

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

CBS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

JORGE LIMA PÉREZ
Ingeniero en biotecnología

**ESTUDIO FISIOLÓGICO DE *Pichia pastoris* CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE GLICEROL: CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO vs. CULTIVO
EN MEDIO LÍQUIDO**

Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

Director

Dr. MARCOS LÓPEZ PÉREZ

Co-director

Dra. DIVANERY RODRÍGUEZ GÓMEZ

Asesora

Mexico, D. F.

Julio de 2015

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F. a 30 de Julio del 2015

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**ESTUDIO FISIOLÓGICO DE *Pichia pastoris* CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE GLICEROL: CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO vs. CULTIVO
EN MEDIO LÍQUIDO**

que presentó

Jorge Lima Pérez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Co-director: Dr. Marcos López Pérez

Asesora: Dra. Divanery Rodríguez Gómez

Jurado:

Presidente: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Secretario: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Vocal: Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Vocal: Dr. José Francisco Miranda Hernández



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana y a CONACyT para la beca otorgada (302174)

A mis directores de tesis Dr. Octavio Loera y Dr. Marcos López, por la confianza y guía que me dieron durante el desarrollo de mi investigación.

A mi asesora la Dra. Divanery por sus comentarios y apoyo en esta investigación.

Al Dr. Gustavo Viniegra, por los comentarios en esta investigación y esas palmadas de ánimo.

Al Dr. Francisco Fernández, por su asesoría en esta investigación.

A mis padres, Jorge y Mariana mis guías y ejemplos maravillosos de personas. Por darme el apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado en mi vida personal y profesional GRACIAS.

A mis Hermanos, Raquel y Rodrigo por estar conmigo en los momentos más importantes y difíciles de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio: Nohemi, Facundo, Miguel, Alejandro, Berenice y Francisco por los comentarios y el apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos que me apoyaron y escucharon cuando más los necesité.

A todas la personas que han dejado algo bueno en mi vida. ¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

Las levaduras son los organismos eucariotas unicelulares más usados por industrias y laboratorios para obtener algún producto de interés. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es una de ellas, esta levadura ha sido usada por más de 20 años para producir proteínas recombinantes y actualmente tiene una gran atención para humanizar proteínas con respecto a los vectores (*Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) más usados en la industria y laboratorios, ya que posee procesos postraduccionales similares a los de los humanos.

En este trabajo se caracterizó la fisiología de crecimiento y consumo de sustrato de *P. pastoris* CBS 7435 en cultivo en medio sólido (CMS) y cultivo en medio líquido (CML) con tres diferentes concentraciones de glicerol (25, 50 y 100 g/L); ambos sistemas de cultivo mostraron la misma producción de biomasa (11.7 ± 0.2 g/L) con 25 g/L de glicerol, asimilando todo el sustrato para generar biomasa. Se encontraron diferencias en la producción de biomasa entre ambos sistemas con glicerol >50 g/L, en el CMS fue superior en un 63% en glicerol con 50 g/L y 173 % superior en glicerol con 100 g/L, comparado con el CML. Por otra parte, a concentraciones superiores a 50 g/L de glicerol, el CMS fue más eficiente en el aprovechamiento de sustrato para generar biomasa, mientras que en el CML una parte del sustrato se usa para mantenimiento en las dos concentraciones evaluadas y al final de la fermentación existe glicerol remanente (20 % y 40 % con 50 g/L de glicerol y 100 g/L, respectivamente). Se observó diferencia en el crecimiento entre ambos sistemas: en el CMS se formaron agregados celulares en las trabéculas y en las capas delgadas de la espuma de poliuretano (PUF) mientras que en el CML las células se mantuvieron disgregadas en toda la fase líquida por la agitación orbital del matraz. Finalmente, se identificaron tres genes relacionados con el transporte de glicerol en *P. pastoris* CBS 7435 reportados en la base de datos del genoma de *P. pastoris* GS115.

Este trabajo compara el sistema en CMS y CML, mostrando que el sistema en CMS es superior al CML para la producción biomasa y asimilación de sustrato, lo que sugiere que podría ser usado para la producción de altas densidades celulares.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Levaduras	1
1.1.1. Definición, generalidades y caracterización de levaduras	1
1.1.2. Levaduras de importancia en biotecnología	1
1.1.3. Levaduras como sistema de expresión eucariótico.....	3
1.1.4. Generalidades de la asimilación y regulación de compuestos de carbono de levaduras.....	6
1.2. Transportadores de membrana y su función	7
1.3. Levaduras metilotróficas	9
1.4. <i>Pichia pastoris</i>	11
1.4.1. Historia	11
1.4.2. Definición y generalidades.....	11
1.4.3. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas heterólogas.....	12
1.4.4. Transporte y asimilación de carbono en <i>Pichia pastoris</i>	14
1.4.5. Transporte y metabolismo de glicerol en <i>Pichia pastoris</i>	20
1.5. Características fundamentales del Cultivo en Medio Sólido (CMS)	21
1.5.1. Comparación entre CMS y CML.....	22
2. ANTECEDENTES	24
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. Microorganismo	27
6.2. Medios de propagación, conservación y producción de biomasa para <i>P. pastoris</i>	27
6.2.1. Medio de propagación de <i>P. pastoris</i>	27
6.2.2. Medio de conservación de <i>P. pastoris</i>	27
6.2.3. Medio para producción de biomasa de <i>P. pastoris</i>	28
6.3. Propagación de levaduras	28
6.4. Conservación de <i>P. pastoris</i>	29
6.4.1. Conservación a medio plazo	29
6.4.2. Conservación a largo plazo	29
6.5. Identificación molecular de la cepa de <i>P. pastoris</i>	29
6.5.1. Aislamiento de ADN genómico	29
6.5.2. Calidad y concentración de ADN genómico	30
6.5.3. Amplificación de espaciadores internos de transcripción (ITS's)	30
6.5.4. Electroforesis en gel de agarosa	31
6.5.5. Purificación de amplificadores, secuenciación y análisis en base de datos.	32
6.6. Preparación de cinéticas de crecimiento	32
6.6.1. Preparación de cultivo en medio sólido	32
6.6.2. Preparación de cultivo en medio líquido	33
6.7. Determinación de biomasa	33
6.7.1. Determinación de biomasa en medio líquido	33
6.7.2. Determinación de biomasa en medio sólido	34
6.8. Determinación de glicerol	34
6.9. Identificación de genes relacionados con el transporte de glicerol de <i>P. pastoris</i>	35
6.9.1. Aislamiento de ADN genómico	35
6.9.2. Diseño de cebadores específicos de transportadores de glicerol ..	35
6.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
6.9.4. Electroforesis en gel de agarosa	36
6.9.5. Purificación de amplificaciones, secuenciación y análisis en base de datos	37

6.10. Micrografías de levaduras.....	37
6.10.1. Micrografías de <i>P. pastoris</i> en CMS.....	37
6.10.2. Micrografías de <i>P. pastoris</i> en CML.....	37
6.11. Ajuste de datos experimentales.....	38
6.11.1. Ajuste de datos de biomasa.....	38
6.11.2. Ajuste de datos de consumo de glicerol.....	38
7. RESULTADOS.....	40
7.1. Identificación molecular de la cepa de <i>P. pastoris</i>.....	40
7.2. Producción de biomasa de <i>P. pastoris</i> en CML y CMS.....	42
7.2.1. Cinéticas de producción de biomasa a diferentes concentraciones de glicerol.....	44
7.3. Cinéticas de consumo de glicerol por <i>P. pastoris</i> a diferentes concentraciones de sustrato.....	48
7.4. Micrografías de espuma de poliuretano y crecimiento de biomasa en CMS y CML.....	53
7.5. Identificación y confirmación de genes relacionados con el transporte de glicerol.....	57
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	66
10. PERSPECTIVAS.....	66
11. BIBLIOGRAFÍA.....	67
12. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Representación de los cuatro principales tipos de transportadores. ...	8
Figura 1.2.	Vía metabólica de metanol.	10
Figura 1.3.	Metabolismo central de carbono de <i>P. pastoris</i>	19
Figura 7.1.	Aislamiento de ADN genómico en gel de agarosa al 0.8%.	40
Figura 7.2.	Amplificación de ITS's en gel de agarosa al 1.5%.	41
Figura 7.3.	Producción de biomasa en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.	42
Figura 7.4.	Perfil de pH en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.	42
Figura 7.5.	Producción biomasa en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.	43
Figura 7.6.	Perfil de pH en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.	43
Figura 7.7.	Cinética de producción de biomasa en CMS y CML con 25 g/L de glicerol.	45
Figura 7.8.	Cinética de producción de biomasa en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.	46
Figura 7.9.	Cinética producción de biomasa en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.	47
Figura 7.10.	Gráfico de fases de biomasa contra glicerol en CMS y CML con 25 g/L de glicerol.	49
Figura 7.11.	Cinética de consumo de glicerol en CMS y CML con 25 g/L de glicerol.	49
Figura 7.12.	Gráfico de fases de biomasa contra glicerol en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.	50
Figura 7.13.	Cinética de consumo de glicerol en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.	51
Figura 7.14.	Gráfico de fases de biomasa contra glicerol en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.	52
Figura 7.15.	Cinética de consumo de glicerol en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.	52
Figura 7.16.	Espuma de poliuretano sin biomasa.	54
Figura 7.17.	Formación de agregados de <i>P. pastoris</i> al inicio de la fase estacionaria en CMS.	55
Figura 7.18.	Morfología de <i>P. pastoris</i> al inicio de la fase estacionaria en CML. ...	56

Figura 7.19.	Aislamiento de ADN genómico en gel de agarosa al 0.8%.	57
Figura 7.20.	Amplificación de GPS's en gel de agarosa al 1.5%.	58
Figura 12.1.	Curva de calibración de glicerol.....	80
Figura 12.2.	Fotografía y modelo de PUF (alta densidad 21 kg/m ³).	80
Figura 12.3.	Cinética de producción de biomasa en medio BMG en CMS y CML con glicerol a 94.6 g/L.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Proteínas terapéuticas eucariontes expresadas en <i>S. cerevisiae</i>	5
Tabla 1.2.	Regulación del metabolismo: efecto combinado de la concentración de oxígeno y azúcar.....	7
Tabla 1.3.	Ventajas y desventajas de usar el sistema promotor AOX1.....	13
Tabla 6.1.	Reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa. ...	30
Tabla 6.2.	Secuencias de cebadores diseñados para amplificar los cuatro transportadores reportados en NCBI.....	35
Tabla 6.3.	Reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa. ...	36
Tabla 7.1.	Concentración y pureza de ADN genómico aislado de <i>P. pastoris</i>	40
Tabla 7.2.	Resultado del análisis de la herramienta BLAST en la base de datos de NCBI	41
Tabla 7.3.	Parámetros cinéticos de crecimiento de biomasa obtenidos del ajuste con el modelo logístico	47
Tabla 7.4.	Parámetros cinéticos de consumo de glicerol obtenidos del ajuste con el modelo de Pirt	53
Tabla 7.5.	Concentración y pureza de ADN genómico aislado de <i>P. pastoris</i>	58
Tabla 7.6.	Resultado del análisis de comparación de amplicones secuenciados con la base de datos con NCBI.	59

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Levaduras

1.1.1. Definición, generalidades y caracterización de levaduras

Una levadura es un hongo unicelular que tiene un núcleo simple y se reproduce de manera sexual (a través de la formación de esporas) o asexual (por gemación y división transversal) (Prescott, 2002). El tamaño de las levaduras puede variar considerablemente, dependiendo de las especies y condiciones de crecimiento. Algunas levaduras pueden tener sólo 2-3 μm de longitud, mientras que otras pueden alcanzar longitudes de 20-50 μm (Walker, 2009). Son comúnmente esféricas, no cuenta con flagelos pero poseen más organelos que otros eucariotas (Prescott, 2002). Algunos hongos son dimórficos, es decir pueden crecer en forma miceliar o en forma levaduriforme en función de la adecuación al ambiente donde se desarrollen. Las levaduras incluyen hongos con forma sexual (levaduras basidiomicetos y levaduras ascomicetos) y asexual (Choudhary & Johri, 2009). Las especies de levaduras, pueden ser identificadas y caracterizadas de acuerdo a varios criterios, basados en la morfología celular, la fisiología, inmunología y mediante marcadores moleculares (Walker, 2009).

1.1.2. Levaduras de importancia en biotecnología

Las levaduras se usan para la preparación de vino, cerveza y pan desde hace miles de años. Derivado del profundo conocimiento sobre la biología de *Saccharomyces cerevisiae*, ésta fue la primera levadura en ser usada para la producción de proteínas heterólogas, como el interferón (Hitzeman *et al.*, 1981) o el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (Valenzuela *et al.*, 1982). Muchas otras levaduras, como *Arxula adenivorans*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica* se han usado también para la producción de proteínas heterólogas (Mishra & Baranwal, 2009). La selección de levaduras como sistemas alternativos se basa en su capacidad de utilizar fuentes de carbono baratas: por ejemplo, los géneros *Hansenula*, *Candida*

y *Pichia* se usan como organismos productores debido a su capacidad para usar metanol como única fuente de carbono (Gleeson & Sudbery, 1988). El empleo de metanol por *Pichia* involucra la acción de una proteína alcohol oxidasa que convierte metanol en formaldehído, éste es convertido a dióxido de carbono y agua por la actividad subsiguiente de dos enzimas: la formaldehído deshidrogenasa y la formiato deshidrogenasa. El peróxido de hidrogeno que se genera también como producto es convertido en agua y oxígeno por medio de una catalasa. El promotor de la enzima alcohol oxidasa es inducible por metanol y reprimido por glucosa y etanol, este promotor en particular se ha utilizado para regular la inducción de la expresión de proteínas heterólogas.

Pichia pastoris se usa para la producción de proteína celular simple (SCP) y proteínas heterólogas (foráneas del propio microorganismo) usando el promotor de la enzima alcohol oxidasa (Mishra & Baranwal, 2009). Las levaduras como *Candida tropicalis*, algunas especies de *Torulopsis* y *Y. lipolytica* se seleccionaron, por ejemplo, con base en su capacidad para utilizar *n*-alcanos como fuente de carbono. Otros sustratos hidrófobos como los ácidos grasos y aceites pueden ser usados también por *Y. lipolytica* (Fickers *et al.*, 2005). Algunas de estas levaduras se usan para la producción de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) vitaminas y coenzimas (Mishra & Baranwal, 2009). El metabolismo de *n*-alcanos se realiza por conversión de ácidos grasos, que son degradados a dióxido de carbono y agua por la ruta de la β -oxidación. En estas levaduras, las enzimas de esta vía se localizan en los peroxisomas. Una de las levaduras empleadas recientemente para la expresión de proteínas heterólogas es *Arxula adenivorans*, ésta puede crecer sobre un gran número de fuentes de carbono, tales como almidón, ácido tánico, *n*-alcanos y purinas (Steinborn *et al.*, 2007). Las levaduras tales como *Brettanomyces naardenensis*. Algunos géneros como *Pichia*, *Candida* y especies como *Pachysolen tannophilus* son también capaces de utilizar pentosas como la xilosa como fuente de carbono (Bhavdish & Devendra, 2009; Steinborn *et al.*, 2007).

1.1.3. Levaduras como sistema de expresión eucariótico

Las levaduras son organismos eucariotas que en la actualidad se utilizan para la expresión de una amplia variedad de proteínas heterólogas de origen diverso (Tabla 1.1). Adicionalmente, es importante destacar que un amplio número de secuencias de ADN de levaduras están disponibles gracias al progreso de varios proyectos encaminados a estudiar su genoma; información que eventualmente podrá utilizarse para la optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes. Los métodos para la expresión eficiente y la producción de proteínas heterólogas, con propósitos tanto industriales como académicos, están actualmente bajo intensa investigación (Gerngross, 2004). Las levaduras combinan la ventaja de los sistemas de expresión bacteriana en términos de su fácil manipulación y tecnología de fermentación controlada con la capacidad para desarrollar procesos de eucariotas, como es la expresión de polipéptidos asociada a complejas modificaciones postraduccionales (Gellissen & Hollenberg, 1997). Una diferencia respecto de las líneas celulares eucariontes superiores productoras de proteínas recombinantes es la capacidad de las levaduras de producir mayores cantidades de proteína (superior a 14.8 g/L) en un medio definido relativamente barato (libre de suplementos derivados de animal) y un proceso de fermentación corto (pocos días), fácilmente escalable a 100 m³. Por consiguiente, arroja mejores cifras en cuanto a rendimiento (Gerngross, 2004). Gerngross (2004) resume cinco parámetros primarios para la evaluación de plataformas de expresión de proteínas:

- El costo de purificación y manufactura
- La capacidad para el control de su procesamiento postraduccionales
- El tiempo requerido para la obtención de la proteína
- La vía reguladora para aprobar una droga/proteína producida en una plataforma de expresión específica
- El conjunto de derechos de patente asociadas con la producción de un producto recombinante en un huésped en particular

La generación de productos terapéuticos basados en proteínas constituyen una clase amplia de nuevos químicos que actualmente se desarrollan por compañías farmacéuticas (Walsh, 2003). Estas empresas están enfocando sus esfuerzos en innovación en el desarrollo de procedimientos para la obtención de productos de alto valor agregado con efectos terapéuticos y para ello están empleando levaduras, pues son capaces de producir estas proteínas recombinantes con características más similares a los organismos que naturalmente las producen, a diferencia de las bacterias (Nel *et al.*, 2009). Una de estas propiedades es la glicosilación, un factor de especial relevancia a efectos de que la actividad enzimática sea lo más parecida a su contraparte nativa. Las levaduras tienen la capacidad para glicosilar glicoproteínas, sin embargo, la N-glicosilación en levaduras ha sido asociada con la hipermanosilación de oligosacáridos (Gerngross, 2004), ocasionando consecuentemente proteínas con un plegamiento, función y estabilidad medianamente óptimo en plasma sanguíneo de los humanos (Helenius & Aebi, 2001). Por otra parte, la abundancia de herramientas en biología molecular y otras técnicas de aplicación en levaduras ha posibilitado para investigadores del GlycoFi Inc. (USA) y del Instituto de investigación coreano de Biociencias y Biotecnología (por sus siglas en inglés KRIBB, Corea), trabajar para que la N-glicosilación humana sea modelada en glicoproteínas producidas por *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (Gellissen *et al.*, 2005; Wildt & Gerngross, 2005). De esta manera la producción de proteínas recombinantes producidas por levaduras ha podido penetrar en los productos de mayor valor agregado, los biofármacos con acción terapéutica en salud humana. Estos ejemplos demuestran que las levaduras pueden ser una alternativa y uno de los mejores sistemas hospederos para la producción de un conjunto de proteínas terapéuticas (Nel *et al.*, 2009). Otro de los inconvenientes que recurrentemente aparecen en la producción de proteínas recombinantes es la presencia en las secuencias de los denominados codones preferenciales, es decir codones que utiliza un organismo preferentemente para codificar la información para un aminoácido, cuando el organismo nativo y el utilizado no utilizan los mismos codones. La expresión del gen presentaría deficiencias respecto del organismo de origen (Gustafsson *et al.*, 2004). La síntesis artificial, junto con tablas de codones

preferentes accesibles en internet, permite un diseño personalizado de genes y una optimización de los codones preferentes, para que se expresen y traduzcan en varios huéspedes. Esta ha sido una estrategia explotada por varias compañías comerciales como GENEART en Alemania y Codon Devices en USA (Nel *et al.*, 2009).

Tabla 1.1. Proteínas terapéuticas eucariontes expresadas en *S. cerevisiae* (Modificada de Mishra & Baranwal, 2009).

Proteína recombinante	Nombre comercial	Compañía	Indicación terapéutica
Factor de sangre recombinante			
Hirudina/Lepidurin	Refludan	Hoechst Marion Roussel (EUA)	Anticoagulante para trombocitopenia asociada a la heparina
Hirudina/desirudina	Revasac	Canyon pharmaceuticals	Prevención de trombosis venosa
Hormona recombinante			
Insulina	Novolog	Novo Nordisk	Diabetes mellitus
Insulina	Tresiba	Novo Nordisk	Diabetes mellitus
Insulina	Apidra	Aventis (Alemania),	Diabetes mellitus
Insulina	Liprolog	Eli Lilly	Diabetes mellitus
Somatotropina	Valtropin	Biopartners	Perturbaciones de crecimiento en niños y adultos
Glucagón	Glucagen	Novo Nordisk	Hiperglucemia
Enzima recombinante			
urato oxidasa	Fasturtec	Sanofi-Synthelabo	Hiperuricemia
Vacuna recombinante			
Hepatitis B	Ambirix	Glaxo Smith Kline	Inmunización contra hepatitis A y B
Hepatitis B	Pediarix	Glaxo Smith Kline	Inmunización contra hepatitis A y B
Hepatitis B	HBVAXPRO	Aventis Pharma	Inmunización contra hepatitis A y B
Hepatitis B	Infanrix-Penta	Glaxo Smith Kline	Inmunización contra la difteria, tétanos, tosferina y hepatitis B
Hepatitis B	Procomvax	Aventis Pasteur	Inmunización contra <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y hepatitis B
Hepatitis B	Primavax	Aventis Pasteur	Inmunización contra difteria, tétanos y hepatitis B
Hepatitis B	Twinrix	Glaxo SmithKline	Inmunización contra hepatitis A y B

1.1.4. Generalidades de la asimilación y regulación de compuestos de carbono de levaduras

Una vez que la glucosa es transportada al interior de la célula, se fosforila con una hexoquinasa. Después puede entrar a glucólisis, donde el producto final es el piruvato, que puede incorporarse en dos diferentes vías metabólicas: en presencia de oxígeno puede dirigirse a vía de respiración y en ausencia de oxígeno se dirige a vía fermentativa. Ambas vías son reguladas por la concentración del oxígeno disuelto y del sustrato en el medio, en la Tabla 1.2 se describen algunos de estos fenómenos. Las levaduras del género *Saccharomyces* poseen efecto Crabtree positivo, esto significa que la actividad de la glucólisis se incrementa en presencia de altas concentraciones de glucosa, disminuyendo la capacidad respiratoria en presencia de oxígeno, lo que provoca un incremento en la concentración de piruvato y la formación de etanol (Käppeli, 1986). Este fenómeno se debe a la acción represiva de la glucosa sobre las enzimas de la respiración (Díaz-Montaña & Ramírez-Córdova, 2009). Las diferentes respuestas entre la diferencia de Crabtree positivo y Crabtree negativo se explica en términos de consumo de azúcar, eficiencia glucolítica, limitación anabólica y niveles enzimáticos de piruvato descarboxilasa, alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintetasa (Postma *et al.*, 1989). En levaduras con efecto Crabtree positivo (*S. cerevisiae*, por ejemplo), la respuesta a un pulso de glucosa induce principalmente la transcripción de los genes de las enzimas fermentativas: piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. Por otra parte, levaduras que presentan efecto Crabtree negativo presentan bajos niveles de enzimas fermentativas, pero presentan una alta actividad de enzimas oxidativas (piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintetasa), permitiendo la generación de altas concentraciones de biomasa, CO₂ y pequeñas cantidades de etanol (Díaz-Montaña & Ramírez-Córdova, 2009).

Tabla 1.2. Regulación del metabolismo: efecto combinado de la concentración de oxígeno y azúcar (Díaz-Montaño & Ramírez-Córdova, 2009).

Glucosa (g/L)	1-5	5-150	>150	
Aerobiosis	Metabolismo respiratorio (Efecto Pasteur)	Metabolismo fermentativo (Efecto Crabtree)	Inhibición sustrato respiración	por o
Anaerobiosis	Metabolismo fermentativo	Metabolismo fermentativo lento		

1.2. Transportadores de membrana y su función

Los transportadores de membrana son fundamentales para la regulación homeostática en la fisiología de las levaduras, aquellos con funciones similares se han analizado estableciendo un conjunto de grupos para su análisis filogenético. La especificidad del sustrato está relativamente conservada en la evolución, lo que ha permitido sentar el postulado de que el análisis filogenético basado en secuencias puede ser utilizado para la asignación de una función enzimática (Ren & Paulsen, 2009). El sistema de clasificación de los sistemas de transporte es, por consiguiente, apropiado para catalogar las familias de los transportadores de membrana de acuerdo a los siguientes elementos: mecanismo de transporte, mecanismos acoplados a energía, filogenia molecular y especificidad de sustrato. Teniendo en consideración lo anterior, existen cuatro grandes clases de transportadores de solutos: canales, transportadores secundarios, transportadores activos primarios y translocadores de grupo (Figura 1.1). Otros transportadores con función o mecanismo desconocidos se incluyen en una clase alternativa. Las cinco clases de transportadores son las siguientes (Ren & Paulsen, 2009):

- **Clase 1:** Poros ó canales, son transportadores que no precisan de energía para su funcionamiento. Transportan agua, iones específicos, y pequeñas moléculas hidrofílicas. Disminuyen la concentración o el gradiente eléctrico con altas velocidades de transporte y baja estéreo-especificidad, en comparación con otras clases de transportadores. La mayoría de los canales iónicos son también llamados canales de barrera.

- **Clase 2:** Transportadores secundarios (también llamados acarreadores). Estos transportadores dirigen el potencial electroquímico, utilizan el gradiente de un ión o de un soluto electroquímico, por ejemplo, la fuerza motriz protón/sodio que dirige procesos de transporte. Los uniportadores transportan un solo tipo de moléculas. Los antiportadores y simportadores asocian el transporte de un ion o molécula en contra de su gradiente de concentración con el movimiento de uno o más iones/moléculas diferentes.
- **Clase 3:** Transporte activo primario. Estos transportadores requieren un aporte energético, transportan sustratos a través de la membrana en contra de un gradiente químico de concentración o de un potencial eléctrico.
- **Clase 4:** Los Translocadores de grupo. Estos modifican los sustratos durante el proceso de transporte. Fosforilan los sustratos usando fosfoenolpiruvato (PEP) y liberan el sustrato fosforilado dentro del citoplasma (por ejemplo: azúcares).
- **Clase 5:** sistemas de transporte no completamente caracterizados. de esta familia de transportadores se tiene información insuficiente para poderlos clasificar en una de las clases anteriores.

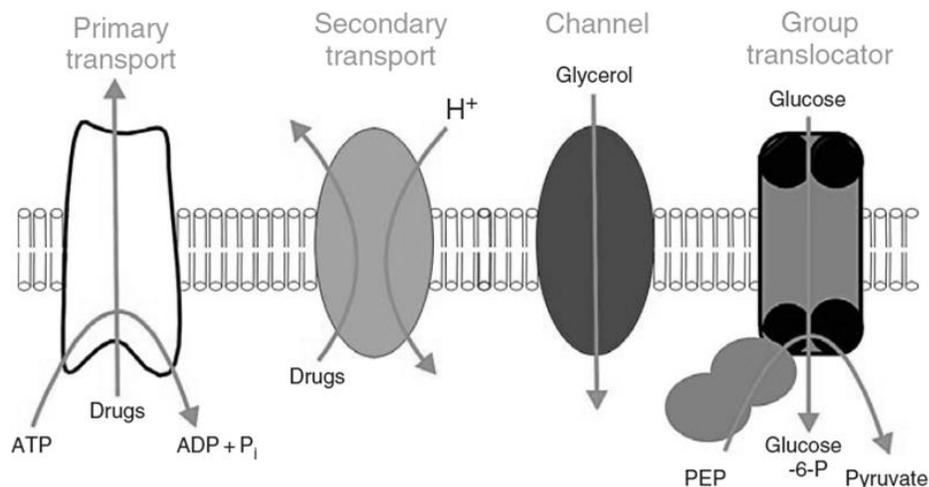


Figura 1.1. Representación de los cuatro principales tipos de transportadores. De izquierda a derecha: Transportador primario; transportador secundario; Canal de glicerol y translocador de grupo (modificado de Ren & Paulsen, 2009).

1.3. Levaduras metilotróficas

Las levaduras metilotróficas son objeto de un interés creciente para investigación básica y también como huéspedes atractivos para la producción de proteínas biológicamente activas. Estas levaduras son un grupo de microorganismos capaces de usar metanol como fuente de carbono y energía. Su adaptación para crecer en metanol está asociada con la inducción de la metanol oxidasa (también llamada alcohol oxidasa), dihidroxiacetona sintasa y otras enzimas involucradas en el metabolismo del metanol. La enzima más expresada en estas levaduras es la alcohol oxidasa. Aunque está prácticamente ausente en células cultivadas con glucosa, puede representar más del 30% de la proteína celular en células cultivadas con metanol. Por otra parte, es preciso destacar que el aprovechamiento del metanol implica un fuerte incremento de la actividad celular ligada a los peroxisomas, orgánulos donde se encuentran estas enzimas. En este sentido, la cantidad de peroxisomas representa más de 80% del volumen celular (Veenhuis *et al.*, 1983). Debido a estas características, las levaduras metilotróficas han ganado la atención de bioquímicos, biólogos moleculares, biólogos celulares, biotecnólogos, microbiólogos y químicos de universidades e industrias (Nel *et al.*, 2009). El uso de estos organismos en investigaciones básicas se relaciona principalmente con el estudio de la regulación homeostática relacionada con los peroxisomas y la asimilación de nitratos (Perez *et al.*, 1997; Veenhuis *et al.*, 2000). Los peroxisomas contienen las enzimas claves involucradas en el metabolismo del metanol, llamadas: alcohol oxidasa (AOX), dihidroxiacetona sintasa (DHAS) y catalasa (CAT). Las dos proteínas AOX y DHAS pueden constituir más del 60% del total de las proteínas celulares en condiciones de crecimiento con metanol, predominancia que se debe a que los genes que codifican estas proteínas son controlados por promotores muy fuertes. Esta característica contribuye en el reconocimiento de las levaduras metilotróficas como huéspedes atractivos para la producción de proteínas heterólogas (Nel *et al.*, 2009).

La vía para metabolizar metanol en organismos metilotróficos (Figura 1.2), comienza con **1**: la oxidación de metanol por la alcohol oxidasa, la reacción genera

formaldehído y peróxido de hidrógeno. **2:** el peróxido de hidrógeno es tóxico para la célula, disociándose en agua y oxígeno por acción de una catalasa. **3, 4:** por una vía de asimilación, el formaldehído es oxidado por dos reacciones subsecuentes de deshidrogenación a dióxido de carbono por la formaldehído deshidrogenasa (FLD) y la formiato deshidrogenasa (FMD). **5:** para que el formaldehído se asimile, éste reacciona con la xilulosa-5-fosfato (Xu5P) por acción de la dihidroxiacetona sintasa (DAS) para generar dos compuestos de tres carbonos: el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona (DHA). **6:** La DHA se fosforila por una dihidroxiacetona kinasa (DAK) para generar dihidroxiacetona fosfato (DHAP). **7:** GAP y DHAP reaccionan para constituir fructosa 1,6-bisfosfato (FBP). **8:** en los últimos pasos se genera fructosa 6-fosfato y xilulosa-5-fosfato (Gellissen, 2000).

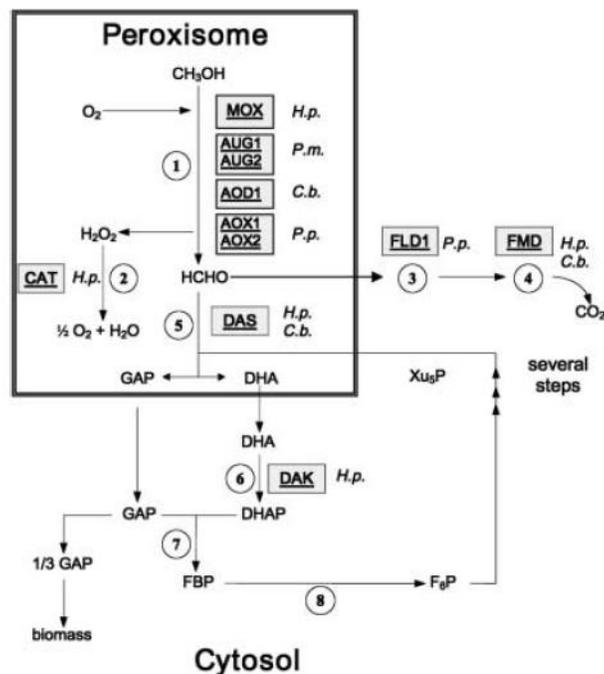


Figura 1.2. Vía metabólica de metanol, el nombre de los genes se presenta en la enzima que traduce, C.b. = *Candida boidinii*, P.m. = *Pichia methanolica*, P.p. = *Pichia pastoris* y H.p. = *Hansenula polymorpha* (modificado de Gellissen, 2000).

1.4. *Pichia pastoris*

1.4.1. Historia

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica que puede crecer en metanol como única fuente de carbono y energía. Phillips Petroleum Company fue la primera compañía en desarrollar un medio y los protocolos para cultivar *P. pastoris* con metanol en cultivo continuo. En la década de los setenta del siglo pasado, *P. pastoris* se consideró como una fuente potencial de proteína unicelular para alimentación estándar, debido a su capacidad para utilizar metanol como fuente carbono. Sin embargo, la crisis del petróleo de esos años causó un dramático incremento en el costo del metano (la fuente del metanol) y por ende también en el costo del proceso de producción, aproximadamente 5 dólares por libra de proteína producida (Nel *et al.*, 2009). El resultado de este problema llevó a Phillips Petroleum Company a invertir en esfuerzos para desarrollar esta levadura como un sistema de expresión para la producción de proteínas (Sreekrishna & Kropp, 1996). Como resultado de la construcción de vectores para transformación, generación de marcadores y métodos de fermentación que se desarrollaron para la explotación de estos sistemas (Rosenfeld, 1999), *P. pastoris* ganó ampliamente la atención por ser un sistema de expresión capaz de producir altos niveles de proteínas heterólogas. La compañía Research Corporation Technologies (Tucson, Arizona, USA) tiene actualmente los derechos de patente del sistema de expresión en *P. pastoris* y la compañía Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA), tiene una licencia exclusiva para vender el Kit de expresión de *Pichia* para propósitos de investigación realizada por científicos (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

1.4.2. Definición y generalidades

El género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes*, subphylum *Saccharomycotina*, phylum *Ascomycota*, reino *Fungi*. Esta levadura presenta reproducción sexual con producción de ascosporas (ocho esporas por asca, con baja viabilidad). En medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o crema. Al microscopio se pueden observar

múltiples yemas. *P. pastoris* es una levadura del tipo metilotrófica y homotática, puede crecer muy bien usando metanol y ácidos grasos como única fuente de carbono (Wegner & Harder, 1987; Walker, 2009), esto es posible gracias a la sobrerregulación en la expresión de genes cruciales (la alcohol oxidasa, AOX; y la proteína multifuncional beta-oxidasa, FOX2) y a la existencia de múltiples peroxisomas cuando *P. pastoris* está creciendo en estas fuentes de carbono (Ellis *et al.*, 1885; Wriessnegger *et al.*, 2007). A diferencia de las cepas homotáticas de *S. cerevisiae*, las cuales son diploides, *P. pastoris* permanece en forma haploide a menos que sea forzada a reproducirse. Para obtener esporas, las células diploides deben cultivarse en un medio limitado de nitrógeno, el cual propicia la esporulación a través de la meiosis (Cereghino & Cregg, 2000).

1.4.3. *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas

Un limitado número de especies de levaduras son capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía. Este grupo de levaduras metilotróficas incluyen a *Candida boidinii*, *Pichia methanolica*, *P. pastoris* y *Hansenula polymorpha*, todas ellas sistemas atractivos para la expresión de genes heterólogos (Gellissen, 2000). El atractivo de *P. pastoris* como un organismo hospedero para la producción de proteínas heterólogas se debe a sus características únicas, tales como: la facilidad de ser modificada genéticamente con técnicas simples, procesos de purificación simples para la proteína heteróloga secretada, modificaciones postraduccionales que realizan los eucariotas, secuencias señal, procesos proteolíticos, no secreción de endotoxinas y alto nivel de expresión de proteínas heterólogas (Cereghino & Cregg, 2000; Hellwing *et al.*, 2001). Para la expresión recombinante de genes en *P. pastoris* es preciso contemplar tres elementos fundamentales: a) Inserción del gen dentro de un vector de expresión. b) Introducción del vector de expresión en el interior de *P. pastoris*. c) Análisis de las cepas potenciales que expresen el gen foráneo insertado. En la mayoría de proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris*, las enzimas requeridas para el metabolismo de metanol están presentes sólo cuando las células son cultivadas en

presencia de metanol como única fuente de carbono (Egli *et al.*, 1980; Veenhuis *et al.*, 1983). Los promotores AOX son los usados más ampliamente, en la Tabla 1.3 se detallan las ventajas y desventajas de la utilización del promotor AOX. El promotor AOX1 es de los más usados y de los más reportados de todos los promotores disponibles para *P. pastoris* (Cereghino *et al.*, 2001). Sin embargo, existen otros promotores utilizables, como el promotor constitutivo GAP (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), mucho menos utilizado porque se cree que la producción constitutiva de proteína heteróloga en *P. pastoris* puede tener efectos citotóxicos (Menéndez *et al.*, 2004). Investigaciones recientes han mostrado que no necesariamente hay efectos citotóxicos, sino que también los niveles de la producción de la proteína recombinante (exo-levanasa LSdB) son similares empleando el promotor GAP o el promotor AOX1 (Menendez *et al.*, 2004). La actividad de la enzima levanasa que se reportó en esta investigación es de 21.1 U/mL con el promotor AOX1 (usado como control) y 26.6 U/mL con el promotor GAP. Además, la producción de biomasa y el tiempo de la fermentación mostraron una marcada diferencia: bajo el control del promotor AOX1 se reportaron 115.2 g/L biomasa en peso seco y 96 horas; y con el promotor GAP se reportaron 59.5 g/L de biomasa en peso seco y 39 horas, por lo que no existe una relación entre la biomasa y la producción de proteína recombinante (Menendez *et al.*, 2004).

Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de usar el sistema promotor AOX1 (modificado de Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Ventajas	Desventajas
La transcripción de la proteína heteróloga está muy bien regulada y controlada por un mecanismo de represión/expresión	El monitoreo del metanol durante un proceso es frecuentemente difícil, debido a la poca fiabilidad de las pruebas en línea y las complicaciones al cuantificarlo después del proceso
Pueden ser expresados altas cantidades de proteína, siempre y cuando éstas no sean tóxicas para la célula	El metanol es inflamable; así que debe evitarse almacenar grandes cantidades
La represión de la transcripción por la fuente de carbono inicial asegura obtener un buen crecimiento antes de que el gen se sobreexpresé	El metanol es el principal derivado de fuentes petroquímicas, por lo cual no es adecuado para su uso en la producción de ciertos productos alimenticios y aditivos
La inducción de la transcripción se logra fácilmente por la adición de metanol	Se requieren dos fuentes de carbono, que sean asimiladas una después de la otra en un punto preciso de la cinética de crecimiento

1.4.4. Transporte y asimilación de carbono en *Pichia pastoris*

La levadura *P. pastoris*, al igual que otras levaduras, puede producir energía a través de la fermentación de azúcares como glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, etc., y polialcoholes como sorbitol y manitol, pero también puede obtener energía de la oxidación de varios productos de fermentación, como el glicerol, etanol y lactato. Además, se sabe bien que *P. pastoris* es una levadura metilotrófica porque es capaz de usar metanol como única fuente de carbono y energía (Calik *et al.*, 2015) (ver Figura 1.3). La velocidad de los procesos de transporte están relacionados con la cinética de crecimiento de los microorganismos (Mattanovich *et al.*, 2009). Los carbohidratos son asimilados por la célula en cierto orden, con fases de adaptación (Lag) intermitentes, debido a la regulación de los mecanismos controlados desde la transcripción de los genes que codifican los transportadores. Estos procesos son finamente regulados por la concentración de glucosa en el medio. Por ello, la presencia o asimilación de glucosa tiene un impacto negativo sobre el metabolismo de otros azúcares (Klein *et al.*, 1998). Ciertas levaduras como *P. pastoris* tienen una velocidad limitada de consumo de glucosa, debido a que poseen menos genes de transportadores de hexosas. Además, para levaduras Crabtree negativas el valor de su K_s (Constante de saturación) para glucosa está usualmente en un rango de μM . La velocidad de consumo de glucosa ($q_{\text{Glc max}} = 0.35 \text{ g g}^{-1}\text{h}^{-1}$) de *P. pastoris* en cultivo quimiostático es 8 veces más baja que la reportada ($q_{\text{Glc max}} = 2,88 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para *S. cerevisiae*, con una tasa máxima específica de crecimiento de $\mu_{\text{max}} = 0.19 \text{ h}^{-1}$ (Baumann *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2006). La velocidad de asimilación de glucosa en *P. pastoris* está limitada por el sobreflujo metabólico, que puede causar un bajo rendimiento celular y la reducción de la formación del producto deseado. Adicionalmente, se han reportado dos secuencias de transportadores de alta afinidad para glucosa (GenBank: XM_002490661 y XM_002490840.1) en *P. pastoris* similares a las de los transportadores de hexosas de *Kluyveromyces lactis* y *S. cerevisiae*. Además de estos, se ha encontrado un receptor de hexosas (*SNF2*) correspondiente a la secuencia PIPA01691 (Mattanovich *et al.*, 2009). Zhang *et al.*, (2010), encontraron dos transportadores de hexosas codificados por *PpHXT1* y *PpHXT2*, reportando que estos dos transportadores pueden transportar

fructosa y glucosa. Sin embargo, no se han podido localizar en su genoma. Por otra parte, se ha observado que *S. cerevisiae* puede asimilar manosa o xilosa, aunque con baja afinidad, con la ayuda de los transportadores Hxt1p y Hxt4p para glucosa (Runquist *et al.*, 2010). No se tiene información de que algún sistema de asimilación de estos sustratos se encuentren en *P. pastoris*.

Por otra parte, *S. cerevisiae* posee un gen que codifica un transportador de galactosa (*GAL2*), sin embargo *P. pastoris* no posee un gen específico para galactosa, pero el transporte de este sustrato podría darse con algún transportador de hexosas. *P. pastoris* a su vez es incapaz de metabolizar sacarosa por la ausencia de la enzima invertasa (Calik *et al.*, 2015), pero posee un transportador (transportador α -glucósido) de alta afinidad para maltosa [GenBank: XM_002493374]. No se tiene información en la base de datos del NCBI de que el genoma de *P. pastoris* tenga un gen que codifique una trehalasa o un transportador específico para trehalosa. Inan & Meagher, (2001) reportaron que la trehalosa puede ser asimilada por *P. pastoris*, así que se puede especular que en esta levadura podría ser hidrolizada por una α -glucosidasa (Calik *et al.*, 2015). *P. pastoris* no puede metabolizar lactosa, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, probablemente debido a la ausencia en su genoma de genes que codifiquen las enzimas α -galactosidasa o β -galactosidasa. El gen *JEN1* en *S. cerevisiae* codifica para un transportador de lactato, mientras su ortólogo (PIPA05648) en *P. pastoris* codifica un transportador de ácido carboxílico (Soares-Silva *et al.*, 2003). Mattanovich *et al.*, (2009) secuenciaron el genoma de *P. pastoris* e identificaron mediante un análisis con BLAST cuatro genes (PIPA00047, PIPA09569, PIPA03381 y PIPA03357) que codifican cuatro transportadores de glicerol de tipo simportador glicerol/protón. Estos genes tienen una alta similitud con los genes que codifican los transportadores de glicerol en *K. lactis* (KLLA0A03223g) y *Y. lipolytica* (YALI0F06776g) y una baja similitud con el gen *STL1* que codifica el transportador de glicerol en *S. cerevisiae*. La diferencia en el número de transportadores de *P. pastoris* y *S. cerevisiae* puede estar relacionada con la diferencia en la velocidad de consumo de este sustrato y la velocidad de crecimiento. La tasa máxima específica de consumo de glicerol de *P.*

pastoris reportada es $q_{\text{Glyce max}} = 0.37 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que la tasa máxima de consumo de glicerol de *S. cerevisiae* es de $q_{\text{Glyce max}} = 0.046 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Además, la tasa máxima específica de crecimiento de *P. pastoris* en glicerol se ha reportado de 0.26 h^{-1} (Mattanovich *et al.*, 2009), lo que sugiere que bajo ciertas condiciones de cultivo el glicerol es mejor para el crecimiento celular que la glucosa (debido probablemente a su alto grado de reducción). Pero estos valores pueden cambiar con base en la composición del medio y las condiciones de transferencia de oxígeno (Calik *et al.*, 2015). La glucosa y el glicerol son asimilados por el metabolismo de carbono por la vía de la glucólisis, la regulación para cada uno es diferente. No se han realizado estudios comparativos del transcriptoma inducido con glucosa y glicerol, sin embargo sí existen estudios de este tipo en *S. cerevisiae*, en los que se ha observado que la adición de glucosa a células cultivadas previamente en glicerol origina un cambio rápido en los patrones de fosforilación de proteínas, así como una reestructuración masiva del estado transcripcional de los genes (más del 40 % de genes en *S. cerevisiae* duplican su expresión cuando se les añade glucosa después de haberse cultivado en glicerol). Este cambio en la transcripción involucra el incremento en la expresión de genes relacionados con la biogénesis de ribosomas y la represión de genes requeridos para la fosforilación oxidativa y otras funciones mitocondriales (Zaman *et al.*, 2008). Y podría pensarse que estos cambios transcripcionales pueden extrapolarse a *P. pastoris*.

Se ha reportado que *P. pastoris* puede utilizar manitol y sorbitol para el crecimiento y como fuente de energía. Sin embargo no hay transportadores para estos compuestos anotados en su genoma, aunque se ha sugerido que el transporte al interior de la célula se da por fosfotransferasas, mecanismo que pertenece a la categoría de translocación de grupo (Calik *et al.*, 2015). La mayoría de las fuentes de carbono son catabolizadas por *P. pastoris* a través de la glucólisis, sin embargo existe poca información relacionada sobre la regulación de su vía glucolítica. El piruvato es clave para entender el flujo central del metabolismo, que puede dar indicios de la regulación de la glucólisis. En condiciones de anaerobiosis y con altas concentraciones de piruvato, la respiración es reprimida. El piruvato es dirigido hacia acetaldehído, para

formar etanol por la acción catabólica de la alcohol deshidrogenasa, y el NADH generado durante la glucólisis es oxidado para mantener el balance rédox y la sobrevivencia del microorganismo (Calik *et al.*, 2015). El gen *PDC* de *P. pastoris* expresa la piruvato descarboxilasa (Shutter *et al.*, 2009; Kueberl *et al.*, 2011). Se ha reportado una K_m de 4.2 mM para la enzima PDCp en *P. pastoris*, un valor significativamente alto comparado con la K_m (2.0 mM) de tres enzimas PDCp de *S. cerevisiae*. Además de la baja afinidad de la enzima PDCp de *P. pastoris* para el piruvato, la enzima también tiene 30 veces menos eficiencia de descarboxilación que la enzima PDCp de *S. cerevisiae* (Agarwal *et al.*, 2013). Por ello, el fenotipo Crabtree negativo de *P. pastoris* puede ser ocasionado por la baja eficiencia de descarboxilación de la enzima PDC o por la existencia de la acetaldehído deshidrogenasa y la acetilCoA sintetasa, enzimas mediadoras de la formación de AcCoA a partir de piruvato, metabolito empleado posteriormente para el crecimiento en el Ciclo TCA o durante la biosíntesis de lípidos, en lugar de generar etanol por la vía de fermentación. Agarwal *et al.*, (2013) reportaron los parámetros cinéticos de la enzima PDCp de *P. pastoris* para establecer si la glucosa y otros azúcares puede causar un impacto en la capacidad respiratoria. Los autores reportaron que las más altas actividades de PDCp fueron obtenidas con crecimiento en glucosa, seguido por el glicerol. Sin embargo, con metanol y etanol la actividad de PDCp fue insignificante. Esta información sugiere que la actividad de PDCp está inducida por cualquiera de los sustratos de la vía de la glucólisis. La piruvato kinasa cataliza la síntesis de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), que es el sustrato para la proteína kinasa A (PKAp). Tanto en *P. pastoris* como en *S. cerevisiae*, PKAp regula la actividad de la enzima PYK1p por fosforilación. Recientemente, Heyland *et al.*, (2011) investigaron el efecto de la sobreproducción de r-proteínas en el metabolismo de células cultivadas en glucosa (Calik *et al.*, 2015). La síntesis de proteínas es un proceso que requiere mucha energía, por lo que la vía de los TCA es fundamental en la sobreproducción de proteínas. Los flujos absolutos del ciclo TCA se mantienen constantes, independientemente de la producción de proteínas y la sobrecarga metabólica en la célula, por lo que el metabolismo se compensa con el decrecimiento del rendimiento celular y la velocidad

específica de crecimiento así como de la velocidad de consumo de glucosa (Heyland *et al.*, 2011). Lo más significativo es que la síntesis de aminoácidos representa uno de los procesos más costosos a nivel energético y se sugiere que es el proceso metabólico limitante en la sobreproducción de proteínas (Heyland *et al.*, 2011). Aún se tiene poca información sobre todas las vías reguladoras del metabolismo de *P. pastoris*, el metabolismo celular y la fisiología celular de esta levadura pero se están investigando. La implementación de técnicas como la transcriptómica, proteómica, metabolómica y flujómica, contribuirían a entender el metabolismo en un marco de referencia más amplio, para posteriormente aprovecharlo en procesos de interés biotecnológico.

1.4.5. Transporte y metabolismo de glicerol en *Pichia pastoris*

El glicerol es la fuente de carbono principal que en la actualidad se está empleando con *P. pastoris* para la generación de productos de alto valor agregado (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). El glicerol puede penetrar al interior celular a través de tres mecanismos i) difusión pasiva, ii) difusión facilitada y iii) transporte activo. La difusión pasiva de glicerol es medible, pero baja, y se ha visto que se reduce en condiciones en las que las células están creciendo en una alta osmolaridad (Hohmann, 2002). El glicerol puede permear la membrana plasmática (entrada) de *S. cerevisiae* a través del canal Fps1p (difusión facilitada) expresado constitutivamente (van Aelst *et al.*, 1991; Olivera *et al.*, 2003) y a través de un transporte activo de glicerol de tipo simportador/protón (Na^+ / H^+) que se ha caracterizado fisiológicamente en *S. cerevisiae* (Lages & Lucas, 1997). Estos sistemas tienen un papel central en la regulación de la concentración intracelular de glicerol (Sutherland *et al.*, 1997; Tamas *et al.*, 1999). Este sistema de transporte de glicerol ha mostrado ser reprimible por glucosa, pero es inducido por crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Lages & Lucas, 1997). El sistema de transporte de glicerol había sido asociado con dos genes *GUP1* y *GUP2*, se creía que las proteínas homólogas que codificaban (Gup1p y Gup2p) eran las encargadas del transporte activo de glicerol en *S. cerevisiae* (Holst *et al.*, 2000). Pero más tarde Neves *et al.*, (2004) publicaron que una cepa con estos genes eliminados (*gup1 gup2 gut1*) mostraba transporte de glicerol. Las células recolectadas a mitad de la fase diáuxica mostraron la mayor actividad de transporte de glicerol en *S. cerevisiae*, por lo que sugirieron que las proteínas Gup1p y Gup2p no estaban relacionadas con el transporte de glicerol. La eliminación del gen *STL1*, el cual codifica un miembro de la familia de transportadores de azúcares, eliminó por completo el transporte activo de glicerol en *S. cerevisiae* (Ferreira *et al.*, 2005). La proteína Stl1p está presente en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* en condiciones en las que un simportador de glicerol es funcional. La proteína Stl1p y el transporte activo de glicerol están sujetos a inactivación por glucosa y son fuertemente inducidos en condiciones de estrés osmótico y con fuentes de carbono no fermentables, como el etanol. Esta investigación sugirió que el gen *STL1* codifica el simportador

glicerol/protón en *S. cerevisiae* (Ferreira *et al.*, 2005). La secuenciación del genoma de *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009) y la secuencia de este gen permitió a este equipo de investigación identificar mediante un análisis con BLAST cuatro genes en el genoma de *P. pastoris* (PIPA00047, PIPA09569, PIPA03381 y PIPA03357) que codifican cuatro transportadores de glicerol de tipo simportador glicerol/protón. Aún se tiene poca información de la caracterización fisiológica de estos genes en ciertas condiciones de cultivo de *P. pastoris*. En cuanto a la ruta que sigue el glicerol una vez que penetra en la célula, a continuación se describe las principales reacciones bioquímicas: una vez que el glicerol entra a la célula se fosforila por la glicerol quinasa (GLPKp), para formar glicerol 3-fosfato (G3P). Posteriormente ocurre la oxidación del G3P a DHAP, debida a la acción de la enzima, dependiente de FAD glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDp). Finalmente, la DHAP continúa la segunda fase de la vía glicolítica y se obtiene el ácido pirúvico. El piruvato es posteriormente oxidado a acetil-CoA y alimenta el ciclo de los ácidos tricarbónicos de donde se obtienen GTP, NADH⁺ + H⁺ y FADH₂; estos dos últimos serán utilizados posteriormente para generar ATP a través de la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa (Calik *et al.*, 2015; Ratledge, 2001; Ren *et al.*, 2003) (ver Figura 1.3).

1.5. Características fundamentales del Cultivo en Medio Sólido (CMS)

El cultivo en medio sólido está ganando atención tanto de investigadores como de la industria, debido a varias ventajas sobre el cultivo sumergido (SmF) o líquido (CML), particularmente porque el cultivo en medio sólido requiere menos energía, produce altos rendimientos y genera menos residuos de agua generando un menor riesgo de contaminación, esto particularmente, por el interés de eliminar los desechos sólidos (Ali & Zulkali, 2011). El cultivo en medio sólido es la fermentación de sustratos sólidos con bajos niveles de humedad o de actividad de agua, sin embargo el sustrato debe poseer al menos la humedad necesaria para el crecimiento del microorganismo. El cultivo en medio sólido (CMS) está definido como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles (Viniegra-González, 1997). En

el (CMS) se trabaja como un cultivo en lote alimentado, con una oxigenación rápida pero baja suplementación de azúcar. Estos procesos tienen la ventaja de ser estáticos, sin gasto de energía mecánica (Viniegra-González *et al.*, 2003). El contenido de agua del CML es más del 95% y el contenido de agua de la masa sólida en el CMS oscila entre el 40% y 80% (Shuler & Kargi, 2002). El CMS fue usado desde 1900 para la producción de enzimas y para la producción de penicilina en 1940. El interés del CMS comenzó a mitad de los años setenta del siglo pasado, pero las bases teóricas para el diseño de reactores se comenzaron a establecer alrededor de la década de los noventa (Rohardjo *et al.*, 2006). Actualmente, el CMS tiene una gran atención por las industrias biotecnológicas debido a su potencial aplicación en la producción de metabolitos secundarios, biocombustibles, alimento, químicos industriales y productos farmacéuticos (Ali & Zulkali, 2011).

1.5.1. Comparación entre CMS y CML

Varios autores han discutido las ventajas del CMS sobre CML, las cuales incluyen:

1. Pequeños volúmenes de masa de fermentación o volumen del reactor, lo que da como resultado un bajo costo de operación.
2. Baja contaminación, debido a bajos niveles de mezcla.
3. Fácil separación de productos.
4. Eficiencia de energía.
5. Tecnología simple.
6. Altos rendimientos.
7. El oxígeno está libremente disponible en la superficie de las partículas.

Ali & Zulkali, (2011) resumen las siguientes características que destacan las condiciones de la fisiología del CMS sobre el CML:

1. No se producen desechos en la producción de enzimas.
2. Se asemeja al ambiente natural de los microorganismos productores.
3. Ausencia de co-producción de carbohidratos.

4. Uso de desperdicios o materia de bajo valor para producir productos de alto valor agregado.
5. No se genera espuma.
6. Elimina la necesidad de controles rigurosos durante el proceso de fermentación.

Por otra parte, entre las principales desventajas del CMS se encuentran las descritas por Doelle *et al.*, (1992):

1. La heterogeneidad y la naturaleza sólida del sustrato, que trae consigo problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
2. Muchos aspectos de ingeniería como el diseño de reactores y el escalado están menos caracterizados con respecto a fermentaciones en medio líquido.

2. ANTECEDENTES

López *et al.*, (2010) fueron los primeros en cultivar células de *P. pastoris* y producir una proteína recombinante (una lacasa de *Trametes versicolor*) usando cultivo en medio sólido (CMS). En ese trabajo se compararon las cinéticas de crecimiento y la expresión heteróloga de una lacasa de *T. versicolor* en CMS y CML o sumergido (SmF). Sus resultados muestran que a bajas concentraciones de sustrato (< 34.9 g/L de glicerol), ambos sistemas de cultivo no mostraron diferencia estadística en la producción de biomasa y de lacasa recombinante. Sin embargo, a altas concentraciones de sustrato (> 34.9 g/L), el sistema con espuma de poliuretano (PUF) produce densidades celulares mayores que el CML. Por otra parte, la producción de lacasa con altas concentraciones de sustrato fue menor en CMS que en CML.

Núñez *et al.*, (2012) desarrolló un sistema de producción de biomasa de *P. pastoris* en columnas de vidrio, empleando tiras de PUF como soporte. Adicionalmente, modificó el medio de cultivo (Hang *et al.*, 2009) y empleó glucosa como única fuente de carbono, para incrementar los rendimientos de biomasa en este sistema.

Mattanovich *et al.*, (2009) secuenciaron el genoma de *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*), además reportaron el secretoma inducido con glucosa como fuente de carbono (sólo 12 proteínas fueron reportadas). Con ayuda del genoma secuenciado (9.5 Mpb) y de un análisis con la herramienta BLAST identificaron dos transportadores de alta afinidad para glucosa (PIPA02661, PIPA003702) y cuatro transportadores de glicerol (PIPA00047, PIPA09569, PIPA03381 y PIPA0357).

Shutter *et al.*, (2009) reportaron el genoma completo de *P. pastoris* GS115 en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Además, registraron en esta base de datos todas las secuencias de genes de esta levadura con una función hipotética, detectando cuatro posibles transportadores de tipo simportador glicerol/protón (Genbank: XM_002493965.1, XM_002493299.1, XM_002493274.1 y XM_002489618.1).

3. JUSTIFICACIÓN

La levadura metilotrófica *P. pastoris* es un excelente sistema de expresión que ha sido usado durante más de 20 años en laboratorios e industrias (Vaishnav & Demain, 2009). Esta levadura ha sido más empleada debido a que posee procesos postraduccionales de proteínas similares a los de los humanos, lo que la convierte en un organismo apropiado para la producción de proteínas con aplicación en humanos (Gerngross, 2004). Las levaduras presentan consumo activo y buen crecimiento en medios con glicerol, de hecho se ha reportado una tasa específica de crecimiento de *P. pastoris* 31 % más rápida en un medio con glicerol que en un medio con glucosa (Mattanovich *et al.*, 2009), lo que sugiere que el glicerol es una buena fuente de carbono debido a que puede ser asimilado más rápido por el metabolismo para producir biomasa por su grado de reducción. Los genes que están involucrados en el mecanismo de transporte de glicerol en *P. pastoris* GS115 están reportados en la base de datos de NCBI (Schutter *et al.*, 2004). La producción de biomasa de *P. pastoris* en medios con altas concentraciones de glicerol es superior en sistemas CMS que en sistemas CML (López *et al.*, 2010).

La investigación de la fisiología de crecimiento y consumo de sustrato entre el CMS y el CML y los mecanismos que están relacionados con el transporte de glicerol en *P. pastoris* CBS 7435 no han sido reportados, por lo que deben ser estudiados y caracterizados fisiológicamente. Con el presente estudio comparativo de fisiología entre el CMS y CML se pretende mostrar que el CMS es más eficiente en la producción de biomasa y aprovechamiento de sustrato en medios con altas concentraciones de glicerol. Además, con este trabajo se podrá explicar, al menos de manera indirecta, algunas de las razones por las que en CMS se obtienen rendimientos superiores en cuanto a biomasa que en CML. Finalmente, la identificación de los genes que están involucrados en el transporte de glicerol sugeriría los posibles genes blanco en *P. pastoris* CBS 7435, para que pudieran ser caracterizados fisiológicamente en el futuro en CMS y CML, y bajo ciertas condiciones de cultivo.

4. HIPÓTESIS

La producción de biomasa y consumo de glicerol será mayor en cultivo sólido a altas concentraciones de glicerol en comparación al cultivo líquido, debido a la formación de agregados celulares de *P. pastoris* y a que el cultivo sólido no está limitado por oxígeno.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar las diferencias de crecimiento, consumo de glicerol y formación de agregados celulares de *P. pastoris* en CMS y CML.

5.2. Objetivos específicos

1. Propagar, conservar e identificar molecularmente la cepa de *P. pastoris*.
2. Determinar la cinética de crecimiento y consumo de glicerol de *P. pastoris* en medio sólido y líquido a diferentes concentraciones de sustrato.
3. Visualizar la diferencia en la morfología de crecimiento celular en CMS y CML.
4. Identificar genes que codifican los transportadores de glicerol en *P. pastoris* por PCR de punto final y secuenciación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismo

El microorganismo empleado en este trabajo fue *Pichia pastoris* CBS 7435 (identificada molecularmente en este trabajo). La cepa fue proporcionada por la Planta Piloto de Fermentación en Estado Sólido (PP4) de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

6.2. Medios de propagación, conservación y producción de biomasa para *P. pastoris*

6.2.1. Medio de propagación de *P. pastoris*

YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

- Extracto de levadura: 10 g/L
- Peptona: 10 g/L
- Dextrosa: 10 g/L

Para formular el medio superficial se adicionó agar bacteriológico (20 g/L). Se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 psi durante 15 minutos.

6.2.2. Medio de conservación de *P. pastoris*

Medio YPD con 30 % de glicerol

- Extracto de levadura: 10 g/L
- Peptona: 10 g/L
- Dextrosa: 10 g/L
- Glicerol: 300 mL/L

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 psi durante 15 minutos.

6.2.3. Medio para producción de biomasa de *P. pastoris*.

Se usó el medio de producción de biomasa reportado por Hang *et al.*, (2009) con la modificación siguiente: glicerol como fuente de carbono a distintas concentraciones (25 g/L, 50 g/L y 100 g/L). La relación C/N de 10 se mantuvo constante modificando la concentración de sulfato de amonio y urea y se usó un amortiguador de fosfatos 150 mM (pH 6). La concentración de los demás reactivos permaneció constante en los tres medios.

• Glicerol	100 g/L	50 g/L	25 g/L
• (NH ₄) ₂ SO ₄	10.63 g/L	5.31 g/L	2.65 g/L
• Urea	3.54 g/L	1.77 g/L	0.88 g/L
• MgSO ₄	0.47 g/L		
• CaCl ₂	0.036 g/L		
• Extracto de levadura	0.5 g/L		
• Elementos traza	1.2 mL/L		
• Biotina	4X10 ⁻⁴ g/L		
• KH ₂ PO ₄	17.60 g/L		
• K ₂ HPO ₄	3.57 g/L		

Elementos traza

• KI	0.008%
• CuSO ₄	0.6%
• MnSO ₄	0.3%
• Na ₂ MoO ₄	0.02%
• H ₃ BO ₃	0.002%
• CoCl ₂	0.05%
• ZnCl ₂	2%
• FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.5%
• Adicionar 5 mL/L de H ₂ SO ₄	

6.3. Propagación de levaduras

Para la propagación de *P. pastoris*, se inocularon 30 mL de medio YPD en un matraz Erlenmeyer de 250 mL a partir de un vial de conservación (ver sección de conservación 6.4), se mantuvo en incubación a 30 °C y 250 rpm durante 24-28 h. El inóculo inicial en todas las cinéticas de este trabajo se propagó hasta alcanzar un

crecimiento con una DO_{600} de 2.0 y La concentración de biomasa al inicio de la fermentación fue de 0.054 ± 0.009 g/L.

6.4. Conservación de *P. pastoris*

6.4.1. Conservación a medio plazo

Los cultivos de *P. pastoris* se conservaron a 4°C cuando se emplearon en un periodo corto de tiempo. La conservación a corto plazo se realizó en medio YPD líquido, placas de agar y tubos inclinados. De acuerdo a Peterman & Simione, (2009) las cepas almacenadas de esta forma son viables durante un año.

6.4.2. Conservación a largo plazo

La conservación a largo plazo de *P. pastoris* se realizó en medio YPD con 30 % de glicerol. Se emplearon tubos criogénicos de 2 mL y se almacenaron a -20 ó -80 °C. Las células almacenadas en estas condiciones se mantienen viables durante varios años (Peterman & Simione, 2009). El procedimiento es el siguiente: un vial almacenado de *P. pastoris* se activó previamente en medio YPD durante 48-72 horas; se inocularon 20 mL de medio YPD con 200 µL de este cultivo activado y se incubó a 30 °C y 250 rpm durante 20-24 horas, hasta alcanzar una DO_{600} de 2-3. Se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon® estéril a 4000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 4 mL de medio YPD/glicerol. Finalmente se obtuvieron alícuotas de 2 mL en tubos criogénicos, conservándose los viales a -20 ó -80 °C (López *et al.*, 2010).

6.5. Identificación molecular de la cepa de *P. pastoris*

6.5.1. Aislamiento de ADN genómico

Para el aislamiento de ADN total se requirió un cultivo fresco de *P. pastoris*. El cultivo se incubó en medio YPD, se incubó a 200 rpm durante 24 h. Luego se empleó el protocolo y reactivos del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega. El aislamiento se hizo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

6.5.2. Calidad y concentración de ADN genómico

Se midió por espectrofotometría la calidad y concentración de 1 μL de muestra de ADN aislado. Para ello, se utilizó un NanoDrop 2000/2000c de Thermo Scientific®.

6.5.3. Amplificación de espaciadores internos de transcripción (ITS's)

6.5.3.1. Cebadores

El protocolo de identificación de la cepa de *P. pastoris*, se basó en la amplificación y secuenciación de la región ITS-1 y la región ITS-2. Estas secuencias tienen el más alto grado de variación génica del ADN ribosomal, lo que permite la discriminación incluso entre especies del mismo género. Los cebadores que se emplean con frecuencia para amplificar estas regiones son los cebadores ITS-F (forward) e ITS-4 (reverse) (Henry, *et al.*, 2000; Iwen, *et al.*, 2002). Las secuencias de los dos cebadores son las siguientes:

ITS-F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3')

ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')

6.5.3.2. Mezcla de reacción de PCR

La mezcla de reacción se adicionó en tubos para PCR de 100 μL , los reactivos de la mezcla se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Sustancia.	Volumen (μL)	Concentración final
Master mix al 2X.	12.5	
Primer (F) 50 μM	0.5	1 μM
Primer (R) 50 μM	0.5	1 μM
DNA [50 ng/ μL]	1	50 ng
H ₂ O libre de RNasa	10.5	
Volumen total (μL)	25	

6.5.3.3. Programa del termociclador

Se utilizó un termociclador MULTIGENE® para la amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2. A continuación se describe el programa del termociclador.

- Desnaturalización inicial 3 min a 94 °C.
- 30 ciclos a:
 - 96 °C durante 1 minuto.
 - 50 °C durante 1 minuto.
 - 72 °C durante 1 minuto.
- Extensión final a 72 °C durante 3 min.
- Mantener a 4 °C.

6.5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para confirmar la integridad del ADN genómico aislado se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y para visualizar los productos de PCR se emplearon geles al 1.5%. La preparación de los geles se realizó en un matraz Erlenmeyer, una vez pesada la agarosa se disolvió en buffer TAE al 1X. Se calentó la suspensión en un microondas hasta tener una solución completamente transparente. Se dejó enfriar y se adicionaron 0.2 µL de Rojo Texas para visualizar el ADN con luz UV. La solución se vertió en el molde para geles con el peine previamente colocado. Luego de solidificar el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis y ésta se llenó con buffer TAE 1X hasta cubrir por completo el gel. Las muestras fueron cargadas en cada uno de los pocillos del gel. Las muestras contenían 2 µL de buffer de carga (6X DNA Loading Dye de Thermo Scientific®) y 3 µL de ADN. Estos geles se corrieron a 90 voltios durante 75 minutos. Para visualizar el ADN, se utilizó un fotodocumentador Gel Logic 2200 PRO. Composición del buffer TAE 10X: 48.4 g/L Tris base, 11.42 mL/L ácido acético glacial y 20 mL/L de EDTA 0.5 M (pH 8).

6.5.5. Purificación de amplificadores, secuenciación y análisis en base de datos

Para conocer la secuencia de los amplicones de interés, se analizaron en el secuenciador de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Los amplicones de interés se purificaron para retirar impurezas y evitar interferencias en el proceso de secuenciación. La purificación de las reacciones de PCR se realizó con un kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Las secuencias obtenidas se analizaron con la herramienta BLAST de *National Center Biothechnology Information* (NCBI).

6.6. Preparación de cinéticas de crecimiento

Para este estudio se emplearon concentraciones de glicerol de 25, 50 y 100 g/L en el medio de producción de biomasa, conservándose una relación C/N de 10 en los tres medios evaluados. Se eligieron estas concentraciones porque el objetivo fue probar la fisiología de crecimiento, consumo de glicerol y diferencia de agregados celulares, en condiciones en que ambos sistemas (CMS y CML) se comportaran igual (25 g/L) y en donde mostraran diferencias en la producción de biomasa (50 g/L y 100 g/L), de acuerdo a lo reportado previamente por López *et al.*, (2010).

6.6.1. Preparación de cultivo en medio sólido

6.6.1.1. Soporte sólido

El soporte sólido inerte que se empleó en este estudio para el cultivo en medio sólido (CMS) fue espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad. La espuma se empleó en cubos de 0.7 centímetros de lado. La preparación de la espuma se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Zhu *et al.*, (1994). El protocolo es el siguiente: se realizaron dos lavados de estos cubos con agua a 100 °C y un lavado con agua destilada para evitar que quedara rastro de sales e impurezas, posteriormente se secaron los cubos a 60 °C durante 14-16 horas en una estufa para eliminar toda el agua. A continuación se colocó la espuma en un desecador para evitar la rehidratación durante su descenso a temperatura ambiente.

6.6.1.2. Cultivo en medio sólido

Para preparar los cultivos en medio sólido se siguió la metodología propuesta por López *et al.*, (2010). La metodología es la siguiente: a cada matraz de 250 mL se le adicionaron 1.5 g de cubos de PUF previamente lavados y secados, los matraces con la espuma se esterilizaron en autoclave a 150 °C y 15 psi durante 20 min. El inóculo se preparó antes de ser vertido en los matraces con la espuma. Para esto se usaron tubos Falcon estériles a los cuales se les adicionaron 23 mL de medio estéril de producción de biomasa. Los tubos con el medio fueron inoculados con 200 µL ($X_0 = 0.054 \pm 0.009$ g/L) de un cultivo previamente activado en 30 mL de medio YPD durante 28 h a 30 °C y 240 rpm. Después de una agitación suave, se vertieron sobre la espuma y con ayuda de una espátula estéril se procuró una homogeneidad del medio inoculado en la espuma. Los matraces del CMS se incubaron a 31 °C sin agitación. La evaluación de producción de biomasa en medio sólido se realizó por triplicado.

6.6.2. Preparación de cultivo en medio líquido

Las cinéticas de producción de biomasa en medio líquido se realizaron por triplicado en matraces de 250 mL con 23 mL de medio de producción de biomasa, los matraces fueron inoculados con 200 µL ($X_0 = 0.054 \pm 0.009$ g/L) de un cultivo previamente activado en 30 mL de medio YPD durante 28 h a 30 °C y 240 rpm. Los matraces inoculados se incubaron en un agitador a 31 °C y 240 rpm.

6.7. Determinación de biomasa

6.7.1. Determinación de biomasa en medio líquido

Para cuantificar la biomasa del experimento se emplearon filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0.2 µm, estas membranas se sometieron a peso constante en una estufa de secado, a 75 °C durante 20 h. Posteriormente se colocaron dentro de un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y evitar su rehidratación hasta su posterior uso; antes de filtrar, las membranas eran pesadas. Con ayuda de un equipo de filtración al vacío se filtró el medio con las células crecidas, se recuperó

además el filtrado para posteriores evaluaciones (determinación de glicerol y pH). Los filtros con la biomasa se sometieron nuevamente a peso constante en la estufa de secado a 75 °C durante 20 h, finalmente las membranas se pesaron nuevamente y se determinó por diferencia de peso la cantidad de biomasa seca en cada uno de los puntos monitoreados.

6.7.2. Determinación de biomasa en medio sólido

Para la cuantificación de biomasa de los cultivos sólidos, se extrajo todo el líquido con la biomasa con ayuda de una jeringa de 60 mL. Se exprimieron todos los cubos de PUF que contenía el matraz. Después de ser extraído todo el fermentado de la espuma de poliuretano, se procedió a realizar un lavado de la espuma con agua destilada a temperatura ambiente (50 mL) para retirar los residuos que pudieran quedar en la espuma. Para asegurar la cuantificación exacta de biomasa se sometió la espuma de poliuretano a un secado en la estufa a 75 °C durante 20 h. El medio que resultó de exprimir la espuma y el medio que resultó del lavado se sometió al mismo procedimiento de filtración con membranas descrito en el apartado 6.7.1.

6.8. Determinación de glicerol

El glicerol remanente presente en los medios se cuantificó en cada uno de los puntos de monitoreo de la cinéticas de crecimiento mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El equipo de HPLC estaba constituido con una bomba binaria (Pump 250) y un detector LC-30 RI (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). La fase móvil y todas las muestras se filtraron con membranas (0.2 µm de tamaño de poro) antes de ser analizadas. La fase móvil consistió en una solución de H₂SO₄ 5 mM. La columna utilizada fue Animex HPX-87H 300 mm x 78 mm (Biorad, Hercules, CA, USA). Todo el proceso se llevó a cabo utilizando un flujo constante de 0.5 mL/min y una presión de 800 psi, con una temperatura de 45 °C. El volumen inyectado para cada una de las muestras fue 20 µL y el monitoreo se realizó a 230 nm. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y el agua usada fue bidestilada.

6.9. Identificación de genes relacionados con el transporte de glicerol de *P. pastoris*

6.9.1. Aislamiento de ADN genómico

A partir de las secuencias que codifican los transportadores de glicerol en *P. pastoris* GS115 reportadas por Shutter *et al.*, (2009), se buscó la amplificación de estos genes en la cepa CBS 7435. La identificación de los cuatro genes reportados se realizó sobre ADN genómico. Para el aislamiento de ADN total se empleó el kit y reactivos del apartado 6.5.1. Para determinar la concentración y calidad del ADN se empleó el mismo proceso que en el apartado 6.5.2.

6.9.2. Diseño de cebadores específicos de transportadores de glicerol

Las cuatro secuencias que codifican los transportadores se obtuvieron de la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2015; Shutter *et al.*, 2009). Con estas secuencias se diseñaron cuatro pares de cebadores (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Secuencias de cebadores diseñados para amplificar los cuatro transportadores reportados en NCBI (Shutter, *et al.*, 2009).

ID del gen	Cebador Forward 5' - 3'	Cebador Reverse 5' - 3'	Nombre Ensayos
8200838	CGTGAGTAATGGTCGCAGACT	GGACTCTACAAGAAGCATTTCGG	GPS1 (f/r)
8199693	GAAATCCCTGCAAGTGGTCC	ACTGCCTCTACGAATGCTGC	GPS2 (f/r)
8199688	TGCCTTCCTCTAAGCAGTATTTACC	CCATATCCTCTAAATCTACGCCTC	GPS3 (f/r)
8197545	TCTCAACCCGTAAGAACCAC	GCCCTTGACACGTCCTCTAC	GPS4 (f/r)

6.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.9.3.1. Componentes de la mezcla de la PCR

Para amplificar los cuatro genes que codifican los transportadores se empleó un kit de amplificación HotStarTaq Master Mix de QIAGEN®. Este kit permite una amplificación con mejor especificidad. La composición de la mezcla de la reacción se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Sustancia.	Volumen (µL)	Concentración final (recomendación del kit)
HotStarTaq Master Mix 2X.	25	2 U HotStarTaq ADN polimerasa
Primer (F) 50 µM	0.5	0.2-0.5 µM
Primer (R) 50 µM	0.5	0.2-0.5 µM
DNA al [571 ng/µL]	1	< 1 µg/reacción
H ₂ O libre de RNasa	23	
Volumen total (µL)	50	

6.9.3.2. Programa del termociclador

Se utilizó un termociclador de la marca MULTIGENE® para todas las reacciones de amplificación. A continuación se describen las condiciones de la reacción en el termociclador.

- Activación inicial por calor 15 min a 95 °C.
- 30 ciclos a:
 - 94 °C durante 1 minuto.
 - 60 °C durante 1 minuto.
 - 72 °C durante 1.5 minuto.
- Extensión final a 72 °C durante 3 min.
- Mantener a 4 °C

6.9.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para confirmar la integridad del ADN y presencia de los productos de PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa, como se describió en la sección 6.5.4

6.9.5. Purificación de amplificaciones, secuenciación y análisis en base de datos

La purificación de amplificaciones, la secuenciación y la comparación en bases de datos se realizó como se describió en la sección 6.5.5

6.10. Micrografías de levaduras

6.10.1. Micrografías de *P. pastoris* en CMS

Para observar la forma de crecimiento en el CMS se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido. El crecimiento fue observado en un sólo punto de la cinética de crecimiento de *P. pastoris* (justo al inicio de la fase estacionaria del cultivo). Las micrografías se tomaron en medios con 25 g/L (22.5 h), 50 g/L (30 h) y 100 g/L (50 h) de glicerol. Se seleccionaron sólo dos cubos de PUF de cada uno de las concentraciones. Las muestras fueron sometidas a un proceso de fijación con glutaraldehído durante 42 h en tubos Eppendorff de 2 mL, se procuró que las muestras no fueran manipuladas vigorosamente. Luego se realizaron lavados para retirar por completo el glutaraldehído de las muestras, los lavados se realizaron con amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.2). Las muestras se sometieron a una segunda fijación con tetraóxido de osmio, cubriéndose la muestra por completo con el tetraóxido. Después de la fijación, las muestras fueron sometidas a un segundo lavado con diferentes concentraciones de etanol (20, 30, 40, 50, 70, 80 y 100 %). Las muestras fueron secadas posteriormente a punto crítico. Se fijaron las muestras en cinta de carbono y grafito y se procedió a cubrir los cubos con un baño de oro. Finalmente fueron visualizados en el microscopio electrónico de barrido.

6.10.2. Micrografías de *P. pastoris* en CML

Para observar la forma de crecimiento en el CML se empleó microscopía óptica. El crecimiento fue observado en un solo punto (justo al inicio de la fase estacionaria del cultivo). Las micrografías fueron tomadas en medios con 25 g/L de glicerol (40 h), 50 g/L (48 h) y 100 g/L (55 h). Se observaron 20 µL de cada muestra con los objetivos 40X y 100X.

6.11. Ajuste de datos experimentales

6.11.1. Ajuste de datos de biomasa

Los datos experimentales obtenidos en la sección 6.7 (por triplicado) fueron ajustados al modelo logístico de Verhulst-Pearl con la herramienta Solver de Excel de Microsoft Office 2013®. Las constantes cinéticas **X_{máx}** y **μ_{máx}** fueron obtenidas de este modelo y usadas para comparar la diferencia entre ambos sistemas.

Ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{máx} \left[1 - \frac{X}{X_{máx}} \right] X$$

Ecuación integrada:

$$X(t) = \frac{X_{máx}}{1 + \frac{X_{máx} - X_0}{X_0} * e^{-\mu t}}$$

Donde:

- **X₀** es la concentración de biomasa inicial en g/L
- **X_{máx}** es la concentración de biomasa máxima producida en g/L
- **μ_{máx}** es la tasa específica de crecimiento máxima en h⁻¹

6.11.2. Ajuste de datos de consumo de glicerol

Los datos de consumo de glicerol obtenidos la sección 6.8 (por triplicado) fueron ajustados al modelo integrado de Pirt con ayuda de la herramienta Análisis de datos-Regresión Lineal de Excel de Microsoft Office® 2013. Las constantes cinéticas **m** y **Y_{x/s}** fueron obtenidas por este modelo y usadas para comparar la diferencia entre ambos sistemas.

Ecuación de Pirt para consumo de sustrato:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + mX$$

Ecuación integrada:

$$S(X) = S_0 - \frac{1}{Y_{x/s}}(X - X_0) - \frac{mX_{m\acute{a}x}}{\mu_{m\acute{a}x}} \text{Ln} \left[\frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{X_{m\acute{a}x} - X} \right]$$

Donde:

- **m** es el coeficiente de mantenimiento en gS/gX*h
- **Y_{x/s}** es el rendimiento de biomasa generada a partir del sustrato en gX/gS

7. RESULTADOS

7.1. Identificación molecular de la cepa de *P. pastoris*

Debido a que no se tenía conocimiento del antecedente de la cepa proporcionada por la PP4, se identificó la cepa de *P. pastoris* empleada en este trabajo, mediante análisis de las secuencias ITS-1 e ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*), este método es el más empleado para identificar molecularmente hongos (Henry *et al.*, 2000; Iwen *et al.*, 2002). En la figura 7.1 se muestra el ADN genómico aislado. La concentración y calidad del mismo se muestran en la tabla 7.1. La concentración (>50 ng/ μ L), la pureza e integridad del ADN (260/280 > 1.8) aislado fueron buenas para la amplificación de la región ITS-1 e ITS-2.

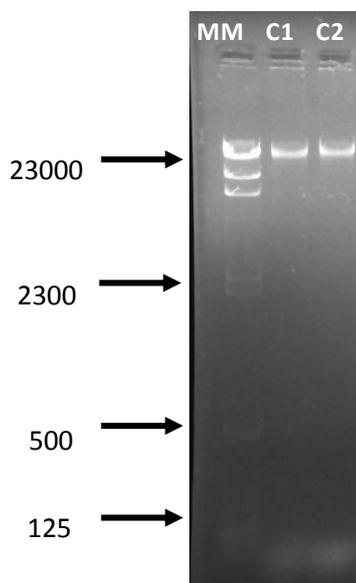


Figura 7.1. Gel de agarosa al 0.8%, MM= marcador molecular de ADN λ /Hind III y (C1 y C2) = muestras de ADN genómico.

Tabla 7.1. Concentración y pureza de ADN genómico aislado de *P. pastoris*

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280
ADN1	65.3	1.94
ADN2	43.6	1.91

A continuación, el ADN aislado se usó como molde para la amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2. En la Figura 7.2 se muestra un solo amplicón, del tamaño esperado de la región ITS-1 e ITS-2 (ligeramente superior a 500 pb). El control negativo (mezcla de reacción de PCR pero sin cebadores) no amplificó lo que sugirió que la amplificación de la región ITS-1 e ITS-2 fue confiable. El análisis con la herramienta BLAST de la secuencia obtenida se muestra en la Tabla 7.2. Se confirmó el género y especie *Pichia pastoris* con un 99% de identidad.

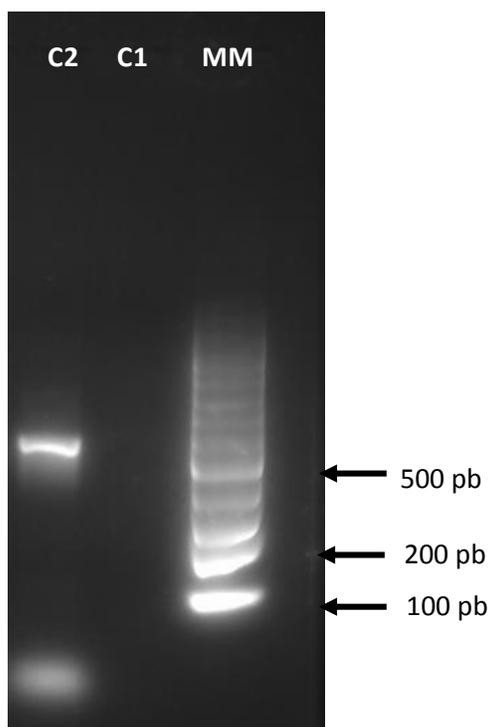


Figura 7.2. Gel de agarosa al 1.5 %, MM= marcador molecular de 100 pb. C2= amplicón (ITS-1 e ITS-2) y C1 = Control negativo.

Tabla 7.2. Resultado del análisis de la herramienta BLAST en la base de datos de NCBI

Descripción del microorganismo	Evaluación	Valor-e	Identidad
<i>Pichia pastoris</i> CBS 7435	100%	2×10^{-88}	99%
<i>Pichia pastoris</i> CBS 7435 chromosome 2	100%	2×10^{-88}	99%
<i>Pichia pastoris</i> CBS 7435 chromosome 3	99%	2×10^{-88}	99%

7.2. Producción de biomasa de *P. pastoris* en CML y CMS

Como primera estrategia se realizaron evaluaciones previas de producción de biomasa en CML y CMS, con el fin de entender el comportamiento de cada condición y establecer los puntos de muestreo para cada cinética. Estas pruebas fueron realizadas porque el medio propuesto en este trabajo no había sido evaluado en ambos sistemas para el crecimiento de biomasa (sección 6.2.3). Se realizaron tres muestreos por triplicado. Para el medio con 50 g/L de glicerol se obtuvieron muestras a las 38 h, 84 h y 120 h. Los resultados (Figura 7.3) muestran que la producción de biomasa en CMS fue superior en un 67 % a la obtenida en CML. No hubo diferencias en los valores de pH de ambos sistemas, como se muestra en la Figura 7.4.

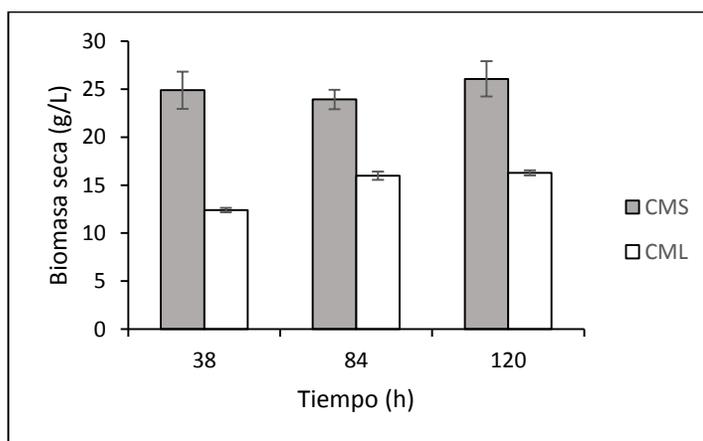


Figura 7.3. Producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.

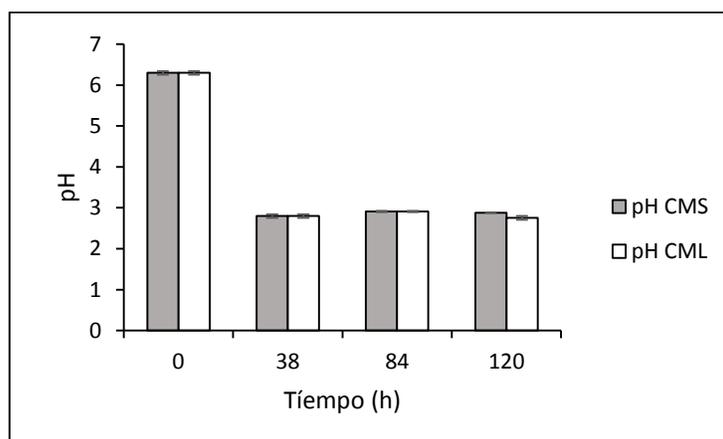


Figura 7.4. Perfil de pH en CMS y CML con 50 g/L de glicerol.

La segunda evaluación previa se desarrolló elevando la concentración con 100 g/L de glicerol (Figura 7.5), esta fue monitoreada a las 38 h, 86 h y 120 h. Los resultados mostraron que el CMS con 100 g/L de glicerol fue superior en un 167 % que la producción de biomasa en CML. La producción de biomasa en CML con 100 g/L de glicerol fue similar que la de CML con 50 g/L de glicerol (Figura 7.3). El pH fue similar en ambos sistemas con 100 g/L de glicerol, como se muestra en la Figura 7.6.

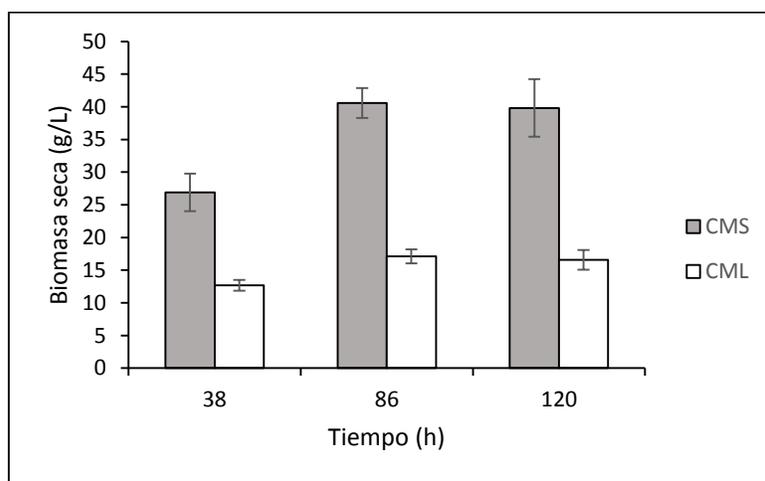


Figura 7.5. Producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.

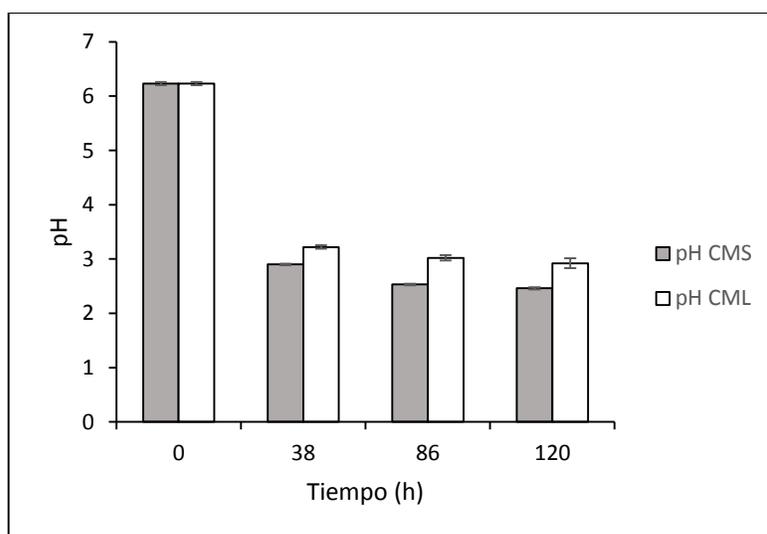


Figura 7.6. Perfil de pH en CMS y CML con 100 g/L de glicerol.

7.2.1. Cinéticas de producción de biomasa a diferentes concentraciones de glicerol

Con la finalidad de analizar las diferencias en la fisiología de crecimiento y consumo de glicerol en CMS y CML, se evaluaron condiciones en las que ambos sistemas fueron similares y condiciones en las que fueron diferentes, en cuanto a producción de biomasa. De acuerdo a López *et al.*, (2010) en concentraciones de glicerol menores a 36.24 g/L, no hubo diferencias a este respecto en los dos sistemas, pero con concentraciones de glicerol superiores a 36.24 g/L los sistemas mostraron diferencia en la producción de biomasa. Con este antecedente se eligieron concentraciones de 25 g/L, 50 g/L y 100 g/L. En la Figura 7.7 se muestran los resultados de la producción de la biomasa y del pH en CMS y CML con un medio con 25 g/L de glicerol. La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) en CMS no mostró diferencia comparada con el CML. Esto es similar a lo reportado por López *et al.*, (2010). Sin embargo sí hubo diferencia en la tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) de ambos sistemas, de hecho en CMS con 25 g/L de glicerol la tasa específica fue 73 % mayor, comparada con el CML (ver Tabla 7.3). Esto difiere con lo reportado por López *et al.*, (2010), lo cual se discutirá más adelante. El pH para ambos sistemas tuvo la misma tendencia y bajó a un pH de 3 en ambos sistemas.

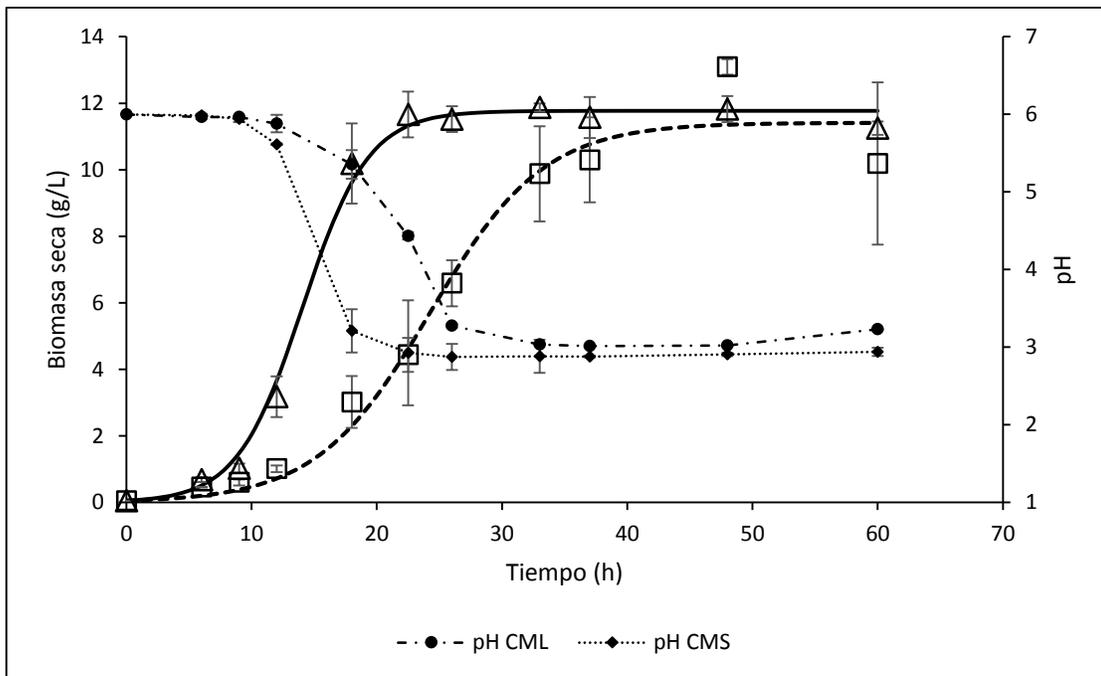


Figura 7.7. Cinética de producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS (Δ) y CML (\square) con 25 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales de biomasa. Las líneas representan el ajuste al modelo logístico, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML. Adicionalmente se muestra el perfil de pH para ambos sistemas.

Los resultados de la cinética de producción de biomasa y evolución del pH del medio con 50 g/L de glicerol se muestran en la Figura 7.8. La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) en CMS fue superior en un 63 % comparada con la del CML. La tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) fue 69 % superior en CMS comparativamente con el CML (ver Tabla 7.3). El pH disminuyó para ambos sistemas hasta 3 y tuvo la misma tendencia.

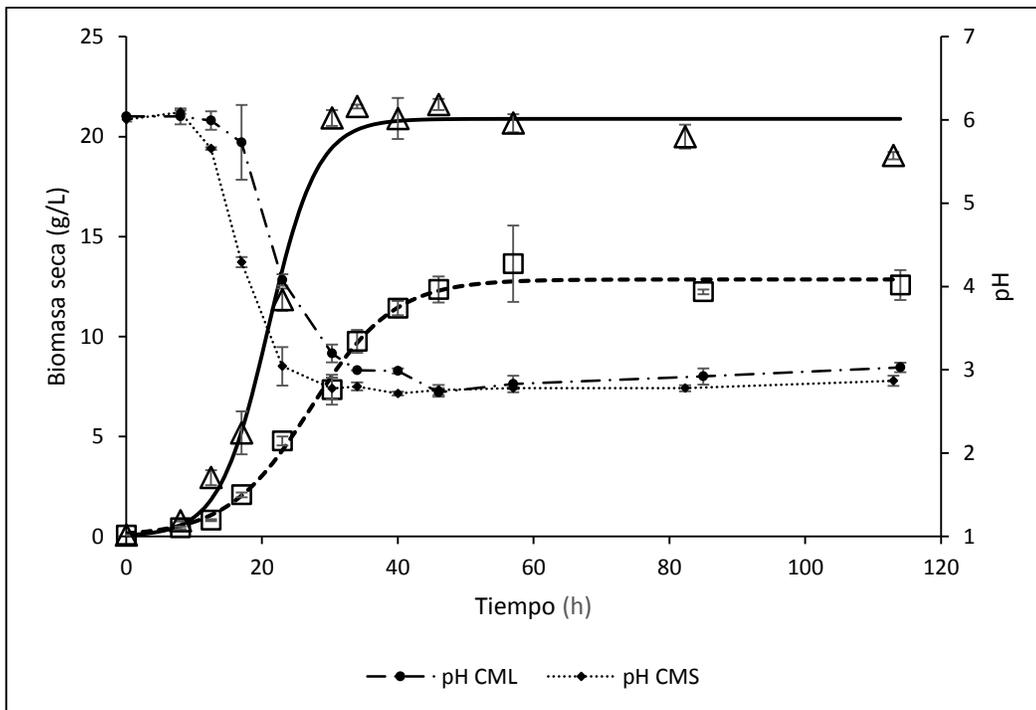


Figura 7.8. Cinética de producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS (Δ) y CML (\square) con 50 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales de biomasa. Las líneas representan el ajuste al modelo logístico, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML. Adicionalmente se muestra el perfil de pH para ambos sistemas.

En la Figura 7.9 se muestra la cinética de producción de biomasa y la evolución del pH del medio con 100 g/L de glicerol. La producción máxima de biomasa en CMS fue superior en un 173 % que en CML. La tasa específica de crecimiento máxima en CMS fue superior en un 29% comparativamente con lo obtenido en CML (ver Tabla 7.3). El pH de ambos sistemas tuvo la misma tendencia y también disminuyó hasta un valor de 3.

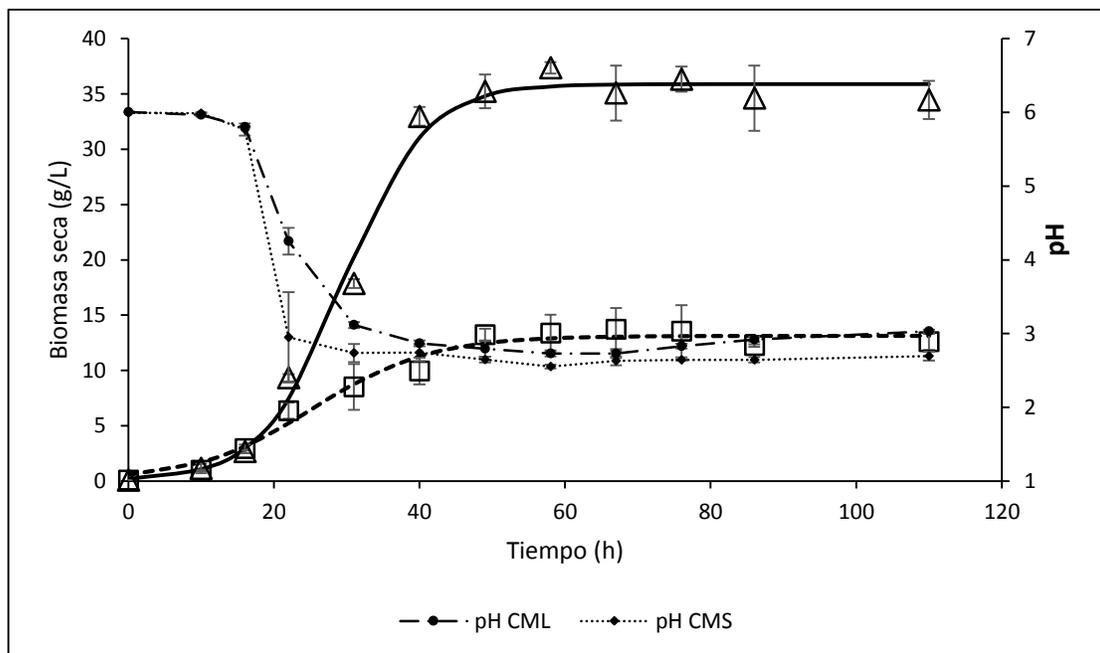


Figura 7.9. Cinética de producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS (Δ) y CML (\square) con 100 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales de biomasa. Las líneas representan el ajuste al modelo logístico, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML. Adicionalmente se muestra el perfil de pH para ambos sistemas.

En la Tabla 7.3 se presenta el resumen de los parámetros cinéticos $X_{m\acute{a}x}$ y $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenidos del ajuste al modelo logístico, empleando la herramienta Solver de Excel. Los datos experimentales en todas las cinéticas del CMS se ajustaron al modelo con un $R^2 > 0.98$, mientras que los datos experimentales de todas las cinéticas del CML se ajustaron al modelo con un $R^2 > 0.94$, lo que sugiere que los datos experimentales de las cinéticas de ambos sistemas se explican con el modelo logístico de crecimiento.

Tabla 7.3. Parámetros cinéticos de crecimiento de biomasa obtenidos del ajuste con el modelo logístico

	25 g/L de glicerol		50 g/L de glicerol		100 g/L de glicerol	
	CMS	CML	CMS	CML	CMS	CML
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	11.7 ± 0.22	11.4 ± 1	20.8 ± 0.2	12.8 ± 0.4	35.8 ± 1	13.13 ± 0.4
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0.38 ± 0.008	0.22 ± 0.005	0.27 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.007	0.12 ± 0.01
R^2	0.98 ± 0.004	0.95 ± 0.04	0.98 ± 0.002	0.98 ± 0.017	0.98 ± 0.007	0.94 ± 0.01

7.3. Cinéticas de consumo de glicerol por *P. pastoris* a diferentes concentraciones de sustrato

Los datos experimentales de consumo de glicerol se ajustaron al modelo de Pirt para el consumo de sustrato, como se describe en la sección 6.11.2. El gráfico de fases de biomasa contra glicerol (ejemplo: Figura 7.10) es imprescindible como primer paso para obtener las constantes del modelo de Pirt ($Y_{x/s}$ y m) y así poder posteriormente ajustar los datos experimentales de consumo de glicerol con respecto al tiempo (ejemplo: Figura 7.11). El gráfico de fases permite visualizar el ajuste de los datos experimentales al modelo de Pirt y también ver cómo el sustrato consumido se utiliza para formar biomasa y qué cantidad de sustrato es empleado en el mantenimiento (si existe). En la Figura 7.10 se muestra el gráfico de fases para ambos sistemas con 25 g/L de glicerol. Los resultados mostraron que no existe diferencia en el rendimiento ($Y_{x/s}$) entre ambos sistemas, en ambos sistemas se utilizó la misma cantidad de sustrato para generar la misma cantidad de biomasa. Sin embargo el CML presentó un coeficiente de mantenimiento de $1.9 \pm 0.1(10^{-2})$ (se puede observar una pequeña curvatura de la recta obtenida del ajuste, propia del mantenimiento) mientras que el CMS no presentó mantenimiento (línea completamente recta) (ver Tabla 7.4). En la Figura 7.11 se presenta el consumo de glicerol con respecto al tiempo, ajustado al modelo de Pirt. Se puede observar que el consumo de sustrato fue más rápido en CMS que en CML, pero ambos sistemas aprovecharon todo el sustrato.

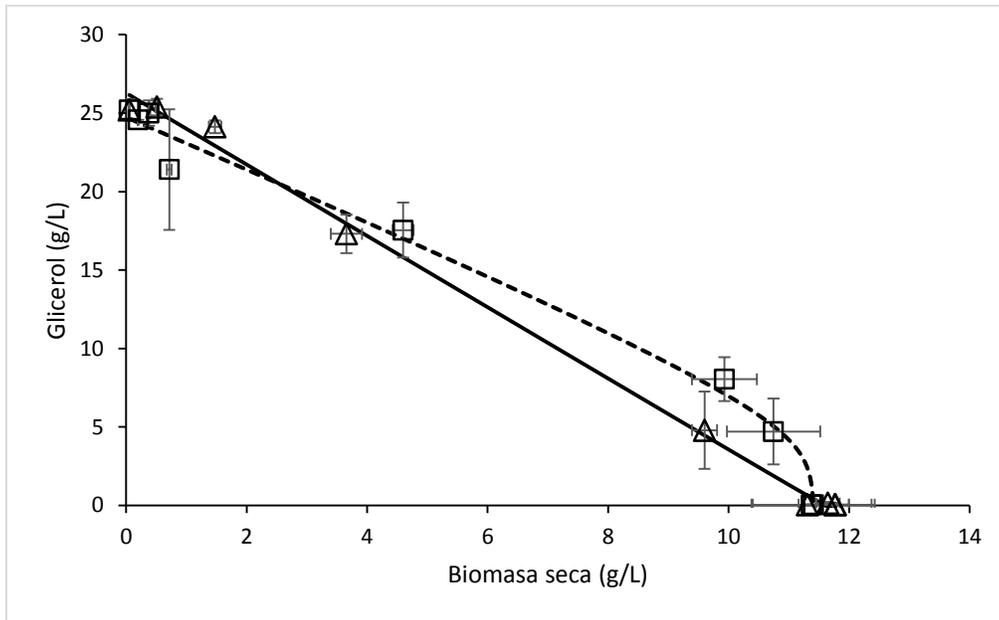


Figura 7.10. Gráfico de fases de biomasa contra glicerol del CMS (Δ) y CML (\square) con 25 g/L de glicerol. Los cuadrados y triángulos representan los datos experimentales y las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (----) para CML.

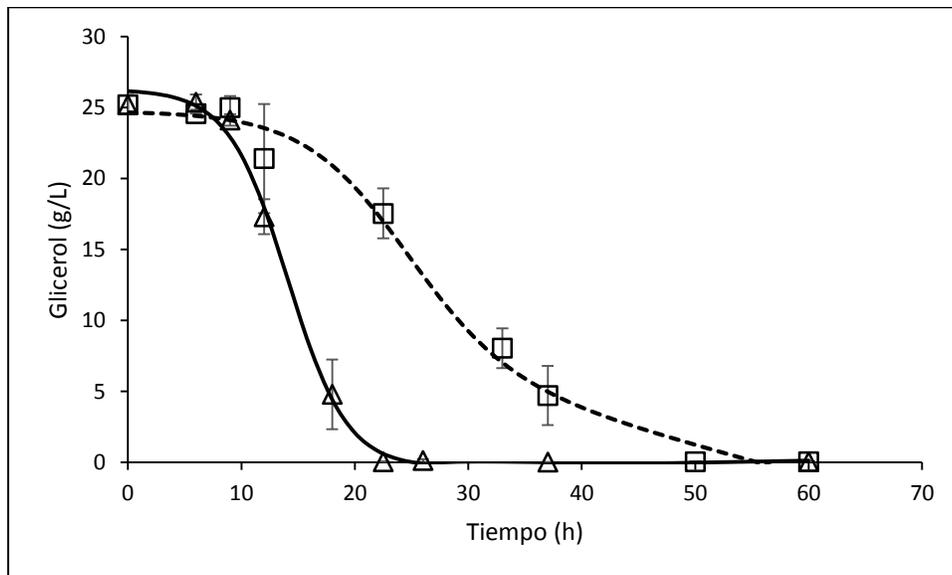


Figura 7.11. Cinética de consumo de glicerol en CMS (Δ) y CML (\square) con 25 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales. Las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (----) para CML.

La Figura 7.12 muestra el gráfico de fases del medio con 50 g/L de glicerol para ambos sistemas. Los resultados del ajuste mostraron que a esta concentración de glicerol el rendimiento $Y_{x/s}$ (0.41 ± 0.01) en CMS fue superior en un 46 % comparado con el rendimiento del CML. El CML sí presenta un coeficiente de mantenimiento elevado (la etapa de manteniendo se puede observar justo cuando la pendiente de la recta del gráfico de fases se vuelve completamente vertical), mayor en un orden de magnitud que el CMS (ver Tabla 7.4). En la Figura 7.13 se muestra el consumo de glicerol para el CMS y el CML, con 50 g/L de glicerol. El aprovechamiento de sustrato en este medio tuvo una gran diferencia entre ambos sistemas, en el CMS se aprovechó todo el sustrato y el consumo de glicerol fue más rápido, mientras que en el CML el consumo fue más lento y además tuvo glicerol residual (20 % del glicerol inicial) al final de la fermentación.

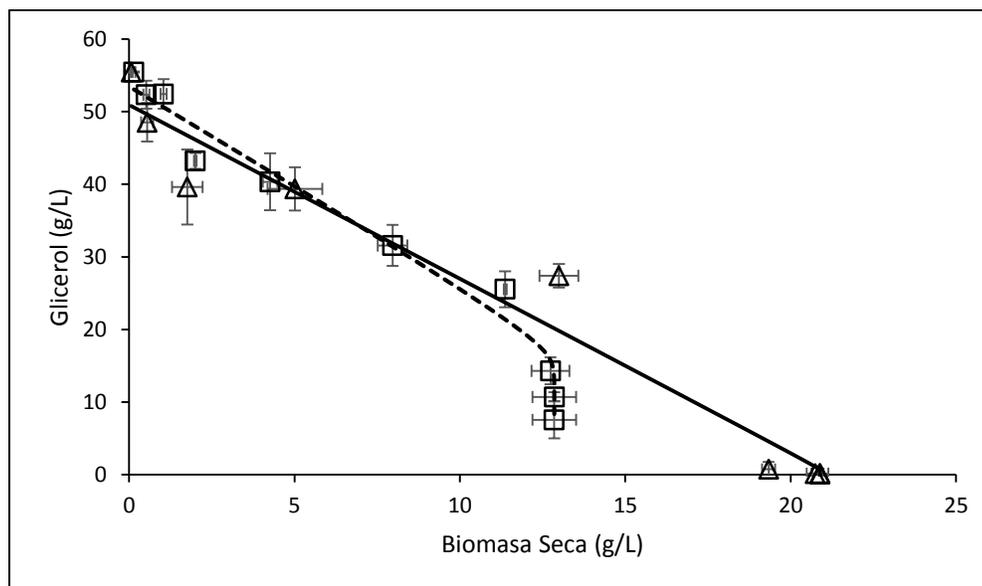


Figura 7.12. Gráfico de fases de biomasa contra glicerol del CMS (Δ) y CML (\square) con 50 g/L de glicerol. Los cuadrados y triángulos representan los datos experimentales y las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML.

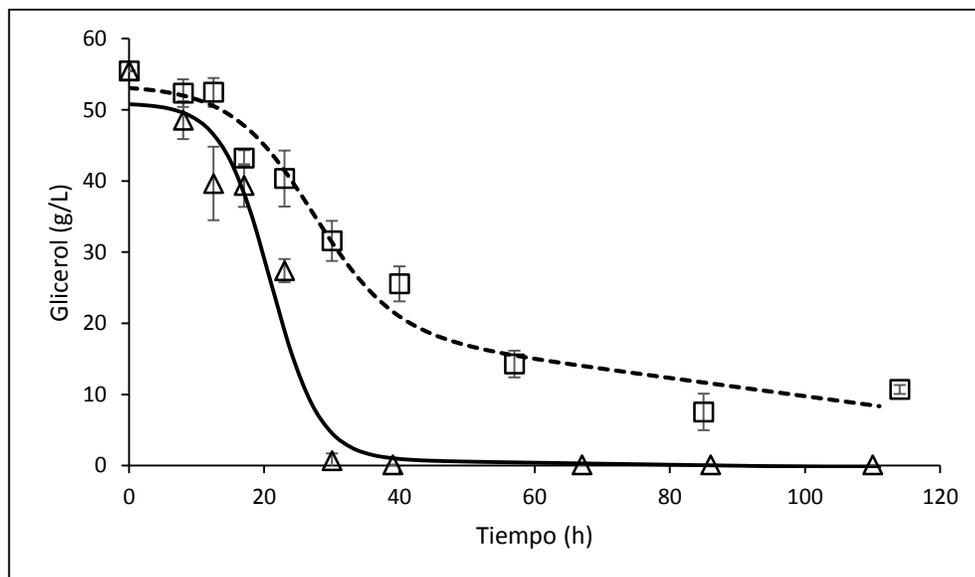


Figura 7.13. Cinética de consumo de glicerol en CMS (Δ) y CML (\square) con 50 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales. Las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (----) para CML.

En la Figura 7.14 se muestra el gráfico de fases del medio con 100 g/L de glicerol. Los resultados mostraron que el rendimiento $Y_{x/s}$ (0.34 ± 0.01) en CMS fue superior en un 48 % comparado con el rendimiento del CML. El CML presentó un coeficiente de mantenimiento elevado (la línea del ajuste muestra la curvatura de la recta que representa el manteniendo), en al menos un orden de magnitud comparado con el CMS (ver Tabla 7.4). En la Figura 7.15 se muestra el consumo de glicerol del medio con 100 g/L de glicerol de ambos sistemas. En esta figura se puede observar que el aprovechamiento de glicerol tuvo la diferencia más grande de las tres concentraciones evaluadas entre ambos sistemas. En el CMS el consumo de sustrato fue más rápido y además se aprovechó todo el sustrato al final de la fermentación, como ocurrió en el CMS con glicerol a 25 y 50 g/L. Pero en el CML el consumo de glicerol fue más lento y se cuantificó también glicerol residual (40 % del glicerol inicial), como en el CML con 50 g/L de glicerol.

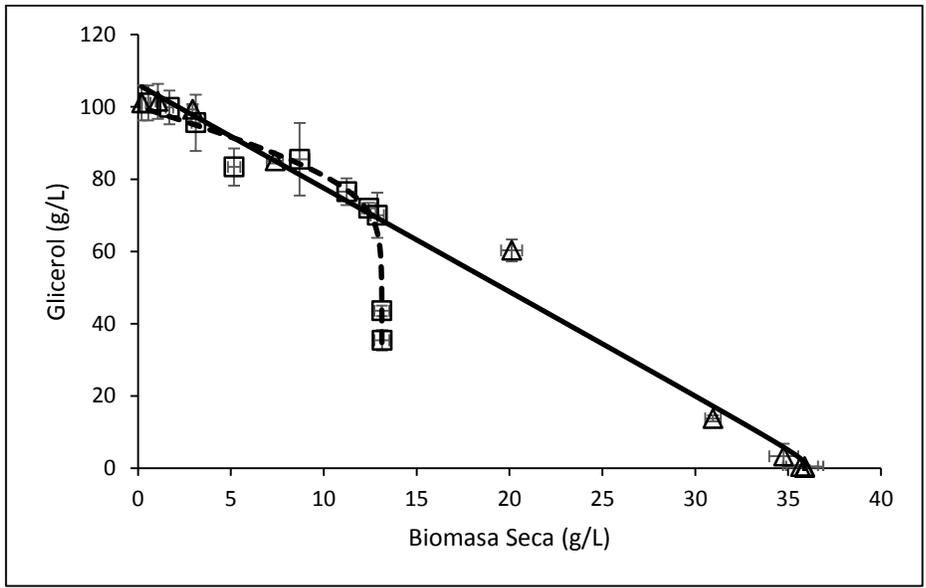


Figura 7.14. Gráfico de fases de biomasa contra glicerol del CMS (Δ) y CML (\square) con 100 g/L de glicerol. Los cuadrados y triángulos representan los datos experimentales y las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML.

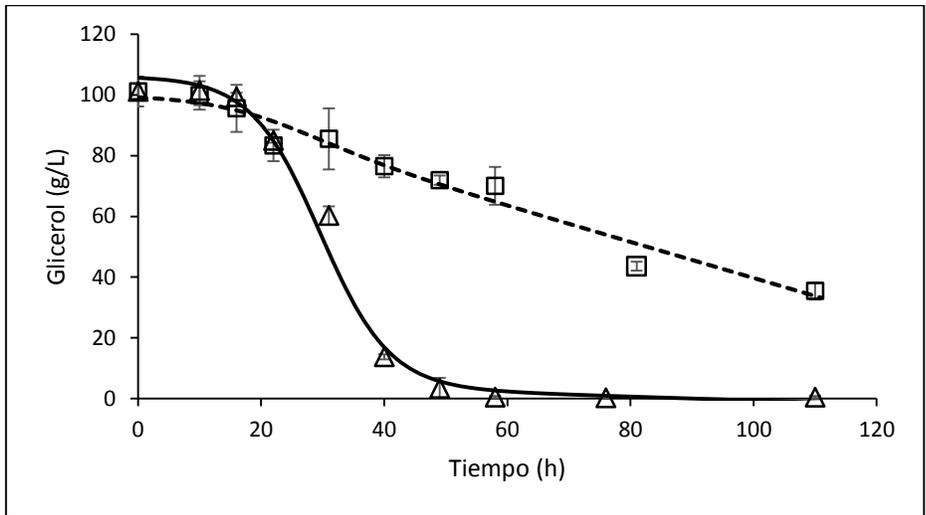


Figura 7.15. Cinética de consumo de glicerol en CMS (Δ) y CML (\square) con 100 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales. Las líneas representan el ajuste al modelo de Pirt, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (---) para CML.

En la Tabla 7.4 se muestra el resumen de los parámetros cinéticos $Y_{x/s}$ y m obtenidos del ajuste al modelo de Pirt, con la herramienta Análisis de datos-Regresión Lineal de Excel. Los datos experimentales de todas las cinéticas del consumo de glicerol del CMS se ajustaron con un $R^2 > 0.96$ y los datos experimentales del consumo de glicerol del CML se ajustaron con un $R^2 > 0.91$, esto sugiere que los datos experimentales de ambos sistemas pueden ser explicados con el modelo de Pirt para el consumo de sustrato.

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos de consumo de glicerol obtenidos del ajuste con el modelo de Pirt

	25 g/L de glicerol		50 g/L de glicerol		100 g/L de glicerol	
	CMS	CML	CMS	CML	CMS	CML
$Y_{x/s}$	0.45 ± 0.01	0.46 ± 0.05	0.41 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.23 ± 0.03
m (gS/gX*h)	1.2 ± 1(10 ⁻³)*	1.9 ± 1(10 ⁻²)	6.7 ± 9(10 ⁻⁴)	9 ± 2(10 ⁻³)	1.7 ± 0.9(10 ⁻³)	4.5 ± 0.3(10 ⁻²)
R^2	0.99 ± 0.005	0.97 ± 0.03	0.96 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.98 ± 0.002	0.91 ± 0.08

*Valor positivo.

7.4. Micrografías de espuma de poliuretano y crecimiento de biomasa en CMS y CML

La fisiología del CMS mostró diferencias comparada con la del CML, como ya se pudo observar en las secciones anteriores. Para evidenciar las diferencias en el crecimiento celular de ambos sistemas se empleó microscopía electrónica de barrido en el CMS y microscopía óptica en el CML. En la Figura 7.16 se muestran las micrografías de la espuma de poliuretano sin células, se puede observar que la espuma no es sólo un complejo de redes y túneles de poliuretano, sino que también está compuesta de muchas membranas delgadas de poliuretano donde también pueden crecer las células de *P. pastoris*. Las micrografías que muestran la diferencia del crecimiento celular entre el CMS y CML se muestran en las Figura 7.17 y 7.18, respectivamente. Las células en CML se visualizaron dispersas en todo el líquido en los tres medios con glicerol evaluados (Figura 7.18), mientras que en CMS las células presentaron un crecimiento en forma de agregados celulares (racimos de uvas) en los

tres medios. La formación de estos agregados no sólo se da en los meniscos formados por el líquido del interior de los túneles y redes de la espuma (López *et al.*, 2010), sino que las levaduras forman agregados (biopelículas) también sobre las trabéculas y las membranas delgadas de poliuretano, como se muestra en la Figura 7.17.

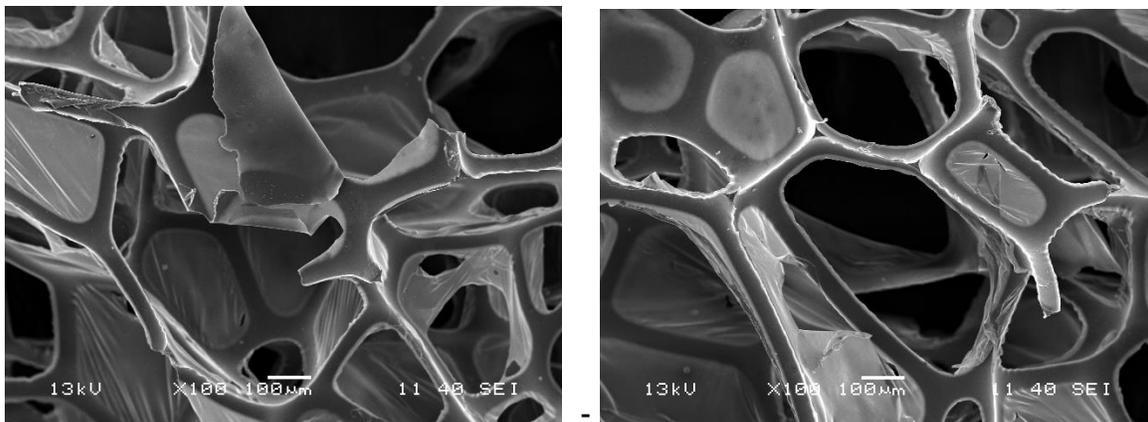


Figura 7.16. Espuma de poliuretano sin biomasa vista con el microscopio electrónico de barrido.

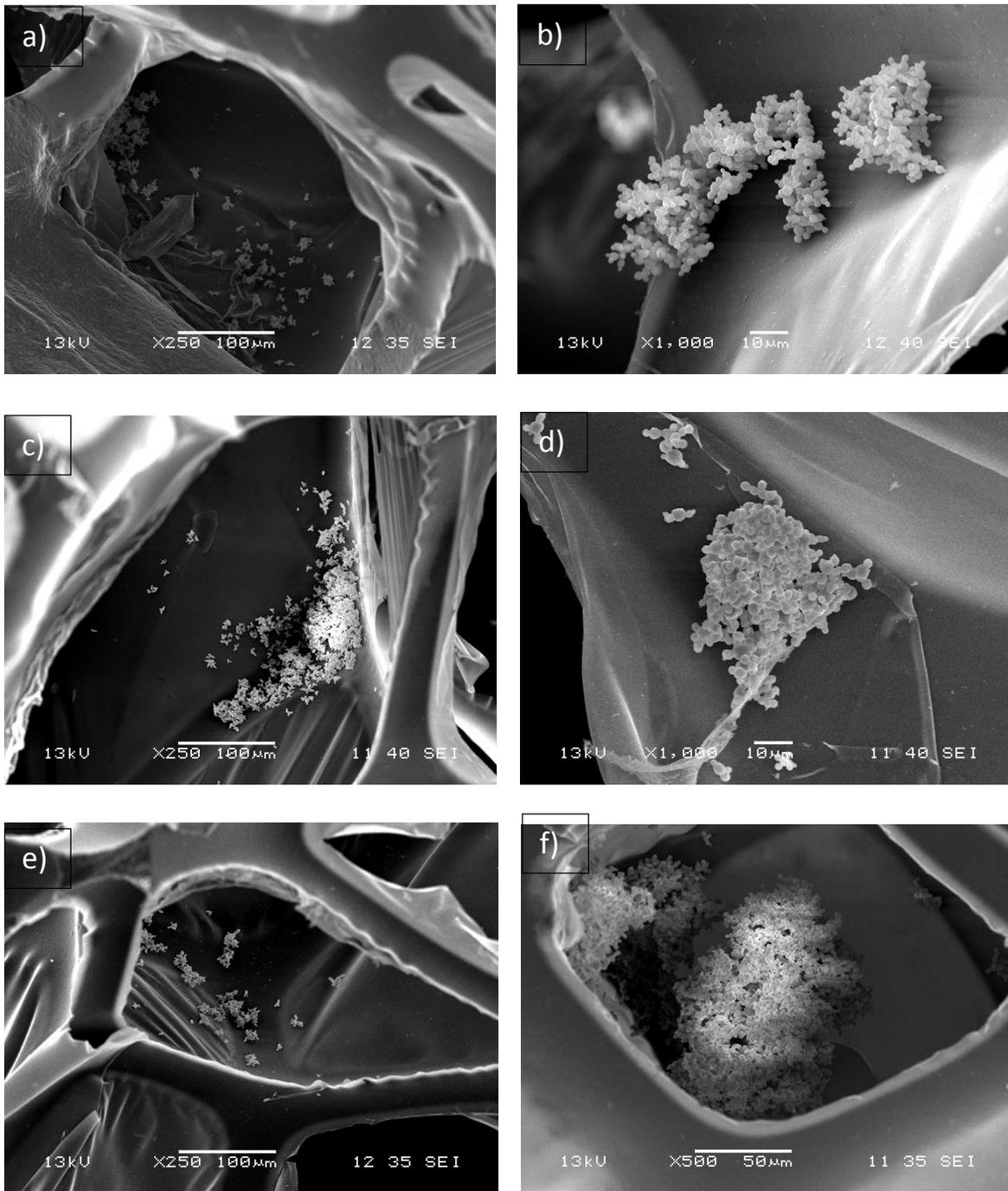


Figura 7.17. Formación de agregados de *P. pastoris* al inicio de la fase estacionaria del cultivo sobre la espuma de poliuretano. a) y b) agregados formados a las 22.5 horas con 25 g/L de glicerol. c) y d) agregados a las 30 horas con 50 g/L de glicerol. e) y f) agregados a las 50 horas con 100 g/L de glicerol. a), c) y e) aumento X250. b), d) aumento X1000 y f) aumento X500.

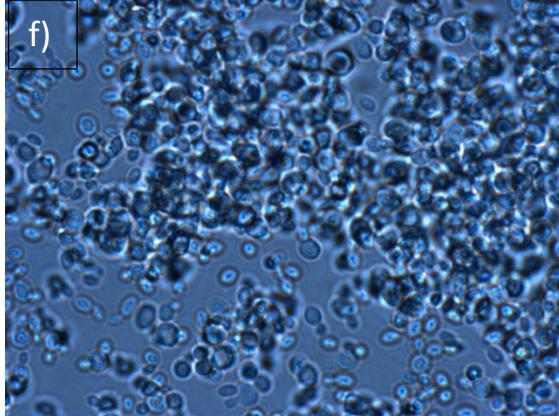
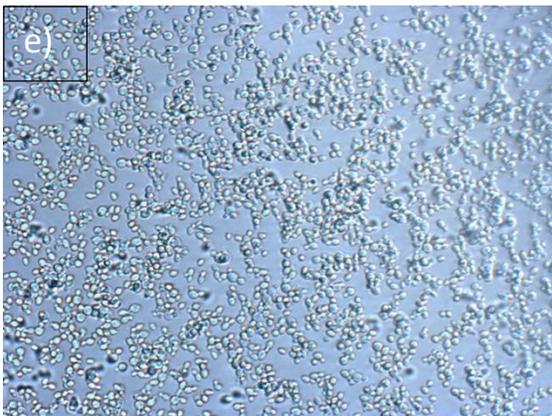
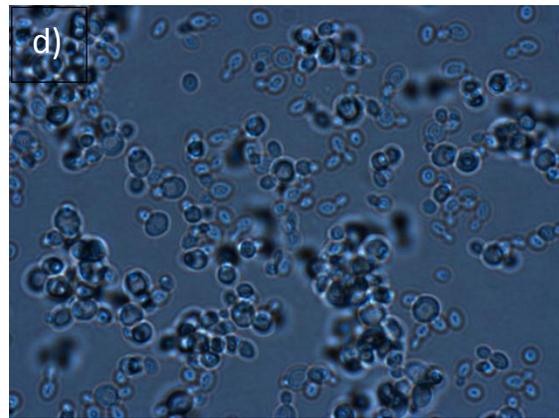
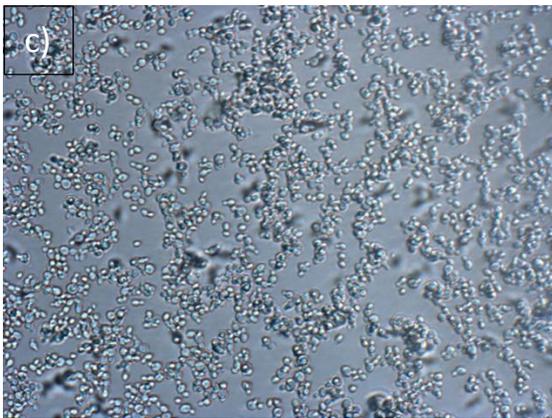
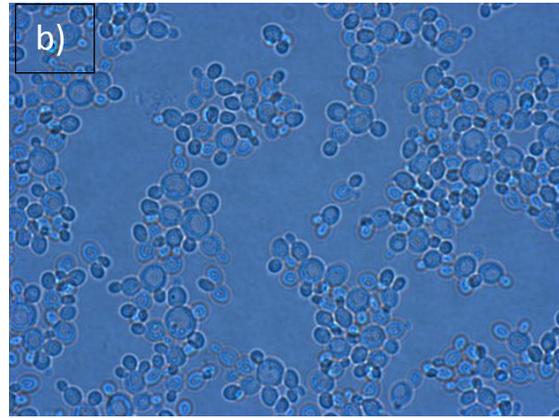
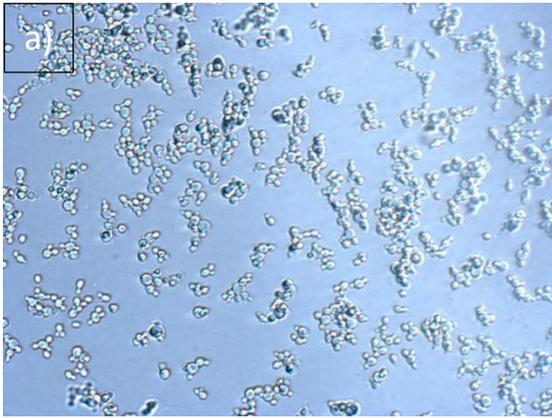


Figura 7.18. Morfología de *P. pastoris* al inicio de la fase estacionaria en CML. a), b) células a las 38 horas con 25 g/L de glicerol. c), d) células a las 47 horas con 50 g/L de glicerol. e) y f) células a las 50 horas con 100 g/L de glicerol. a), c) y e) aumento a 40X. b), d) y f) aumento a 100X.

7.5. Identificación y confirmación de genes relacionados con el transporte de glicerol

Con la finalidad de identificar los genes que codifican los transportadores en la cepa de *P. pastoris* CBS 7435 empleada en este trabajo, se procedió a la amplificación de los mismos con las secuencias reportadas descritas en la sección 6.9. Se realizaron tres extracciones de ADN y en la Figura 7.19 se muestra el ADN genómico aislado. En la Tabla 7.5 se muestra la concentración y calidad del ADN aislado con el Kit de Promega®. El ADN aislado tuvo una alta concentración ($> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$), pureza e integridad idónea para procesos de amplificación ($260/280 > 1.8$). Este ADN fue empleado como molde para todas las pruebas de amplificación de los transportadores de glicerol.

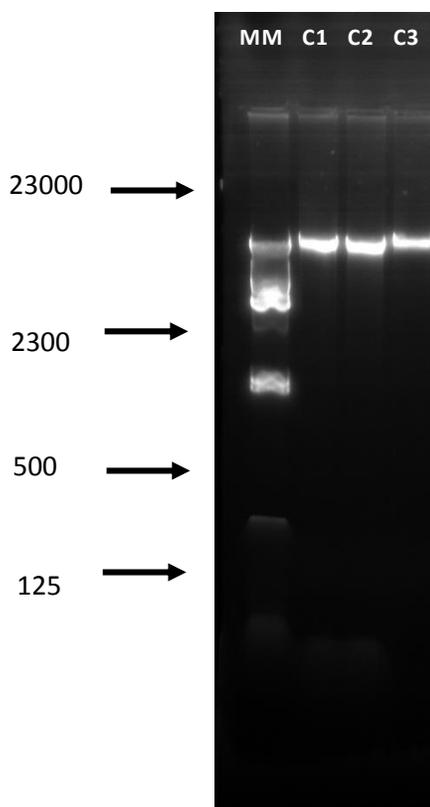


Figura 7.19. Gel de agarosa al 0.8%, MM= Marcador molecular de ADN λ /Hind III. C1, C2 y C3 = Muestras de ADN genómico aislado.

Tabla 7.5. Concentración y pureza de ADN genómico aislado de *P. pastoris*

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280
ADN1	505.0	1.87
ADN2	571	2.00
ADN3	212.3	1.85

En la Figura 7.20 se muestra el gel del resultado de los productos de PCR, se puede observar un sólo amplicón para cada una de las reacciones (excepto el control negativo en el C6). El tamaño de los amplicones (GSP1, GSP2, GPS3 y GSP4) fue de 1500 pares de bases aproximadamente, el tamaño esperado de acuerdo al diseño de los cebadores para amplificar los genes que codifican los transportadores. El amplicón del control positivo (misma mezcla de reactivos para la reacción de PCR pero con cebadores para amplificar la región de los ITS's) también fue el esperado (aproximadamente 500 pb). El control negativo no amplificó (mezcla de reacción para PCR sin cebadores), lo que sugiere que la amplificación fue confiable para secuenciar el producto de PCR como siguiente etapa.

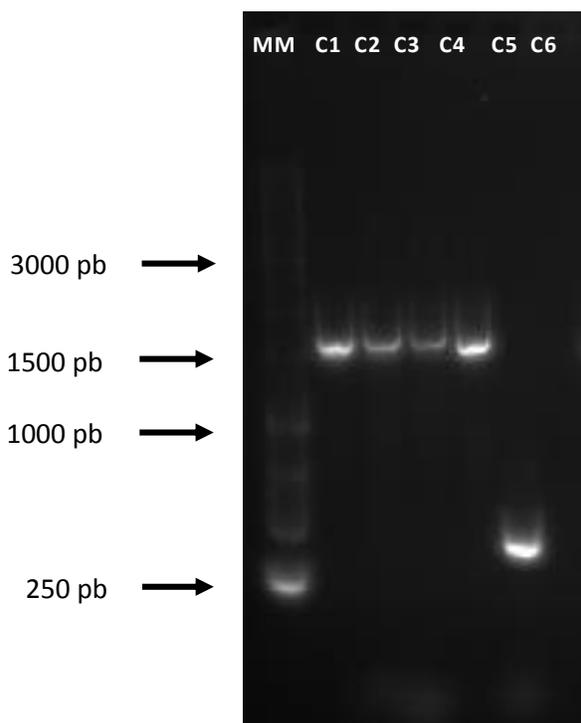


Figura 7.20. Gel de agarosa al 1.5%, MM= marcador molecular de 1000 pb. C1 = GPS1, C2 = GPS2, C3 = GPS3 y C4 = GSP4 (*Glycerol symporter proton*). C5 = Control positivo (ITS's) y C6 = Control negativo.

A continuación se purificaron los productos de PCR, se enviaron a secuenciar los cuatro amplicones y los resultados obtenidos se compararon con las bases de datos, como se describió en la sección 6.5.5. El análisis con la herramienta BLAST de las cuatro secuencias obtenidas se muestran en la Tabla 7.6. Esta herramienta permitió confirmar la identidad de los productos de PCR. Se identificaron sólo tres genes de los cuatro buscados, ya que GPS1 no arrojó ningún resultado. GPS2 correspondió con un 99 % de identidad al simportador glicerol/protón de la membrana plasmática, sujeto a inactivación con glucosa de *P. pastoris* GS115 (PAS_chr3_1099). GPS3 correspondió con un 91 % de identidad al simportador glicerol/protón de la membrana plasmática de *P. pastoris* GS115 (PAS_chr3_1076). Por su parte, GPS4 correspondió con un 88 % de identidad al simportador glicerol/protón de la membrana plasmática, sujeto a inactivación con glucosa de *P. pastoris* GS115 (PAS_chr1-1_0028) (Shutter *et al.*, 2009). Estos tres genes hallados en el genoma, están relacionados con el transporte de glicerol en *P. pastoris* GS115 (Mattanovich *et al.*, 2009; Shutter *et al.*, 2009).

Tabla 7.6. Resultado del análisis de comparación de amplicones secuenciados con la base de datos con NCBI.

Nombre de amplicón en ensayos	Evaluación	Valor-e	Identidad	Nombre de gen en NCBI	Numero de identidad en NCBI
GPS2	100%	0.0	99 %	PAS_chr3_1099	8199693
GPS3	100%	6×10^{-171}	91 %	PAS_chr3_1076	8199688
GPS4	100%	2×10^{-161}	88 %	PAS_chr1-1_0028	8197545

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se estableció una estrategia experimental para establecer criterios comparativos entre la fisiología de crecimiento y consumo de glicerol por *P. pastoris* en dos condiciones de cultivo claramente diferenciadas: cultivo en medio sólido (CMS) y cultivo en medio líquido (CML). La utilización de *P. pastoris* en la industria ha adquirido una gran importancia en los últimos años, esta es por tanto una de las razones por las que son relevantes los estudios enfocados al análisis de su genética y su fisiología. Muestra de ello, son algunos ejemplos de estudios realizados con esta levadura en la producción de proteínas recombinantes, como insulina humana (Wang *et al.*, 2001), antígeno de *Plasmodium falciparum* para vacuna contra malaria (Brady *et al.*, 2001), antitrombina III humana (Mochizuki *et al.*, 2001), una tanasa de *Aspergillus oryzae* (Stapleton *et al.*, 2004), el fragmento de la cadena pesada de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* (Potter *et al.*, 2000) y una lacasa de *Trametes versicolor* (López *et al.*, 2010). La industria de la producción de proteínas recombinantes para la obtención de productos de alto valor agregado ha crecido de forma muy importante en los últimos años y lo que es más importante, hay una enorme perspectiva de crecimiento para este mercado (Pavlou & Reichert, 2005). Como consecuencia de eso, se ha hecho imprescindible para este sector de la biotecnología la optimización de los procesos de producción de estas proteínas, lo que inevitablemente pasa por la profundización en la genética y fisiología de los organismos productores.

En este sentido, el primer paso para llevar a cabo este trabajo fue la identificación molecular de la cepa objeto de estudio. Una vez que se identificaron las secuencias del ITS-1 e ITS-2 en las bases de datos, se diseñó la estrategia experimental adecuada para establecer criterios comparativos, lo suficientemente consistentes para la obtención de conclusiones en lo referente a la fisiología del CMS y CML. En este sentido, uno de los elementos novedosos de este estudio es que el soporte sólido que se utilizó para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento fue espuma de poliuretano, algo novedoso porque hay muy pocos estudios donde se ha utilizado

este material para la producción de levaduras: únicamente se ha publicado el trabajo de López *et al.*, (2010). Adicionalmente hay un trabajo de Nuñez-Reyes *et al.*, (2012), en el que se utilizó espuma de poliuretano de alta densidad. Hay dos diferencias fundamentales, desde el punto de vista metodológico, entre el presente trabajo y el de López *et al.*, (2010): por una parte, en este trabajo no se evalúa la producción de una proteína recombinante y, por la otra, se supuso diferente la fisiología de crecimiento de *P. pastoris* en este trabajo por las diferencias relevantes existentes en la composición del medio de cultivo. Particularmente, en el trabajo de López *et al.*, (2010) se utilizaron dos fuentes de carbono, tartrato amónico y glicerol. Por otra parte, en el presente trabajo, por el contrario, se decidió no utilizar el tartrato amónico a efectos de poder observar únicamente el efecto teniendo en consideración los datos del glicerol como única fuente de carbono.

Para evitar los cambios de pH debido al crecimiento de la levadura se utilizó un amortiguador de fosfatos (150 mM). Para establecer criterios comparativos consistentes, se utilizaron tres concentraciones diferentes de glicerol, 25, 50 y 100 g/L, de manera similar al trabajo de López *et al.*, (2010). Sin embargo, es preciso señalar que para el análisis de la fisiología de *Pichia pastoris* ya ha sido utilizada esta metodología previamente (Shnada *et al.*, 2014). Adicionalmente, se añadieron sulfato de amonio y urea hasta alcanzar una relación carbono/nitrógeno de 10, relación C/N que también ha sido reportada en otros trabajos sobre la fisiología de *P. pastoris*, y finalmente se añadieron al medio sales y metales necesarios para el crecimiento de *P. pastoris* (Hang *et al.*, 2009). Respecto a los resultados obtenidos de producción de biomasa, se observaron dos líneas de tendencia claras: por una parte cuando la cantidad de glicerol en el medio fue de 25 g/L, los resultados indicaron diferencias en las tasas específicas de crecimiento entre ambos sistemas, sin embargo en términos de producción de biomasa neta no se encontraron diferencias. Sin embargo, cuando se utilizaron 50 y 100 g/L de glicerol se encontraron diferencias entre CML y CMS, resultados que ya han sido obtenidos en otros trabajos como el de López *et al.*, (2010) quienes reportaron que cuando la concentración inicial de sustrato fue mayor (>94.6

g/L de glicerol), en CMS se produjo una cantidad de biomasa significativamente mayor que los CML.

En todas las concentraciones y en ambos sistemas, el tiempo en el que se alcanzó la máxima producción de biomasa fue 50 % menor que lo reportado por López *et al.*, (2010), estas diferencias pueden atribuirse como ya se mencionó a que el medio usado en entre estos trabajos son completamente diferentes. Algunos metales y sales son necesarias para el crecimiento de levaduras (Hang *et al.*, 2009), Rolfe *et al.*, (2012) estudiaron algunas sales y metales que son esenciales (a cierta concentración) en ciertas fases del crecimiento, el cobalto, fierro, molibdeno, magnesio, sodio y calcio fueron los más relevantes en este estudio. La regulación génica del transporte y la acumulación transitoria de estos elementos en el interior de la célula es indispensable para la rápida adaptación en la fase Lag y la fase exponencial del crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *S. cerevisiae* (Brejning *et al.*, 2003), estos elementos son cofactores de enzimas encargadas de síntesis de ARN, ADN, enzimas del metabolismo, respiración y proteínas. La disponibilidad de estos elementos en el medio aseguran una rápida adaptación y crecimiento de las células (Rolfe *et al.*, 2012).

Otro factor importante a considerar es que el sistema sólido no está limitado por oxígeno, la adición de PUF como soporte en el CMS aumenta 100 veces la relación A/V en cultivo sólido que en el cultivo líquido (López *et al.*, 2010) lo que permite que el oxígeno tenga mayor área de contacto con el medio y por consiguiente con las células. Además de que puede difundir con mayor facilidad a través de la red tridimensional de los cubos de PUF, lo que origina que las células puedan oxidar todo el sustrato disponible. La disponibilidad del último aceptor final de electrones (O_2) en la vía de la respiración asegura que se obtenga la máxima cantidad de energía para el crecimiento (Calik *et al.*, 2015), esto puede contrastarse en los gráficos de fases de consumo de glicerol contra formación de biomasa (ver apartado 7.3). En las tres concentraciones de glicerol evaluadas en este trabajo, en CMS todo el sustrato consumido se empleó para generar biomasa (la línea del ajuste a modelo de Pirt representa una línea recta en las tres concentraciones de glicerol evaluadas): si la transferencia de oxígeno a las

células no limita la respiración para oxidar el sustrato, el transporte del sustrato al interior de la célula es rápido y por tanto, su crecimiento (García-Ochoa *et al.*, 2010). Por ello, el aumento en la concentración de glicerol en CMS no provocó un efecto negativo en el crecimiento. Por otro lado, en el sistema líquido la producción de biomasa no mostró diferencias al aumentar la concentración de glicerol en el medio de cultivo. Las modificaciones de solutos disueltos (amortiguador, sales), sobre todo el aumento en la concentración de glicerol en el medio de cultivo propuesto en este trabajo, la configuración del matraz (con baffles/sin baffles) y la agitación puede ocasionar problemas de transferencia de oxígeno al medio y detener el crecimiento de las células (Klockner & Buchs, 2012); de hecho la concentración de oxígeno en la fase líquida en agua pura a 30°C es de 7.41 mg/L, sin solutos disueltos, y esta concentración se ve afectada por la cantidad de solutos disueltos (EIFAC, 1986). Por su parte, la concentración de oxígeno al que están en contacto las células en el CMS es de 21 % (concentración de oxígeno en la atmósfera).

Posiblemente el problema de difusión de oxígeno en los matraces del CML ocasiona que la respiración celular en CML sea más lenta y por consecuencia, el crecimiento sea más lento que el CMS y esto se refleja en las tasas específicas de crecimiento de las tres concentraciones evaluadas en este trabajo. Consecuentemente, la velocidad de asimilación de sustrato también fue menor, tal y como se muestra en los gráficos de consumo de glicerol con respecto al tiempo (ver apartado 7.3). Además en el CML se observó el empleo de glicerol para mantenimiento celular (punto de inflexión donde la recta con pendiente se vuelve completamente vertical en las curvas de los gráficos de fases). Posiblemente, la generación de nuevos solutos como biomasa y algunos metabolitos dificultan aún más la transferencia de oxígeno al medio y a la célula, inhibiendo la cadena respiratoria y deteniendo el crecimiento (Calik *et al.*, 2015). Las células necesitan mantenerse y usan el sustrato restante para la reparación celular, es por eso que cuando no hay crecimiento aún existe consumo de glicerol, en menor proporción con 25 g/L de glicerol y en mayor

proporción en 50 y 100 g/L de glicerol, (ver gráficos de consumo de glicerol con respecto al tiempo, sección 7.3).

Carnicer *et al.*, (2009) realizaron un estudio de metabolitos extracelulares producidos por *P. pastoris* bajo condiciones de hipoxia en CML y encontraron que en un cultivo aireado con 8 % de oxígeno se producía etanol y arabitol, mientras que en aireación con atmósfera normal (21 %) estos metabolitos no se sintetizan. El etanol tiene un efecto tóxico sobre las células y el arabitol probablemente tiene un rol parecido al glicerol, funcionando como osmoprotector bajo condiciones de estrés. El arabitol también se acumula bajo condiciones de estrés salino y altas concentraciones de sustrato (Carnicer *et al.*, 2009). Se ha reportado la producción de este metabolito también en *Pichia anomalia* con altas concentraciones de sustrato (Bellinger & Larher, 1988). Es posible que en CML se dé la producción de estos metabolitos, sintetizados a partir del glicerol consumido durante el manteniendo (ver gráficos de fases de los CML, sección 7.3)

Arellano-García *et al.*, (2015) modelaron la estructura 3D de la PUF de alta densidad con ayuda de un *software* y sugirieron una conexión de trabéculas de poliuretano (aristas de cubos), con la posibilidad de que en cada trabécula de PUF se forme una biopelícula de microorganismos en forma cilíndrica (ver Figura 12.2 de anexos). Las micrografías tomadas en este trabajo para observar la red tridimensional de la PUF mostraron que la espuma no sólo es una red formada por trabéculas de poliuretano, sino que también está formada de muchas capas muy delgadas de dicho material (ver Figura 7.16). En estas capas delgadas de poliuretano pueden crecer las levaduras y también en las trabéculas del poliuretano. La inexistencia de agitación en el CMS permite que las células crezcan en agregados de células (como racimos de uvas) colonizando toda la espuma, en concreto donde se encuentren los nutrientes necesarios para el crecimiento. Por ello no existe diferencia en la morfología del crecimiento de las células en CMS con respecto a la concentración de glicerol (ver Figura 7.17). Esta configuración es muy importante a efectos de explicar las claras diferencias en la fisiología de crecimiento encontradas entre CMS y CML, puesto que

permite pensar en un fenómeno de adecuación a este tipo de ambiente, más cercano a donde evolucionaron las levaduras, y que por ejemplo sugiere que las células del exterior de los agregados están expuestas de forma diferente a diferentes elementos del ambiente que las células del interior del agregado (en este caso en particular es interesante mencionar el estrés osmótico que podría generarse derivado de las elevadas concentraciones de glicerol presentes en el medio). Esta es una diferencia fundamental respecto de la configuración celular en CML (ver Figura 7.18) donde la cantidad de área celular expuesta al glicerol es mucho mayor, y por lo tanto no hay un ajuste tan efectivo a concentraciones que aumentan un estrés osmótico, lo que tiene como consecuencia una clara diferencia en la cantidad del flujo de energía metabólica que las células deben destinar al mantenimiento.

Se identificaron solo tres genes de los cuatro reportados en la base de datos de NCBI que se sugiere codifican los transportadores de glicerol (Shutter *et al.*, 2009). Los tres genes identificados presentan una identidad mayor al 88 % con los genes reportados para *P. pastoris* GS115. El gen no identificado no arrojó similitud con ninguna secuencia del genoma de *P. pastoris*, posiblemente porque fue una de las secuencias que poseía más interferencia de todas las demás, o bien porque hubo un mal diseño de cebadores que amplifiquen otra región y finalmente que este gen amplificado en la cepa CBS 7435 no sea similar al gen de la cepa GS115 (tal vez sólo sea similar la región donde se diseñaron los cebadores). De hecho, lo que motivó a realizar la identificación molecular de la cepa empleada en este trabajo fue que al principio se realizó un estudio de crecimiento de la cepa CBS 7435 en el mismo medio y condiciones de cultivo que López *et al.*, (2010), pero se obtuvieron datos totalmente diferentes (ver Figura 12.3, apartado de anexos), ya que ellos emplearon una cepa recombinante derivada de la GS115. Existen muchos estudios donde se muestra que existen diferencias fisiológicas y genéticas inclusive entre cepas de diversos microorganismos y entre cepas de *P. pastoris* (Krainer *et al.*, 2012).

9. CONCLUSIONES

La producción de biomasa y consumo de sustrato son superiores en CMS, en relación al CML, en concentraciones de glicerol superiores a 50 g/L, esto puede deberse a que la relación A/V del CMS asegura que el sistema no está limitado por oxígeno (como ocurre en el CML), por lo que las células de *P. pastoris* pueden oxidar todo el sustrato para generar biomasa. Con esto se puede sugerir que el CMS es el mejor sistema de cultivo para producir grandes densidades de biomasa de *P. pastoris*. Además, al no necesitarse energía para agitar el sistema en el CMS, como sí ocurre en el CML, se reducen los costos de operación.

La formación de agregados celulares de *P. pastoris* en CMS favorece un rápido ajuste celular al entorno ambiental, lo que se ve reflejado en forma directa en el crecimiento acelerado y el consumo de sustrato. Mientras, que en el CML la agitación constante disgrega a las células, probablemente incrementando el estrés que provoca un ajuste metabólico para usar más sustrato destinado a mantenimiento.

10. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas para continuar este estudio se proponen las siguientes:

- Visualizar el crecimiento celular *in situ* de *P. pastoris* en los cubos PUF con microscopia confocal, esto podría dar una idea más amplia de los agregados celulares sin retirar ninguna célula del sistema. De esta manera se podrían visualizar los agregados formados en las capas delgadas (meniscos) del líquido con las trabéculas de poliuretano.
- Comparar el transcriptoma y proteoma de *P. pastoris* en CMS y CML podría dar información muy importante sobre la regulación de la expresión de genes en ambos sistemas. Con este estudio se podría saber qué puntos de regulación son diferentes (transporte, señalización, metabolismo, respiración, etc.) y qué mecanismos posiblemente estén relacionados con las diferencias fisiológicas en ambos sistemas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P. K., Uppada, V., & Noronha, S. B. (2013). Comparison of pyruvate decarboxylases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:9439-9449. doi:10.1007/s00253-013-4758-4
- Ali , H. Q., & Zulkali, M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*, 22:255-266. doi:64433881
- Arellano-Garcia, L., Dorado, A. D., Morales-Guadarrama, A., Sacristan, E., Gamisans, X., & Revah, S. (2015). Modeling the effects of biomass accumulation on the performance of a biotrickling filter packed with PUF support for the alkaline biotreatment of dimethyl disulfide vapors in air. *ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY*, 99:97-107. doi:10.1007/s00253-014-5929-7
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P., & Mattanovich, D. (2008). Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 100:177-183. doi:10.1002/bit.21763
- Bellinger, Y., & Larher, F. (1988). A ¹³C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeasts *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media. *Can J Microbiol*, 34:605-661.
- Bhavdish, N. J., & Devendra, K. C. (2009). Basidiomycetous Yeasts: Current Status. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 21-43). New Delhi: Springer Science + Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_2

- Brady, C. P., Shimp, R. L., Miles, A. P., Whitmore, M., & Stowers, A. W. (2001). High-Level Production and Purification of P30P2MSP119, an Important Vaccine Antigen for Malaria, Expressed in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23:468-475. doi:10.1006/prev.2001.1526
- Brejning, J., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2003). Genome-wide transcriptional changes during the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiology*, 179:278-294. doi:10.1007/s00203-003-0527-6
- Calık, P., Ozge, A., Hande, G., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., Ozdamar, T. H. (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 95:20-36. doi:10.1016/j.bej.2014.12.003
- Carnicer, M., Baumann, K., Topf, I., Sánchez-Ferrando, F., Mattanovich, D., Ferrer, P., & Albiol, J. (2009). Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microbial Cell Factories*, 8:1-14. doi:10.1186/1475-2859-8-65
- Cereghino, J., & Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:45-66. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
- Cereghino, L. G., Cereghino, L. J., Sunga, J. A., Johnson, M., Lim, M., Gleeson, M., & Gregg, J. (2001). New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, 263:159-169. doi:10.1016/S0378-1119(00)00576-X
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Basidiomycetous Yeast: Current Status. In T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and*

Applications (págs. 19-46). New York: Springer Science+Business Media BV.

Diaz-Montaña, D. M., & Ramírez-Córdova, J. d. (2009). The Fermentative and Aromatic Ability of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* Yeasts. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 282-301). New Delhi: Springer Science + Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_14

Doelle, H. W., Mitchell, D. A., & Rolz, C. E. (1992). *Solid Substrate Cultivation*. London: Elsevier.

Egli, T., van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Harder, W., & Fiechter, A. (1980). Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Archives of microbiology*, 124:115-121. doi:10.1007/BF00427715

Ellis, S., Brust, P., Koutz, P., Waters, A., Harpold, M., & Gingeras, T. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.*, 5:1111-1121. doi:10.1128/MCB.5.5.1111.

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Brandt, A. (2005). A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16:2068-2076. doi:10.1091/mbc.E04-10-0884

Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5:527-543. doi:10.1016/j.femsyr.2004.09.004

- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49:289–307. doi:10.1016/j.bej.2010.01.011
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 54:741-750.
- Gellissen, G., & Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review. *Gene*, 190:87-97. doi:10.1016/S0378-1119(97)00020-6
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., & van dei Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS Yeast Res*, 5:1079-1096. doi:10.1016/j.femsyr.2005.06.004
- Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature biotechnology*, 22:1409-1414. doi:10.1038/nbt1028
- Gleeson, M. A., & Sudbery, P. E. (1988). The methylotrophic yeasts. *Yeast*, 4:1-15. doi:10.1002/yea.320040102
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, 22:346-353. doi:10.1016/j.tibtech.2004.04.006.
- Hang, H., Ye, X., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, M., & Zhang, S. (2009). A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucosa as the growth subtrate. *Enzyme*

and Microbial Technology, 44:185-188.
doi:10.1016/j.enzmictec.2008.12.002

Helenius, A., & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291:2364-2369. doi:10.1126/science.291.5512.2364

Hellwing, S., Emde, F., Raven, N., Henke, M., Logt, P., & Fisher, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 74:344-352. doi:10.1002/bit.1125

Henry, T., Iwen, P. C., & Hinrichs, S. H. (2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 4:1510-1515. doi:0095-1137/00/\$04.00+0

Heyland, J., Fu, J., Blank, L. M., & Schmid, A. (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 157:1942-1953. doi:10.1002/bit.23114

Hitzeman, R. A., Hagie, F. F., Levine, H. L., Goeddel, D. W., Ammerer, G., & Hall, B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293:717-723. doi:10.1038/293717a0

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:300-372. doi:10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002

Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., & Kielland-Brandt, M. (2000). *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 37:108-124. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01968.x

- Inan, M., & Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92:585-589. doi:10.1016/S1389-1723(01)80321-2
- Iwen, P., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40:22-46. doi:doi:10.1080/mmy.40.1.87.109
- Käppeli, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microb Physiol*, 28:181-209. doi:10.1016/S0065-2911(08)60239-8
- Klein, C. J., Olsson, L., & Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology*, 144:13-24. doi:10.1099/00221287-144-1-13
- Klockner, W., & Buchs, J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*, 30:307-314. doi:10.1016/j.tibtech.2012.03.001
- Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwing, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11:1-22. doi:1475-2859-11-22
- Kueberl, A., Shneider, J., Thallinger, G. G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., Pichler, H. (2011). High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal Biotechnonogy*, 154:312-320. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.04.014
- Lages, F., & Lucas, C. (1997). Contribution to the physiological characterisation of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1322:8-18. doi:10.1016/S0005-2728(97)00062-5

López, M., Loera, O., Guerrero-Olazarán, M., Viader-Salvadó, J. M., Gallegos-López, J. A., Fernández, F. J., . . . Viniegra-González, G. (2009). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J Chem Technol Biotechnol* 2010, 85:435-440. doi:10.1002/jctb.2306

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

Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., Gasser, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 13. doi:10.1186/1475-2859-8-29

Menendez, J., Hernandez, L., Banguela, A., & Pais, J. (2004). Functional production and secretion of the *Gluconoacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enz Microb Technol*, 34:446-452. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.11.018

Mishra, S., & Baranwal, R. (2009). Yeast Genetics and Biotechnological Applications. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 324-351). © Springer Science + Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_16

Mochizuki, S., Hamato, N., Hirose, M., Miyano, K., Ohtni, W., Kameyama, S., Ohi, H. (2001). Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 23, 55-63. doi:10.1006/prev.2001.1479

- NCBI. (05 de 04 de 2015). *National Center for Biotechnology Information*.
Obtenido de National Center for Biotechnology Information (NCBI):
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glycerol%20proton%20symporte
r%20%20Komagataella%20pastoris%20GS115%20](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glycerol%20proton%20symporte%20%20Komagataella%20pastoris%20GS115%20)
- Nel, S., Labuschagne, M., & Albertyn, J. (2009). Advances in Gene Expression in Non-Conventional Yeasts. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 370-397). New Delhi: © Springer Science + Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_18
- Neves, L., Oliveira, R., & Lucas, C. (2004). Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Research*, 5, 51-62. doi:10.1016/j.femsyr.2004.06.012
- Núñez-Reyes, D. E., Favela-Torres, E., & López-Pérez, M. (2012). Desarrollo de un sistema de producción de *Pichia pastoris* en cultivo en medio sólido. Mexico D.F.: Tesis de Maestría.
- Olivera, R., Lages, F., Silva-Graca, M., & Lucas, C. (2003). Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1613:57-71. doi:10.1016/S0005-2736(03)00138-X
- Pavlou, A. K., & Reichert, J. M. (2005). Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 22:1513-1519. doi:10.1038/nbt1204-1513
- Perez, M. D., Gonzalez, G., Avila, J., Brito, N., & Siverio, J. M. (1997). The *YNT1* gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes *YNI1* and *YNR1* encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem. J.*, 321:397-403.

- Peterman, K., & Simione, F. (2009). Preservation, Storage and Transport: Integrity and Compliance. En M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (págs. 261-270). Manassas, VA, USA: Elsevier Inc.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 55:468-477.
- Potter, K. J., Bevins, M. A., Vassilieva, E. V., Chiruvolu, V. R., Smith, T., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (1998). Production and Purification of the Heavy-Chain Fragment C of *Botulinum Neurotoxin*, Serotype B, Expressed in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 13:357-365. doi:10.1006/prev.1998.0910
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*. McGraw-Hill.
- Ratledge, C. (2001). Biochemistry and Physiology of Growth and Metabolism,. En C. Ratledge, & B. Kristiansen, *Basic Biotechnology*, (págs. 17-45). Cambridge: Cambridge University.
- Ren, H. T., Yuan, J. Q., & Beligardt, K. H. (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J. Biotechnol*, 106:53-68. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.08.003
- Ren, Q., & Paulsen, I. T. (2009). Transport, Solute. En M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (págs. 529-544). San Diego State, CA, USA: Elsevier Inc.
- Rohardjo, Y. S., Tramper, J., & Rinzema, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24:161-179. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.09.002

- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., Hinton, J. C. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194: 686-701. doi:10.1128/JB.06112-11
- Rosennfeld, S. A. (1999). Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods . Enzymol*, 306:154-169.
- Runquist, D., Hahn-Hagerdal , B., & Radstrom, P. (2010). Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels*, 1-7. doi:10.1186/1754-6834-3-5
- Shnada, H., Toyin, K., Tahir, H., Dabai, A., & Abiodun, S. (2014). Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp. *International Scholarly Research Notices*, 1-8. doi:10.1155/2014/762021
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic principles*. USA: Prentice Hall PTR.
- Shutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27: 561-566. doi:10.1038/nbt.1544
- Soares-Silva, I., Schuller, D., Andrade, R. P., Baltazar , F., Cássio, F., & Casal, M. (2003). Functional expression of the lactate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biochemical Journal*, 376:781-787. doi: 10.1042/BJ20031180
- Sreekrishna, K., & Kropp, K. E. (1996). En K. Wolf, *Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook* (págs. 203-251). Heidelberg: Springer-Verlag.

- Stapleton, P. C., O'Brien, M. M., O'Callaghan, J., & Dobson, A. D. (2004). Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from *Trametes versicolor* and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34:55-63. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.08.006
- Steinborn, G., Wartmann, T., Gellissen, G., & Kunze, G. (2007). Construction of an *Arxula adenivorans* host-vector system based on *trp1* complementation. *Journal of biotechnology*, 127:392-401. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.07.026
- Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Kilian, S. G. (1997). Characteristic of *Fps-1* dependent and independent glycerol transport in *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*, 179:7790-7795. doi:0021-9193/97/\$04.0010
- Tamas, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C., Hernández, A., Albertyn, J., Valadi, H., Hohmann, S. (1999). Fsp1p controls the accumulations and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol.*, 31:1087-1104.
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2009). Industrial Biotechnology, (overview). En M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (págs. 281-294). San Diego: Elsevier Inc.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., & Ammerer, B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles yeast. *Nature*, 298:298-347.
- van Aelst, L., Hohmann, S., Zimmermann, F. K., Jans, A., & Thevelein, J. M. (1991). A yeast homologue of the bovine lens fibre *MIP* gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signalling. *The EMBO journal*, 2095-2104. doi:PMC452894

- Veenhuis, M., Salomons, F. A., & van del Klei, I. J. (2000). Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: A structure/function analysis. *Microsc. Res. Tech.*, 51:584-600. doi:10.1002/1097-0029(20001215)51:6<584::AID-JEMT8>3.0.CO;2-W
- Veenhuis, M., van Dijken, J. P., & Harder, W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds. *Adv. Microb. Physiol.*, 24:1-78. doi:10.1016/S0065-2911(08)60384-7
- Viniegra-González , G. (1997). Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. En S. Roussos, B. K. Lonsane, M. Raimbault, & G. Viniegra-González, *Advances in Solid State Fermentation* (págs. 2: 5-22). Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez , S., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13:157-167. doi:10.1016/S1369-703X(02)00128-6
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. En M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (págs. 478-491). San Diego: Elsevier Inc.
- Walsh, G. (2003). Biopharmaceutical benchmarks—2003. *Nature Biotechnology*, 21:865-870. doi:10.1038/nbt1103-1396a
- Wang, Y., Liang, Z.-H., Zhang, Y.-S., Yao, S.-Y., Xu, Y.-G., Tang, Y.-H., Feng, Y.-M. (2001). Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering*, 73:74-79. doi:10.1002/1097-0290(20010405)73:1<74::AID-BIT1038>3.0.CO;2-V
- Wegner, G., & Harder, W. (1987). Methylotrophic Yeasts -- 1986. *Microbial Growth on C1 Compounds*, 5:131-138. doi:10.1007/978-94-009-3539-6_17

- Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology*, 3:119-128. doi:10.1038/nrmicro1087
- Wriessnegger, T., Gubitz, G., Leitner, E., Ingolic, E., Cregg, J., & de la Cruz, B. (2007). Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia*. *Biochim Biophys Acta*, 1771:455-461. doi:10.1016/j.bbalip.2007.01.004
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X., & Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.*, 42:27-81. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130206
- Zhang, P., Zhang, W., Zhou, X., Bai, P., Creqq, J., & Zhang, Y. (2010). Catabolite repression of *Aox* in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter *PpHxt1* and pexophagy. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:6108-6118. doi:10.1128/AEM.00607-10
- Zheng, H., Wang, X., Chen, J., Zhu, K., Zhao, Y., Yunliu, Y., Jiang, W. (2006). Expression, purification, and immobilization of His-tagged d -amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70:683-689. doi:10.1007/s00253-005-0158-8
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., & Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Nutrition and Food Research*, 16:643-648. doi:10.1007/BF00128615

12. ANEXOS

A. Curva estándar para determinar glicerol por HPLC

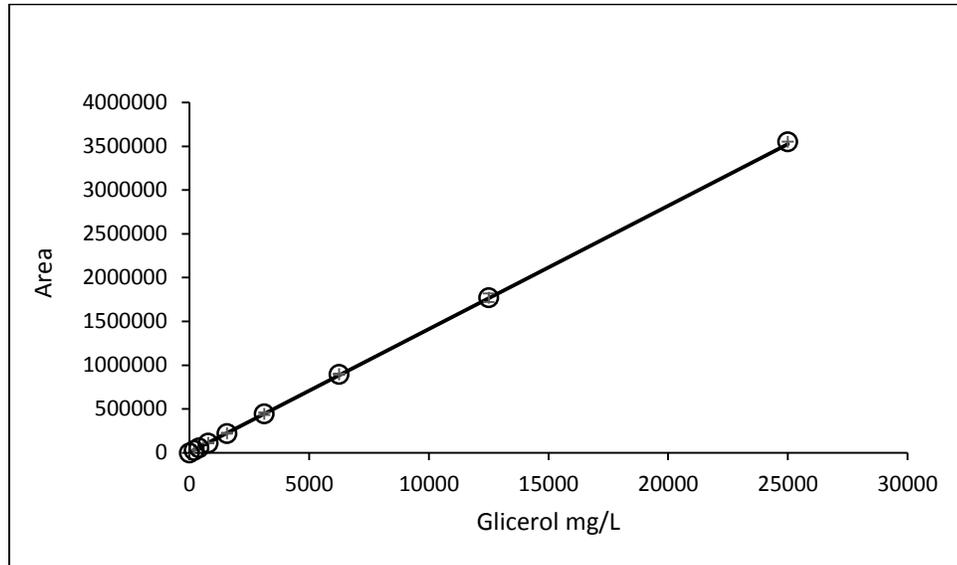


Figura 12.1. Curva de calibración. La línea continua representa el ajuste lineal y los puntos representan el estándar de glicerol. $R^2 > 0.99$.

$$\text{Fórmula: } \text{Area} = 140.8 \pm 2.5 \left[\text{Glicerol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \right] + 3462.4 \pm 1012.3$$

B. Fotografía y modelo tridimensional de PUF extraído de (Arellano-García *et al.*, 2015).

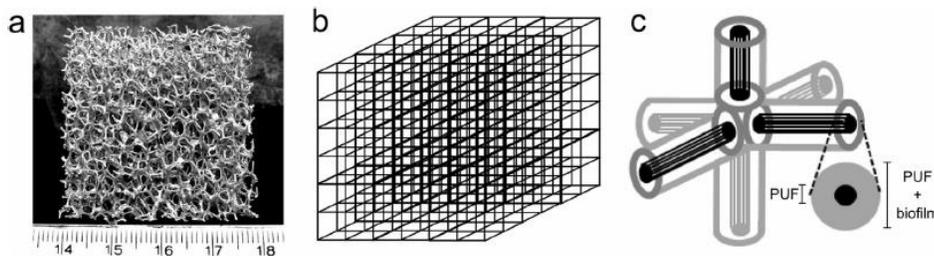


Figura 12.2. Fotografía de PUF (alta densidad 21 kg/m^3) a) Escala en centímetros, b) Modelo de estructura propuesta para la PUF. c) Filamentos tridimensionales de PUF (0.3 mm) con biomasa (biopelícula).

C. Cinéticas de producción de biomasa de *P. pastoris* CBS 7435 en CML y CMS con medio BMG según López *et al.*, (2010).

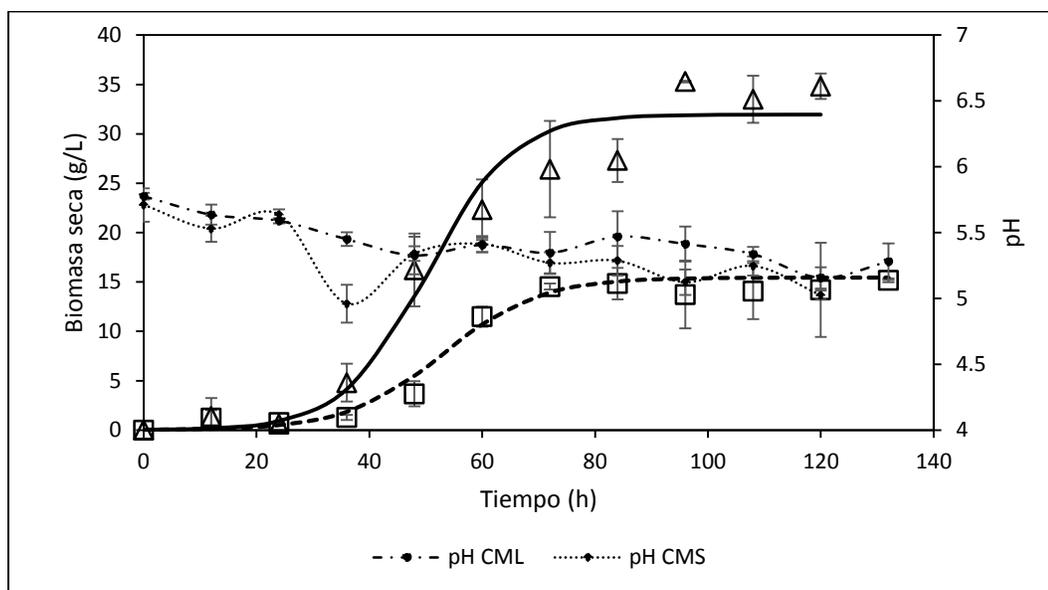


Figura 12.3. Producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS (Δ) y CML (\square) con 94.6 g/L de glicerol. Los triángulos y cuadrados representan los datos experimentales de biomasa. Las líneas representan el ajuste al modelo logístico, esto es, línea continua (—) para CMS y línea discontinua (----) para CML. Adicionalmente se muestra el perfil de pH para ambos sistemas.

	90.4 g/L de glicerol	
	CMS	CML
Xmax (g/L)	31.9 ± 0.6	15.4 ± 0.7
μ (h⁻¹)	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01
R²	0.96	0.98