letters*. <https://www.researchgate.net/publication/323749177>
- Sahm, H. (1977). Metabolism of methanol by yeasts. In T. K. Ghose, A. Fiechter, & N. Blakebrough (Eds.), *Advances in Biochemical Engineering, Volume 6* (pp. 77-103). Springer Berlin Heidelberg.
- Saleh, A., Qamar, S., Tekin, A., Singh, R., & Kashyap, R. (2021). Vaccine development throughout history. *Cureus*, 13(7). <https://doi.org/10.7759/cureus.16635>
- Saraswat, S., Athmaram, T., Parida, M., Agarwal, A., Saha, A., & Dash, P. K. (2016). Expression and characterization of yeast derived chikungunya virus like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(7), e0004782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004782>
- Shahcheraghi, S. H., Ayatollahi, J., Aljabali, A. A. A., Shastri, M. D., Shukla, S. D., Chellappan, D. K., Jha, N. K., Anand, K., Katari, N. K., Mehta, M., Satija, S., Dureja, H., Mishra, V., Almutary, A. G., Alnuqaydan, A. M., Charbe, N., Prasher, P., Gupta, G., Dua, K., . . . Tambuwala, M. M. (2021). An Overview of Vaccine Development for COVID-19. *Therapeutic Delivery*, 12(3), 235-244. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0129>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.20318>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V., Liu, C.-P., & Meagher, M. M. (2003). Improved Production of Recombinant Ovine Interferon- $\tau$  by Mut+ Strain of *Pichiapastoris* Using an Optimized Methanol Feed Profile. *Biotechnology Progress*, 19(3), 794-802. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp025744q>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2003). *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier Science.
- Teng, X., Chen, X., Zhu, K., & Xu, H. (2018). Immunogenicity of heparin-binding hemagglutinin expressed by *Pichia pastoris* GS115 strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(2), 219. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.24280.6064>
- Tolner, B., Smith, L., Begent, R. H. J., & Chester, K. A. (2006). Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *NATURE PROTOCOLS*, 1, 1006-1021. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.126>
- Tomàs-Gamisans, M., Ødum, A. S. R., Workman, M., Ferrer, P., & Albiol, J. (2019). Glycerol metabolism of *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp.) characterised by

- 13C-based metabolic flux analysis. *New Biotechnology*, 50, 52-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.01.005>
- Trentmann, O., Khatri, N. K., & Hoffmann, F. (2004). Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1766-1775. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp049711h>
- Tripathi, L., Mani, S., Raut, R., Poddar, A., Tyagi, P., Arora, U., De Silva, A., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2015). *Pichia pastoris*-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1005. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01005>
- Vartak, A., & Sucheck, S. J. (2016). Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines*, 4(2), 12. <https://doi.org/10.3390/vaccines4020012>
- Vega, L. E. F. d. I., & Morales, J. S. M. (2021). *El impacto de la crisis del COVID-19 en México*. Publicaciones Empresariales UNAM. FCA Publishing.
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, Article 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, 7(3), 155-165. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>
- Wong-Arce, A., Gonzalez-Ortega, O., Romero-Maldonado, A., Miranda-López, A., García-Soto, M., Farfán-Castro, S., Betancourt-Mendiola, L., Teeravechyan, S., Srisutthisamphan, K., Comas-García, M., Solís Andrade, K. I., & Rosales-Mendoza, S. (2024). Production and Immunogenicity Assessment of LTP50: An *Escherichia coli*-Made Chimeric Antigen Targeting S1- and S2-Epitopes from the SARS-CoV-2/BA.5 Spike Protein. *Pharmaceuticals*, 17(3), 302. <https://doi.org/10.3390/ph17030302>
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J. C. A., & Jakob, U. (2000). Heating Greatly Speeds Coomassie Blue Staining and Destaining. *BioTechniques*, 28(3), 426-432. <https://doi.org/10.2144/00283bm07>
- World Health Organization. (2023a). Retrieved 18-10 from <https://covid19.who.int/region/amro/country/mx>
- World Health Organization. (2023b). Retrieved 26-10 from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19))
- Yang, S., Li, Y., Dai, L., Wang, J., He, P., Li, C., Fang, X., Wang, C., Zhao, X., Huang, E., Wu, C., Zhong, Z., Wang, F., Duan, X., Tian, S., Wu, L., Liu, Y., Luo, Y., Chen, Z., . . . Gao, G. F. (2021). Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Infect Dis*, 21(8), 1107-1119. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00127-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00127-4)

- Yurimoto, H., Oku, M., & Sakai, Y. (2011). Yeast Methylo-trophy: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis. *International Journal of Microbiology*, 2011, 101298. <https://doi.org/10.1155/2011/101298>
- Zhang, H., Loovers, H. M., Xu, L.-Q., Wang, M., Rowling, P. J. E., Itzhaki, L. S., Gong, W., Zhou, J.-M., Jones, G. W., & Perrett, S. (2009). Alcohol oxidase (AOX1) from *Pichia pastoris* is a novel inhibitor of prion propagation and a potential ATPase. *Molecular Microbiology*, 71(3), 702-716. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06557.x>
- Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *ScienceDirect*, 50, 173-182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>
- Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 1-8. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y)
- Zhang, W., Hywood Potter, K. J., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 210-215. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0035-3>
- Zhang, W., Sinha, J., Smith, L. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Maximization of Production of Secreted Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* Fed-Batch Fermentation. 21(2), 386-393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp049811n>
- Zhong, Y., Yang, L., Guo, Y., Fang, F., Wang, D., Li, R., Jiang, M., Kang, W., Ma, J., Sun, J., & Xiao, W. (2014). High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0163-7>
- Zhu, W., Gong, G., Pan, J., Han, S., Zhang, W., Hu, Y., & Xie, L. (2018). High level expression and purification of recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 147, 61-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.02.003>
- Zhu, W., Xu, R., Gong, G., Xu, L., Hu, Y., & Xie, L. (2021). Medium optimization for high yield production of human serum albumin in *Pichia pastoris* and its efficient purification. *Protein Expression and Purification*, 181, 105831. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105831>
- Zou, L., Miles, A. P., Wang, J., & Stowers, A. W. (2003). Expression of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25 in *Pichia pastoris* for use in human clinical trials. *Vaccine*, 21(15), 1650-1657. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00701-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00701-6)

## 10. Anexos

### Anexo 1. Concentraciones de glicerol y metanol para el ensayo 3A

Tabla 10: Concentraciones de glicerol para la etapa de GB en el ensayo 3A

| Tiempo (h) | Glicerol (%) |
|------------|--------------|
| 0          | 3.00         |
| 6          | 2.24         |
| 8          | 1.74         |
| 10         | 0.57         |
| 12         | 0            |

Tabla 11: Concentraciones de metanol para la etapa de MFB del ensayo 3A

| Tiempo (h) | Metanol (%) | Tiempo (h) | Metanol (%) |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 14         | 0.57        | 75         | 0.5         |
| 24         | 0.35        | 77         | 0.92        |
| 26         | 0.49        | 78         | 0.38        |
| 28         | 0.5         | 78.01      | 0.72        |
| 32         | 0.57        | 82         | 0.32        |
| 36         | 0.36        | 96         | 0.91        |
| 48         | 0.21        | 98         | 0.24        |
| 52         | 0.14        | 98.5       | 0.24        |
| 55         | 1.86        | 101        | 0.06        |
| 58         | 0.62        | 102        | 0.28        |
| 72         | 0.32        | 110        | 0.27        |
| 72.01      | 0.84        |            |             |

Anexo 2. Concentraciones de glicerol y metanol para el ensayo 1B

Tabla 12: Concentraciones de glicerol para la etapa de GB y GFB en el ensayo 1B

| Tiempo (h) | Glicerol (%) | Tiempo (h) | Glicerol (%) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 0          | 5.49         | 22         | 0            |
| 2          | 5.65         | 24         | 0            |
| 4          | 4.88         | 25         | 0.17         |
| 16         | 2.59         | 26.5       | 0            |
| 18         | 0.14         | 27         | 0.07         |
| 20         | 0            |            |              |

Tabla 13: Concentraciones de metanol para la etapa de MFB del ensayo 1B

| Tiempo (h) | Metanol (%) |
|------------|-------------|
| 26.5       | 0.75        |
| 27         | 0.76        |
| 28         | 1.5         |
| 40         | 5.24        |
| 42         | 3.85        |
| 44         | 2.07        |
| 46         | 0.05        |
| 48-88      | 0           |

Anexo 3. Concentraciones de glicerol y metanol para el ensayo 2B

Tabla 14: Concentraciones de glicerol para la etapa de GB y GFB en el ensayo 2B

| Tiempo (h) | Glicerol (%) |
|------------|--------------|
| 0          | 3.77         |
| 2          | 3.66         |
| 4          | 3.6          |
| 6          | 3.53         |
| 8          | 3.34         |
| 16         | 0.5          |
| 18         | 0.01         |
| 20         | 0.01         |
| 21         | 0            |

Tabla 15: Concentraciones de metanol para la etapa de MFB del ensayo 2B

| Tiempo (h) | Metanol (%) | Tiempo (h) | Metanol (%) |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 22         | 0.43        | 47         | 12.51       |
| 23         | 0.81        | 49         | 13.4        |
| 25         | 1.8         | 51         | 14.73       |
| 27         | 2.57        | 53         | 16.08       |
| 29         | 3.56        | 65         | 24.14       |
| 41         | 7.74        | 67         | 24.62       |
| 43         | 8.98        |            |             |

Anexo 4. Concentraciones de glicerol y metanol para el ensayo 3B

Tabla 16: Concentraciones de glicerol para la etapa de GB y GFB en el ensayo 3B

| Tiempo (h) | Glicerol (%) | Tiempo (h) | Glicerol (%) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| 0          | 4.70         | 10         | 3.90         |
| 2          | 4.67         | 12         | 2.86         |
| 4          | 4.63         | 22         | 0.37         |
| 6          | 4.58         | 23         | 0.02         |
| 8          | 4.36         | 24         | 0.00         |

Tabla 17: Concentraciones de metanol para la etapa de MFB del ensayo 3B

| Tiempo (h) | Metanol (%) | Tiempo (h) | Metanol (%) |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 24         | 0.25        | 55         | 2.03        |
| 25         | 0.12        | 57         | 2.13        |
| 27         | 0.09        | 71         | 1.17        |
| 29         | 0.00        | 73         | 1.11        |
| 31         | 0.00        | 75         | 1.34        |
| 33         | 0.00        | 77         | 1.35        |
| 35         | 0.08        | 79         | 1.33        |
| 47         | 1.07        | 81         | 1.40        |
| 49         | 1.36        | 83         | 1.25        |
| 51         | 1.72        | 95         | 2.31        |
| 53         | 1.82        |            |             |



Anexo 5. Variables operaciones del proceso fermentativo del ensayo 1<sup>a</sup>

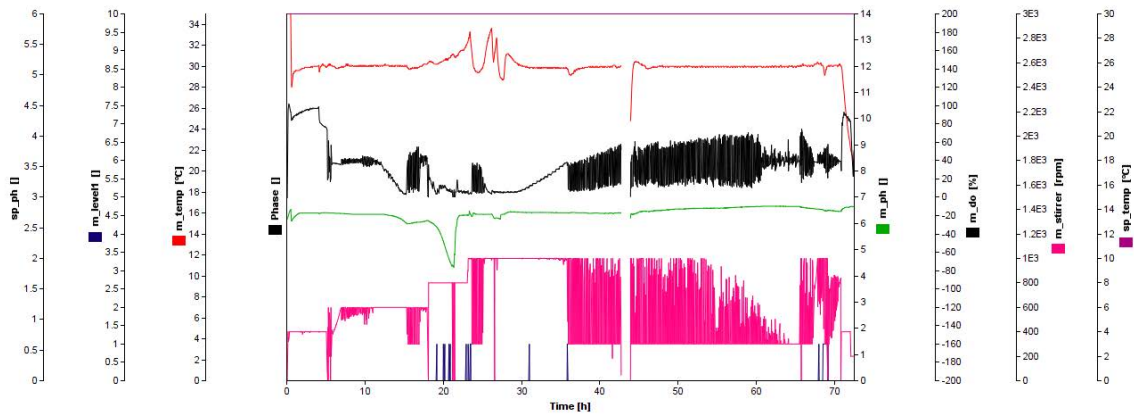


Figura 37. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 1A, rosa – concentración de oxígeno disuelto (%), verde – pH, negro – agitación (rpm), rojo – temperatura (°C), azul – nivel.

Anexo 6. Variables operaciones del proceso fermentativo del ensayo 2<sup>a</sup>

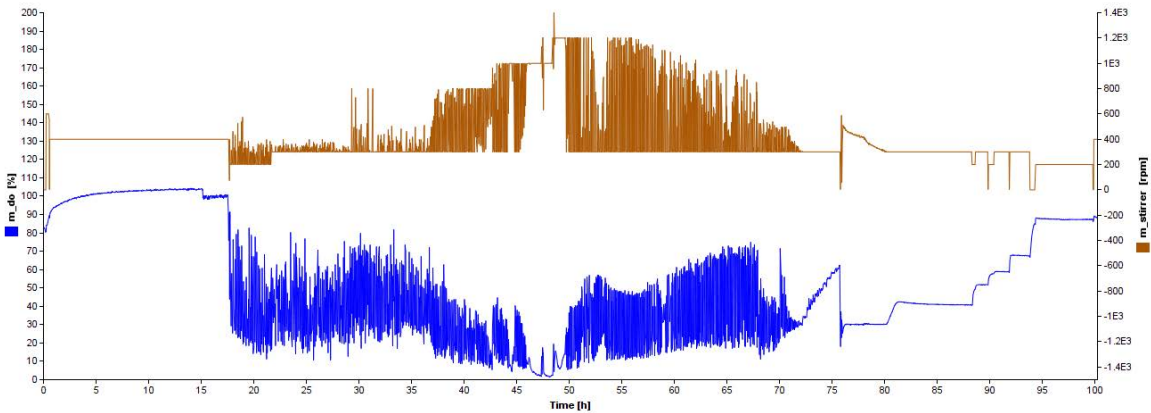


Figura 38. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 2A, azul – concentración de oxígeno disuelto (%), marrón – agitación (rpm)

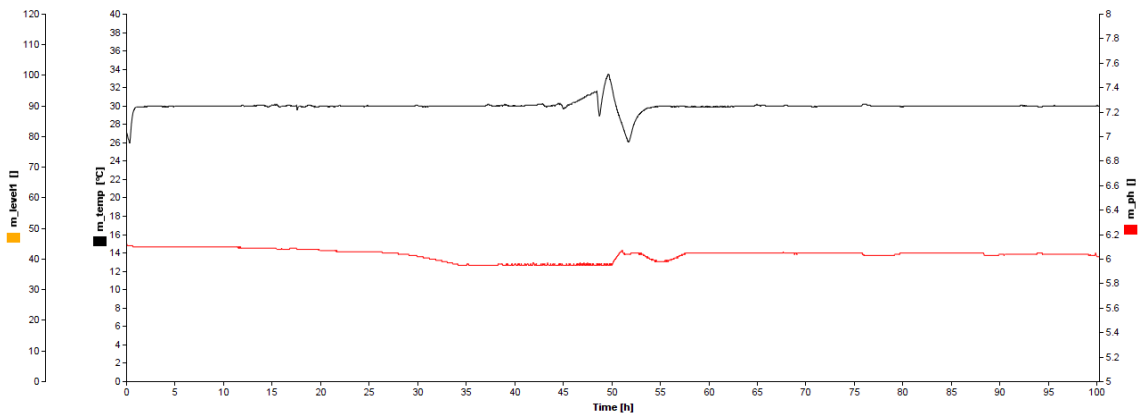


Figura 39. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 2A, rojo – pH, negro – temperatura (°C)

Anexo 7. Variables operaciones del proceso fermentativo del ensayo 3<sup>a</sup>

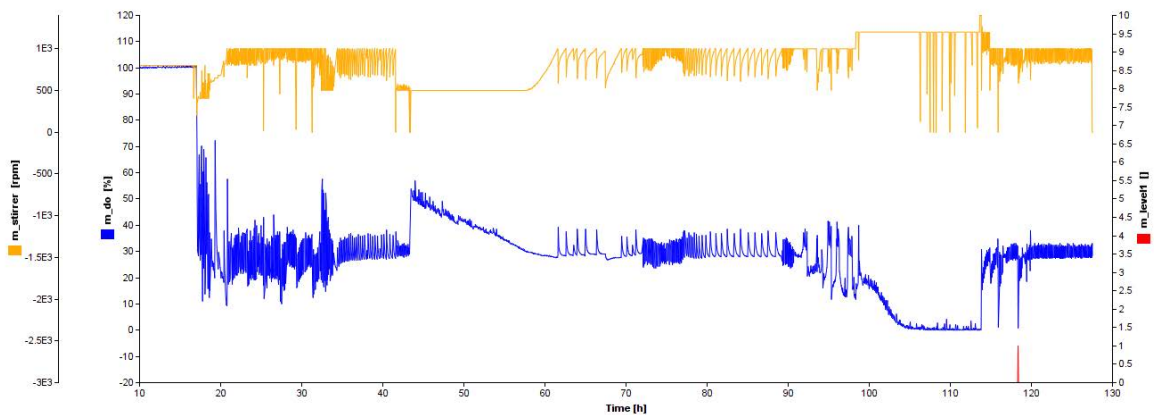


Figura 40. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 3A, azul – concentración de oxígeno disuelto (%), amarillo – agitación (rpm), rojo – nivel.

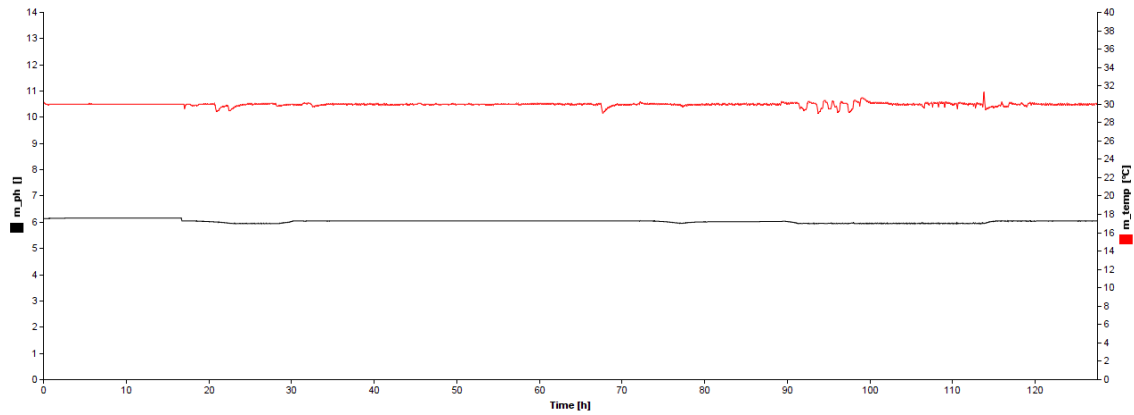


Figura 41. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 3A, negro – pH, rojo – temperatura (°C).

#### Anexo 8. Variables operaciones del proceso fermentativo del ensayo 1B

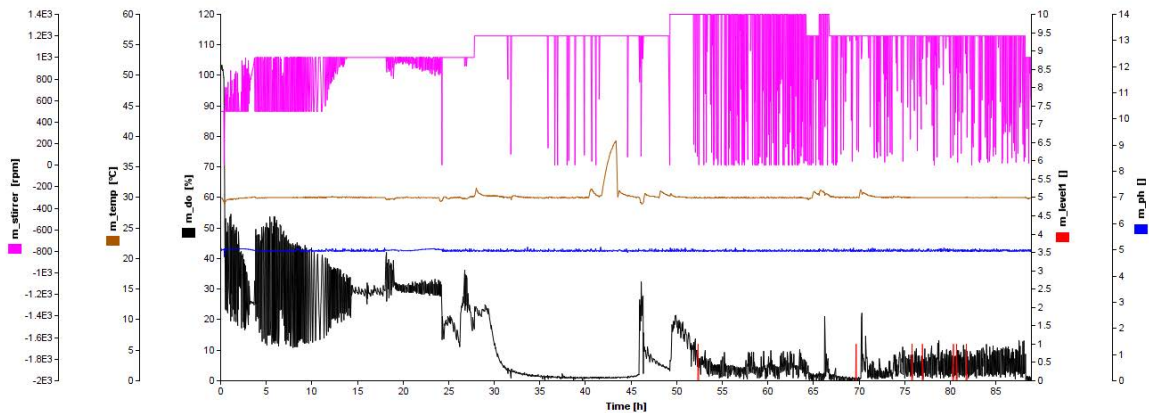


Figura 42. Variables operacionales del proceso fermentativo del ensayo 1B, negro – concentración de oxígeno disuelto (%), rojo – nivel, azul – pH, marrón – temperatura (°C), magenta – agitación (rpm)