

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE *Pichia pastoris* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO”

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta:

DIANA ETHEL NUÑEZ REYES

Comité tutorial:

Dr. Ernesto Favela Torres	Director
Dr. Gustavo Viniegra González	Asesor
Dr. Marcos López Pérez	Asesor

México, D.F.

Noviembre, 2012.

“No te rindas, por favor no cedas...

aunque el frío queme, aunque el miedo muerda,

aunque el sol se esconda, y se calle el viento,

aun hay fuego en tu alma,

aun hay vida en tus sueños.

porque la vida es tuya y tuyo también es el deseo,

porque cada día es un comienzo nuevo,

porque esta es la hora y el mejor momento”.

Mario Benedetti

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 Noviembre del 2012.

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

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA PRODUCCIÓN DE
Pichia pastoris EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.

que presentó

Diana Ethel Nuñez Reyes

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Marcos López Pérez

Jurado:

Presidente: Dr. Gustavo Viniegra González

Secretaria: Dra. María de Lourdes Villa Tanaka

Vocal: Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Vocal: Dr. Marcos López Pérez

México D.F. a 30 de Noviembre del 2012.

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

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA PRODUCCIÓN DE
Pichia pastoris **EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.**

que presentó

Diana Ethel Nuñez Reyes



Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Marcos López Pérez

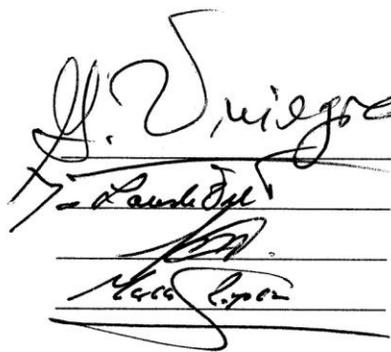
Jurado:

Presidente: Dr. Gustavo Viniegra González

Secretaria: Dra. María de Lourdes Villa Tanaka

Vocal: Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Vocal: Dr. Marcos López Pérez



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis no hubiera podido ser realizada sin la ayuda de muchas personas, a todas ellas quiero expresarles la fortuna de haber trabajado y compartido con todos ustedes, estoy muy agradecida con la ayuda, aprecio, amistad y solidaridad recibida.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ernesto Favela Torres, por abrirme las puertas de su grupo al aceptar ser mi director de tesis, por todo el conocimiento que me ha brindado, por su paciencia, por su preocupación en mi crecimiento profesional, por su dedicación en este trabajo, pero sobre todo, por su confianza y consejos que me ha brindado, ya que ha sido como un amigo.

Al Dr. Aldo González, por su confianza, sus consejos y porque gracias a él llegué a la UAMI.

Al Dr. Gustavo Viniegra González, por su disposición, su paciencia, sus valiosas aportaciones en este trabajo y su preocupación en mi crecimiento profesional.

Al Dr. Marcos López Pérez, por su asesoría y gran ayuda.

Al Dr. Francisco José Fernández, por su confianza y apoyo.

Hay gente que no ha estado cerca de mi, pero han estado en mis días, en mis recuerdos y a través de la distancia. Me refiero a toda mi familia, a mis padres y hermanos, que siempre me han apoyado y me han dado ánimos para lograr mis proyectos.

A Axel, por estar conmigo y el apoyo que me brinda.

A mis compañeros del laboratorio de la Planta Piloto 4, en especial a Susy, Naye y a Ednita.

A Tere Torres, por su gran ayuda técnica, ya que sin ella gran parte del trabajo experimental no hubiera sido posible.

A Rosy, por su gran ayuda técnica y porque siempre me ayudó de buena manera cuando lo necesité.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por permitirme realizar este trabajo.

MUCHAS GRACIAS

Dedicatoria

A mis padres, quienes siempre han estado apoyádome a través de la distancia, han creído en mí y de quienes he recibido apoyo incondicional, porque gracias a ellos estoy en este momento culminando un proyecto más en mi vida.

A mis hermanos, quienes también a pesar de la distancia me hay apoyado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Biotecnología de proteínas recombinantes.....	4
1.1.Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	5
1.2.Sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i>	9
2.- Aspectos generales del género <i>Pichia</i>	10
2.1. <i>Pichia pastoris</i>	10
2.2. Metabolismo de <i>Pichia pastoris</i>	13
3.- Fisiología de levaduras en relación al rendimiento de biomasa.	16
3.1. Transporte de azúcares.	18
3.2. Efecto de los subproductos en el rendimiento de biomasa.	18
3.3. Energía de mantenimiento y factores ambientales.	23
4.- Cultivo en medio sólido.	31
4.1. Biorreactores para cultivo en medio sólido.	32
JUSTIFICACIÓN.....	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.- Microorganismo.	40
2.- Conservación de la cepa.....	40
2.1. A corto plazo.	40
2.2. A largo plazo.	40
3.- Soporte.	40
4.- Medios de cultivo.....	40
5.- Producción del inóculo.....	41
6.- Curva estándar de células.....	41
7.- Caracterización del EPU.	42
7.1. Capacidad de retención de agua (u).....	42
7.2. Curvas de secado del EPU.....	42
7.3. Actividad del agua en el EPU.....	42
8.- Modelo experimental.....	43

9.- Cultivo en medio sólido en reactor de columna.....	43
10.- Procesamiento de muestras.	44
11.- Métodos analíticos.	44
11.1. Determinación de biomasa por turbidimetría.	44
11.2. Determinación de glucosa.	44
11.3. Determinación de humedad.	45
11.4. Determinación de pH.....	45
11.5. Determinación por HPLC.....	45
12.- Cálculo de parámetros cinéticos.....	45
12.1. Rendimiento (Y _{x/s}).	45
12.2. Tasa específica de producción de CO ₂ (μ _m).	46
12.3. Fase lag del crecimiento de <i>P. pastoris</i>	46
12.4. Coeficiente respiratorio (CR).	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
1.- Caracterización del soporte inerte (EPU).....	48
1.1. Capacidad de retención de agua.	49
1.2. Curvas de secado.	51
1.3. Actividad de agua.	53
2.- Crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en cultivo en medio sólido sobre EPU.....	56
2.1. Composición del medio de cultivo.	57
2.2. Diseño del sistema de cultivo en medio sólido.....	63
2.3. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i>	67
2.4. Efecto del nivel de inóculo sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i>	70
3.- Efecto del grosor de las placas de espuma de poliuretano y diferentes concentraciones iniciales de glucosa sobre la producción de biomasa y el metabolismo de <i>Pichia pastoris</i> ..	72
3.1. Efecto del espesor de la placa en los parámetros de crecimiento.	73
3.2. Parámetros cinéticos.....	80
4.- Balances de carbono.....	86
CONCLUSIONES.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión (Guerrero y col., 2004).....	6
Tabla 2. Ventajas y desventajas de diferentes hospederos para la producción de proteínas recombinantes (Guerrero y col., 2004).....	8
Tabla 3. Reacciones de producción de radicales de oxígeno y su desintoxicación en levaduras (Verduyn, 1991).....	26
Tabla 4. Efecto del H ₂ O ₂ en el rendimiento celular en cultivos limitados de glucosa en quimiostato de <i>Hansenula polymorpha</i> ATCC 46059 a un ratio de dilución de 0.10 h ⁻¹ (Verduyn, 1991).....	27
Tabla 5. Clasificación y diferencias en biorreactores a nivel laboratorio, piloto e industrial (Ruíz y col., 2007).....	33
Tabla 6. Resumen de los valores de crecimiento de <i>P. pastoris</i> , consumo de glucosa y pH con diferentes fuentes de nitrógeno.....	62
Tabla 7. Parámetros de crecimiento y consumo de glucosa de <i>P. pastoris</i> en función de la región de la placa de EPU en posición vertical.....	63
Tabla 8. Parámetros asociados al crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS en reactor de columna horizontal.....	65
Tabla 9. Parámetros asociados al crecimiento de <i>P. pastoris</i> a diferentes concentraciones iniciales de sustrato y con espesor de placa, h = 0.7 cm.....	68
Tabla 10. Parámetros asociados al crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS (López y col, 2009). 70	
Tabla 11. Parámetros asociados al crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS en función del tamaño de inóculo.....	71
Tabla 12. Parámetros de crecimiento de <i>P. pastoris</i> con glicerol como fuente de carbono (López y col., 2009).....	77
Tabla 13. Parámetros fisiológicos de las cepas de <i>P. pastoris</i> (Kern y col., 2007).....	78
Tabla 14. Tasas específicas de crecimiento y coeficientes de rendimiento de glucosa con diferentes concentraciones iniciales durante la fase de cultivo por lote (Klein y col., 1998).....	79

Tabla 15. Comparación de la densidad celular y la producción de fitasa entre la glucosa y el glicerol en cultivos por lote alimentado (Hang y col., 2009).....	79
Tabla 16. Rendimiento celular (g biomasa/g sustrato) de <i>C. utilis</i> CBS 621 y <i>S. cerevisiae</i> CBS 8066 en cultivos aerobios limitados de carbono en medio mínimo sobre varias fuentes de carbono como una función del grado de reducción (Verduyn y col., 1991 ^a).	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de producción de una proteína heteróloga con <i>Pichia pastoris</i>	12
Figura 2. Red de vías bioquímicas activas construida para células de <i>P. pastoris</i> creciendo con glicerol o glucosa como única fuente de carbono (Fiaux y col., 2003).	15
Figura 3. Ruta de la formación y consumo de acetato en levaduras (Verduyn, 1991).....	21
Figura 4. Representación esquemática del desacoplamiento de la membrana plasmática por los ácidos débiles (Verduyn, 1991).	23
Figura 5. Biorreactor columna- charola para CMS (Ruíz y col., 2007).	34
Figura 6. Diseño del sistema en columna para el CMS.....	43
Figura 7. Micrografías de EPU.....	49
Figura 8. Capacidad de retención de agua, u, en placas de EPU.....	50
Figura 9. Curvas de secado de EPU con diferente espesor.	52
Figura 10. Parámetros V_{max} y K_{sat} para caracterizar el secado en el EPU.....	52
Figura 11. Actividad de agua de las placas de EPU en función del contenido de humedad. ...	54
Figura 12. Curva estándar de producción de biomasa de <i>P. pastoris</i>	57
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en cultivo superficial.	58
Figura 14. Producción de biomasa de <i>P. pastoris</i> en CMS con EPU.....	59
Figura 15. Cinética de consumo de glucosa por <i>P. pastoris</i> en CMS con EPU.....	59
Figura 16. Variación del pH en CMS con EPU utilizando <i>P. pastoris</i>	60

Figura 17. Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.	60
Figura 18. Cinética de consumo de glucosa por <i>P. pastoris</i> en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.	61
Figura 19. Variación del pH del medio durante el crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.	61
Figura 20. Efecto del contenido de medio de cultivo (relación medio/EPU) en la producción de CO ₂ por <i>P. pastoris</i>	64
Figura 21. Efecto del modo de operación del cultivo sobre el crecimiento y consumo de sustratos por <i>P. pastoris</i> (Barrigón y Ramón, 2011).	64
Figura 22. Efecto del modo de operación del cultivo sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i> (Barrigón y Ramón, 2011).	65
Figura 23. Efecto de la fracción polimérica intacta, f, el rendimiento de la biomasa con S ₀ = 50 g/L.	66
Figura 24. Producción de CO ₂ por <i>P. pastoris</i> a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.	67
Figura 25. Efecto de la concentración inicial de glucosa, S ₀ , sobre la productividad de la biomasa calculada como $P = Y_{X/S} S_0 \mu_{max}$	69
Figura 26. Efecto del tamaño de inóculo sobre el perfil de producción acumulada de CO ₂ por cultivos de <i>P. pastoris</i> en EPU.	70
Figura 27. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS.	73
Figura 28. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el rendimiento de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en CMS.	76
Figura 29. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre la producción de CO ₂ por <i>P. pastoris</i> en CMS.	80
Figura 30. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre la duración de la fase lag de <i>P. pastoris</i> en CMS.	81
Figura 31. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre la tasa específica de producción de CO ₂ de <i>P. pastoris</i> en CMS.	82

Figura 32. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el coeficiente respiratorio de <i>P. pastoris</i> en CMS.	83
Figura 33. Tasas de transferencia de O ₂ y CO ₂ y el CR de la fermentación de la levadura <i>P. stipitis</i> (Anderlei y col., 2004).	85
Figura 34. Balances parciales y totales de carbono en los cultivos realizados con diferente concentración inicial de glucosa y diferente espesor de EPU.	87
Figura 35. Representación esquemática de las rutas metabólicas durante el crecimiento de <i>C. utilis</i> con varias fuentes de carbono (Verduyn y col., 1991 ^a).	89

RESUMEN

La demanda de proteínas recombinantes terapéuticas (PRT) de consumo humano se ha convertido en una realidad comercial y ha aumentado dramáticamente durante los últimos años, salvando un número incontable de vidas gracias a la casi accesibilidad ilimitada de estas proteínas. Más de 80 proteínas recombinantes están aprobadas para consumo humano. Aunque mucho se ha avanzado, la producción de proteínas recombinantes constituye un campo que necesita ser mucho más estudiado, más aún cuando los precios de muchos de estos medicamentos son altos y de difícil acceso en países en vías de desarrollo, por ello, uno de los mayores objetivos de la industria es maximizar la productividad, es decir, obtener altas concentraciones de producto en un menor tiempo y las altas concentraciones celulares (biomasa) son un prerequisite para obtener una alta productividad de proteínas recombinantes.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se propone el cultivo en medio sólido (CMS) como alternativa gracias a las ventajas que ofrece en comparación con el cultivo sumergido (CS) en la producción de biomasa y enzimas.

Considerando que para la producción de biomasa en condiciones de cultivo en medio sólido es necesario favorecer la transferencia de O_2 , se decidió evaluar el uso de capas finas de poliuretano (EPU) como soporte para el crecimiento de *Pichia pastoris*. Además, se evaluó la concentración inicial de glucosa (50 a 150 g/L) sobre la producción de biomasa de *P. pastoris*. Estos experimentos demostraron que el rendimiento $Y_{x/s}$ (g/g) disminuye al aumentar la concentración de glucosa obteniéndose un $Y_{x/s}$ de 0.45 para una $S_0 = 50$ g/L, valor muy cercano al teórico 0.5, lo cual demuestra que este sistema está bien aireado, pero para $S_0 = 150$ g/L se obtuvo un $Y_{x/s}$ de 0.28.

El análisis del cambio del coeficiente respiratorio (CR), en función de diferentes concentraciones iniciales de glucosa y diferentes espesores de EPU, permitió determinar que con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L y un espesor de 0.7 cm, el metabolismo

respiratorio de la glucosa fue completo ($CR > 0.9$) y que el descenso del CR es debido al agotamiento de la glucosa. A concentraciones de glucosa superiores a 50 g/L y espesores de EPU de 0.3 y 0.5 cm el valor de CR fue menor a 0.9, de lo cual podemos asumir que al aumentar la concentración de glucosa o disminuir el espesor de la placa de EPU, no se realiza el metabolismo completo de la glucosa y se obtienen diferentes productos como ácidos orgánicos.

Las conclusiones de este trabajo se pueden resumir en que el modelo de estudio propuesto para la producción de biomasa de *Pichia pastoris* a partir de glucosa como fuente de carbono y energía en un medio de cultivo impregnado en espuma de poliuretano bajo condiciones de cultivo en medio sólido, permitió demostrar que la producción de levaduras en placas de EPU con un espesor $h = 0.7$ cm y $S_0 = 50$ g/L, es un sistema más simple que el cultivo sumergido, aireado y agitado por lote simple y produce rendimientos y concentraciones celulares similares (20 g/L). Incluso que si se permite un metabolismo mixto (aerobio y fermentativo) se puede alcanzar con $S_0 = 150$ g/L, la concentración celular de 40 g/L, valor que ya calificaría en el límite inferior de los cultivos densos. Los cuales llegan a tener hasta más de 100 g/L de levaduras en cultivos sumergidos y controlados en forma de lote alimentado. También se obtuvo que los efectos de grosor de las placas de EPU sobre el crecimiento de *Pichia pastoris* no son tan importantes como el efecto de la concentración inicial de glucosa.

A nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo en el que se evalúa el crecimiento de *Pichia pastoris* utilizando glucosa como fuente de carbono en cultivo en medio sólido con EPU, lo cual es muy importante para la producción a nivel industrial de proteínas recombinantes con esta levadura.

Palabras clave: *Pichia pastoris*, poliuretano, cultivo en medio sólido

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha impactado el área de la medicina, principalmente con su contribución al conocimiento a nivel molecular de la causa de diversas enfermedades, lo cual ha generado una revolución en la industria farmacéutica con la producción de biofármacos contra enfermedades específicas (Villaverde y Mattanovich, 2007; Betton y Chaffotte, 2005).

Un biofármaco es una molécula biológica con fines terapéuticos obtenida a partir de un organismo vivo, ya sea a partir de bacterias, hongos, células animales y levaduras, entre otros. Estas moléculas presentan mayor acción terapéutica y menos reacciones secundarias, al ser prácticamente homólogas a las producidas por el organismo (Yang y col., 1992; Maldonado y col., 2007; Graumann y Premstaller, 2006). Esto se traduce en que el paciente en la actualidad puede acceder a tratamientos más eficaces y seguros. La gran mayoría de estos biofármacos son proteínas recombinantes (Graumann y Premstaller, 2006).

Un aspecto importante de estas proteínas de uso terapéutico es que son específicas contra padecimientos que antes se consideraban incurables, estas proteínas actualmente se utilizan en tratamientos curativos y paliativos. Un claro ejemplo de esto es el interferón beta 1a y 1b, el cual ha elevado la calidad de vida de los pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple (Maldonado y col., 2007; Graumann & Premstaller, 2006).

En diversos estudios se ha demostrado que la importancia de las proteínas recombinantes con acción terapéutica se ha incrementado exponencialmente en los últimos 30 años. En 2004 la industria biofarmacéutica era de alrededor de 45 mil millones y para el 2020 se prevén ventas de hasta 200 mil millones de dólares, con un cubrimiento de más del 10% de toda la industria farmacéutica. En la actualidad, las grandes farmacéuticas tienen sus mayores ingresos de la venta de estos productos, por tanto, la investigación en este rubro también ha aumentado en gran modo y el catálogo de biofármacos es cada vez mayor en tratamiento,

curación, prevención o diagnóstico de enfermedades (Pavlou y Reichert, 2010; Datamonitor, 2004; Parmar, 2006).

Las PRT en general se generan mediante diferentes procesos productivos. La serie de pasos fundamentales para obtenerlas son: tener un gen que codifique para la proteína de interés, un hospedero que realice las modificaciones que se requieran para obtener una proteína funcional, que la proteína sea expresada a las concentraciones requeridas, un proceso de producción, un método de separación y purificación, un sistema de estabilización, y finalmente la formulación.

Por otro lado, actualmente cerca del 60% de PRT aprobadas para consumo humano, son producidas en células de mamífero de ovario de hámster chino (CHO) y de riñón de hámster bebé (BHK), ya que presentan la capacidad de producir las proteínas de manera bien plegada, con las modificaciones postraduccionales necesarias para ser altamente similares a las endógenas (Palomares y col., 2004; Bleckwenn y Shiloach, 2004). Sin embargo, los costos asociados a los medios de cultivo y adaptación de las células animales hacen de este sistema el más costoso para la producción de una proteína. Por ello, los procesos productivos actuales para manufacturar proteínas recombinantes de alto valor agregado, requieren ser altamente productivos, robustos y con bajos costos de producción (Lee, 1996; Sodoyer, 2004).

En el presente trabajo se propone el cultivo en medio sólido (CMS) como una alternativa para la producción de proteínas recombinantes ya que ha demostrado ser un procedimiento adecuado en referencia a lo anteriormente mencionado, para la obtención de proteínas recombinantes en otros microorganismos de gran interés como *Aspergillus niger* (Ramesh y Losane, 1991) o *Bacillus licheniformis* (Pereira y col., 1993).

La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína a producir. *Pichia pastoris* está entre las levaduras más utilizadas en la industria, por su alta velocidad de crecimiento, adaptabilidad a los cambios de escala en biorreactores y la posibilidad de alcanzar altas

concentraciones celulares, redituando en altas productividades (Siegel y Brierley, 1989; Ramon y col., 2004; Kong y col., 2009; Hartner y Glieder, 2006; Cregg y col., 2000). Otra gran ventaja es que estos microorganismos no producen endotoxinas, y además son capaces de glicosilar proteínas de manera similar a las líneas celulares animales.

La producción de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris* se divide en dos etapas, la primera es la producción de biomasa y la segunda la inducción de la proteína con metanol. En el presente proyecto sólo se aborda la primera etapa (Fig. 1).

En este trabajo se evaluó el cultivo en medio sólido sobre espuma de poliuretano para la producción de biomasa de *Pichia pastoris*. Con este propósito, el diseño experimental seguido en esta tesis, se basó en el diseño y evaluación de un sistema de cultivo sólido utilizando tiras de poliuretano colocadas dentro de columnas de vidrio.

1.- LA BIOTECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

La Biotecnología de proteínas está implicada en el aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales tales como plantas, animales o bien microorganismos, para su subsiguiente empleo en diversas aplicaciones. La tecnología del DNA recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la Biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteína, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Se considera una proteína recombinante o proteína heteróloga aquella cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo. Actualmente, se ofrecen en el mercado internacional una gran variedad de proteínas recombinantes para un amplio abanico de aplicaciones, incrementándose día a día la lista de estos productos, lo que ha llegado a construir toda una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Walsh y Headon, 1995).

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas.

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el bioproceso que se empleará para su producción (Tabla 1). El origen biológico de la proteína es importante ya que generalmente un sistema de expresión eucariota es más eficiente para sintetizar una proteína de origen eucariota que un sistema de expresión procariota. Respecto a las propiedades químicas y biológicas de la proteína es importante analizar su secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización prematura de la transcripción, la secuencia aminoacídica para evaluar el peso

molecular, punto isoeléctrico y tipo de modificaciones postraduccionales presentes, la estabilidad a un pH y temperatura determinada, proteólisis, la posible toxicidad sobre el hospedero, el destino celular deseado (extracelular o intracelular) y el grado de pureza deseado, etc. Un tercer factor a considerar es la aplicación que se le dará posteriormente a la proteína, si ésta se aplicará en las áreas biomédica (agentes terapéuticos, vacunas y diagnóstico clínico) o de alimentos (procesos industriales, aditivos y nutraceúticos) para emplearla en humanos, animales o plantas, o en el área de la Química de la transformación como la industria del papel, textil y del cuero, farmacéutica y química, o bien como reactivo en el área de la química analítica o en el medio ambiente como fuente de energía o tratamiento de residuos. Por último, se tiene que considerar el bioproceso que se empleará para su producción, específicamente el tipo y condiciones operacionales de cultivo, la escala de producción de la proteína de interés según si sólo se requieren unos pocos miligramos para fines de investigación o en la escala de gramos o kilogramos para fines industriales, además de evaluar el costo del bioproceso.

1.1. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Actualmente se emplean una gran variedad de hospederos que van desde microorganismos unicelulares tales como bacterias, hongos, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas.

Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* ha sido la más empleada para estos fines, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus lactis*, etc. (Walsh y Headon, 1995). Debido al nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética, *E. coli* ofrece varias ventajas (Tabla 2) respecto a otros hospederos, lo que ha permitido el desarrollo de una variedad de vectores de expresión y cepas mutantes. Sin embargo, el empleo de *E. coli* tiene también desventajas, tales como su ineficiencia para secretar proteínas al medio de cultivo y además éstas suelen precipitar como cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular. Adicionalmente, la síntesis de las proteínas heterólogas en *E. coli* induce a un incremento de la proteólisis celular, cuenta con un

sistema ineficiente para realizar modificaciones postraduccionales y genera endotoxinas dañinas para la salud.

Tabla 1. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión (Guerrero y col., 2004).

ORIGEN DE LA PROTEÍNA	<ul style="list-style-type: none"> • Procariota • Eucariota 		
PROPIEDADES DE LA PROTEÍNA	<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia nucleotídica 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de codones preferenciales 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades químicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño • pI • Modificaciones postraduccionales 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteólisis • pH • Temperatura 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidad • Destino celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracelular • Intracelular 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Grado de pureza 		
APLICACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> • Biomedicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Agente terapéutico • Vacunas • Diagnóstico 	<ul style="list-style-type: none"> • Humanos • Animales • Plantas
	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentos 	<ul style="list-style-type: none"> • Procesos Industriales • Aditivos • Nutraceuticos • Suplemento alimenticio 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Química de la Transformación 	<ul style="list-style-type: none"> • Industria del Papel • Industria Textil y del Cuero • Industria Farmacéutica • Industria Química 	<ul style="list-style-type: none"> • Catálisis enzimática • Síntesis estereoselectiva
	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo Químico 	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo analítico 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Medio ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Energía y combustibles • Tratamiento de residuos 	
BIOPROCESO	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo • Condiciones de cultivo • Escala • Costo 		

Si se emplea *Bacillus subtilis*, se tiene la ventaja de la secreción de la proteína heteróloga, sin embargo, esta bacteria secreta una gran cantidad de proteasas, además se dispone de una menor cantidad de vectores de expresión, elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes y se ha reportado menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económica de proteínas de eucariotas superiores de interés industrial y/o académico (Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos y col., 1992). Las levaduras ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Además, las levaduras mantienen las ventajas de los microorganismos al ser unicelulares, de fácil manipulación y rápido crecimiento. Por otro lado, tienen una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales (Eckart y Bussineau, 1996), lo cual les da una ventaja para la producción de proteínas de origen eucariota.

El empleo de *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero en un sistema de expresión eucariota ofrece la ventaja de ser uno de los organismos eucariotas mejor caracterizado, su genoma ha sido totalmente secuenciado y es considerado como organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) americana. Por estos motivos, muchos de los sistemas de expresión desarrollados para la producción de proteínas heterólogas están basados en *S. cerevisiae*. Las limitaciones de este microorganismo se han puesto de manifiesto al aumentar de manera significativa el número de sistemas de expresión basados en levaduras no convencionales (no *Saccharomyces*), los cuales exhiben mejores prestaciones como productores de ciertas proteínas heterólogas. Entre estos nuevos microorganismos hospederos se incluyen *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, los cuales constituyen la base de diversos procesos desarrollados a escala industrial (Buckholz y Gleeson, 1991; Gellisen y Hollenberg, 1997; Muller y col., 1998).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de diferentes hospederos para la producción de proteínas recombinantes (Guerrero y col., 2004).

BACTERIAS	
<i>Escherichia coli</i>	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Buen nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética. Se cuenta con gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes. Fácil manipulación. Cultivos baratos con altas densidades celulares. Niveles moderados de producción de la proteína recombinante.</p>	<p>Ineficiente secreción de la proteína al medio de cultivo. Formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular. La síntesis de las proteínas heterólogas induce a un incremento de la proteólisis celular. Realiza pocas modificaciones postraduccionales. Generación de endotoxinas dañinas para la salud humana y animal.</p>
<i>Bacillus subtilis</i>	
<p>Secreción de la proteína heteróloga</p>	<p>Secreta una gran cantidad de proteasas afectando el rendimiento del producto recombinante. Dispone de pocos vectores de expresión y elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes comparado con <i>E. coli</i>. Menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.</p>
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<p>Sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la Biología Molecular y la Fisiología. Genoma totalmente secuenciado. Vectores de expresión y cepas disponibles. Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial. Cultivos baratos. Se producen altos niveles de la proteína recombinante. Realiza modificaciones postraduccionales. Es considerado como organismo GRAS.</p>	<p>Produce hiperglicosilaciones. Baja eficiencia en la secreción de la proteína heteróloga.</p>
<i>Pichia pastoris</i>	
<p>Emplea los promotores más fuertes y eficientemente regulados de los conocidos. Vectores de expresión y cepas disponibles. Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial. Secreción eficiente de la proteína heteróloga. Medios de cultivo son baratos y formulados libre de toxinas y pirógenos. Los cultivos alcanzan altas densidades celulares. Altos niveles de producción. Bajos niveles de secreción de proteínas endógenas facilitando la purificación de la proteína heteróloga. Realiza modificaciones postraduccionales.</p>	<p>Produce patrones glicosilaciones no deseables para algunas proteínas. Actividad proteolítica Algunas proteínas no se producen de forma eficiente.</p>

1.2 Sistema de expresión de *Pichia pastoris*.

El sistema de expresión basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha ganado aceptación como hospedero para la producción de proteínas recombinantes (Romanos, 1995, Escamilla y col., 1999; Cereghino y Cregg, 2000). *Pichia pastoris* comparte las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae* pero supera a ésta de 10 a 100 veces en los niveles de producción de proteínas heterólogas (Cregg y col., 1993; Romanos, 1995, Guerrero y Viader, 2003). Ambas levaduras se han utilizado en la producción de muchas proteínas eucariotas y en la mayoría de los casos la productividad de *P. pastoris* ha sido superior a la de *S. cerevisiae* (Romanos, 1995; Cereghino y Cregg, 2000). *Pichia pastoris* comparada con *S. cerevisiae*, presenta importantes ventajas para la expresión de proteínas heterólogas. En *P. pastoris* el promotor usado para transcribir genes heterólogos proviene del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris* cuya expresión es regulada por metanol. Este promotor es uno de los más eficientes y fuertemente regulados de los conocidos actualmente. Esta capacidad para mantener los cultivos con la expresión heteróloga “apagada” en ausencia de metanol es importante para minimizar el efecto tóxico que presentan muchas proteínas heterólogas sobre el hospedero (Cereghino y Cregg, 1999). Por otro lado, mientras que *S. cerevisiae* presenta dificultades para conseguir elevadas densidades celulares, *P. pastoris* es relativamente fácil de cultivar a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L, en peso seco. Además, *S. cerevisiae* puede presentar baja eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas (Cereghino y Cregg, 1999; Guerrero y Viader, 2003). Adicionalmente, la glicosilación en el proceso de postraducción en *P. pastoris* se lleva a cabo con oligosacáridos más pequeños que en *S. cerevisiae*, reduciendo los fenómenos de hiperglicosilación de muchas proteínas de eucariotas expresadas en este último sistema (Romanos, 1995, Higgins y Cregg, 1998). Cabe destacar los bajos niveles de secreción al medio de cultivo de proteínas endógenas en *P. pastoris*, lo cual supone una gran ventaja para la purificación de la proteína recombinante producida. Finalmente, el medio de cultivo empleado para el cultivo de *P. pastoris* en un biorreactor es una mezcla definida de sales, oligoelementos, biotina y fuente de carbono y nitrógeno que no resulta ser caro y puede ser formulado libre de toxinas y pirógenos (Higgins y Cregg, 1998, Guerrero y Viader, 2003).

Debido a las ventajas que presenta la levadura *P. pastoris* sobre otros microorganismos como se mencionó anteriormente, se eligió esta levadura para el presente trabajo. A continuación, se detallan aspectos generales del género *Pichia*.

2. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO *Pichia*.

Las levaduras metilotróficas fueron aisladas por primera vez en 1969 y su atractivo principal fue la producción de proteína celular simple (SCP) (Ogata y col., 1969; Spencer y col., 2002). El género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes*, phylum *Ascomycota*, reino *Fungi*. Esta levadura presenta reproducción sexual con producción de ascosporas (4 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.

Al género *Pichia* pertenecen muchas especies, algunas asociadas con insectos y que se han aislado de lodos fundidos y galerías de coleópteros. Otras especies son cactoflicas, habitantes específicos de cactus e incluso se han encontrado formando asociaciones con *Drosophila*. Estas formas asociadas con insectos presentan ascosporas en forma de sombrero o hemisférica (saturnosporas). Algunas especies de este género pueden ser encontradas en diversos ambientes, incluyendo salmuera y fluidos de curtimbres. Dentro del género *Pichia* se encuentran especies tanto fermentativas como no fermentativas y se han encontrado varios tipos de coenzimas Q (CoQ7, CoQ8 y CoQ9) como intermediarias en la cadena de transporte de electrones, lo que muestra que el género es muy heterogéneo.

2.1 *Pichia pastoris*.

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es un poderoso sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes (Cereghino y Cregg 2000). En los últimos años, más de 500 proteínas se han clonado y expresado con este sistema (Cereghino y col. 2002). Las ventajas de este sistema incluyen potenciales de expresión (Rodríguez y col. 1994; Kobayashi y col 2000; Richter y col. 2006), secreción eficiente de la proteína extracelular (Peng y col. 2004; Inan y col. 2006), modificaciones post-traduccionales como la glicosilación (Tsai y col.

2006) y el crecimiento de alta densidad celular en un medio definido (Cereghino y Cregg 2000; Hong y col. 2002). La razón principal para que *Pichia pastoris* presente estas ventajas es la existencia del promotor de la alcohol oxidasa 1 (pAOX1), un promotor fuerte y bien regulado. El promotor AOX1 regula la expresión del gen de la alcohol oxidasa, la primera enzima en la vía del metabolismo del metanol, en el nivel de la transcripción, combinando la represión/depresión con un mecanismo de inducción por metanol. El promotor AOX1 se encuentra fuertemente reprimido cuando las células de *Pichia* se cultivan en presencia de glucosa u otras fuentes de carbono, pero la expresión del gen se induce más de 1000 veces cuando las células se trasladan a un medio que contiene metanol como única fuente de carbono (Cereghino y col. 2002). Para aprovechar esta circunstancia, la fermentación con *Pichia* tiene que ser dividida en dos fases: comúnmente, se utiliza el glicerol como sustrato de crecimiento en la primera fase de la acumulación de biomasa, mientras que en la segunda fase sólo se alimenta de metanol para inducir la expresión del gen adyacente al promotor pAOX1. Una alternativa a esta estrategia es una alimentación mixta por lote, que en algunos casos ha permitido aumentar considerablemente la productividad de los sistemas recombinantes de *Pichia*, especialmente los que exhiben un fenotipo Mut^S (utilización lenta de metanol) (Loewen y col., 1997; Xie y col., 2003). Con una alimentación mixta de glicerol/metanol, es posible tomar la ventaja de la utilización simultánea de estos sustratos y garantizar un buen crecimiento celular e inducir la expresión de la proteína heteróloga (Thorpe y col., 1999); sin embargo, el máximo nivel de expresión de la proteína no es alcanzado debido a la represión parcial del promotor AOX1 por incluso cantidades leves de glicerol residual. Mientras tanto, el control del proceso se complica más y es difícil en este caso para el co-consumo tanto de la represión por sustrato y el inductor. Para prevenir este problema, se ha investigado en la utilización de diferentes fuentes de carbono no represivas, como alternativa al glicerol, en el protocolo de fermentación mixta de alimentación para la producción de la proteína recombinante de *P. pastoris* (Thorpe y col., 1999; Xie y col., 2005).

Por el contrario, se ha hecho poco esfuerzo para explorar las posibilidades en la utilización de glucosa como sustrato de crecimiento a excepción del trabajo de Guo y col. (2007). Debido a la fuerte represión por la fuente de carbono, la glucosa se ha considerado

inviabile para la fermentación de *Pichia*. Sin embargo, la glucosa sigue siendo una fuente de carbono atractiva debido a su precio mucho más bajo que el glicerol o el sorbitol. Como ejemplo, en la producción a escala industrial de fitasa de calidad con *P. pastoris* y *Hansenula polymorpha*, el costo de glicerol fue del 60% y 85%, respectivamente, del total de gastos de materias primas (Mayer y col. 1999). Económicamente, la glucosa puede ser una alternativa ideal de sustrato de crecimiento para sustituir el glicerol.

Pocos investigadores han estudiado la producción de biomasa utilizando *Pichia pastoris* en cultivo en medio sólido, salvo el reporte de López y col. (2009). En dicho estudio, la mayor producción de biomasa (55 g de peso seco celular/L) se obtuvo a las 200 h de cultivo, utilizando glicerol como fuente de carbono.

Como se mencionó anteriormente, debido a la represión en la inducción de la proteína heteróloga al cultivarse en glucosa u otras fuentes de carbono, el cultivo de *P. pastoris* se divide en dos etapas:

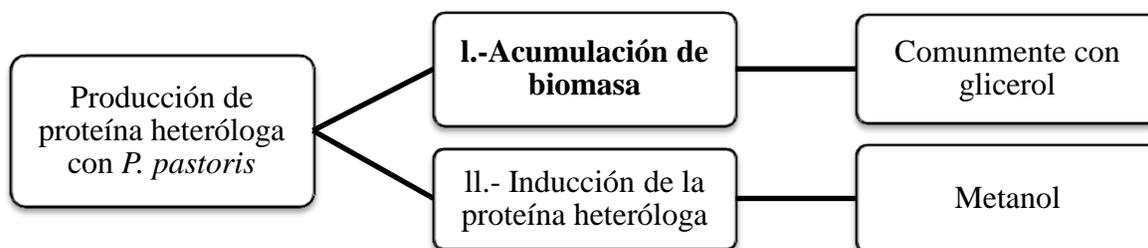


Figura 1. Etapas de producción de una proteína heteróloga con *Pichia pastoris*.

En el presente trabajo únicamente se aborda la primera etapa del proceso de producción de una proteína heteróloga con *P. pastoris*, que es la acumulación de biomasa con

glucosa como única fuente de carbono y se realizó en cultivo en medio sólido utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

2.2. Metabolismo de *Pichia pastoris*.

Aunque la red central metabólica es bastante similar para todas las cepas de levaduras, existen variaciones importantes con respecto a su regulación (Gancedo y col., 1989; Flores y col., 2000). Está bien documentado que durante el crecimiento aeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*, el catabolismo de la glucosa y los azúcares están relacionados a un fuerte deterioro en la capacidad respiratoria (llamado Efecto Crabtree). En contraste, la mayoría de levaduras no-*Saccharomyces* crecen bajo condiciones aerobias en un modo respiratorio, es decir, equivalentes de reducción son utilizados para reducir el oxígeno a agua. De hecho, las variaciones en la regulación del metabolismo central de carbono en géneros no-*S. cerevisiae* son esencialmente inexplorados. Por otra parte, las investigaciones más amplias del metabolismo de aminoácidos han sido sólo para *S. cerevisiae* (Jones y Fink, 1982). En vista de la importancia de *P. pastoris* para la investigación de la biotecnología, este organismo representa un blanco obvio para los estudios de su metabolismo.

2.2.1. Modelo de red de reacciones bioquímicas de *P. pastoris*.

Debido a que el metabolismo central de carbono de *P. pastoris* no se ha caracterizado por completo, el modelo de red de reacciones bioquímicas tomado para la interpretación de datos fue el identificado para *S. cerevisiae* (Maaheimo y col., 2001; Fiaux y col., 2003), que también ha demostrado ser adecuado para *P. stipitis* (Fiaux y col., 2003). Tras analizar los datos publicados (Gancedo y col., 1968; Gancedo y Serrano 1989), sólo se añadió la vía para el metabolismo de glicerol (Figura 2). Este implica la fosforilación de glicerol por una glicerol citosólica quinasa a 3-fosfoglicerol que posteriormente se oxida por una fosfato oxidorreductasa ubiquitona mitocondrial (membrana) FAD-dependiente de glicerol, a fin de producir dihidroxiacetona fosfato. La dihidroxiacetona fosfato generada sirve para la síntesis tanto de piruvato como la gluconeogénesis (Gancedo y Serrano, 1989). En principio, el ciclo de glioxilato también tuvo que ser incluido (se indica en gris en la Figura 2). Las dos

reacciones características de este ciclo son catalizadas por la malato sintetasa (MS) y la isocitrato liasa (ICL), que están sujetas a represión catabólica en *S. cerevisiae* (Gancedo y Gancedo, 1997). Notablemente, la represión se produce en menor medida en *S. cerevisiae* cuando crece en un medio que contiene una fuente de carbono no fermentable, tal como glicerol como única fuente de carbono (Fernández y col., 1993; Schöler y Schüller, 1994). Aunque ICL y MS son probablemente citosólicas en *S. cerevisiae* (Gancedo y Serrano, 1989), se supone que se encuentran en los peroxisomas en las levaduras metilotróficas tal como *P. pastoris* (Bruinenberg y col., 1989). Sin embargo, el patrón del marcador de ^{13}C derivado a partir de la acción del ciclo del glioxilato y el flujo de salida de oxaloacetato (OAA) de la mitocondria no lo puede distinguir (Fiaux y col., 2003). Por lo tanto, el intercambio de OAA entre el citosol y las mitocondrias se consideró también que podría ocurrir de forma bidireccional, como fue discutido para levaduras que crecen en cultivos de quimiostatos limitados de glucosa (Fiaux y col., 2003). Se debe tener en cuenta que el intercambio de los intermediarios de C4 en el citosol y las mitocondrias puede ocurrir a través de cualquiera de los mecanismos de transporte de los intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), por ejemplo, el transportador succinato-fumarato (Palmieri y col., 1997; Palmieri y col., 1999), o transportadores mitocondriales redox, por ejemplo el transportador malato-oxalacetato, el transportador malato-aspartato y el transportador malato-piruvato (Bakker y col., 2001).

La red se basa en las redes identificadas para *S. cerevisiae* (Maaheimo y col., 2001) y *P. stipitis* (Fiaux y col., 2003) y en la literatura sobre el metabolismo de *P. pastoris* (Gancedo y col., 1968; Gancedo y Serrano, 1989). El metabolismo central de carbono de *P. pastoris* se secciona en subredes citosólicas y mitocondriales. Además, las reacciones del ciclo del glioxilato se supone que residen en los peroxisomas en la levadura metilotrófica como *P. pastoris*. Debido a que las reacciones del glioxilato no pueden ser identificadas con la estrategia empleada con marcador ^{13}C (sus reacciones se representan en gris en la Fig. 2). Los aminoácidos y los fragmentos de carbono originarios a partir de un intermediario clave del metabolismo central de carbono están representados en cajas rectangulares. Las líneas finas entre los átomos de carbono de aminoácidos denotan enlaces carbono que se forman entre los fragmentos procedentes de diferentes moléculas precursoras, mientras que las líneas gruesas

indican conectividades de carbono intacto en los fragmentos resultantes de una sola molécula precursora. Los esqueletos de carbono de los productos intermedios de la glicólisis, ciclo TCA y vía de las pentosas fosfato están representados por círculos, cuadrados y triángulos, respectivamente.

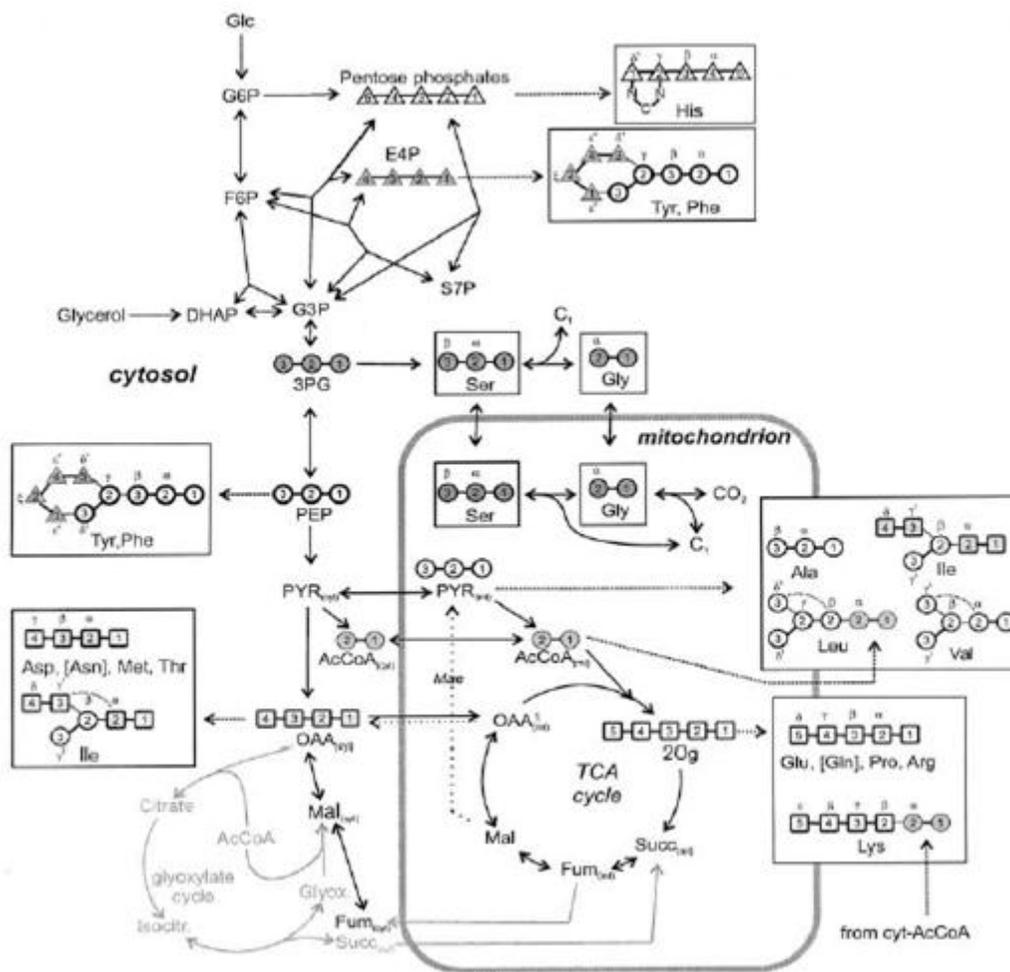


Figura 2. Red de vías bioquímicas activas construida para células de *P. pastoris* creciendo con glicerol o glucosa como única fuente de carbono (Fiaux y col., 2003).

La numeración de los átomos de carbono se refiere a los átomos correspondientes en la molécula precursora. Abreviaturas: AcCoA, acetil-coenzima A, DHAP, dihidroxiacetona fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; Fum, fumarato; G6P, glucosa 6-fosfato; Glc, glucosa; Glyox, glioxilato; G3P gliceraldehído 3-fosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; Mae, enzima málico; Mal, malato; OAA, oxaloacetato; 2Og, 2-oxoglutarato; PYR, piruvato; PEP, fosfoenolpiruvato; S7P, seduheptulose-7-fosfato; Ser, serina; Succ, succinato. Para AcCoA, Fum, OAA, PYR y Succ citosólico (CYT) y mitocondrial (mt) se indican por separado.

2.2.2. Metabolismo del glicerol en *P. pastoris*.

El glicerol es un polihidroxi alcohol que se puede utilizar como una fuente de carbono y energía por las levaduras. Los pasos que se llevan a cabo una vez que entra el glicerol a la célula son los siguientes: se fosforila por la glicerol quinasa y se forma glicerol-3-fosfato (G3P). Posteriormente, ocurre la oxidación del G3P a DHAP, debida a la acción de la enzima dependiente de FAD, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Finalmente, la DHAP continúa la segunda fase de la glucólisis hasta obtener ácido pirúvico. El piruvato es oxidado a acetil-CoA y alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos del cual se obtiene GTP, NADH + H⁺ y FADH₂, estos dos últimos se utilizan para generar ATP mediante la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa (Ratledge, 2001; Ren y col., 2003).

En el género *Pichia* (*P. sorbitophyla*) se ha descrito un sistema de transporte activo de glicerol muy similar al de *S. cerevisiae* (Lages y Lucas, 1995), en el cual el glicerol puede penetrar al interior celular mediante tres mecanismos: a) difusión pasiva, b) difusión facilitada y c) transporte activo. La difusión pasiva de glicerol es medible, pero baja, y esta se reduce en condiciones donde las células crecen con una alta osmolaridad. Otros autores concluyen que el estrés osmótico afecta a las propiedades físico-químicas de la membrana plasmática, lo cual podría explicar los cambios en la permeabilidad (Brown, 1974; Sutherland y col., 1997; Gancedo, 1998). La difusión facilitada está mediada por canales de glicerol, estos juegan un papel fundamental en el control intracelular de la concentración de este sustrato (Sutherland y col., 1997). Las levaduras también cuentan con un sistema de toma activa de glicerol vía simporte (con Na⁺ o H⁺) (Lages y Lucas, 1995; Lucas y col., 1990).

3. Fisiología de levaduras en relación al rendimiento de biomasa.

El rendimiento de biomasa (g de biomasa producida por g de sustrato consumido) puede ser un factor importante en procesos industriales. Un alto rendimiento de biomasa es especialmente importante cuando el precio de la materia prima (por ejemplo, la fuente de carbono) constituye una gran parte de los costos del producto final. Además, cualquier mejora en el rendimiento disminuye la demanda de oxígeno y reduce la producción de calor. Esto tiene un impacto en el precio del producto ya que los costos de oxígeno y de refrigeración son

de los más significativos en los procesos a gran escala. Alternativamente, en algunos procesos es necesario mantener una formación de biomasa mínima, a fin de lograr una conversión máxima de la fuente de carbono en productos extracelulares como el etanol o ácido cítrico (Verduyn, 1991).

El límite estequiométrico para la producción de biomasa (asimilación máxima de la fuente de carbono) es determinado por la cantidad de CO₂ gastado en el anabolismo y la cantidad de fuente de carbono requerido para la generación de NADPH. Este límite puede alcanzarse estequiométricamente cuando las levaduras utilizan formatos como una fuente de energía adicional. En resumen, los factores que afectan a la producción de biomasa se discuten a continuación (Verduyn, 1991):

- *La energía necesaria para la formación de la biomasa (Y_{ATP})*. Depende fuertemente de la naturaleza de la fuente de carbono.
- *Composición celular*. La composición macroscópica de la biomasa y, en particular el contenido en proteínas, tiene un efecto considerable sobre el requerimiento de ATP para la formación de biomasa. Por lo tanto, la determinación del contenido de proteína de la biomasa es relevante en los estudios de la bioenergética.
- *Transporte de la fuente de carbono*. Transporte activo (es decir, que requiere energía), que ocurre para azúcares y polioles, pueden contribuir al cálculo teórico del ATP requerido para la formación de biomasa.
- *Relación P/O*. La eficiencia en la generación de energía mitocondrial tiene un fuerte efecto sobre el rendimiento celular. La relación P/O es determinada en un grado importante por el número de sitios translocadores de protones en la cadena respiratoria mitocondrial.
- *Mantenimiento y factores ambientales*. Los factores como el estrés osmótico, metales pesados, O₂ y presiones de CO₂, temperatura y pH afectan el rendimiento de las levaduras. Varios mecanismos pueden estar involucrados, a menudo afectando las necesidades energéticas de mantenimiento.

- *Metabolitos como etanol y ácidos débiles.* El etanol aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, mientras que los ácidos débiles pueden actuar como conductores de protones.

- *Contenido de energía del sustrato de crecimiento.* Algunas veces se predice el rendimiento de biomasa mediante la correlación del contenido de energía de la fuente de carbono (representado por el grado de reducción) para la producción de biomasa o el porcentaje de asimilación de la fuente de carbono.

3.1. Transporte de azúcares.

Un parámetro que afecta tanto a la exigencia de ATP para la asimilación y el rendimiento de ATP para la desasimilación, es la energía requerida para el transporte de la fuente de carbono.

La absorción de los azúcares en levaduras puede ocurrir por difusión facilitada y/o por transporte activo a través de un mecanismo de simporte proton-azúcar (Romano, 1986). En general se supone que en *Saccharomyces cerevisiae* la captación de glucosa se produce a través de la difusión facilitada (Lang y Cirillo, 1987; Romano, 1982). Sin embargo, dependiendo de las condiciones de crecimiento, se han reportado al menos dos portadores de glucosa con diferentes K_m (Postma y col., 1989b) en *S. cerevisiae* en condiciones limitantes de glucosa. En *Candida utilis*, en cultivo con limitación de glucosa, aparecen dos “proton-symporters” con diferentes valores de K_m , así como un portador por difusión (Postma y col., 1988). A concentraciones elevadas de glucosa, la síntesis de estos portadores se regula por las condiciones de crecimiento. Cuando la glucosa está presente en exceso, la síntesis de los mecanismos de simporte se reprime (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989).

3.2. Efecto de los subproductos en el rendimiento de biomasa.

3.2.1. Alcoholes.

La producción de etanol no es deseable en procesos comerciales en los que un máximo rendimiento de biomasa es importante, por ejemplo la producción de levadura de panadería. *Saccharomyces cerevisiae* puede exhibir el efecto llamado Crabtree: la generación de ácidos

y/o alcoholes bajo condiciones aeróbicas (Van Dijken y Scheffers, 1986). Este fenómeno ocurre en quimiostatos limitados de azúcar a una tasa de dilución "crítica", el valor de la cual es fuertemente dependiente de la cepa (Alexander y Jeffries, 1990). En *S. cerevisiae* CBS 8066 la tasa de dilución crítica fue tan alta como 0.38 h^{-1} (Postma y col., 1989), mientras que para otras cepas la formación de etanol comienza entre las tasas de dilución de 0.25 y 0.30 h^{-1} (Alexander y Jeffries, 1990).

Aparte de la pérdida de carbono, el etanol también puede interferir con el metabolismo celular. La inhibición de crecimiento de la levadura y la fermentación de etanol ha sido un tema importante en la literatura (D'Amore y Stewart, 1987). La mayoría de las observaciones sobre el efecto de etanol sugieren un aumento en la permeabilidad de la membrana, dando lugar a fugas de amino ácidos (Salgueiro, 1988), el realce del efecto de desacoplamiento del acetato (Pampulha y Loureiro, 1989), la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF) a través de la membrana plasmática (Cartwright y col., 1986) y la inhibición de algunas enzimas, en particular la ATPasa de la membrana plasmática (Cartwright y col., 1987). La inhibición propuesta de la ATPasa de la membrana plasmática (Cartwright y col., 1987) ha sido cuestionada por Petrov y Okarokov (1990). Experimentos con vesículas de membrana plasmática de *S. carlbergensis* indicó que el PMF a través de la membrana plasmática disminuyó en presencia de etanol pero que esto no era debido a la inhibición de la ATPasa. Se sugirió que la permeabilidad de la vesícula a los protones se aumentó en presencia de etanol. Rosa y Sá-Correia (1991) encontraron la inhibición de la ATPasa de membrana plasmática en concentraciones de etanol superiores al 3% en volumen. Sin embargo, concentraciones más altas de etanol (6-8% v/v) elevaron el nivel de la actividad de ATPasa de membrana plasmática, compensando así la inhibición de la enzima por el etanol. Además, hay una clara diferencia entre la permeabilidad de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* cuando crece en cultivo batch o quimiostato. En este último, la permeabilidad pareció no ser afectada por la exposición al etanol hasta 10% v/v (Jones y Greenfield, 1987). La inhibición directa o inactivación de las enzimas citosólicas sólo parece ocurrir en concentraciones altas de etanol, en el orden de 15% v/v (Pascual y col., 1988). Esta concentración es aproximadamente el límite que puede ser tolerado por la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha

demostrado que el aumento aparente en el flujo pasivo de protones (como se sugiere por una caída en el pH intracelular) después de un suministro de etanol para *S. cerevisiae* se debe (al menos en parte) a la formación de ácido acético, lo que resulta en una disminución transitoria en el pH intracelular (Loureiro y Santos, 1990).

Desafortunadamente, existen pocos datos cuantitativos sobre el efecto del etanol en la producción de biomasa. En cultivos en lote de *S. cerevisiae* crecido en glucosa suplementado con etanol, el rendimiento de biomasa comenzó a disminuir a concentraciones de etanol superiores al 4% (Rosa y Sá-Correia, 1991).

Algunos autores reportaron efectos tóxicos del etanol, en particular, de la inhibición de la fermentación. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de biotina (Winter y col., 1989) o magnesio (Dasari y col., 1990) puede aliviar el efecto aparente de inhibición por etanol. Además, se ha observado que el etanol añadido es menos tóxico que el etanol producido endógenamente (Novak y col., 1981) lo cual ha llevado a sugerir que muchos de los efectos atribuidos originalmente al etanol se deben a otros metabolitos, tales como alcoholes más largos (Okolo y col., 1987) o ácidos débiles (Viegas y col., 1985).

3.2.2. Ácidos débiles.

La producción de ácidos débiles es un evento normal durante el crecimiento de levaduras, incluso bajo condiciones limitadas de carbono. El ácido acético es de los productos más conocidos formados durante el cultivo de levaduras. La formación de ácido acético se ha demostrado en condiciones aerobias y anaerobias limitadas de glucosa en *S. cerevisiae* (Postma y col., 1989; Verduyn y col., 1990b). El ácido acético es formado a partir de piruvato a través de la piruvato descarboxilasa y acetaldehído deshidrogenasa (Figura 3). En principio, el acetato puede ser convertido en acetyl-CoA por la acetyl-CoA sintetasa. Sin embargo, esta última enzima está sujeta a la represión por glucosa. Esto da como resultado un aumento de la producción de acetato en función de la limitación de glucosa en quimiostatos con *S. cerevisiae* CBS 8066 (Postma y col., 1989). Se ha demostrado una relación entre la cantidad de acetato producido en dos cepas de *S. cerevisiae* durante cultivos anaerobios en quimiostato y la cantidad de acetaldehído deshidrogenasa (s) y acetyl-CoA sintetasa (Verduyn y col., 1990b).

Una observación común en cultivos es que la presencia de ácido acético coincide con un aumento en la velocidad de fermentación (Pons y col., 1986; McDonald y col., 1987). En cultivos aerobios limitados de glucosa en quimiostato con *S. cerevisiae*, la aparición de ácido acético coincidió con un aumento en la tasa de respiración (Postma y col., 1989a). Esto sugiere que los ácidos débiles pueden desacoplar la generación de energía de la formación de biomasa.

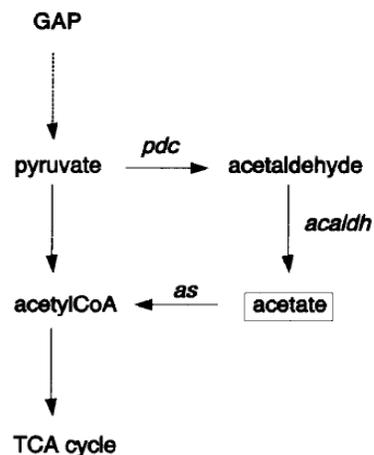


Figura 3. Ruta de la formación y consumo de acetato en levaduras (Verduyn, 1991).
Enzimas: *pdc*: piruvato descarboxilasa; *acaldh*: acetaldehído deshidrogenasa; *as*: acetilCoA sintasa.

El mecanismo de desacoplamiento por ácidos débiles se muestra esquemáticamente en la Figura 3. Los ácidos débiles no metabolizables entran en la célula por difusión pasiva en su forma no dissociada ya que la tasa de consumo depende del pH (Pampilha y Loureiro 1989; Viegas y col., 1989). Una vez dentro de la célula, el ácido se disocia debido al pH relativamente alto del citosol. Esto significa que, en efecto, los ácidos débiles actúan como conductores de protones. Si este proceso continúa sin cesar, se colapsa el ΔpH a través de la membrana plasmática y hará que el pH intracelular sea similar al pH externo. Por lo tanto, los protones tienen que ser eliminados a través de la ATPasa de la membrana plasmática, que requiere la hidrólisis de ATP. Para proporcionar este ATP, es necesario un aumento de la respiración y/o fermentación (dependiendo de las condiciones de crecimiento). El destino del anión no es totalmente claro. En general se supone que la membrana es impermeable a los aniones. Por lo tanto, la acción de los ácidos débiles es diferente a la de desacopladores 'reales'

como el 2,4-dinitrofenol (DNP), que son permeables tanto en la forma no disociada y disociada. Esto permite ciclos rápidos de estos compuestos a través de las membranas, lo que lleva a la disipación de componentes de la fuerza protón-motriz tanto de la química (ΔpH) y eléctrica ($\Delta\Psi$). Sin embargo, se ha sugerido que el flujo de salida de algunos ácidos, incluyendo benzoato y sorbato, puede producirse a través de un sistema de transporte activo aún no resuelto (Warth 1988, 1989).

De acuerdo con el mecanismo descrito anteriormente, la captación y desacoplamiento de ácidos débiles debe ser mínima a altos valores de pH externo, en la que los ácidos débiles son casi completamente disociados. Esto fue confirmado en un experimento (Verduyn) en el que 5 mM de benzoato de metilo (un ácido débil no metabolizable) se añadió al quimiostato con medio limitado de glucosa en un cultivo aeróbico de *Hansenula polymorpha*. El rendimiento de biomasa en presencia de benzoato fue dependiente del pH del cultivo. A pH 7.1 el rendimiento de un cultivo de control (sin benzoato) y un cultivo con benzoato fueron similares. El pH más bajo en el que fue posible alcanzar un estado estable en presencia de benzoato fue de 5.4. En este pH, el benzoato causó una disminución del 50% del rendimiento de biomasa. El rendimiento del cultivo sin benzoato no se vio afectado en este intervalo de pH (Figura 4).

La tasa de absorción de ácidos débiles depende de la longitud de la cadena del ácido (Warth, 1989). Aparte de un efecto sobre la fuerza protón-motriz, la acumulación de los ácidos dentro de la célula también puede inhibir diversos procesos celulares. Pampulha y Loureiro-Dias (1990) han estudiado el efecto del ácido acético sobre la actividad de enzimas glicolíticas en *S. cerevisiae*. Las concentraciones de ácido acético requerido para inhibir enzimas glicolíticas en un 50% difieren de 0.12 M a más de 1 M, dependiendo de la enzima ensayada.

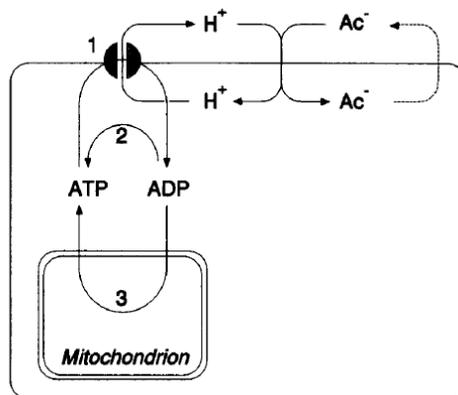


Figura 4. Representación esquemática del desacoplamiento de la membrana plasmática por los ácidos débiles (Verduyn, 1991).

(1): ATPasa de membrana plasmática. (2): formación de ATP mediante la fosforilación del sustrato y (3): formación de ATP a través de la respiración.

Como la formación de subproductos tóxicos, tales como ácido acético, es generalmente proporcional a la concentración de biomasa, los problemas derivados de la acumulación de estos compuestos son más probables que ocurran en cultivos de alta densidad celular. Además, el desacoplamiento ácido no es necesariamente debido a la producción de compuestos endógenos. Sustratos complejos de crecimiento pueden contener ácidos. Por ejemplo, la melaza, que se utiliza como sustrato en la producción comercial de levadura de panadería, puede contener los ácidos acético, láctico y butírico (Essia-Ngang y col., 1989; Beudeker y col., 1990). Si estos ácidos actúan de verdad como desacopladores probablemente depende en un grado importante (aparte del pH del cultivo) de la tasa de crecimiento impuesta. A una mayor tasa de dilución (flujos altos de glucosa) las enzimas que participan en la oxidación del ácido acético pueden ser reprimidas (Postma y col., 1989a) y por lo tanto el ácido acético no puede ser co-utilizado con el (los) azúcar (es). Los efectos desacoplantes de los ácidos orgánicos, con frecuencia en combinación con un bajo pH, pueden ser útiles para mejorar los rendimientos del producto en procesos en los que no se requiere un alto rendimiento de biomasa, por ejemplo, en la producción de ácido cítrico (Linton y Centeno, 1989).

3.3 Energía de mantenimiento y factores ambientales.

Durante mucho tiempo se ha establecido que una fracción de la energía generada en el catabolismo se utiliza en procesos distintos a la formación de la biomasa, llamada energía de

mantenimiento (Pirt, 1965). Los procesos involucrados pueden ser, entre otros, la rotación de las macromoléculas y el mantenimiento homeostático celular (Tempest y Neijssel, 1984). El mantenimiento se determina generalmente a partir de gráficas de $1/Y$ frente a $1/D$, en la que Y puede representar el rendimiento de fuente de carbono, oxígeno o ATP (este último valor usualmente se obtiene a partir de experimentos en quimiostato). Se ha postulado por Neijssel y Tempest (1976) que también puede ocurrir un crecimiento dependiente de energía de mantenimiento.

Generalmente, los coeficientes de mantenimiento de levaduras con diversas fuentes de carbono parecen ser pequeños como puede verse a partir de los listados por Roels (1983), Goldberg (1985) y Stouthamer y van Verseveld (1987). El efecto de mantenimiento en los rendimientos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo limitado de glucosa en quimiostato fue calculado por Roels (1981). Parece que la producción de biomasa de levaduras se ve menos afectada por el mantenimiento que en bacterias, que generalmente tienen un coeficiente de mantenimiento mucho mayor (Stouthamer y van Verseveld, 1987).

En muchos casos no ha sido posible determinar el mantenimiento (Verduyn y col., 1990a). Esto no es sorprendente en vista de los grandes cambios que pueden ocurrir en la composición de las células.

Los requerimientos de energía de mantenimiento probablemente son afectados por el pH, temperatura, estrés osmótico, etc. Una interpretación clara reportada del efecto de estos parámetros ambientales se ve obstaculizada por el hecho de que muy pocos estudios han sido llevados a cabo en cultivos con quimiostato. Muchos estudios sólo comparan las tasas de crecimiento máximas en cultivos en lote, y no proporcionan información sobre el rendimiento de la biomasa. En los siguientes párrafos, se da una visión general de algunos factores ambientales que afectan la producción de biomasa, así como su modo general de acción (Verduyn y col., 1990a).

3.3.1. Estrés osmótico.

Tradicionalmente, se ha centrado una considerable atención en la osmoregulación en los microorganismos (Vreeland, 1987). Cuando se añaden altas concentraciones de sal al

medio de crecimiento, el agua de las células se pierde y se da una acumulación intracelular de solutos que se produce con el fin de restaurar el equilibrio osmótico (Higgins y col., 1987). La concentración de sal intracelular se mantiene a una concentración más baja que en el medio. El principal osmoregulador en *Saccharomyces cerevisiae* parece ser el glicerol, mientras que en algunas otras levaduras tanto el glicerol como el arabitol son producidos intracelularmente bajo estrés salino (Reed y col., 1987; Meikle y col., 1988; Jovall y col., 1990). Durante el cultivo en lote de *S. cerevisiae* bajo estrés osmótico, 29% (g/g) la glucosa se convierte en glicerol (Larsson y Gustafsson, 1987). Watson (1970) presentó datos sobre el crecimiento anaerobio de *S. cerevisiae* en presencia de NaCl. Demostrando que el requerimiento de energía de mantenimiento se cuadruplica en presencia de NaCl 1M. En contraste con muchos otros estudios anteriores sobre energética, el Y_{ATP} fue calculado correctamente, es decir, fue corregido para la producción de glicerol que requiere una entrada neta de 1 ATP/glicerol formado de acuerdo con la ecuación: $0.5 \text{ glucosa} + \text{ATP} + \text{NADH} \rightarrow \text{glicerol} + \text{NAD}^+$.

En algunas especies osmotolerantes se ha demostrado un transporte activo de glicerol, impulsado por Na (Lucas y col., 1990; Van Zyl y col., 1990). Estas levaduras convierten una fracción más pequeña de glucosa a glicerol, y una parte importante del glicerol es retenido dentro la célula, a diferencia de la situación con *S. cerevisiae*. La adición de desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol (DNP) da como resultado un flujo de salida de glicerol (Van Zyl y col., 1990).

Maiorella y col., (1984) mostraron que la adición de sales a un cultivo limitado de glucosa en quimiostato de *S. cerevisiae* da como resultado una disminución en los rendimientos, el aumento de la fermentación y el aumento de la producción de glicerol.

3.3.2. Presiones de oxígeno y dióxido de carbono.

Las altas presiones parciales de O_2 y CO_2 por lo general afectan la fisiología y el rendimiento de los microorganismos (Onken y Liefke, 1989). El estrés por O_2 puede ser debido a la formación de superóxido o radicales hidroxilo. Los radicales superóxido se forman durante la respiración (Cadenas y col., 1983; Nohl 1986). Éstos pueden ser convertidos en H_2O_2 a través de superóxido dismutasas que, en formas diferentes, se producen tanto en el

citósol y en las mitocondrias de las levaduras (Chang y Kosman 1989). Posteriormente, el H_2O_2 puede ser degradado por peroxidasas y catalasas. En levaduras, la enzima mitocondrial citocromo *c* peroxidasa (CCP) tiene probablemente una de las principales funciones en la desintoxicación de H_2O_2 (Verduyn y col., 1988a). La desintoxicación de H_2O_2 mediada por catalasa es probablemente limitada a H_2O_2 generado en los peroxisomas por varias oxidasas. La actividad catalasa no es esencial para la eliminación de los H_2O_2 como se demostró por el hecho de que los mutantes catalasa-negativos de *Hansenula polymorpha* son capaces de crecer sobre mezclas de glucosa/ H_2O_2 en quimiostato (Verduyn y col., 1988a). También mutantes catalasa-negativos de *S. cerevisiae* pueden crecer en ácido oleico, el cual es metabolizado a través de una oxidasa peroxisomal productora de H_2O_2 (Veenhuis y col., 1987). En la Tabla 3 se muestra un listado de algunos de los radicales libres y las reacciones de generación de H_2O_2 y los mecanismos de defensa.

Tabla 3. Reacciones de producción de radicales de oxígeno y su desintoxicación en levaduras (Verduyn, 1991).

Reacción	Enzima	Localización
$O_2 + e \rightarrow O_2^-$	Varias	Cadena transportadora de electrones
$2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Superóxido dismutasas	Citosol y mitocondria
$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$	Catalasa	Peroxisomas
$2Cit\ c^{2+} + H_2O_2 \rightarrow 2Cit\ c^{2+} + H_2O$	Citocromo <i>c</i> peroxidasa	Mitocondria

Se ha demostrado que la mitocondria de levadura puede producir H_2O_2 , probablemente con O_2^- como un intermedio, aunque a una tasa baja de $2\text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína mitocondrial (Boveris 1978). Debido a la presencia de CCP en las mitocondrias, esta tasa ha sido subestimada. La descomposición de H_2O_2 por CCP afecta la producción de biomasa, como los electrones son aceptados en el nivel de citocromo *c* y por lo tanto se pasa por alto el complejo de citocromo *c* oxidasa, reduciendo así la relación P/O. En la Tabla 4 se muestra el efecto del H_2O_2 en la producción de biomasa con limitación de glucosa de *H. polymorpha*. Mediante el aumento en la adición de cantidades de H_2O_2 en el medio, progresivamente más oxígeno se sustituye como un aceptor de electrones por H_2O_2 . La concentración residual de H_2O_2 en el fermentador fue baja ($<0.5\text{ mM}$). Sin embargo, se calculó que el efecto negativo del H_2O_2 en la producción de biomasa fue mayor de lo esperado si sólo la relación el P/O se redujo, debido a una derivación parcial de la translocación de protones en el sitio III. Por lo

tanto, a pesar de su baja concentración en el fermentador, el H₂O₂ afectó a la fisiología (Verduyn y col., 1991b). La reducción de H₂O₂ puede ser acoplado a una oxidación anaerobia de etanol, lo que demuestra que el H₂O₂ puede funcionar como un aceptor de electrones (Verduyn, 1991).

Tabla 4. Efecto del H₂O₂ en el rendimiento celular en cultivos limitados de glucosa en quimiostato de *Hansenula polymorpha* ATCC 46059 a un ratio de dilución de 0.10 h⁻¹ (Verduyn, 1991).

Concentración acumulada de H ₂ O ₂ (mM)	Rendimiento (g.g glucosa ⁻¹)
0	0.44
100	0.39
170	0.34
220	0.30

La susceptibilidad de los microorganismos a altas presiones parciales de O₂ y/o radicales de O₂ es generalmente estudiada por aireación con O₂ puro o la adición de compuestos de O₂ que generan radicales (Carr y col., 1986). El sofocamiento del cultivo en quimiostato de *Saccharomyces cerevisiae* con O₂ al 100% resultó en una disminución en el rendimiento de 25-40% y un aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa total (Lee y Hassan, 1987). El rendimiento de biomasa con limitación de glucosa de *S. cerevisiae* CBS 8066 disminuyó en un 24% durante el crecimiento con una presión parcial de O₂ de 60% a una tasa de dilución de 0.10 h⁻¹ (Verduyn y col., 1991b). También las especies de *Candida* son sensibles a las presiones mayores de O₂. El rendimiento del crecimiento-etanol de *Candida utilis* fue fuertemente reducido por una presión de pO₂ > 350 mbar (Paca y Gregr, 1979). En otra cepa de *Candida* (Onken y Liefke, 1989) el rendimiento de biomasa disminuyó a 0 entre una saturación de O₂ de 210 mbar (es decir a un 1 bar de presión de aire) y 500 mbar. Estos datos indican que las tensiones de oxígeno disuelto que son ligeramente superior a 210 mbar pueden disminuir considerablemente el rendimiento de biomasa.

El efecto del CO₂ en la fisiología de las levaduras y en el rendimiento de producción de biomasa ha sido estudiado por Jones y Greenfield (1982) y Onken y Liefke (1989). Parte del efecto tóxico puede ser debido a la disociación de CO₂ a HCO₃⁻. Este compuesto inhibe

numerosas enzimas, incluyendo enzimas del ciclo TCA como la succinato deshidrogenasa (Jones y Greenfield 1982) y puede afectar la permeabilidad de la membrana plasmática. Hay pocos datos disponibles sobre el efecto del CO₂ en el rendimiento de producción de biomasa en levaduras, la mayoría de los estudios se han centrado en la reducción de $\mu_{\text{máx}}$ en cultivos en lote. Cultivos aerobios de *Saccharomyces cerevisiae* en lote alimentado tuvieron una reducción en el rendimiento a presiones de CO₂ superiores a 350 mbar (Chen y Gutmanis, 1976), pero la reducción en el rendimiento fue sólo el 10% a una pCO₂ de 500 mbar.

En cultivos de alta densidad celular, tal como se utilizan en muchos procesos comerciales, se pueden dar lugar a problemas relacionados con la presión de gas. La aireación con aire a veces es insuficiente para garantizar las condiciones aeróbicas. En este caso, el O₂ es mezclado con aire o lo sustituye. Bajo estas condiciones, la concentración alta de O₂ puede dar lugar a la formación de especies reactivas de O₂ (ROS). Los efectos del CO₂ se pueden esperar cuando el CO₂ no es despojado y se acumulan en el sistema. De hecho, los factores negativos que afectan los rendimientos de biomasa han sido utilizados exitosamente para aumentar la conversión del producto. Por ejemplo, el rendimiento de la producción de ácido cítrico por cepas de *Aspergillus* y de *Candida tropicalis* se podría mejorar por presiones altas de oxígeno.

3.3.3. Temperatura.

A menudo, se deduce en la literatura sobre microbiología que la temperatura óptima de crecimiento es la temperatura a la que la tasa de crecimiento es más alta (Stanier y col., 1987).

A altas temperaturas el coeficiente de mantenimiento de *Escherichia coli* en diversas fuentes de carbono, aumentó 7 a 10 veces cuando la temperatura de crecimiento fue aumentada de 30 a 40 °C. Al parecer, el incremento cambió el material celular, pero no fue la causa principal del aumento observado en el mantenimiento (Wallace y Holms 1986). También en el crecimiento en metanol de *Hansenula polymorpha*, incrementos en la temperatura de cultivo resultó en un incremento en el coeficiente de mantenimiento (Heijnen y Roels, 1981).

Un análisis detallado del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de levaduras ha sido realizado por Van Uden (1984). Las altas temperaturas suelen dar lugar a pequeñas mutantes, y puede afectar la permeabilidad de la membrana plasmática. Por lo tanto, un efecto sobre el rendimiento se puede esperar como resultado de una disminución en la eficiencia de generación de energía y un aumento en el mantenimiento. Además, se ha sugerido que una disminución en el rendimiento a altas temperaturas puede ser debido a la desasimilación de la glucosa por una fracción inviable del cultivo (Van Uden y Madeira, 1976). Los efectos negativos de las altas temperaturas sobre el crecimiento se han mejorado en presencia de alcoholes (Van Uden 1984) y ácidos, incluyendo ácido octanoico (Sá-Correia, 1986) y ácido acético (Pinto y col., 1989).

La composición de la biomasa puede variar significativamente con la temperatura de crecimiento. Los datos de Harder y Veldkamp (1967) para una bacteria, que puede ser típica para los microorganismos en general, mostró que el contenido de proteínas y de ARN de biomasa fueron mínimas a una temperatura óptima de crecimiento, pero aumentó considerablemente a niveles inferiores y superiores de temperatura. También para *C. utilis*, se ha demostrado que el contenido de ARN y proteína aumenta cuando la temperatura de cultivo se reduce de 30 a 20 °C (Brown y Rose, 1969). En un estudio sobre *S. cerevisiae*, Parada y Acevedo (1983) demostraron que el contenido de ARN incrementa al aumentar la temperatura de cultivo. En *Trichosporon cutaneum*, el contenido de ARN y proteína fue menor a la temperatura óptima de crecimiento (Fiechter y col., 1989).

3.3.4. pH.

Las levaduras son capaces de mantener más o menos constante el pH citosólico con el pH extracelular en un rango de 3.5-9 (Höfer y col., 1985; Warth 1988; Viegas y Sá-Correia, 1991). La ATPasa de la membrana plasmática juega un papel central en la homeostasis del pH (Serrano, 1988). Durante el crecimiento en medios con amortiguador a pH 3.5 se observó un aumento de 2-3 veces en la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática en comparación al crecimiento a pH 5-6 (Eraso y Gancedo 1987). Mutantes de *S. cerevisiae* con una reducción en la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática, fueron más sensibles a

un crecimiento a pH bajo, así como al efecto de la adición de ácido acético (que puede bajar el pH citosólico) en comparación con la cepa silvestre (Vallejo y Serrano, 1989).

El rendimiento de biomasa en cultivos en quimiostato es a menudo independiente del pH del medio durante un cierto rango, como se muestra, por ejemplo, para *Kluyvermyces marxianus* (Rouwenhorst y col., 1988) y *S. cerevisiae* (Verduyn y col., 1990b). A valores de pH más bajos el rendimiento disminuye. El contenido de proteína de *S. cerevisiae* es independiente del pH, por lo tanto, la disminución en el rendimiento no es probablemente debido a un cambio en la composición de la biomasa. Una disminución en el rendimiento puede ser debido a un mayor flujo pasivo de protones a un pH más bajo. Hay poca información acerca de la permeabilidad pasiva de protones de la membrana plasmática de las levaduras. Verduyn y col., (1990a) han demostrado que existe una correlación aparente entre el pH del cultivo y el mantenimiento anaerobio en quimiostato en condiciones limitadas de glucosa de *S. cerevisiae* CBS 8066 y H1022. Esta correlación fue calculada suponiendo que la energía requerida para la formación de la biomasa (por ejemplo, $Y_{ATP \text{ max}} \text{ experimental}$) es constante. La energía de mantenimiento así calculada aumentó fuertemente con la disminución del pH del cultivo y alcanzó un máximo de aproximadamente $12 \text{ mmoles ATP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cuando se grafica la energía de mantenimiento versus el logaritmo del pH del cultivo resulta una línea recta (Verduyn y col., 1990a). Esto sugiere que el grado de desacoplamiento es una función lineal de la concentración de protones. Algunas observaciones particulares se han hecho para el crecimiento de *Trichosporon cutaneum* como una función del pH del cultivo (Fiechter y col., 1989). Esta levadura pareció ser muy sensible al pH externo: el rendimiento disminuyó linealmente entre pH 6 y 3.5 durante el crecimiento aerobio con limitación de glucosa. Curiosamente, la composición celular se vio afectada significativamente por la disminución del pH del medio, con un aumento del 25% en el contenido de proteínas y RNA (Fiechter y col., 1989). Los efectos combinados de temperatura y pH en el rendimiento de biomasa de *S. cerevisiae* TBPM 14 en quimiostato en cultivo limitado de glucosa fueron examinados por Eroshin y col., (1976). Durante un intervalo de pH de 2-7 y un rango de temperatura de 22-35 °C el rendimiento de biomasa máximo para esta cepa fue encontrado a un pH de 4.1 y 28.5 °C.

4. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.

El cultivo en medio sólido (CMS) se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles que además pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía (Hölker y col., 2004). La fermentación se lleva a cabo en presencia de bajo contenido de agua libre, aunque el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo. Esto se acerca al ambiente natural al cual los microorganismos están adaptados (Pandey 2003). Entre las aplicaciones del CMS se encuentra la producción de metabolitos secundarios, aflatoxinas, enzimas y cultivo de hongos, entre otras (Hölker y col. 2004). Publicaciones reportadas en producción de enzimas por hongos filamentosos han mostrado mayores rendimientos de producción de biomasa y enzimas por CMS, en comparación con el cultivo sumergido (Viniegra y col., 2003).

Doelle y col., (1992) mencionan que las principales ventajas de utilizar el CMS son:

- a) La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- b) La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación, ya que se obtiene mayor productividad volumétrica.
- c) La aireación forzada se ve facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo, etc.

Este sistema posee también algunas limitaciones (Hesseltine, 1972; Shankaranand y col., 1992), destacándose la carencia de métodos fiables para la caracterización del crecimiento en los soportes sólidos. La heterogeneidad y la naturaleza complicada de los materiales de uso común como superficies para el crecimiento interfieren con la determinación precisa del mismo, y por lo tanto de los parámetros del proceso. Pocos estudios han descrito la cinética de crecimiento de hongos en los sistemas de CMS, aunque algunos de ellos lo han hecho mediante el monitoreo en línea de CO₂ (Saucedo y col., 1992) y la medición del

contenido de componentes estructurales, tales como proteínas, glucosamina y ergosterol (Desgranges y col., 1991).

En todo proceso hay un equipo crítico donde se forman los productos a obtener, en este caso el equipo donde se lleva a cabo el cultivo es llamado “biorreactor” el cual proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto bioactivo deseado.

4.1 Biorreactores para cultivo en medio sólido.

La última década ha sido una de las más importantes para el desarrollo en el diseño, operación y escalamiento de biorreactores para el cultivo en medio sólido. Los tipos de biorreactores mas estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se han introducido nuevos tipos de biorreactores en cultivo en medio sólido denominados de cama empacada o columna de lecho fijo.

Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas de Petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no operan con aireación ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación.

Dentro de los procesos de cultivo en medio sólido existen actualmente dos categorías: a) escala laboratorio en las cuales utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y b) escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas (Tabla 5). En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados y, sólo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles.

Tabla 5. Clasificación y diferencias en biorreactores a nivel laboratorio, piloto e industrial (Ruíz y col., 2007).

BIORREACTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<i>Escala laboratorio</i>		
Columna	Económico, fácil montaje, monitoreo y control humedad, temperatura, biomasa y CO ₂ . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O ₂ , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
Columna Estéril	Control de humedad y temperatura. Sistema de esterilización previo inoculación y toma de muestra.	Formación de gradientes de concentración de O ₂ y nutrientes.
Tambor horizontal	Mayor aireación y mezclado del sustrato. Existen varios diseños con modificaciones que mejoran la remoción del calor.	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor
Zymotis	Mejor transferencia de calor	Problemas de asepsia en el proceso. Mayor compactación de la cama de sustrato
Growtek	Facilidad en la toma de muestra. Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido. Menor acumulación de calor en la cama de sustrato.	No cuenta con un sistema de aireación. Solo se pueden manejar una sola carga de 400 mL de medio líquido por fermentación.
Proceso continuo	Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.	Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial
Columna-Charola	Económico. Alta transferencia de O ₂ y aireación. Mayor transferencia de nutrientes. Fácil remoción de temperaturas elevadas.	Primer Prototipo. Optimizar la cantidad y tamaño de charolas en el volumen del cilindro.
<i>Escala piloto y/o industrial</i>		
Biocon	Automatizado en el control de las variables de estudio del crecimiento microbiano. Altos niveles de asepsia. Equipo compacto.	Dificultad en la toma de muestra. Rápida generación de calor exotérmico por crecimiento microbiano.
Lecho fluidizado	Operación de forma continua. Menor aglomeración del sustrato. Incremento en la transferencia de O ₂ y humedad. Variedad de configuraciones de soportes.	Formación de altos esfuerzos cortantes que pueden afectar al microorganismos y rendimiento del producto

En el presente trabajo se decidió evaluar la producción de biomasa de *P. pastoris* en biorreactor de columna-charola, debido a su ventaja económica y capacidad de transferencia de oxígeno.

4.1.1. Biorreactor columna-charola.

Diseño realizado en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, el cual consiste en una columna de 13 pulgadas de altura y un diámetro de 10 pulgadas (Figura 5). En su interior se encuentran 8 charolas perforadas, las cuales tienen una capacidad de 140 mL cada una. La transferencia del O₂ es por burbujeo a través de un distribuidor de aire, permitiendo la transferencia de flujo de 194 mL/min. La

temperatura es regulada por una chaqueta de enfriamiento y/o calentamiento, por lo que es posible controlar y medir los cambios de temperatura. Bajo este sistema se permite una mejor distribución de O₂ por aireación hacia las charolas (Ruiz, 2004).

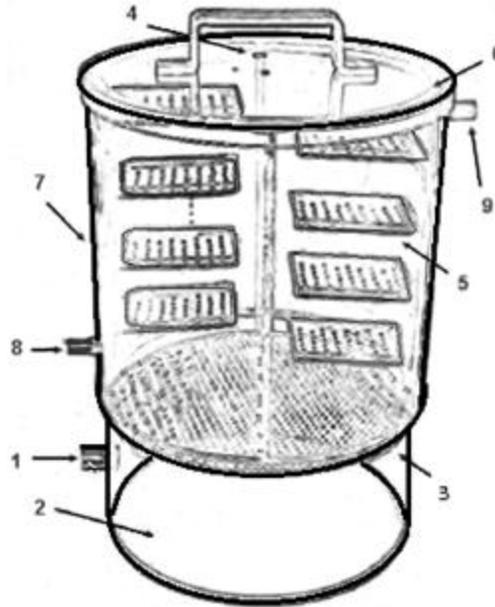


Figura 5. Biorreactor columna- charola para CMS (Ruíz y col., 2007).

(1) Entrada de aire estéril, (2) entrada de agua estéril, (3) distribuidor de aire, (4) entrada para el termómetro, (5) charola, (6) chaqueta para el control de temperatura, (7) columna de acrílico, (8) entrada de agua, (9) salida de agua.

Existe un gran interés por llevar a cabo diseño de biorreactores a nivel laboratorio que puedan ser escalados para su uso a nivel industrial, por lo que se han llevado a cabo investigaciones para determinar los aspectos de ingeniería que afectan al cultivo en medio sólido ya que es un sistema denominado de las tres E's: energético, económico y ecológico (Raghavarao y col., 2003).

Sin embargo, los avances en el diseño de equipos que permitan el desarrollo de un cultivo en medio sólido han sido pocos y variados en cuanto a sus características, debido al principio fundamental de trabajar con matrices sólidas que limitan la predicción de parámetros trascendentales como el oxígeno y la temperatura. Siendo de gran relevancia el combinar el

desarrollo de biorreactores nobles para CMS con los estudios llevados a cabo para un mayor entendimiento de los fenómenos de transporte que afectan el diseño de los sistemas fermentativos. Por lo tanto, se han desarrollado modelos de sistemas en medio sólidos, buscando cuantificar las variables que permitan optimizar el bioproceso. Sin embargo, aún no han sido aplicados para la construcción de biorreactores a escala industrial (Mitchell y col., 2003) debido a que es necesario crear los equipos con mayor automatización.

Aunque es bien sabido que los sistemas de cultivo en medio sólido difícilmente desbancarán a los sistemas líquidos, por los costos a nivel industrial que estos involucrarían, el diseño de biorreactores permitirá tener otras alternativas tecnológicas para las futuras empresas biotecnológicas de México y el mundo (Aguilar y col., 2003).

JUSTIFICACIÓN

La demanda de proteínas recombinantes terapéuticas de consumo humano se ha convertido en una realidad comercial y ha aumentado dramáticamente durante los últimos años, salvando un número incontable de vidas gracias a la casi accesibilidad ilimitada de estas proteínas. Más de 80 proteínas recombinantes están aprobadas para consumo humano. Aunque mucho se ha avanzado, la producción de proteína recombinantes constituye un campo que necesita ser mucho más estudiado, más aún cuando los precios de muchos de estos medicamentos son altos y de difícil acceso en países en vías de desarrollo.

Una de las estrategias que se deberá seguir debe estar encaminada a desarrollar nuevos procesos más eficientes y menos costosos de producción de proteínas recombinantes. Por ello, en el presente trabajo se propone el cultivo en medio sólido (CMS) como alternativa para la producción de proteínas recombinantes debido a las ventajas que ofrece en comparación con el cultivo sumergido en la producción de biomasa y enzimas (Viniegra y col., 2003). Además, el CMS favorece el transporte y asimilación de oxígeno por los microorganismos. Por ello, se decidió utilizar espuma de poliuretano (EPU) como soporte inerte en el CMS, ya que presenta una relación área/volumen 100 veces mayor a la que tienen los sistemas de cultivo líquido en matraz Erlenmeyer.

Considerando la relevancia que está teniendo *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes en gran cantidad de sectores industriales, (farmacéutico, agropecuario y alimentario, entre otros) junto con la ausencia de artículos que aborden esta área de investigación, nos condujo a desarrollar este trabajo que permitiera establecer un sistema para la producción de levadura (primera etapa de producción de proteína recombinante) en CMS usando placas de EPU como soporte.

HIPÓTESIS

El uso de capas finas de poliuretano como soporte para el crecimiento de *Pichia pastoris* favorecerá la transferencia de oxígeno y, por consiguiente, la producción de biomasa en condiciones de cultivo en medio sólido.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de producción de levadura en cultivo en medio sólido usando placas de espuma de poliuretano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la humedad crítica y la capacidad de retención de agua de la espuma de poliuretano.
- 2.- Diseñar las condiciones de operación para los estudios de crecimiento de *Pichia pastoris* en cultivo en medio sólido sobre espuma de poliuretano.
- 3.- Evaluar el efecto del grosor de las placas de espuma de poliuretano y la concentración inicial de glucosa (50 a 150 g/L) sobre la producción de biomasa de *Pichia pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismo.

Se utilizó una cepa de la levadura *Pichia pastoris* que fue proporcionada por la Dra. Elba Villegas de la UAEM.

2. Conservación de la cepa.

2.1. A corto plazo.

Se propagó la cepa en tubos inclinados con medio YM. Después de la inoculación, se incubó a 30 °C durante 3 días, posteriormente se conservó a 4 °C por un periodo no mayor a 7 días.

2.2. A largo plazo.

Se propagó la cepa en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo YPD (Cancino y col., 2008). Después de la inoculación se incubó a 30 °C durante 24 h a 150 rpm; posteriormente, se centrifugó y se liofilizó utilizando como acarreador leche descremada al 10%.

3. Soporte.

Se usó como soporte inerte espuma de poliuretano (EPU) en forma de tiras delgadas con un espesor de 0.3 a 0.7 cm. La EPU se lavó previamente con agua caliente (60 °C), después con agua destilada a temperatura ambiente, se secó a 60 °C y se conservó a resguardo de la luz.

4. Medios de cultivo.

Medio YM en g/L: extracto de levadura, 3; extracto de malta, 3; peptona, 5; glucosa, 10 y agar, 20 en agua destilada.

Medio YPD en g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 10 y glucosa, 10 en agua destilada (Cancino y col., 2008).

Medio para CMS. En una primera etapa se usó el medio reportado por Hang y col. (2009). El medio se compone en (g/L): glucosa 50; (NH₄)₂SO₄, 2; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄·7H₂O, 0.47; CaCl₂·2H₂O, 0.036 y 1.2 mL/L de solución de elementos traza. La solución de elementos traza se compone de CuSO₄, 0.6%; KI, 0.008%; MnSO₄, 0.3%;

Na_2MoO_4 , 0.02%; H_3BO_3 , 0.002%; CoCl_2 , 0.05%; ZnCl_2 , 2%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.5%. El pH del medio se ajustó a 5.5 con H_2SO_4 al 10 %.

Sin embargo, debido a problemas asociados a la disminución importante del pH se realizaron estudios de composición del medio de cultivo. Como resultado de ello, se obtuvo el siguiente medio que fue utilizado para los estudios de crecimiento en medios con diferentes concentraciones de glucosa: glucosa 50; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8.78; Urea, 2.85; KH_2PO_4 , 6.6; K_2HPO_4 , 6.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.47; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.036, extracto de levadura, 0.5; solución de elementos traza, 1.2 mL/L; biotina, 1 mL/L; solución amortiguadora citrato-fosfato. El pH del medio se ajustó a 5.5 con H_2SO_4 al 10 %.

5. Producción del inóculo.

Primeramente, se inoculó por estría un tubo inclinado con medio YM a partir de un tubo con la cepa propagada proveniente del cepario de la Planta piloto de fermentaciones sólidas de la UAM-I. Este tubo se dejó crecer durante 3 días a 30 °C y se utilizó como inóculo. Para ello, se agregaron 3 ml de solución fisiológica estéril (NaCl al 0.9 %) al tubo y se agitó perfectamente. Se realizó una dilución 1:100 de la suspensión del inóculo y se contaron las células en la cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos correspondientes de tal manera que el inóculo fuera de 2×10^7 células por gramo de espuma de poliuretano (cél/g EPU).

6. Curva estándar de células.

Las células obtenidas en el tubo inclinado (sección anterior) se recuperaron, se centrifugaron y se resuspendieron en solución fisiológica (NaCl 0.9%, p/v). A la suspensión obtenida se le realizaron diluciones sucesivas, a las cuales se les midió la densidad óptica a 600 nm y se utilizó agua destilada como blanco. Con base en los datos obtenidos, se establecieron los parámetros de la curva estándar, para la posterior cuantificación de la biomasa celular.

7. Caracterización del EPU.

7.1. Capacidad de retención de agua (u).

Se utilizaron cuadros de EPU de 2x2 cm. Cada uno de los cuadros se pesó en la balanza. Se adicionó 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL de capacidad y se agregaron 10 cuadros de un mismo espesor, se hizo lo mismo para los otros dos espesores. Los cuadros de EPU se presionaron con una superficie plana, hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejaron hidratar durante 10 min. Una vez que los cuadros estaban completamente hidratados, se sacaron con una pinza y se pesaron uno por uno en la balanza. Se realizaron 10 repeticiones para cada espesor.

7.2. Curvas de secado del EPU.

Se utilizaron cuadros de EPU de 1x1 cm. Se adicionó 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL de capacidad y se agregaron los cuadros. Se presionaron con una superficie plana hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejaron hidratar durante 10 min. Una vez que los cuadros estaban completamente hidratados, se sacaron con una pinza y se colocaron uno por uno en la termobalanza. La curva de secado se realizó con el método 2, que consiste en secar a una temperatura de 130 °C hasta 90 s de peso constante. La curva de secado se realizó por triplicado para cada espesor de EPU.

7.3. Actividad del agua en el EPU.

Se utilizaron círculos de EPU de 3 cm de diámetro y 0.7 cm de espesor. Se adicionó 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL de capacidad y se agregaron los círculos. Se presionaron con una superficie plana hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejaron hidratar durante 10 min. Una vez que los círculos estaban completamente hidratados, se sacaron uno por uno y se pusieron en una charola de aluminio. Posteriormente, la charola se metió a la estufa a una temperatura de 60 °C y se sacaron 2 círculos cada 30 min, hasta cumplir 300 min. Al sacar cada círculo, éste se colocó dentro de un estuche con tapa y se dejó enfriar durante 5 min. El análisis de actividad de agua se realizó para cada círculo en un equipo llamado Aqualab. Se hizo por duplicado para cada tiempo.

8. Modelo experimental.

Cada unidad experimental (UE) se formó de 3 placas de EPU (previamente esterilizadas en la autoclave, 15 min a 15 lb) de 10x3 cm dentro de una columna de vidrio, las cuales se separaron utilizando mallas plásticas (figura 6b) (previamente esterilizadas en la autoclave, 15 min a 15 lb) de tal manera que permitieran el flujo de aire a través de las placas. A las placas se les adicionó el medio de cultivo previamente inoculado. Las UE se incubaron a 30°C y se les colocó a la entrada un humidificador de aire.

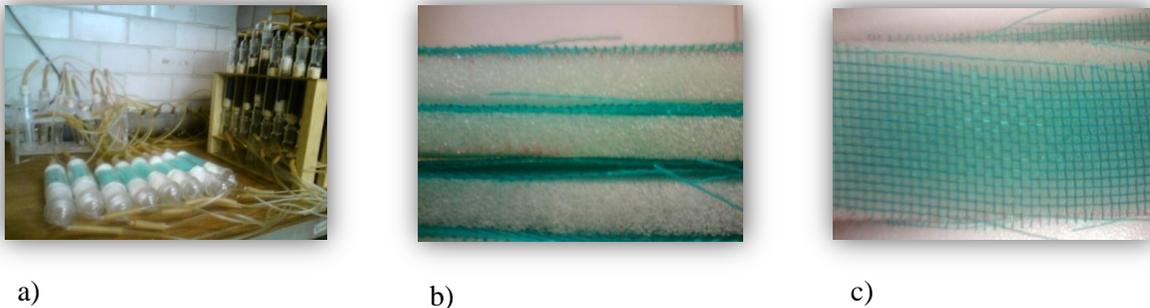


Figura 6. Diseño del sistema en columna para el CMS.
a).-Unidad experimental, b) Separación de las placas de EPU con una malla plástica, c) malla plástica porosa.

9. Cultivo en medio sólido en reactor de columna.

A continuación se describe el procedimiento que se siguió con el objetivo de evaluar el crecimiento de *Pichia pastoris* en el reactor de columna.

9.1. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del grosor de la placa de poliuretano sobre el crecimiento de *Pichia pastoris*.

Se utilizaron tiras de EPU de 10x3 cm de tres diferentes espesores (0.3, 0.5, y 0.7 cm). Se ensayaron 3 concentraciones iniciales de glucosa (50, 100 y 150 g/L). Los cultivos se dividieron por concentración, se realizaron 3 cultivos en tiempos distintos, se ensayó una misma concentración inicial de glucosa en los tres espesores de EPU por cultivo. Una vez preparado el medio, éste se colocó en un matraz Erlenmeyer de capacidad de 125 mL y se esterilizó en autoclave. Posteriormente, se agregó una relación medio (mL)/ EPU (g) de 15 por cada placa de EPU. Se colocaron 3 placas de EPU con una misma concentración dentro de una

columna de vidrio. Cada condición se realizó por duplicado. En total se realizaron 6 columnas para cada concentración inicial de glucosa. Las columnas se colocaron horizontalmente en un cuarto de temperatura controlada a 30°C. A cada columna se le colocó un humidificador de aire con un flujo de aire de 50 mL/min aproximadamente. Durante todo el periodo de incubación se analizaron en línea el flujo de aire y las concentraciones de O₂ y CO₂ a la entrada y salida de las columnas de fermentación mediante un metabolímetro. En todos los casos los cultivos se detuvieron cuando cesó la producción de CO₂.

10. Procesamiento de muestras.

Cada muestra proveniente de las UE se procesó de la siguiente manera. Se extrajo una placa de EPU para análisis de humedad y dos placas se utilizaron para análisis de glucosa y pH. Para ello, cada placa se cortó en 4 partes y se colocaron dentro de un tubo para centrífuga de 50 mL y se le agregó 40 mL de agua desionizada. Se agitó vigorosamente con un vórtex por 1 min. Se tomó una muestra de 1 mL y se colocó en un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 10000 rpm por 3 min. El precipitado se resuspendió en solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se estimó la concentración celular por turbidimetría. El sobrenadante se utilizó para análisis de glucosa, HPLC y pH.

11. Métodos analíticos.

11.1. Determinación de biomasa por turbidimetría.

Al precipitado que se resuspendió en solución fisiológica obtenido en la sección 9 se le midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (se realizó la dilución correspondiente). Con los datos obtenidos en esta sección y los de la curva estándar de biomasa se realizaron los cálculos necesarios para posteriormente obtener la concentración celular para cada placa de EPU en la UE.

11.2 Determinación de glucosa.

La determinación de glucosa se llevó a cabo mediante el kit enzimático SPINREACT.

-Estándar: Se realizó una dilución 1:10 del estándar original del kit, adicionando a 4.5 mL de agua destilada 0.5 mL del estándar de glucosa, quedando una concentración final de 0.1 mg/mL.

Posteriormente, se realizó la dilución 1:100 para cada muestra, para el método enzimático se colocaron 100 μ l de cada muestra (dilución) en un tubo de ensaye respectivo, también se agregaron 100 μ l del estándar (por triplicado) y a cada tubo se le agregó 1 mL del reactivo. Se agitó en vórtex y se dejó reaccionar por media hora. Transcurrido el tiempo se leyó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800) a 505 nm.

11.3. Determinación de humedad.

Se determinó la humedad de la placa de EPU de la materia húmeda en una termobalanza (Ohaus®). La determinación de humedad se realizó a 130 °C hasta obtener el peso constante.

11.4. Determinación de pH.

El sobrenadante obtenido de la sección de procesamiento de muestras se utilizó para el análisis de pH mediante el uso de un potenciómetro.

11.5. Determinación por HPLC.

El sobrenadante obtenido de la sección de procesamiento de muestras se utilizó para el análisis de compuestos por medio de HPLC (Perkin Elmer®). Se utilizó una columna de ácidos orgánicos (Aminex® HPX-87H) y se operó a las siguientes condiciones: fase móvil: 5mM H₂SO₄ a un flujo de 0.6 mL/min, a una temperatura de 65 °C.

12. Cálculo de parámetros cinéticos.

12.1. Rendimiento (Y_{x/s}).

Una vez analizadas las muestras de biomasa producida y sustrato residual al final del cultivo. Se realizaron los siguientes cálculos:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f}$$

Donde:

X_o = biomasa inicial

X_f = biomasa final

S_o = sustrato inicial

S_f = sustrato final

12.2. Tasa específica de producción de CO₂ (μ_m).

Se realizó el cálculo con los datos experimentales arrojados por el metabolómetro y la ayuda de una hoja de cálculo. Se graficaron los valores observados de la integral de CO₂ Vs tiempo y la curva obtenida se ajustó a una curva dada por la ecuación logística, se obtuvieron los valores calculados, con éstos valores y con el programa Solver se estimó la μ_m .

12.3. Fase lag del crecimiento de *P. pastoris*.

Una vez obtenida la gráfica de la integral de CO₂ Vs tiempo, se calculó la pendiente de la fase exponencial y la intersección con el eje horizontal. Para obtener el valor de la fase lag, se dividió el valor de la intersección entre el valor de la pendiente.

12.4. Coeficiente respiratorio (CR).

El CR se calculó dividiendo los valores de la derivada del CO₂ producido entre los valores de la derivada del O₂ consumido.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL SOPORTE INERTE (EPU)

1.1. Capacidad de retención de agua.

Esta parte inicial del trabajo experimental se realizó para determinar la capacidad de retención de agua, u , definida en Materiales y Métodos, y la cinética de secado de placas de EPU de diferente grosor. La Fig. 7a muestra las micrografías del EPU dónde todas las celdas poliméricas están completamente conectadas entre sí. Pero, en las micrografías, 7b, 7c y 7d se observan zonas con celdas rotas o desconectadas. Una observación de las placas indicó que las zonas externas con rupturas tenían una profundidad menor de la distancia, $d = 0.05$ cm.

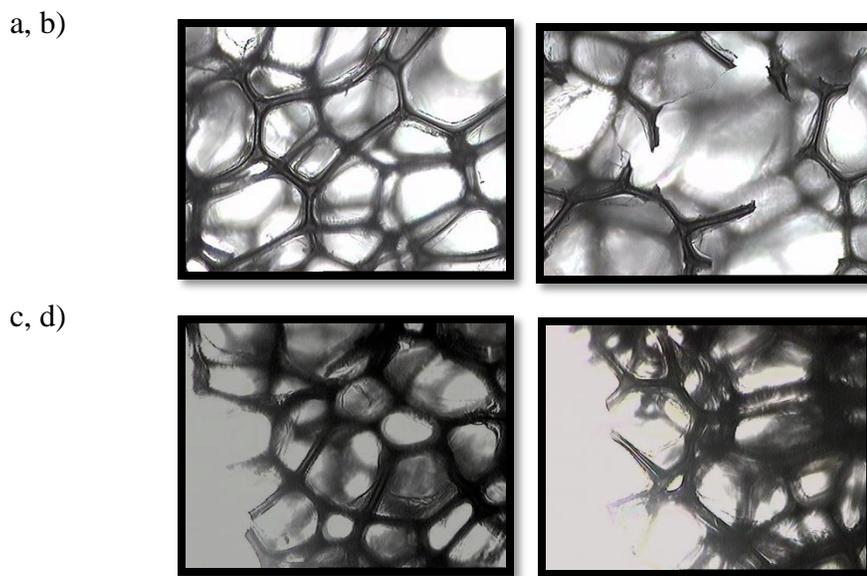


Figura 7. Micrografías de EPU.

a) Forma de los poros intactos, b, c y d) Ruptura de los poros en la superficie.

Como el agua sólo se deposita en forma de meniscos en celdas bien conectadas, se consideró que las placas con ancho, A ; largo, B , y espesor, h , tendrían un volumen total:

$$V_T = ABh$$

Pero como la profundidad, d , de la zona destruida es más o menos uniforme, se puede calcular el volumen efectivo, V_E .

$$V_E = (A - 2d)(B - 2d)(h - 2d)$$

Por lo tanto, la fracción, f , del volumen total, que puede retener agua sería:

$$f = \frac{(A - 2d)(B - 2d)(h - 2d)}{ABh}$$

Suponiendo que el EPU tiene una máxima capacidad de carga, u_{max} , la capacidad relativa u sería:

$$u = u_{max} \frac{(A - 2d)(B - 2d)(h - 2d)}{ABh}$$

Si consideramos que, d , es mucho menor que A ó B , el valor de u puede ser aproximada por la siguiente función:

$$u \approx u_{max} \left(1 - \frac{2d}{h}\right)$$

De forma que u se aproxima al eje horizontal cuando $h \rightarrow 2d$ y $u \rightarrow u_{max}$ cuando $h \gg 2d$. La Fig. 8 muestra la curva teórica con $d = 0.026$ cm y $u_{max} = 74.5$ gH₂O/gEPU. Esta curva se hizo pasar por los 30 valores experimentales expresados por medio de círculos.

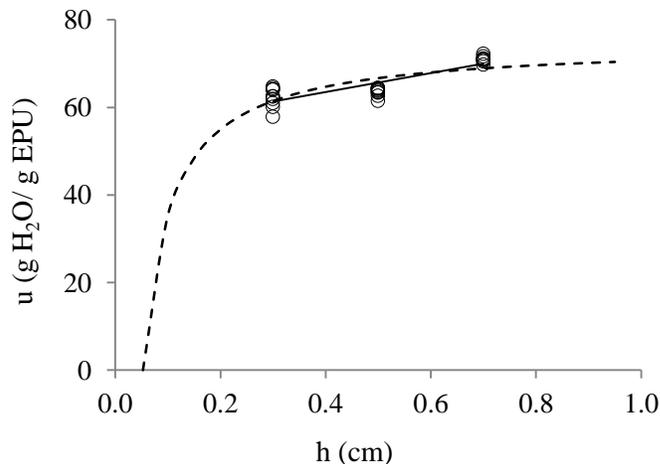


Figura 8. Capacidad de retención de agua, u , en placas de EPU. La curva teórica (---) indicó, $u_{max} = 74.5$ g H₂O/ g EPU y $d = 0.026$ cm con $R^2 = 0.60$. El modelo lineal (---) ofreció una mejor correlación ($R^2 = 0.76$). La curva interrumpida indica la extrapolación del modelo como hipótesis indicativa.

El coeficiente de correlación entre la curva teórica y los datos no fue muy alto ($R^2 = 0.59$), pero puede servir para dar una idea del orden de magnitud de u_{\max} . Sin embargo, la extrapolación sugiere que al reducir el espesor, $h < 0.3$ cm, de las placas, se reducirá mucho el valor de u y cuando la placa sea muy delgada ($h \leq .052$ cm) no habrá retención del agua, porque todo el polímero tendrá celdas abiertas en las que casi no se formarán meniscos.

Este factor no es tomado en cuenta en la mayor parte de los experimentos de fermentación con EPU pues se utilizan cubos con arista $h = 0.5$ cm. En ese caso la fracción útil sería:

$$f = \frac{(h - 2d)^3}{h^3} = \left(1 - \frac{2d}{h}\right)^3 \approx 0.72$$

Lo cual corresponde a un volumen sin agua del 28% del volumen de los cubos utilizados.

Estos resultados sobre la distribución del agua en la EPU están relacionados con los obtenidos en las secciones subsiguientes, lo cual será comentado en su oportunidad.

1.2. Curvas de secado.

Para determinar la humedad crítica de las tiras de EPU con diferente espesor se realizaron curvas de secado (Fig. 9). Los datos obtenidos no permiten identificar el valor de humedad crítica del poliuretano; ya que no se observó la transición de velocidad de secado constante a la de secado decreciente. Se puede asumir que la humedad inicial del EPU está por debajo de la humedad crítica y por ello sólo se observa la velocidad decreciente en donde la velocidad de secado es mayor a la velocidad de traslado del agua interior a la superficie del EPU debido a la porosidad del material.

Para caracterizar la curva de secado se utilizó una curva de saturación tipo Langmuir. Por ello se buscó utilizar otros parámetros como la V_{\max} y K_s para caracterizar el secado en el EPU.

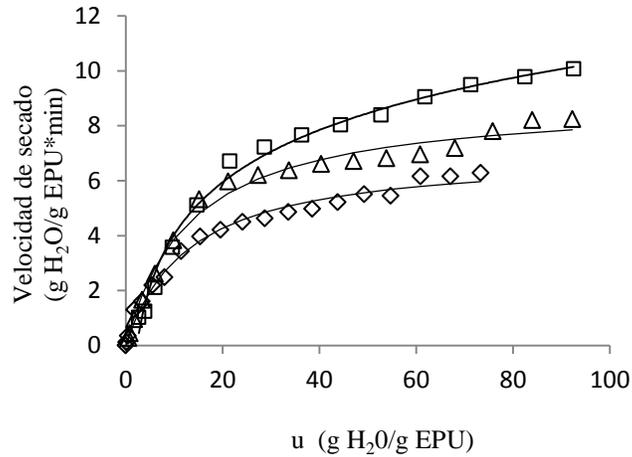


Figura 9. Curvas de secado de EPU con diferente espesor.
 (□ 0.3 cm, △ 0.5 cm, ◇ 0.7 cm)

En la Figura 10 se representan las curvas que relacionan a la velocidad de secado con la carga de agua, u (g H₂O/ g EPU). Estas curvas fueron seguidas de cerca por funciones de Langmuir, con velocidad máxima, V_{max} , y constante de saturación, K_{sat} . Pero estos parámetros fueron función del espesor, h , de la placa:

$$v = \frac{V_{max}u}{K_{sat} + u}$$

Los datos mostraron funciones lineales decrecientes en el espesor de la placa, h , tanto de V_{max} como K_{sat} . Aunque el nivel de correlación fue mayor para V_{max} vs. h (espesor).

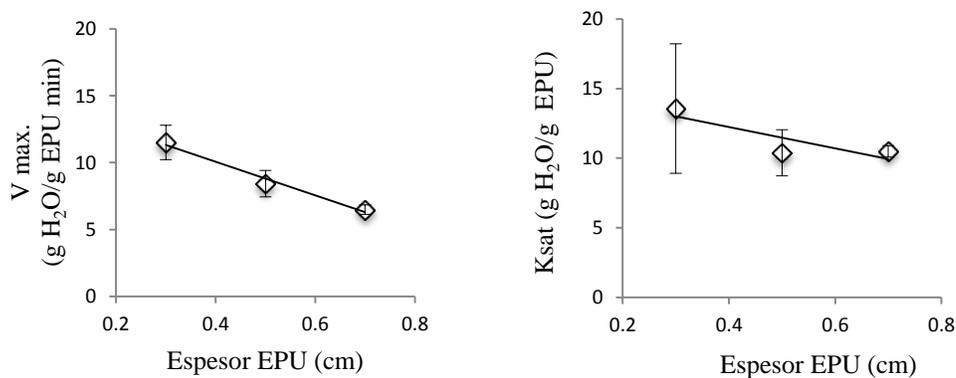


Figura 10. Parámetros V_{max} y K_{sat} para caracterizar el secado en el EPU.

Este resultado es congruente con un modelo en el cual el agua se evapora con más facilidad en láminas delgadas de EPU, porque el área específica ($\alpha = A/V$) es mayor. Lo cual se ilustra por la siguiente relación:

$$\alpha = \frac{2(A + B)h + 2AB}{ABh} = 2 \left[\frac{1}{A} + \frac{1}{B} \right] + \frac{2}{h}$$

Esta relación muestra que, α , disminuye cuando h aumenta. Como la evaporación es un fenómeno de superficie, su velocidad máxima, V_{\max} , será proporcional al área específica, α , y por lo tanto decrecerá al aumentar el espesor de la placa.

1.3. Actividad de agua.

El agua es el solvente en donde ocurren las reacciones químicas y enzimáticas de la célula y es indispensable para el desarrollo de los microorganismos. La actividad de agua (A_w) del medio representa la fracción molar de las moléculas de agua totales que están disponibles, y es igual a relación (ρ/ρ_o) que existe entre la presión parcial de vapor de la solución (ρ) respecto a la del agua pura (ρ_o).

El valor de la A_w nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente. Variaciones en la actividad de agua pueden afectar la tasa de crecimiento, la composición celular y la actividad metabólica del microorganismo, debido a que si no disponen de suficiente cantidad de agua libre (no asociada a solutos, ni al soporte de crecimiento) en el medio necesitarán realizar más trabajo para obtenerla y disminuirá el rendimiento del crecimiento.

La gran mayoría de los microorganismos requieren valores de A_w altos para poder crecer. De hecho, los valores mínimos de actividad de agua para diferentes tipos de microorganismos son los siguientes: bacterias $A_w > 0.90$, levaduras $A_w > 0.85$, hongos filamentosos $A_w > 0.80$.

Debido a la importancia de la A_w en el crecimiento de los microorganismos, se decidió evaluar si existe una interacción entre el soporte de cultivo y el agua que pudiera afectar la disponibilidad del agua para el microorganismo.

En la figura 11 se presenta la actividad de agua en función del contenido de humedad de las placas de EPU.

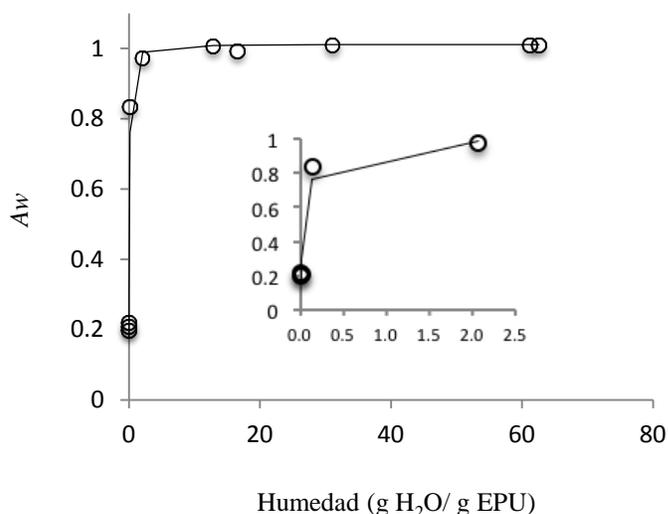


Figura 11. Actividad de agua de las placas de EPU en función del contenido de humedad.

Con los resultados obtenidos de la A_w , se realizó un ajuste del cual obtuvimos el valor de $A_{w_{max}}=1.012$, valor que solo puede ser de 1 y la diferencia se debió al error experimental, también se obtuvo un valor de $K = 0.00473$ (g H₂O/g EPU) el cual equivale a la cantidad de humedad a la mitad de la $A_{w_{max}}$. Este resultado indica que la EPU puede adsorber cantidades muy bajas de humedad ($u < 50$ mg H₂O/g EPU). Cuando u es mayor, ($u > 0.25$ g H₂O/g EPU) prácticamente toda el agua se encuentra en forma libre. La Fig. 7 muestra que el agua se encuentra repartida en meniscos con un espesor pequeño. Por lo tanto, este sistema de cultivo no concuerda con la definición usual, atribuida a Moo-Young y col., (1984) que definieron a los cultivos sobre sustratos sólidos como los que se desarrollan en “ausencia de agua libre”. Sin embargo, la EPU ha sido considerada desde hace más de 20 años como un sistema de fermentación sobre sustrato sólido. En este trabajo confirmamos que la mayor parte del agua presente en la EPU se encuentra “libre” es decir, con una actividad igual a la unidad.

Con base en los resultados obtenidos de la capacidad de retención de agua y de la A_w , en la siguiente etapa se evaluará el crecimiento de *P. pastoris* sobre espuma de poliuretano considerando estos dos factores físicos de la EPU.

**2. CRECIMIENTO DE *Pichia pastoris* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO SOBRE
ESPUMA DE POLIURETANO**

Una vez que se determinó la capacidad de retención de agua y la actividad de agua de la EPU, se prosiguió a realizar los experimentos para evaluar el crecimiento de *Pichia pastoris* sobre espuma de poliuretano.

2.1 Composición del medio de cultivo.

En este capítulo se evaluó el crecimiento de *P. pastoris* empleando el medio de cultivo reportado por Hang y col. en 2009, modificado.

2.1.1 Curva estándar de biomasa.

Para determinar la concentración celular en la suspensión obtenida después de la extracción de las células de las tiras de EPU, se realizó una curva estándar de densidad óptica a 600 nm versus la concentración celular (Fig. 12). Se obtuvo una respuesta lineal hasta una concentración celular de 0.165 g/L. Por ello, en todos los casos, la densidad óptica se midió a valores no mayores a 0.6. La curva de ajuste presenta una pendiente de 3.66 DO L/g, la cual será usada en posteriores análisis de biomasa por turbidimetría.

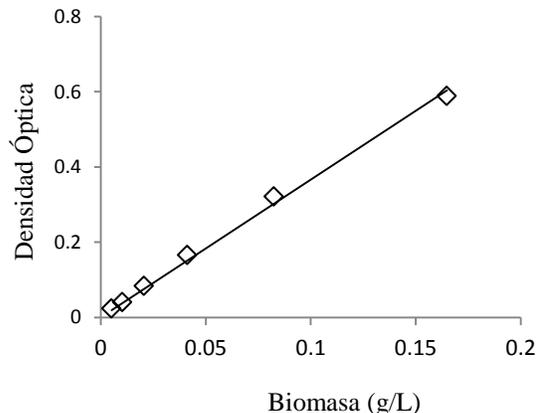


Figura 12. Curva estándar de producción de biomasa de *P. pastoris*.
($R^2=0.99$)

2.1.2. Producción del inóculo de *Pichia pastoris*.

Para los estudios de CMS se decidió inocular con una suspensión celular obtenida en un cultivo en medio superficial (YM). Para ello, en una primera etapa se determinó la cinética de crecimiento en el cultivo superficial (Fig. 13). Los datos muestran que la máxima

concentración celular se alcanza entre los días 3 y 4. Con base en ello, se decidió producir los inóculos con tiempos de incubación entre 3 y 4 días. Las suspensiones celulares obtenidas en este estudio fueron usadas para obtener la curva estándar de densidad óptica en función de la concentración celular.

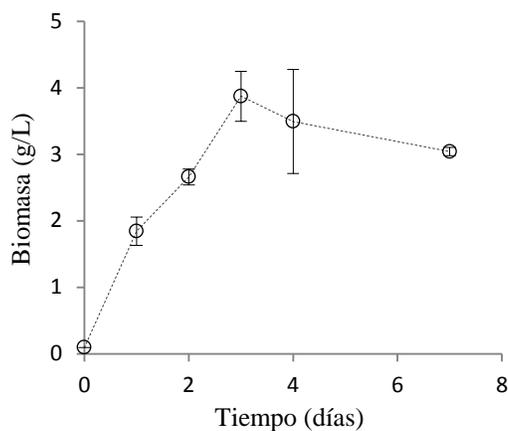


Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. pastoris* en cultivo superficial.

2.1.3. Evaluación de la composición del medio de cultivo.

Una vez que se determinaron las condiciones de producción, cosecha y cuantificación del inóculo, se procedió al diseño del medio de cultivo para los estudios de producción de *P. pastoris* en CMS en EPU. Estos estudios sirvieron también para montar la metodología de análisis de humedad, pH, concentración celular y contenido de glucosa en el medio. En la figura 14 se presenta la producción de biomasa (g/L) en función del tiempo, obtenido por dos métodos de análisis, por conteo celular y turbidimetría. Se observa que no existe diferencia significativa entre ambos métodos pudiéndose utilizar cualquiera de los dos para posteriores análisis de producción de biomasa. La cinética se detuvo a los 2 días debido a que se obtuvo un valor de pH de 2.7 siendo ya inadecuado para el crecimiento de la levadura.

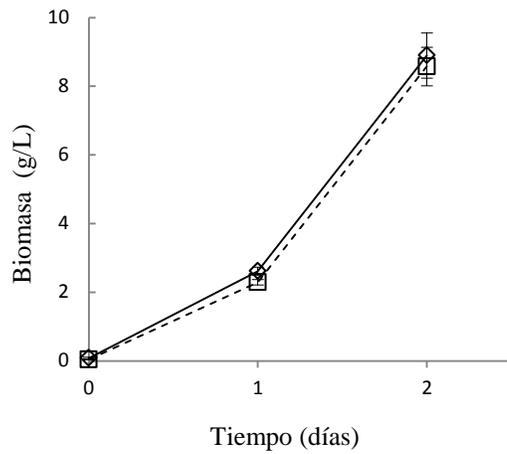


Figura 14. Producción de biomasa de *P. pastoris* en CMS con EPU.
(Conteo celular ◇, Turbidimetría □)

En la figura 15 se muestra que en los dos días de cultivo el consumo de glucosa fue menor del 100%. Como se mencionó anteriormente, el cultivo se detuvo debido al bajo valor de pH obtenido en el medio de cultivo (Fig. 16) y se sabe que ésta levadura tiene su pH óptimo de crecimiento en un intervalo de 4 a 6 (Hang y col., 2009).

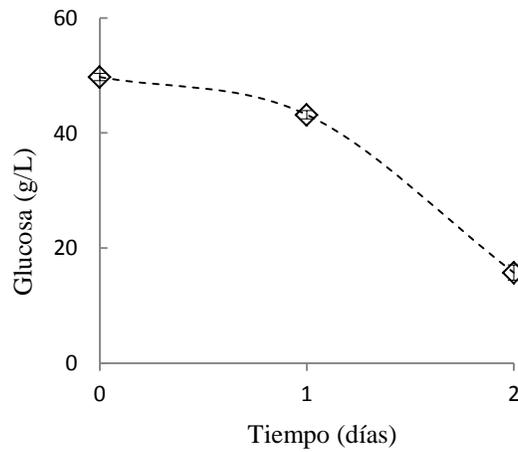


Figura 15. Cinética de consumo de glucosa por *P. pastoris* en CMS con EPU.

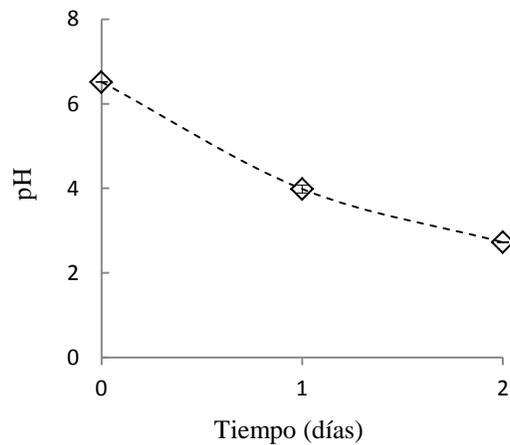


Figura 16. Variación del pH en CMS con EPU utilizando *P. pastoris*.

Con base en lo anterior, se decidió modificar la composición del medio de cultivo para evitar que al final de este el pH alcanzara valores menores a 4.0; para ello, se decidió evaluar la adición de diferentes fuentes de nitrógeno (urea, sulfato de amonio y nitrato de amonio).

La figura 17 presenta la producción de biomasa en g/L en función del tiempo. Los datos muestran que la mayor producción de biomasa se obtuvo con el medio con 100% de nitrato de amonio y la menor producción con el medio con el 100% de urea.

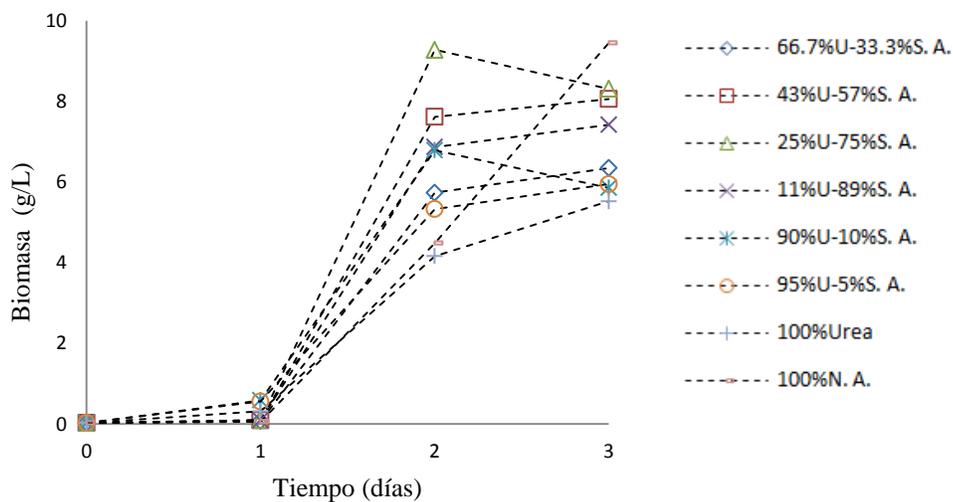


Figura 17. Cinética de crecimiento de *P. pastoris* en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.

En la figura 18 se presenta el consumo de glucosa (g/L) en función del tiempo. Los datos muestran que el mayor consumo de glucosa (arriba del 95%) se obtuvo con los medios que contenían 43%U-57%S.A. y 25%U-75%S.A.

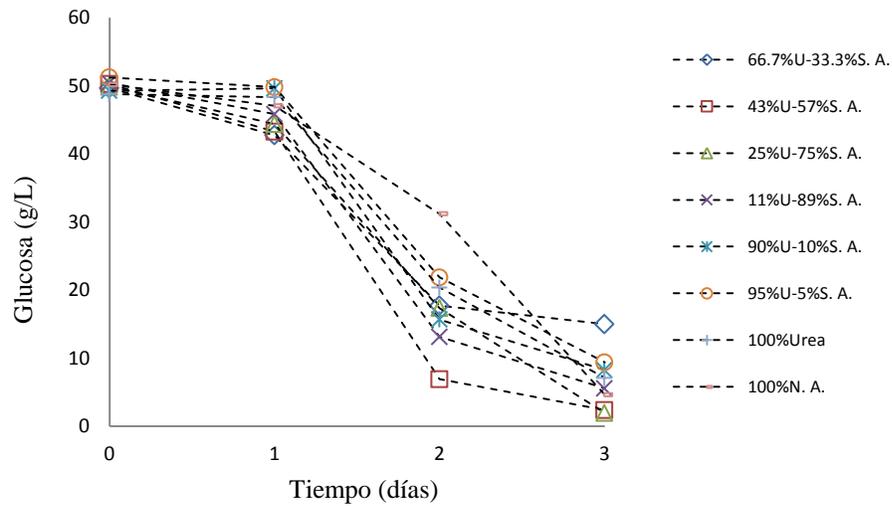


Figura 18. Cinética de consumo de glucosa por *P. pastoris* en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.

La figura 19 presenta la variación del pH a lo largo de la cinética. Se observa que se obtuvieron valores de pH menor a 3. El menor valor de pH 2.3 se obtuvo con el medio con 100% de nitrato de amonio y el mayor valor pH 3.8 con el medio con 100% de urea.

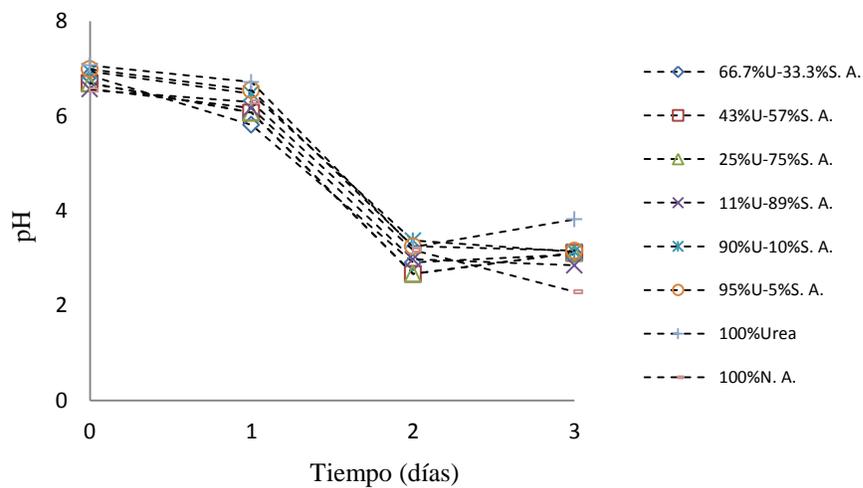


Figura 19. Variación del pH del medio durante el crecimiento de *P. pastoris* en CMS con diferente tipo y concentración de fuente de nitrógeno.

Con los resultados obtenidos en la figura 17 se puede observar que el medio que contiene 100% de urea mostró el menor valor de crecimiento, lo cual se puede deber a que la levadura no asimila adecuadamente este compuesto como fuente de nitrógeno.

Tabla 6. Resumen de los valores de crecimiento de *P. pastoris*, consumo de glucosa y pH con diferentes fuentes de nitrógeno.

Medio	N-urea (%)	Biomasa (g/L)	Glucosa g/L	pH
66%U-33.3%S.A.	66	6.35	15.0	3.1
43%U-57%S.A.	43	8.06	2.4	3.1
25%U-75%S.A.	25	8.31	2.0	3.0
11%U-89%S.A.	11	7.42	5.6	2.9
90%U-10%S.A.	90	5.86	8.3	3.1
95%U-5%S.A.	95	5.95	9.4	3.2
100%U	100	5.52	7.1	3.8
100%N.A.	0	9.44	4.6	2.3

Los datos de la Tabla 6 muestran que a valores de 25 y 43 % de N presente en el medio proporcionado por urea se obtienen los mayores valores de producción de biomasa y el menor valor de glucosa residual. Sin embargo, se puede observar que probablemente la levadura asimila mejor el nitrato de amonio como fuente de nitrógeno ya que con éste se obtuvo la mayor producción de biomasa.

Debido a que el cambio de tipo de fuente de nitrógeno no impidió que el pH final fuera igual o menor a 4, se decidió evaluar la adición de un amortiguador de citrato-fosfato a un pH de 5.5.

Con este amortiguador se logró mantener valores de pH mayores a 4, resolviendo de esta manera el bajo valor de pH en el medio y se prosiguió al diseño del sistema para el cultivo en medio sólido.

2.2. Diseño del sistema de cultivo en medio sólido.

Una vez que se determinó la composición del medio de cultivo se procedió a los estudios de producción de levadura en medio sólido con EPU. En una primera etapa y con base en los resultados obtenidos de la curva de secado se evaluó la producción de levadura en tiras de EPU de 15x3 cm con una relación medio de cultivo inoculado: EPU de 20:1 y se incubaron en posición vertical dentro de columnas de vidrio a 30 °C. En este estudio se usó una concentración inicial de glucosa de 100 g/L.

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos en función de la región de la placa de poliuretano. En las tres regiones se obtuvo un consumo de glucosa del 100%, sin embargo, la producción de biomasa y el rendimiento aumentó al bajar la localización de la placa, obteniéndose los mayores valores de producción de biomasa y rendimiento en la región inferior (9.2 g/L y 0.25 respectivamente). Estos resultados muestran que hubo un escurrimiento del medio de cultivo a través de la placa vertical y se puede suponer que hubo pérdida de medio al acumularse en la parte inferior.

Tabla 7. Parámetros de crecimiento y consumo de glucosa de *P. pastoris* en función de la región de la placa de EPU en posición vertical.

Región	Biomasa (g/L)	Y x/s (g/g)	Cg* (%)
Superior	6.2 ±1.97	0.17 ±0.03	100
Media	6.7 ±2.08	0.18 ±0.03	100
Inferior	9.2 ± 0.4	0.25 ±0.01	100

*Cg: consumo de glucosa

Debido al drenado de medio de cultivo en la proporción evaluada y con las columnas incubadas en posición vertical, se decidió evaluar el efecto de la relación medio de cultivo:EPU sobre la producción celular en sistemas con distribución homogénea de sustratos y productos. Para reducir el drenado del medio se decidió incubar las columnas horizontalmente.

En la figura 20 se presenta el perfil de producción de CO₂ por *Pichia pastoris*.

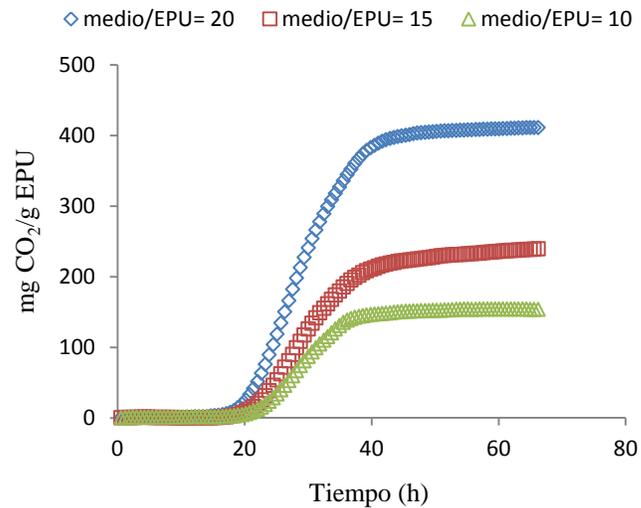


Figura 20. Efecto del contenido de medio de cultivo (relación medio/EPU) en la producción de CO₂ por *P. pastoris*.

El perfil de producción de CO₂ permite diferenciar una fase de retardo mayor a 20 h la cual es muy larga. Comparando nuestros resultados con la literatura se encontró que Barrigón y Ramón (2011) obtuvieron una fase de retardo menor a 10 h y un Y_{x/s} de 0.5 utilizando 40 g/L de glicerol para *P. pastoris* (Fig. 21).

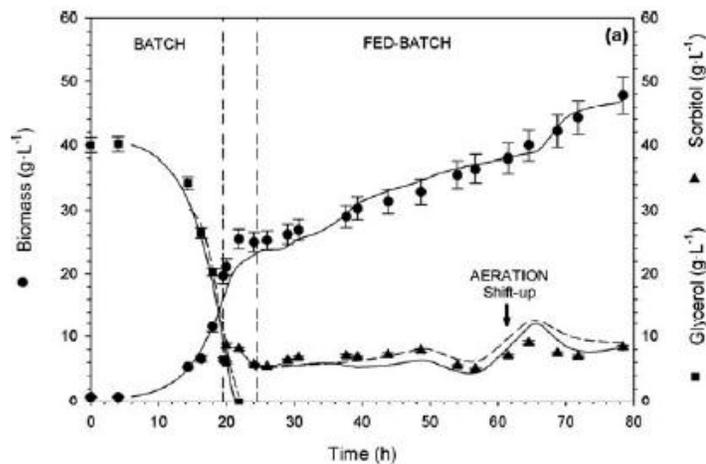


Figura 21. Efecto del modo de operación del cultivo sobre el crecimiento y consumo de sustratos por *P. pastoris* (Barrigón y Ramón, 2011).

La tabla 8 presenta los parámetros asociados al crecimiento en función de la relación medio de cultivo/gEPU. Los datos muestran una mayor producción de biomasa con la relación medio/gEPU de 15 y 10. Se puede asumir que con la relación de 20 hubo un escurrimiento del medio por lo cual se obtuvo una menor producción de biomasa. Con estos resultados se decidió continuar experimentos utilizando una relación medio/gEPU de 15. También se obtuvo la tasa específica de producción de CO₂ (μ_m) mediante la ecuación Logística. Se puede observar un valor máximo de μ_m para la relación medio/gEPU de 10.

Tabla 8. Parámetros asociados al crecimiento de *P. pastoris* en CMS en reactor de columna horizontal.

Medio/EPU (mL/g)	Biomasa (g/L)	Yx/s (g/g)	Cg (%)	μ_m (1/h)
20	11.6 ±0.022	0.22 ±0.023	100 ±0.001	0.17 ±---
15	16 ±0.028	0.32 ±0.03	95 ±0.157	0.17 ±0.03
10	15.6 ±0.022	0.31 ±0.022	97 ±0.066	0.21 ±0.01

En el trabajo de Barrigón y Ramón (2011) se obtuvo una μ de 0.26/h (Fig. 22). Jungo (2007) reportó una μ de 0.24/h. Con estos datos de la literatura podemos decir que el valor de la μ_m obtenida en este trabajo se encuentra en un valor cercano al obtenido en otros trabajos.

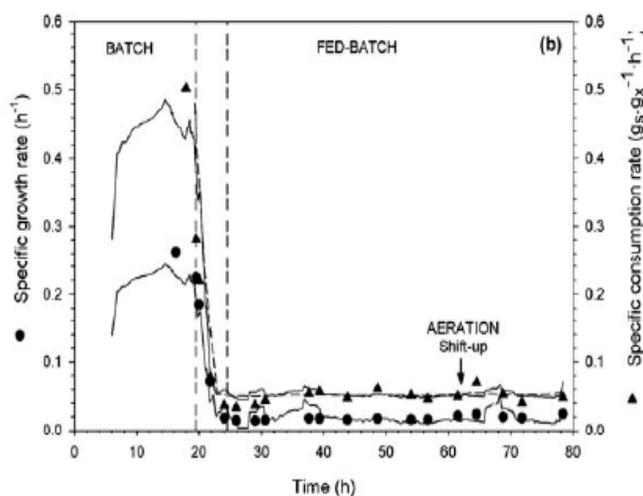


Figura 22. Efecto del modo de operación del cultivo sobre el crecimiento de *P. pastoris* (Barrigón y Ramón, 2011).

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo en términos de la composición del medio de cultivo y de la relación medio de cultivo inoculado: EPU se evaluó el efecto del grosor del EPU en la producción de levaduras con un medio con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L.

Se evaluaron tiras de EPU con espesor, $h = 0.3, 0.5$ y 0.7 cm. En los tres casos se obtuvo un consumo de glucosa mayor al 98 %. En la figura 23 se presentan los rendimientos $Y_{X/s}$ y $Y_{CO_2/s}$ obtenidos para cada grosor de EPU pero estimados en función de la fracción volumétrica con celdas poliméricas intactas (véase el capítulo 1 de la sección de resultados). Se puede observar una tendencia a aumentar ambos rendimientos conforme, f , se aproxima a la unidad. Es de notarse que un aumento en, f , del 6% produjo un incremento cercano al 50% en los rendimientos.

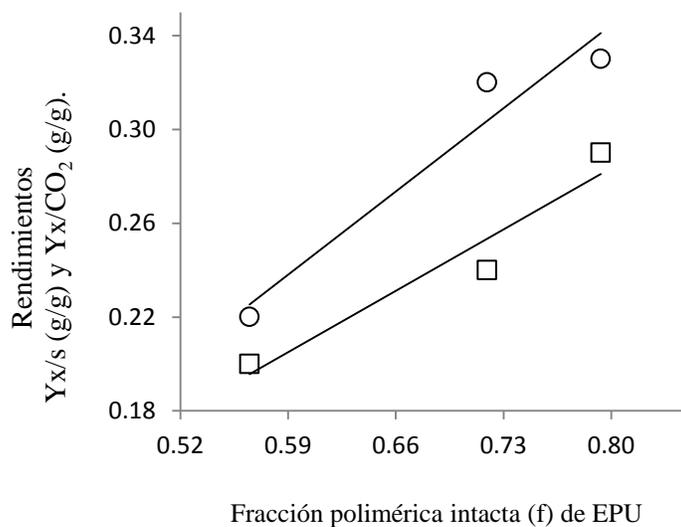


Figura 23. Efecto de la fracción polimérica intacta, f , el rendimiento de la biomasa con $S_0 = 50$ g/L. El valor de f fue calculado según lo expuesto en el capítulo 1 $f = (1 - (2)0.026/h)^3$, $h = 0.3, 0.5, 0.7$ cm. La curva superior (○) corresponde a los valores de $Y_{X/s} = \Delta X/\Delta S$. La curva inferior (□) corresponde a los valores de $Y_{X/CO_2} = \Delta X/\Delta CO_2$.

Este es un resultado importante porque muestra de qué manera el espesor de las placas de EPU es una variable sensible para el diseño de reactores, porque afecta el impacto del volumen con la red polimérica rota, que como se vio en el capítulo 1 de la sección de

resultados, puede estimarse con un espesor, $d = 0.025$ cm. Y a su vez, esto probablemente afecta el intercambio de oxígeno y la dispersión de la biomasa dentro de la placa.

2.3 Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el crecimiento de *P. pastoris*.

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo en medio sólido con EPU se evaluó el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el crecimiento de *P. pastoris* en reactor de columna. Para ello, se utilizó el espesor $h = 0.7$ cm de EPU ya que fue con el que se obtuvieron los mayores rendimientos en la sección anterior.

En la figura 24 se muestra el efecto de la concentración inicial de glucosa en la producción de CO_2 . La gráfica (ΔCO_2) vs. t , mostró que hubo retardo (fase lag) atribuible a la concentración inicial del sustrato y sus pendientes promedio, disminuyeron, monotónicamente, con la concentración inicial del sustrato (S_0).

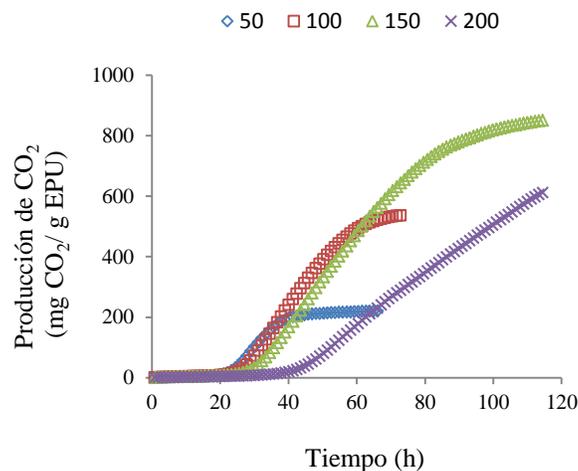


Figura 24. Producción de CO_2 por *P. pastoris* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

Estos resultados se pueden explicar por una inhibición μ representada por la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$$

Cuando la constante de saturación, K_S , es mucho menor de S , se puede simplificar de la siguiente manera:

$$\mu \approx \frac{\mu_{max}}{\frac{S}{K_I}} = \frac{\mu_{max}K_I}{S}$$

Esta ecuación seguiría de cerca la función inversa $\mu \propto 1/S_0$ observada en la Fig. 24 y es mostrada en la Tabla 9, con una buena correlación estadística ($R^2 = 0.99$).

En la tabla 9 se presentan los parámetros asociados al crecimiento de *P. pastoris* con diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Los datos muestran un consumo de glucosa mayor al 99 % para las concentraciones iniciales de glucosa de 50, 100 y 150 g/L y sólo de 65 % para 200 g/L. La correlación lineal negativa con respecto a S_0 , mostró un valor máximo (extrapolado) de $Y_{X/S} \approx 0.5$ que sería el esperado cuando el cultivo estuviese bien oxigenado. Estos resultados indican claramente que un exceso de sustrato reduce la eficiencia de la biosíntesis. En otras palabras, hay limitaciones de transferencia de oxígeno al interior de las placas de EPU, que se eliminan, al reducir significativamente la demanda biológica de oxígeno que es proporcional al S_0 . También se muestra que el crecimiento de *Pichia pastoris* se inhibe en medios hipertónicos ($S_0 > 50$ g/L).

Tabla 9. Parámetros asociados al crecimiento de *P. pastoris* a diferentes concentraciones iniciales de sustrato y con espesor de placa, $h = 0.7$ cm.

S_0 (g/L)	Glucosa (g/L)	Biomasa (g/L)	Cg (%)	$Y_{X/S}$ * (g/g)	μ_m ** (1/h)
50	45.3	20 ±1.8	100 ±0	0.43 ±0.041	0.17
100	91.4	32 ±1	99 ±0.4	0.35 ±0.01	0.08
150	144.6	34 ±0.9	100 ±0.2	0.24 ±0.006	0.05
200	196.1	21 ±7.6	65 ±35	0.16 ±0.019	0.04

*Los valores calculados del rendimiento siguieron la correlación lineal $Y_{X/S} = 0.525 - (S_0/625)$; $R^2 = 0.86$

** Se obtuvo la correlación, $\mu_{max}K_I = 8.31/S_0$, con respecto a los datos experimentales ($R^2 = 0.99$).

La elevación de la concentración inicial, $S_0 \geq 50$ g/L, del sustrato sobre el rendimiento, $Y_{X/S}$, y la tasa de crecimiento, μ_{max} , reduce la productividad, según se muestra en la Fig. 25.

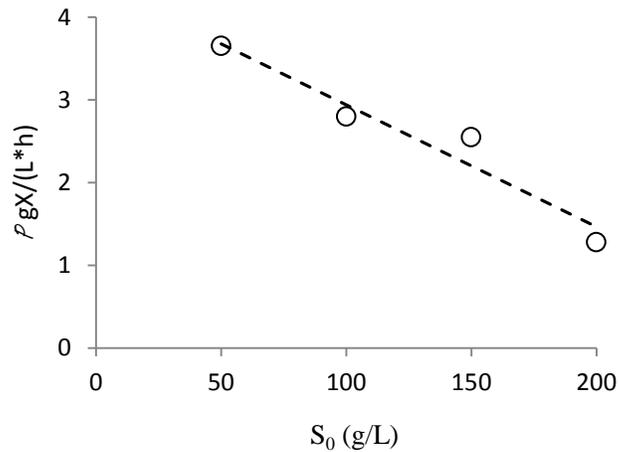


Figura 25. Efecto de la concentración inicial de glucosa, S_0 , sobre la productividad de la biomasa calculada como $\mathcal{P} = Y_{X/S} S_0 \mu_{\max}$.

(Se utilizaron placas de EPU con un espesor, $h = 0.7$ cm. El inóculo fue de 2×10^6 células/mL, $R^2 = 0.94$).

Si bien, al aumentar, S_0 , cancela el decrecimiento de μ_{\max} , que es inversamente proporcional a esta variable, al final, predomina el efecto inhibitorio de S_0 sobre el rendimiento. Estos datos no concuerdan con los publicados con *Aspergillus niger* por Viniegra y col., (199?) quienes observaron pocos cambios en $Y_{X/S} \approx 0.3$, en el intervalo de S_0 que va de 50 g/L a 100 g/L. Las diferencias de la fisiología de este hongo filamentoso con la levadura, en medios hipertónicos, aún no han sido estudiadas. Pero, por el momento, bastaría indicar que la condición con más alta productividad estudiada ($\mathcal{P} = 3.6$ gX/(Lh)) corresponde a $S_0 = 50$ g/L y $h = 0.7$ cm.

Por otra parte, López y col. (2009) evaluaron distintas concentraciones iniciales de glicerol sobre el crecimiento de *P. pastoris*. Los resultados se observan en la tabla 10. Los datos muestran cómo disminuye el $Y_{X/S}$ a medida que aumenta la concentración inicial de glicerol, así mismo la μ presenta el mismo comportamiento. Se puede destacar que ellos obtienen una μ_{\max} de 0.11/h a una concentración de glicerol de 36.24 g/L y nosotros obtenemos una μ_m de 0.18/h a una concentración de glucosa de 50 g/L.

Tabla 10. Parámetros asociados al crecimiento de *P. pastoris* en CMS (López y col, 2009).

Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Y x/s estimado (g/g)	μ (1/h)
9.03	7.09 ± 0.46	0.78	0.26 ± 0.03
36.24	24.6 ± 0.93	0.67	0.11 ± 0.04
90.4	51.6 ± 3.31	0.57	0.09 ± 0.003

2.4. Efecto del nivel de inóculo sobre el crecimiento de *P. pastoris*.

Para mejorar el crecimiento se estudió el efecto del tamaño del inóculo. Este experimento se realizó con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L y se utilizó la placa de EPU de 7 mm de grosor.

En la figura 26 se presenta el CO₂ producido para cada nivel de inóculo. Se puede observar el efecto del inóculo sobre la fase de retardo disminuyendo a 5 h para un inóculo de 10⁸ cél/mL. Además, se puede observar la mayor producción de CO₂ para el inóculo de 10⁷ cél/mL con el cual también se obtuvo el mayor Y_{x/s} por lo cual se puede asumir que con esta concentración de inóculo el metabolismo de la glucosa se utiliza principalmente para la producción de biomasa y CO₂.

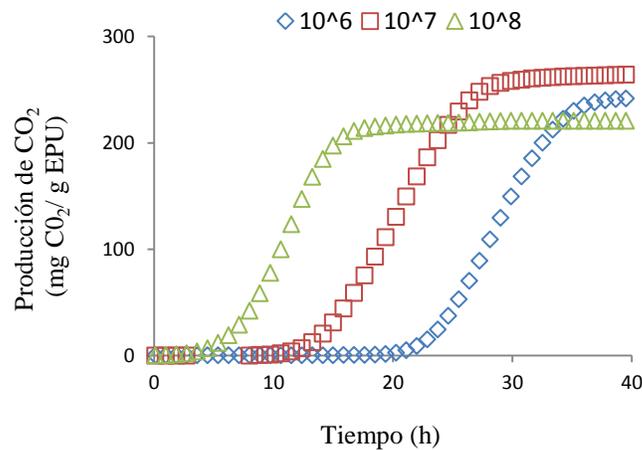


Figura 26. Efecto del tamaño de inóculo sobre el perfil de producción acumulada de CO₂ por cultivos de *P. pastoris* en EPU.
(S₀ = 50 g/L y h = 0.7 cm).

Comparando nuestros resultados con la literatura se encontró similitud en los resultados de la fase de retardo con el trabajo de Barrigón y Ramón (2011), quienes utilizaron una concentración de inóculo de 0.5 g/L y obtuvieron una fase de retardo aproximadamente de 5 h (Figura 21).

Los parámetros asociados al crecimiento se muestran en la Tabla 11. Se observa que en los tres casos hubo un consumo de glucosa mayor al 99 %. El mayor valor de $Y_{x/s}$ obtenido fue con el nivel de inóculo de 10^7 cél/mL de medio y la mayor μ_m de 0.35 (1/h) se obtuvo con el inóculo de 10^8 cél/mL.

Tabla 11. Parámetros asociados al crecimiento de *P. pastoris* en CMS en función del tamaño de inóculo.

Inóculo (cél/mL _{medio})	Inóculo (g/L)	Biomasa (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Cg (%)	μ_m (1/h)
10^6	0.01	18 ± 1.01	0.37 ± 0.02	99 ± 0.19	0.26 ± 0.002
10^7	0.08	19 ± 0.49	0.45 ± 0.01	100 ± 0.07	0.24 ± 0.01
10^8	0.84	16 ± 2.16	0.37 ± 0.05	100 ± 0.01	0.35 ± 0.02

Guo y col., (2007) evaluaron glicerol y glucosa como sustratos para el crecimiento de *P. pastoris* en CS y obtuvieron valores de $Y_{x/s}$ de 0.51 y 0.49 (g/g), respectivamente. Ellos mencionan que el rendimiento obtenido con glucosa es ligeramente menor que con glicerol ya que al utilizar glucosa y con una limitación de oxígeno se puede llevar a cabo una fermentación etanólica y con exceso de oxígeno una fermentación oxidativa produciéndose ácido acético lo cual no sucede con glicerol. Comparando el mayor $Y_{x/s}$ obtenido en este trabajo ($Y_{x/s}=0.45$) con el de Guo y col., (2007) para glucosa, podemos observar que nos encontramos en un valor muy cercano.

Con los resultados obtenidos en este capítulo, se estableció el medio y las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de *Pichia pastoris* sobre EPU en CMS con el que se resolvió el problema de la disminución del pH y al final se obtuvo un $Y_{x/s}$ de 0.45 para una concentración de glucosa inicial de 50 g/L. Con estos datos, en el siguiente capítulo se realizaron los experimentos para evaluar el efecto del espesor de las placas de EPU y la concentración de glucosa inicial sobre la producción de biomasa de *Pichia pastoris* en reactor de columna.

**3. EFECTO DEL GROSOR DE LAS PLACAS DE ESPUMA DE
POLIURETANO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE
GLUCOSA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y EL METABOLISMO
DE *Pichia pastoris*.**

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo y se evaluó el crecimiento de *Pichia pastoris* en el diseño de CMS sobre EPU, se prosiguió a evaluar el efecto del espesor de las placas de EPU y la concentración inicial de glucosa sobre la producción de biomasa de *Pichia pastoris* en reactor de columna, los resultados de esta etapa se muestran a continuación:

3.1. Efecto del espesor de la placa en los parámetros de crecimiento.

En el capítulo 2 de la sección de resultados se estableció que la máxima productividad se obtuvo con $h = 0.7$ cm; en esta sección se presentan los resultados obtenidos del estudio del efecto del espesor de la placa sobre el rendimiento y la velocidad de crecimiento.

La Figura 27 presenta la biomasa producida en función del espesor del EPU a diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Se observa que los efectos de grosor sobre la producción de biomasa a las concentraciones de glucosa evaluadas, no fueron significativos con valores de $h = 0.3$ y 0.5 cm. Pero con $h = 0.7$ cm, se notó un aumento en la producción de biomasa, siendo para este espesor los valores más altos obtenidos, $20 \text{ g/L} < X \leq 40 \text{ g/L}$. De cualquier forma, es importante resaltar que la concentración de $X = 40 \text{ g/L}$ ya calificaría en el límite inferior de los cultivos densos. Los cuales llegan a tener hasta más de 100 g/L de levaduras en cultivos sumergidos y controlados en forma de lote alimentado.

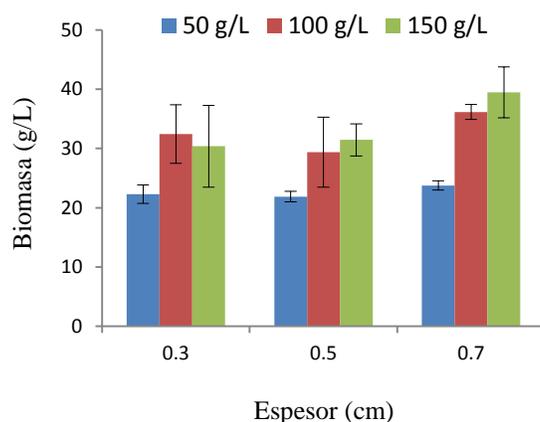


Figura 27. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el crecimiento de *P. pastoris* en CMS.

En el trabajo de López y col., 2009 se obtuvo una producción de biomasa de 51.6 g/L utilizando una concentración inicial de glicerol de 90 g/L con EPU como soporte sólido, se observa que con glucosa no se alcanzó la misma producción de biomasa que con glicerol.

Para entender los resultados presentados, los analizaremos primeramente sobre la base del sistema de transporte de glucosa en *Pichia pastoris*.

Van Urk y col., 1989 evaluaron los parámetros cinéticos de transporte de glucosa de cuatro levaduras Crabtree¹ negativas y cuatro Crabtree positivas. En levaduras Crabtree positivas, un aumento en la concentración de glucosa externa puede dar lugar a la captación de glucosa por difusión facilitada sin restricciones y, por tanto, a fermentación aeróbica. En contraste, las levaduras Crabtree negativas pueden restringir la entrada de glucosa por sus regulados sistemas de simporte de H⁺ y por lo tanto prevenir la aparición del metabolismo de desbordamiento. Las levaduras Crabtree negativas poseen sistemas de captación de glucosa que tienen mucha mayor afinidad que los sistemas de las levaduras Crabtree positivas. En levaduras que poseen uno o dos sistemas de alta afinidad, se observó la alcalinización de las suspensiones por la adición de glucosa y después de aproximadamente 10 segundos se observa una rápida acidificación del buffer. Esta acidificación se debe probablemente a la excreción de H⁺ por la ATPasa de la membrana plasmática estimulada por la glucosa y la producción de CO₂ durante el metabolismo de la glucosa.

P. stipitis tiene un sistema de captación de glucosa con muy alta afinidad que es un proceso que requiere energía, llamado simporte de H⁺ (Van Urk y col., 1989). Con altas concentraciones de glucosa este transporte de alta afinidad se reprime y sólo se detecta un transportador de baja afinidad. (Gasnier, 1987; Spencer-Martins y van Uden, 1985 a).

¹ El efecto Crabtree positivo, mejor conocido como “efecto glucosa” se refiere a que, cuando la concentración de azúcar en el medio es elevada, *S. cerevisiae*, sólo metaboliza los azúcares por vía fermentativa, e incluso en presencia de oxígeno, la respiración es imposible. Por lo tanto, un efecto Crabtree negativo, se presenta cuando un microorganismo puede utilizar los azúcares por la vía respiratoria, aún cuando su concentración sea muy elevada. Tomado de <http://es.scribd.com/doc/20375393/36/Efecto-Pasteur-y-efecto-Crabtree>.

P. pastoris pertenece al mismo género que *P. stipitis* con lo cual podemos suponer que también *P. pastoris* presenta el sistema de captación de glucosa con muy alta afinidad (simporte de H⁺) el cual no permite el metabolismo de desbordamiento. Sin embargo, a las altas concentraciones utilizadas en este trabajo, ese sistema se reprime y el transporte de glucosa se da por difusión facilitada, provocando la fermentación aerobia y con ello la producción de etanol, del cual se hablará más adelante.

En estudios anteriores, Franzblau y Sinclair (1983) se basan en los trabajos de DeDeken (1966), Bulder (1964) y McClary y Bowers (1967) para clasificar a las levaduras que pueden ser generalmente divididas dentro de tres grupos basados en su respuesta metabólica a variaciones en la concentración de sustrato y en su ambiente gaseoso. Estos son:

- 1) Las facultativas y Crabtree positivas. Poseen una mitocondria reprimible por la glucosa, y son mucho más sensibles a la concentración de glucosa que al oxígeno.
- 2) Las facultativas, y Crabtree negativas. No exhiben represión mitocondrial por glucosa y son más sensibles a cambios en la concentración de oxígeno que a variaciones en los niveles de sustrato.
- 3) Las levaduras aerobias obligadas que se parecen a las facultativas excepto por su falta total de habilidad fermentativa.

Pichia pastoris es una levadura facultativa y Crabtree negativa y a diferencia de las levaduras Crabtree positivas cuyo sistema fermentativo es de naturaleza constitutivo, el sistema de las levaduras Crabtree negativas, parece ser inducible (Franzblau y Sinclair, 1983).

Tomando en cuenta los estudios de Franzblau y Sinclair, (1983) sostenemos la hipótesis de que la especie *Pichia pastoris* empleada en este estudio puede utilizar la glucosa al mismo tiempo por la vía aerobia y anaerobia y por lo tanto, puede producir biomasa y productos fermentativos con rendimientos que van a variar según la concentración de la glucosa y el grado de oxigenación del medio, que en este caso, será difusivo y dependerá del espesor de la placa de EPU.

En la Fig. 28 se muestra que para distintos espesores de la placa (y por tanto para diferentes valores de f) el rendimiento de *Pichia pastoris* con $S_0 = 50$ g/L, estuvo en el intervalo $0.46 \leq Y_{X/S} \leq 0.49$. Lo cual indica que el cultivo está bien aireado, pues su rendimiento se acerca al máximo valor de $Y_{X/S} = 0.5$. Con $S_0 = 100$ g/L; el intervalo del rendimiento es $0.30 \leq Y_{X/S} \leq 0.38$ y con $S_0 = 150$ g/L; $0.22 \leq Y_{X/S} \leq 0.28$. Estos resultados concuerdan con un aumento progresivo del metabolismo fermentativo (que tiene menor rendimiento) sobre el aeróbico ($Y_{X/S} = 0.5$) conforme aumenta la concentración de glucosa. En los casos estudiados se observa una ligera tendencia para que aumente el rendimiento, conforme aumenta f , lo cual confirma el resultado mostrado en el capítulo 2 de la sección de resultados.

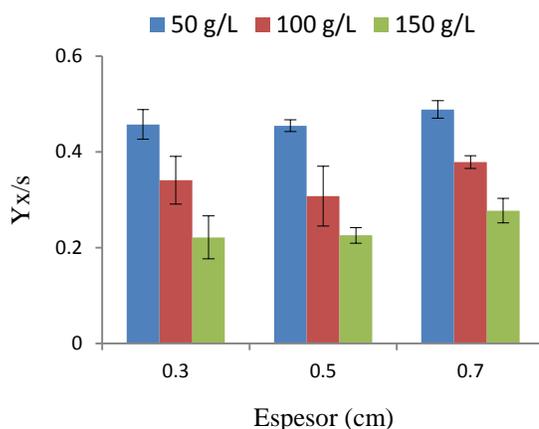


Figura 28. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el rendimiento de crecimiento de *P. pastoris* en CMS.

Por su parte, López y col., (2009) obtuvieron un $Y_{X/S} = 0.78$, pero emplearon un medio con un sustrato mixto (glicerol y tartrato de amonio). De forma que sería necesario comparar los rendimientos por unidad de carbono utilizado y no sólo por unidad de glucosa. En este sentido conviene señalar que Guo y col., (2007) observaron que con $S_0 = 50$ g/L de glucosa se obtiene un $Y_{X/S} = 0.49$. Lo cual se compara mucho mejor con nuestros resultados.

Tabla 12. Parámetros de crecimiento de *P. pastoris* con glicerol como fuente de carbono (López y col., 2009).

Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Y x/s estimado (g/g)	μ (1/h)
9.03	7.09 ± 0.46	0.78	0.26 ± 0.03
36.24	24.6 ± 0.93	0.67	0.11 ± 0.04
90.4	51.6 ± 3.31	0.57	0.09 ± 0.003

Usando como base los estudios de Franzblau y Sinclair, 1983, podemos suponer para *Pichia pastoris*, que es Crabtree negativo, que la disminución del $Y_{x/s}$ al aumentar la concentración inicial de glucosa es debida a la limitación por oxígeno y no a una represión por glucosa.

Para entender la respiración llevada a cabo por *Pichia pastoris*, se analizó el trabajo de Kern y col., 2007 en el cual estudian las oxidasas mitocondriales alternativas (AOX o Aod) que son enzimas fundamentales para un acceso directo a la vía respiratoria estándar en las plantas, muchos hongos y levaduras (Veiga y col., 2000, 2003a). Estas oxidasas terminales transfieren directamente electrones desde el ubiquinol mitocondrial al oxígeno. Esto permite la respiración, incluso en presencia de complejo III y IV y de inhibidores como antimicina A o cianuro. La energía libre resultante se libera en forma de calor. En contraste con la oxidasa del citocromo c, que es la oxidasa terminal de la vía respiratoria estándar, una oxidasa alternativa no bombea electrones a través de la membrana de la mitocondria. Así, el suministro de pequeños intermediarios metabólicos por las rutas metabólicas centrales obtienen un desacoplamiento de la producción de energía celular. La producción de ATP por respiración, se basa en la actividad del complejo I (Berthold y col., 2000; Joseph-Horne y col., 2001; Siedow y Umbach, 2000).

Las funciones biológicas de estas presuntas oxidasas alternativas en diferentes organismos parecen ser tan diversos como el respectivo modo de inducción. Las oxidasas alternativas se consideran generalmente para permitir el control de la síntesis de ATP para mantener la homeostasis de la tasa de crecimiento y un volumen continuo del ciclo TCA bajo una carga de energía alta (Joseph-Horne y col., 2001; Moore y col., 2002).

En *Pichia pastoris*, como una levadura Crabtree negativo, la CRR fue detectada por Veiga y col., (2003c). Kern y col., 2007 identificaron el gen que codifica para la oxidasa alternativa de *P. pastoris* y encontraron que se expresa en la presencia de glucosa y es muy inducible en presencia de antimicina A, un inhibidor del complejo III de la vía del citocromo.

En la Tabla 13, Kern y col., (2007) muestran los parámetros fisiológicos de algunas cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente.

Tabla 13. Parámetros fisiológicos de las cepas de *P. pastoris* (Kern y col., 2007).

Cepa	q_s (g/g.h)		μ_{max} (1/h)		Etanol (g/L)	
	1% Glucosa	5% Glucosa	1% Glucosa	5% Glucosa	1% Glucosa	5% Glucosa
X-33	0.39±0.02	0.31±0.03	0.237±0.004	0.231±0.003	1.6±0.003	6.91±0.22
X-33 Δ PpAOD	0.37±0.025	0.32±0.03	0.236±0.003	0.231±0.004	1.4±0.019	3.47±0.03
X-33 PpAOD	0.41±0.015	0.40±0.025	0.245±0.004	0.241±0.003	1.76±0.035	7.97±0.35

Lo que hay que destacar en la Tabla 13 es que para todas las cepas se observa una ligera disminución en los valores de q_s (tasa de captación de glucosa) y $\mu_{m\acute{a}x}$ (tasa máxima de crecimiento) al aumentar la concentración de glucosa de 1% a 5%. Comportamiento que también se obtuvo en el presente trabajo.

Kern y col., (2007) comentan que la respiración de *Pichia pastoris* con glucosa como fuente de carbono induce la actividad de la oxidasa alternativa obteniéndose un $Y_{x/s}$ más bajo que con otras fuentes de carbono ya que la actividad oxidasa alternativa produce calor en lugar de apoyar la formación de ATP para producción de biomasa.

En los trabajos de Klein y col. (1998), en cultivos sumergidos, aireados y agitados, resumidos en la Tabla 14, se muestra que un aumento en la concentración de glucosa reduce, $Y_{x/s}$, aumenta la producción de etanol y también reduce el rendimiento de CO_2 . Es de notarse que los valores de $Y_{x/s}$ de la Tabla 14 se acercan al valor de $Y_{x/s} = 0.4$ obtenido en este trabajo con $S_0 = 50$ g/L, pero aquí sin agitación y con aireación difusiva desde el medio hacia el interior de la placa de EPU.

Tabla 14. Tasas específicas de crecimiento y coeficientes de rendimiento de glucosa de *Saccharomyces cerevisiae* con diferentes concentraciones iniciales durante la fase de cultivo por lote (Klein y col., 1998).

Concentración de glucosa inicial (g/L)	20	45
Tiempo de la fase por lote (h)	22±0.5	26±0.5
μ_s^a (h ⁻¹)	0.16±0.03	0.13±0.02
$Y_{\text{biomasa/glucosa}}$ (g[DCW]/g)	0.39±0.05	0.37±0.05
$Y_{\text{Etanol/glucosa}}$ (mol/mol)	0.008±0.015	0.012±0.011
$Y_{\text{CO}_2/\text{glucosa}}$ (mol/mol)	1.15±0.04	1.10±0.03

^a μ_s fue obtenida por regresión lineal de la tasa específica de crecimiento observada durante la fase batch.

Cabe señalarse que Hang y col., (2009) han obtenido en cultivo agitado por lote sencillo, valores de $Y_{X/S} = 0.39$ y 0.45 con glucosa y glicerol, respectivamente, los cuales son valores similares a los obtenidos en este trabajo en CMS (Fig. 28). Nuevamente, es útil recalcar que los rendimientos de la Fig. 28 ($0.46 \leq Y_{X/S} \leq 0.49$) se obtuvieron sin agitación. Cabe destacar que el costo por lote se reduce aproximadamente un 70% cuando se utiliza la glucosa en lugar de glicerol como única fuente de carbono para la etapa de producción de biomasa. Por este motivo es atractivo el uso de la glucosa a nivel industrial, además de su gran disponibilidad que presenta.

Tabla 15. Comparación de la densidad celular y la producción de fitasa entre la glucosa y el glicerol en cultivos por lote alimentado (Hang y col., 2009).

		Glucosa	Glicerol
Glucosa o glicerol en lote	Concentración inicial (g/L)	20	40
	Duración (h)	20	22
	μ_s (1/h)	0.16± 0.02	0.18± 0.02
	Rendimiento (g[DCW]/L)	0.39±0.06	0.45±0.04
Glucosa o glicerol en lote alimentado	Concentración de solución de alimentación (%p/v)	70	50
	Duración (h)	20±0.5	24±0.5
	Máxima densidad celular (g[DCW]/L)	100±8	100±7
	Rendimiento (g[DCW]/L)	0.55±0.02	0.59±0.04
Glucosa o glicerol en fase de crecimiento	Costo ^a de glucosa o glicerol (US\$ por lote)	2.46	9.35
Metanol en lote alimentado	Tiempo de inducción (h)	100	100
	Duración de la fase de transición (h)	8	3-4
	Actividad final de fitasa (FTU/mL)	2200±152	2310±180
	Rendimiento (FTU[metanol]/mL[fitasa])	0.25±0.11	0.28±0.09

^a Los precios de glucosa (grado industrial) y glicerol (grado industrial) se obtuvieron de Chinachemnet.com Corporation (China, agosto de 2008).

En resumen, se puede concluir que la producción de levaduras en placas de EPU, con un espesor $h = 0.7$ cm y $S_0 = 50$ g/L es un sistema más simple que el cultivo sumergido, aireado y agitado por lote simple, pero produce rendimientos y concentraciones celulares similares (20 g/L). Incluso que si se permite un metabolismo mixto (aerobio y fermentativo) se puede alcanzar con $S_0 = 150$ g/l, la concentración celular de 40 g/L. Pero también es preciso reconocer que el sistema aquí estudiado tendría una productividad volumétrica menor que el lote alimentado ya que en este último sistema se logra una concentración final de células cercanas a 100 g/L.

3.2. Parámetros cinéticos.

En la figura 29, se presenta el rendimiento $Y_{CO_2/S}$ (g CO_2 / g glucosa consumida) en función del espesor y a diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Los datos muestran que al disminuir el grosor se produce una menor concentración de CO_2 por g. de glucosa consumida y de igual manera el $Y_{CO_2/S}$ disminuye al aumentar $S_0 =$ de 100 a 150 g/L. Lo cual nos indica que la glucosa consumida se está desviando a la producción de otros compuestos propios del metabolismo de esta levadura.

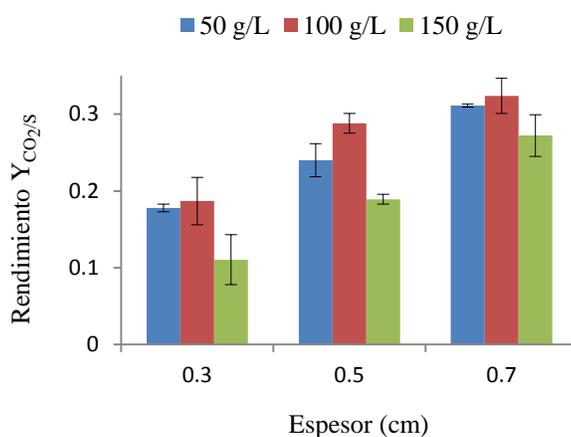


Figura 29. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el rendimiento $Y_{CO_2/S}$ por *P. pastoris* en CMS.

En la figura 30 se muestran los valores de la fase Lag en función del espesor y a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

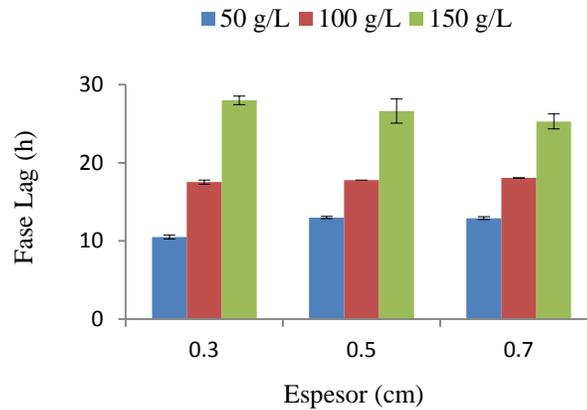


Figura 30. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre la duración de la fase lag de *P. pastoris* en CMS.

Se observa un aumento en el tiempo de la fase lag al incrementar la concentración inicial de glucosa, sin embargo, el efecto de grosor no causa un impacto significativo en el tiempo lag. Las altas concentraciones iniciales de glucosa causan un efecto en la duplicación celular debido a la presión osmótica que se ejerce sobre las células.

En la figura 31 se representa la tasa específica de producción de CO₂ (μ_m) en función del espesor y a diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Se observa que la μ_m es afectada por la concentración de glucosa, al aumentar, la μ_m disminuye drásticamente. Los datos muestran una ligera tendencia de la μ_m al disminuir el grosor para una misma concentración.

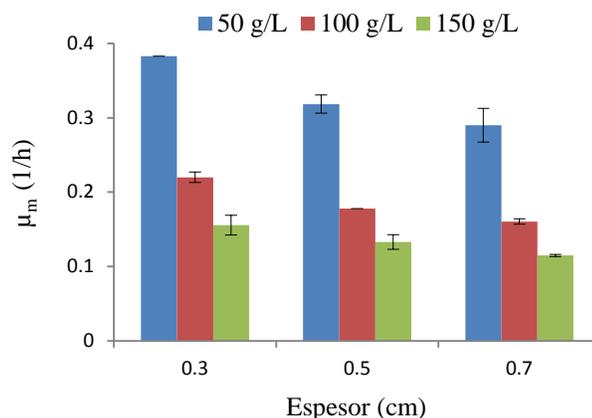
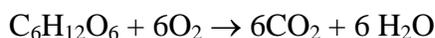


Figura 31. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre la tasa específica de producción de CO₂ de *P. pastoris* en CMS.

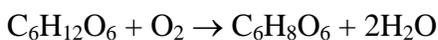
En la figura 32 se representa el coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de glucosa y diferentes espesores de EPU. Es interesante recalcar que todas las experiencias aquí mostradas tuvieron curvas difásicas de CR en el tiempo. Al principio de la fermentación CR < 0.4, creció progresivamente hasta alcanzar un valor máximo que nunca fue mayor de la unidad y luego decreció. Este patrón respiratorio indica que, la mayor parte del tiempo, una parte significativa del metabolismo es distinto del clásico metabolismo aeróbico con CR = 1 que seguiría la estequiometría siguiente:



Los valores de CR < 1 tampoco se pueden explicar sólo por la fermentación etanólica que sigue la siguiente estequiometría y no consume oxígeno.



Pero podría explicarse por la formación de alguna proporción de productos parcialmente oxidados como el ácido cítrico que, consumiendo oxígeno, sigue la siguiente estequiometría sin liberación de CO₂.



De esta forma, es posible pensar en un metabolismo complejo con proporciones variables de consumo de O_2 y formación de CO_2 y otros productos parcialmente oxidados.

La Fig. 32 indica que cada una de las fermentaciones con diferentes concentraciones iniciales ($S_0 = 50, 100, 150$ g/L) presentó un pico a un tiempo característico: $t_{max} = 18, 25$ y 38 h, respectivamente. Pero los valores máximos de CR crecieron monótonicamente con el valor de h (es decir de f) y por ende, se presentó una relación compleja entre el valor de, S_0 y f , para producir el máximo valor de CR. Por ejemplo: con $h = 0.3$ cm ($f = 0.57$) el máximo valor de $CR \approx 0.8$, fue con $S_0 = 100$ g/L. Pero con los valores de $h = 0.5$ y 0.7 cm ($f = 0.72$ y 0.8) los valores máximos de, $0.9 \leq CR \leq 1$, correspondieron a $S_0 = 50$ g/L. Y en todas las placas con $S_0 = 150$ g/L, el cociente respiratorio estuvo en el intervalo: $0.4 \leq CR \leq 0.7$. Todo esto sugiere que las células de *Pichia pastoris*, crecidas con medios hipertónicos ($S_0 \geq 50$ g/L) desarrollan fermentaciones mixtas, cuya orientación varía con la fase del cultivo y con el nivel de aireación, que en este caso estuvo creado por la difusión pasiva de oxígeno en placas de distinto grosor.

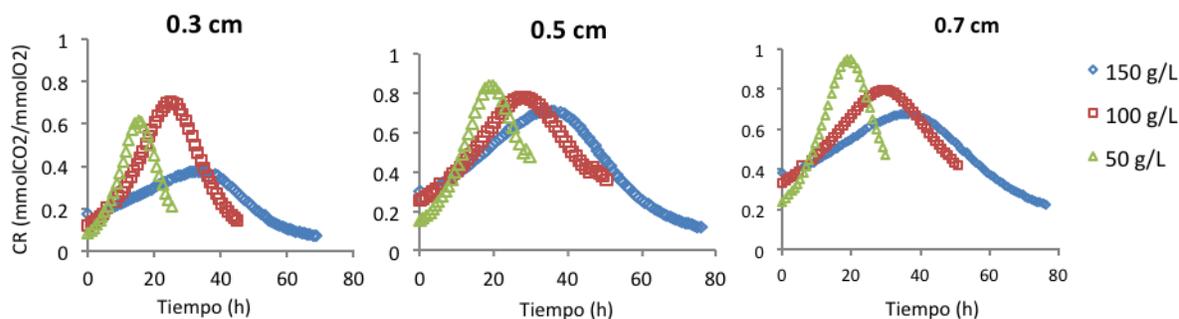


Figura 32. Efecto de la concentración inicial de glucosa y del espesor del EPU sobre el coeficiente respiratorio de *P. pastoris* en CMS.

Para entender el comportamiento observado del CR en este trabajo, analizaremos los siguientes artículos:

Hang y col., 2009 comentan que la medición de los parámetros en tiempo real (DO y RQ) permiten establecer las condiciones de cultivo para evitar el efecto Pasteur (represión de

oxígeno) y el efecto Crabtree (represión de la glucosa de la cadena respiratoria), así como para preparar la inducción con metanol en un cultivo de *P. pastoris* en lote alimentado con glucosa. Estos autores establecen que el metabolismo respiratorio completo de glucosa se asegura por el control de $CR \geq 0.9$.

Por otro lado, Anderlei y col., 2004 evaluaron la medición en línea de la actividad respiratoria de *Pichia stipitis*, incluyendo la tasa de transferencia de oxígeno (OTR), la tasa de transferencia de dióxido de carbono (CTR), y el cociente respiratorio (CR). La tasa de transferencia de oxígeno es un parámetro comúnmente empleado para cuantificar el estado fisiológico de un cultivo aeróbico, ya que la mayoría de las actividades metabólicas dependen del consumo de oxígeno. Sustrato o limitaciones de oxígeno, inhibiciones por productos, el crecimiento diauxico y fenómenos biológicos pueden ser descubiertos basados en el curso de la tasa de transferencia de oxígeno durante la fermentación (Anderlei y Büchs, 2001). La tasa de transferencia de dióxido de carbono (CTR) y el cociente respiratorio (CR) en biorreactores agitados proporcionan más información, utilizados en la predicción de la concentración de biomasa, evaluando eficiencias energéticas del crecimiento, monitoreando rendimientos de crecimiento y controlando procesos por lotes alimentados (Grosz y col., 1984; Wang y col., 1979).

La Fig. 33, tomada del trabajo de Anderlei y col., (2004) que durante las primeras 5 h, el valor fue $CR \leq 1$. Después, el CR aumentó hasta llegar a 3.0, a las 9 h, descendió abruptamente para permanecer con valores $CR < 1$ después de 10 h. El ascenso del CR entre 5 h y 9 h se acompañó de la producción de etanol que terminó después de las 10 h. La forma de las curvas de CR indicadas en la Fig. 33, es muy diferente de las aquí presentadas en la Fig. 32. Ahí las curvas fueron muy asimétricas y en este trabajo, fueron marcadamente simétricas. Pero, en ambos casos se presentó la curva difásica de CR. La explicación más sencilla a estos experimentos es la variación entre las tasas de aireación y las demandas biológicas de oxígeno, a lo largo del proceso en el que aumenta la biomasa y disminuye la concentración del sustrato. Para explicar mejor estos resultados se llevaron a cabo balances de carbono que se presentan en el capítulo 4 de la sección de resultados.

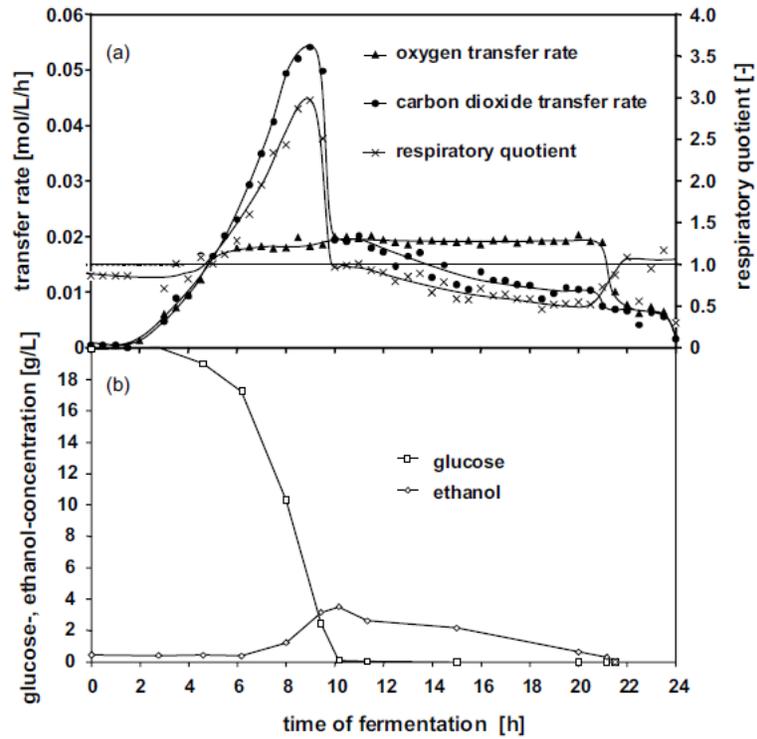


Figura 33. (A) Tasas de transferencia de O₂ y CO₂ y el CR de la fermentación de la levadura *P. stipitis* (Anderlei y col., 2004).

(B) La concentración de glucosa y etanol del análisis fuera de línea. Condiciones de agitación del agitador rotatorio: 100 rpm frecuencia de agitación, 50 mm diámetro de agitación, 30 °C temperatura de la fermentación, 10 mL volumen de llenado.

4. BALANCES DE CARBONO

4.- Balances de carbono.

En este capítulo se presentan los balances parciales de C, pues se omitió la producción de etanol que no pudo ser recuperado por la falta de un sistema condensador. Sin embargo, se observó que utilizando la medición de la biomasa, el CO₂ y el ácido cítrico final, los balances se acercaban al 100% con S₀ = 50 g/L. Pero eran menores con S₀ = 100 y 150 g/L. Para cerrar los balances se procuró identificar un pico adicional en el perfil de HPLC. Con estos datos, se mejoraron notablemente los balances, según se muestra en la Fig. 34.

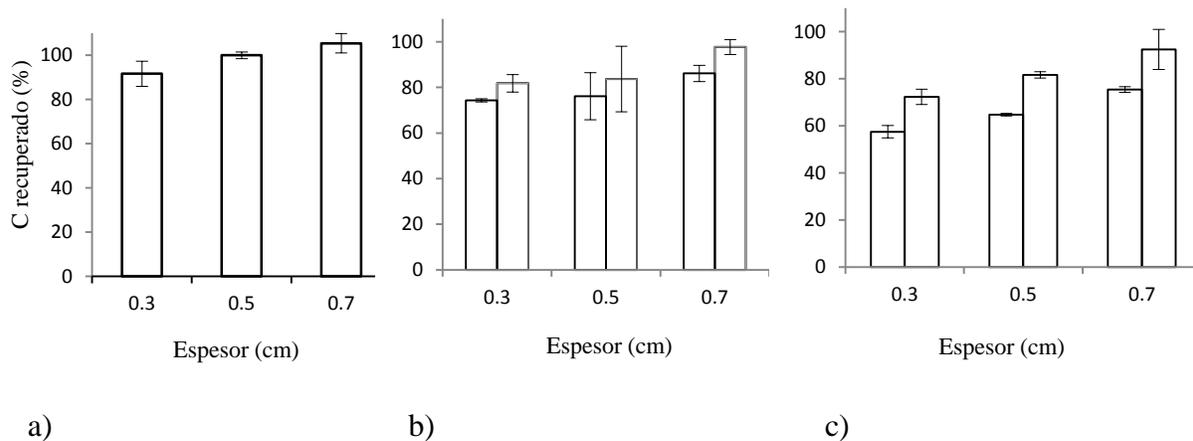


Figura 34. Balances parciales y totales de carbono en los cultivos realizados con diferente concentración inicial de glucosa y diferente espesor de EPU. [a) 50 g/L, b) 100 g/L y c) 150 g/L]

Sin embargo, a pesar del incremento en los balances, sigue faltando un 30 % para la concentración de 150 g/L en el grosor de 0.3 cm. En los casos en los cuales no se alcanzó valores del porcentaje de carbono recuperado mayor al 90% se supone que fue debido a la producción de etanol que se perdió durante el tiempo de cultivo.

Después de realizar los balances de carbono, se realizaron los balances de grado de reducción y se encontró que el producto faltante tiene un grado de reducción de 6, que corresponde al etanol, esto confirma las condiciones obtenidas de limitación de oxígeno provocando la producción de etanol.

Una vez que se tenían los balances de grado de reducción, se decidió analizar en la bibliografía la relación entre el contenido de energía del sustrato con el rendimiento de biomasa.

Verduyn, 1991 realizó un estudio detallado al respecto. Comenta que durante mucho tiempo se ha intentado predecir el rendimiento de los microorganismos en diferentes fuentes de carbono, relacionando el contenido de energía de la fuente de carbono (generalmente expresa como el grado de reducción) a un número de parámetros. Estos parámetros incluyen el rendimiento de los electrones disponibles (Payne, 1970) o la producción de calor por la cantidad de biomasa formada (Birou y col., 1987; Von Stockar y Marison 1989). Linton y Stephenson (1978) han demostrado que existe una correlación entre el calor de combustión del sustrato y el rendimiento de biomasa máxima expresada como g de biomasa/(g de carbono sustrato). Un modelo más refinado fue presentado por Gommers y col., (1988). En este modelo el porcentaje de asimilación de la fuente de carbono estaba relacionada con su calor de combustión. La tendencia general de estos estudios fue una figura con una parte ascendente (hasta un grado de reducción de aproximadamente 4.5 a 5) y una parte horizontal a mayores grados de reducción en que la asimilación era cerca de 100% (es decir, posiblemente un crecimiento limitado de carbono). Sin embargo, hay una serie de excepciones a la aparente regla de que el rendimiento con una fuente de carbono con un alto grado de reducción automáticamente será más alto que con una de un menor grado de reducción. Verduyn y col., 1991a cultivaron una levadura (*Candida utilis*) en una amplia variedad de fuentes de carbono (Tabla 16). Las rutas empleadas para el metabolismo general durante el metabolismo de las diversas fuentes de carbono se representan esquemáticamente en la Figura 35.

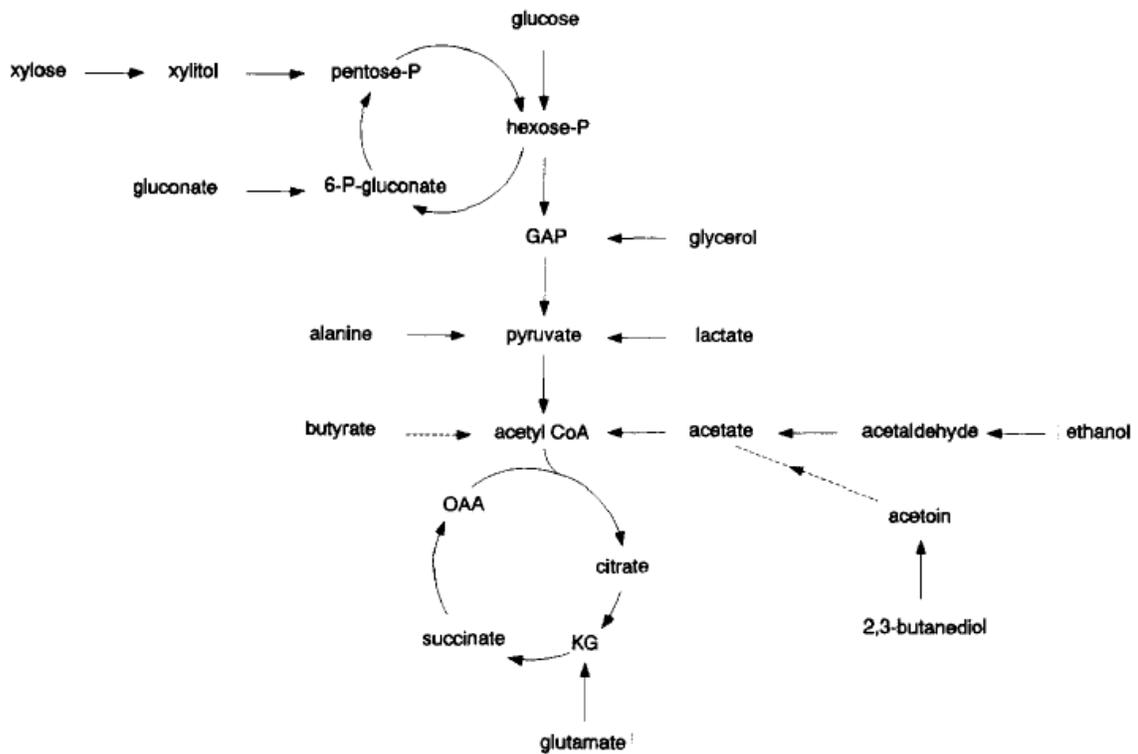


Figura 35. Representación esquemática de las rutas metabólicas durante el crecimiento de *C. utilis* con varias fuentes de carbono (Verduyn y col., 1991^a).

Debido a que la absorción de glicerol en *C. utilis*, es por difusión pasiva o difusión facilitada (Gancedo y col., 1968) concluyen que, en general, las fuentes de carbono con un alto grado de reducción tienen un porcentaje de asimilación mayor que aquellos con un bajo grado de reducción, pero hay sus excepciones comunes y que el contenido de carbono y energía del sustrato determina el rendimiento de biomasa en un grado importante.

Tabla 16. Rendimiento celular (g biomasa/g sustrato) de *C. utilis* CBS 621 y *S. cerevisiae* CBS 8066 en cultivos aerobios limitados de carbono en medio mínimo sobre varias fuentes de carbono como una función del grado de reducción (Verduyn y col., 1991^a).

Fuente de Carbono	Grado de reducción	Rendimiento (g/g)
<i>C. utilis</i>		
Ácido cítrico	3.0	0.34
Ácido pirúvico	3.3	0.39
Ácido succínico	3.5	0.39
Ácido glutámico	3.6	0.29
Ácido glucónico	3.7	0.44
Ácido acético	4.0	0.39
D-alanina	4.0	0.31
Glucosa	4.0	0.51
Ácido láctico	4.0	0.42
Xilosa	4.0	0.42
Glicerol	4.7	0.58
Acetoina	5.0	0.49
Ácido butírico	5.0	0.61
2,3-Butanediol	5.5	0.52
Etanol	6.0	0.69
<i>S. cerevisiae</i>		
Ácido acético	4.0	0.29
Etanol	6.0	0.61

CONCLUSIONES

El modelo de estudio propuesto para la producción de biomasa de *Pichia pastoris* a partir de glucosa como fuente de carbono y energía en un medio de cultivo impregnado en espuma de poliuretano bajo condiciones de cultivo en medio sólido permitió demostrar que:

1. La producción de levaduras en placas de EPU, con un espesor $h = 0.7$ cm y $S_0 = 50$ g/L es un sistema más simple que el cultivo sumergido, aireado y agitado por lote simple, pero produce rendimientos y concentraciones celulares similares (20 g/L). Incluso que si se permite un metabolismo mixto (aerobio y fermentativo) se puede alcanzar con $S_0 = 150$ g/L, la concentración celular de 40 g/L.
2. Es importante resaltar que la concentración de biomasa de 40 g/L obtenida en este trabajo ya calificaría en el límite inferior de los cultivos densos. Los cuales llegan a tener hasta más de 100 g/L de levaduras en cultivos sumergidos y controlados en forma de lote alimentado.
3. Los efectos de grosor de las placas de EPU sobre el crecimiento de *Pichia pastoris* no son tan importantes como el efecto de la concentración inicial de glucosa.

A nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo en el que se evalúa el crecimiento de *Pichia pastoris* utilizando glucosa como fuente de carbono en cultivo en medio sólido con EPU.

PERSPECTIVAS

Para continuar posteriormente con este trabajo se propone utilizar placas de EPU con un grosor de 0.7 cm, ya que es el que tiene más espacios vacíos que permiten una mayor aireación. También se recomienda evaluar diferentes flujos de aire mayores al utilizado en este trabajo (50 cm³/min) hasta lograr un consumo completo de la glucosa con un metabolismo respiratorio.

Cabe destacar, que las ventajas que pudiera tener el sistema de cultivo sólido aquí desarrollado sobre la producción de biomasa, podrían tener un impacto significativo en la industria que rodea a *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, C.N., Augur, C., Favela T. E., Viniegra G. G. (2001) Induction and repression patterns of fungal tannase in solid state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36 (6): 565-570 1.143 (3).

Alexander, M.A., y Jeffries, T.W. (1990) Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microbiology Technology* 12:2-19

Anderlei, T., Büchs, J. (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* 7 157–162.

Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J. (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17: 187–194.

Bakker, B.M., Overkamp, K.M., Van Maris, A.J.A., Kötter, P., Luttik, M.A.H., Van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 15–37.

Berthold, D. A., Andersson, M. E. y Nordlund, P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1460: 241–254.

Betton, J.M., Chaffotte, A. (2005) Recombinant protein folding and production. *Med Sci (Paris)* 21(6-7): 613-617.

Beudeker, R.F., van Dam, H.W., van der Plaat, J.B. y Vellenga, K. (1990) Developments in baker's yeast production. In: Verachtert H & de Mot R (Eds) *Yeast biotechnology and Biocatalysis* 103-145.

Birou, B., Marison, I.W. y Von Stockar, U. (1987) Calorimetric investigation of aerobic fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 30:650-660

Bleckwenn, N.A., Shiloach, J. (2004) Large-scale cell culture. *Curr Protoc Immunol App 1.*

Boveris, A. (1978). Production of superoxide anion and hydrogen peroxide in yeast mitochondria. In: Bacila M, Horecker BL & Stoppani AOM (Eds) *Biochemistry and Genetics of Yeasts: Pure and Applied Aspects* (pp 65-80). Academic Press, New York, San Francisco and London.

Brown, A.D. (1974). Microbiol water relations: features of intracellular composition of sugar tolerant yeast. *J Bacteriol* 118: 769-777.

Brown, C.M. y Rose, A.H. (1969) Effects of temperature on composition and cell volume of *Candida utilis*. *J. Bacteriol.* 97: 262-272

Bruinenberg, P.G., Blaauw, M., Veenhuis, M. y Ab, G. (1989) Purification and some properties of malate synthase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61, 11–16.

Buckholz, R. G., Gleeson, M. A. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 9, 1067-1072.

Bulder, C. J. E. A. (1964) Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 30:1-9.

Cadenas, E., Brigelius, R., Akerboom, T. y Sies, H. (1983) Oxygen radicals and hydroperoxides in mammalian organs: aspects of redox cycling and hydrogen peroxide metabolism. In: Sund H y Ullrich V (Eds) *Biological Oxidations* 288-310.

Carr, R.I.G., Bilton, R.F. y Atkinson, T.(1986) Toxicity of paraquat to microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.* 52:1112-1116

Cartwright, C.P., Juroszek, J.R., Beavan, M.J., Ruby, F.M.S., Morais, S.M.F. y Rose, A.H. (1986) Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132:369-377

Cartwright, C.P., Veazey, F.J. y Roase, A.H. (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharornyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:509-513

Cereghino, G. P. L., Cregg, J. M. (1999) Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. *Current Opinion Biotechnology* 10: 422-427.

Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., Cregg, J. M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *CurrOpin Biotechnol.*13:329–32.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24:45–66.

Chang, E.C. y Kosman, D.J. (1989) Intracellular Mn(II)-associated superoxide scavenging activity protects Cu,Zn superoxide dismutase deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J. Biol. Chem.* 264:12172-12178

Chen, S.L. y Gutmanis, F. (1976) Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnol. Bioeng.* 18:1455-1462

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16(1): 23-52.

Cregg, J.M., Vedvick, T. S., Rascke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11: 905-910.

D'Amore, T. y Stewart, G.G. (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 9:322-330.

Datamonitor. (2004) Recombinant therapeutic proteins: Delivering a \$53 billion mature market by 2010. Parmar HC. Biopharmaceuticals market overview. *Pharmaceutical Technology Europe*.

DeDeken, R. H. (1966) The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44: 149-156.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M., Durand, A. (1991) Biomass estimation in solid state fermentation, I. Manual biochemical methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 200-205.

Eckart, M. R., Bussineau, C. M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current Opinion Biotechnology* 7: 525-530.

Eraso, P. y Gancedo, C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS* 224:187-192

Eroshin, V.K., Utkin, I.S., Ladynichev, S.A., Samoylov, V.V., Kuvshinnikov, V.D. y Skryabin, G.K. (1976) Influence of pH and temperature on the substrate yield coefficient of yeast growth in a chemostat. *Biotechnol. Bioeng.* 18:289-295

Escamilla, L.L., Viader, J.M., Guerrero, M. (1999) Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* 2, 27-33.

Essia, J. J., Letourneau, F. y Villa, P. (1989) Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 125-128

Fernández, E., Fernández, M., Moreno, F. y Rodicio, R. (1993) Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.* 333: 238–242.

Fiaux, J., C., Akar, Z.P., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T. & Sauer, U. (2003) Metabolic flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryotic Cell* 2:170–180.

Fiechter, A., Kappeli, O. & Meussdoerffer, F. (1989) Batch and continuous cultures. In: Rose AH & Harrison JS (Eds) *The Yeasts*, Vol 2 (pp 99-129). Academic Press, London.

Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T. & Gancedo, C. (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 507–529.

Franzblau, S. G. y Sinclair, N. A. (1983) Induction of fermentation in Crabtree-negative yeasts. *Mycopathologia* 82: 185-190.

Gancedo, C. & Serrano, R. (1989) Energy-yielding metabolism. In *The Yeasts, Metabolism and Physiology of Yeasts* (Rose, A.H. & Harrison, J.S., eds), 3:205–259. Academic Press, London.

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Bio Rev* 62:334-361.

Gancedo, J.M. & Gancedo, C. (1997) Gluconeogenesis and catabolite inactivation. *In Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications* (Zimmermann, F.K. & Entian, K.-D., eds) 359–377.

Gasnierb. (1987). Characterization of low- and highaffinity glucose transports in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biochimica et biophysica acta* 903: 425-433.

Gellisen, G., Hollenberg, C. (1997) Application of yeast in gene expression studies: a comparasion of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, and *Kluyveromyces lactis*- a review. *Gene* 190: 87-97.

Goldberg, I. (1985) Single cell protein. *Springer Verlag* 79.

Gomez, A. & Castillo, F.J. (1983) Production of biomass and [α -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnol. Bioeng.* 25:1341-1357

Gommers, P.J.F., Van Schie, B. J., Van Dijken, J.P. y Kuenen, J.G. (1988) Biochemical limits to microbial growth yields: An analysis of mixed substrate utilization. *Biotechnol. Bioeng.* 32:86-94.

Graumann, K., Premstaller, A. (2006) Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 1(2): 164-186.

Grosz, R., Stephanopoulos, G., San, K.-Y. (1984) Sensitivity problems with respiratory and heat evolution measurements. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1198–1208.

Guerrero, M., Viader, J. M. (2003) *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes. *In: Procesos Biotecnológicos.* (ed. By Galán-Wong

L.J., Elías- Santos M., Tamez- Gurra P., Quintero- Ramírez R., Quintero- Zapata I.), pp 136-165. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza.

Guo, M.J., Zhuang, Y.P., Chu, J., Zhang, S.L., Xiong, A.S., Peng, R.H. (2007) Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* PHY34. *Process Biochem.* 42:1660–5.

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 glucose as the growth substrate. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 185–188.

Harder, W. & Veldkamp, H. (1967) A continuous culture of an obligately psychrophilic *Pseudomonas* species. *Archiv für Microbiologie* 59:123-130.

Hartner, F.S., Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* 14: 5-39.

Heijnen, J.J. & Roels, J.A. (1981) A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 23:739-763.

Hesseltine, C.W. (1972) Solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 24: 517-532.

Higgins, D. R., Cregg, J. M. (1998) Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology* 103 (ed. By Higgins D. R., Cregg J. M.), Humana Press, Totowa, NJ.

Höfer, M., Nicolay, K. & Robillard, G. (1985) The electrochemical H⁺ gradient in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 17:175-182.

Holker, U., Hofer, M., Lenz, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microb Biotechnol* 64(2):175-186.

Hong, F., Meinander, N.Q., Jonsson, L.J. (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79:438–49.

Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., Meagher, M.M. (2006) Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by over expression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng* 93:771–8.

Jones, E.W. & Fink, G.R. (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Metabolism and Gene Expression* (Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R., eds), pp. 181–299. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Jones, R.P. & Greenfield, P.F. (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enz. Microb. Technol.* 4: 210-223.

Jones, R.P. & Greenfield, P.F. (1987) Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast* 3:223-232

Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. y Wood, P. M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 1504: 179–195.

Jovall, P.A., Tunblad, I. & Adler, L. (1990) ¹³C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 154:209-214.

Kern, A., Hartner, F. S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., Kai-Uwe F. y Glieder, A. (2007) *Pichia pastoris* 'just in time' alternative respiration. *Microbiology* 153: 1250–1260.

Klein, C., Olsson, L, Nielsen, J. (1998) Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* 144:13–24.

Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Tomomitsu, K. (2000) High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *J Biosci Bioeng* 90:280–8.

Kong, N., Mu, X., Han, H., Yan, W. (2009) Pilot-scale fermentation, purification, and characterization of recombinant human Oncostatin M in *Pichia pastoris*. *Prot Express Purif* 63(2): 34-39.

Lages, F. and Lucas, C. (1995). Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerante yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast. Feb*; 11(2): 111-119.

Larsson, C. & Gustafsson, (1987) Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaromyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch. Microbiol.* 147:358-363.

Leao, C. & van Uden, N. (1984) Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 774:43-48.

Lee, F.J. & Hassan, H.M. (1987) Biosynthesis of superoxide dismutase and catalase in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:531-536.

Lee, S.Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14(3): 98-105.

Linton, J.D. & Rye, A.J. (1989) The relationship between the energetic efficiency in different microorganisms and the rate and type of metabolite overproduced. *J. Indust. Microbiol.* 4: 85-96.

Linton, J.D. y Stephenson, R.J. (1978) A preliminary study on the growth yields in relation to the carbon and energy content of various organic growth substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* 3:95-98.

Loewen, M.C., Liu, X., Davies, P.L., Daugulis, A.J. (1997) Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:480-6.

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

Loureiro, M.C. & Santos, H. (1990) Effects of ethanol on *Saccharomyces cerevisiae* as monitored by in vivo ^3p and ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Arch. Microbiol.* 153:384-391.

Lucas, C., Da Costa, M. & van Uden, N. (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaromyces hansenii*. *Yeast* 6:187-191.

Lung, J.M. & Ciriuo, V.P. (1987) Glucose uptake in a kinase less *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Bacteriol.* 169: 2932-2937.

Maaheimo, H., Fiaux, J., Cakar, Z.P., Bailey, J.E., Sauer, U. & Szyperski, T. (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* 268: 2464–2479.

Maiorella, B., Blanch, H.W. & Wilke, C.R. (1984) Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1155- 1166.

Maldonado, L.M., Hernández, V.E., Rivero, E.M. (2007) Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomol Eng* 24(2): 217-222.

McClary, D. O. y Bowers, B. D. (1967) Structural differentiation of obligately aerobic and facultatively anaerobic yeasts. *J. Cell Biol.* 32: 519-524.

McDonald, I. J., Walker, T. & Johnson, B.F. (1987) Effects of ethanol and acetate on glucose-limited chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe*, a fission yeast. *Can. J. Microbiol.* 33: 598-601.

Meikle, A.J., Reed, R.H. & Gadd, G.M. (1988) Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol* 134:3049-3060.

Mitchell, D. A., Von Meien, O. F., Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bio-reactors. *Biochemical Engineering Journal* 137-147.

Moore, A. L., Albury, M. S., Crichton, P. G. y Affourtit, C. (2002) Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 7: 478–481.

Moo, M., Moreira, A.R., Tengerdy, R. P. (1983) Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold, 117-144.

Muller, S., Sandal, S., Kamp-Hansen, P., Dalboge, H. (1998) Comparison of expression systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, and *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Y. lipolytica*. *Yeast* 14: 1267- 1283.

Neijssel, O.M. & Tempest, D.W. (1976) Bioenergetic aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbonlimited and carbon-sufficient chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 107:215-221.

Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M. & Goma, G. (1981) Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 23:201-211.

Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M.A. (1969) Yeast capable of utilizing methanol. *Agricul Biol Chem* 33:1319.

Okolo, B., Johnston, J.R. & Berry, D.R. (1987) Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. *Biotechnol. Lett.* 9:431-434.

Onken, U. & Liefke, E. (1989) Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.* 40:137-169.

Paca, J. & Gregr, V. (1979) Effect of pO₂ on growth and physiological characteristics of *C. utilis* in a multistage tower fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1827-1843.

Palmieri, L., Lasorsa, F.M., De Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M.J. & Walker, J.E. (1997) Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett.* 417: 114–118.

Palmieri, L., Vozza, A., Agrimi, G., De Marco, V., Runswick, M.J., Palmieri, F. & Walker, J.E. (1999) Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxalacetate and sulfate. *J. Biol. Chem.* 274: 22184–22190.

Palomares, L.A., Estrada, S., Ramírez, O.T. (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 267: 15-52.

Pampulha, M.E. & Loureiro, M.C. (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:375-380.

Pampulha, M.E. & Loureiro, V. (1989) Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 11:269

Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng* 13(2-3):81-84.

Parada, G. & Acevedo, F. (1983) On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25:2785-2788.

Pascual, C., Alonso, A., Garcia, I., Romay, C. & Kotyk, A. (1988) Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 32:374-378.

Pavlou, A.K., Reichert, J.M. (2004) Recombinant protein therapeutics success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol* 22: 1513-1519.

Payne, W.J. (1970) Energy yields and growth of heterotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:17-52.

Peinado, J.M., Cameira, P.J. & Loureiro, M.C. (1989) Regulation of glucose transport in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 135:195-201.

Peng, L.S., Zhong, X.F., Ou, J.X., Zheng, S.L., Liao, J., Wang, L. (2004) High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 108:185–92.

Petrov, V.V. & Okarokov, L.A. (1990) Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlbergensis* plasmalemma by nalcobols as a possible cause of its de-energetization. *Yeast* 6: 311-318.

Pinto, I., Cardoso, H., Leao, C. & van Uden, N. (1989) High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 33:1350-1352.

Pirt, S.J. (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London* 163B: 224-231.

Pons, M.N., Rajab, A. & Engasser, J.M. (1986) Influence of acetate on growth kinetics and production control of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:193-198.

Postma (1989) Kinetics of growth and glucose transport in glucose limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5:159-165.

Postma, E., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1988) Adaptation of the kinetics of glucose transport to environmental conditions in the yeast *Candida utilis* CBS 621: a continuous culture study. *J. Gen. Microbiol.* 134:1109-1116.

Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan T. V., Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 127-135.

Ramon, R., Feliu, J.X., Cos, O., Montesinos, J.L., Berthet, F.X., Valero, F. (2004) Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 26(18): 1447-1452.

Ratledge, C. (2001). Biochemistry and Physiology of growth and metabolism, in basic Biotechnology, C Ratledge, B Kristiansen, Editors., Cambridge University Press: Cambridge. 17-45.

Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. & Gould, C.M. (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponential growing yeasts. *Appl. Env. Microbiol.* 53:2119-2123.

Ren, H. T., Yuan, J. Q. and Bellardt, K. H. (2003). Macrokinetics model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J Biotechnol.* 106: 53-8.

Richter, S., Nieveler, J., Schulze, H., Bachmann, T.T., Schmid, R.D. (2006) High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholine esterase in *Pichia pastoris* and its purification. *Biotechnol Bioeng* 93:1017–22.

Rodriguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcon, V. (1994) High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 33:135–46.

Roels, J.A. (1981) Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 22:2457-2514

Romano (1986) Sugar transport systems of baker's yeast and filamentous fungi. In: Morgan MM (Ed) Carbohydrate Metabolism in cultured cells (pp 225-244). Plenum Publishing Corp.

Romano, A.H. (1982) Facilitated diffusion of 6-deoxy-D-glucose in bakers' yeast: evidence against phosphorylation-associated transport of glucose. *J. Bacteriol.* 152:1295-1297.

Romanos, M. A., Scorer, C. A., Clare, J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488.

Romanos, R. (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Current Opinion Biotechnology* 6: 527-533.

Rosa, M.F. & Sá-Correia, I. (1991) In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* 57:830-835.

Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., van der Baan, A.A., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1988) Production, distribution and kinetic properties of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Env. Microbiol.* 54:1131-1137.

Ruiz, H. A. (2004). Desarrollo de un bioproceso para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizando pomaza de limón. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila.

Salgueiro, S.P., Sá-Correia, I. & Novais, M. (1988) Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:903-909.

Saucedo, G., Lonsane, B.K., Krishnaiah, M. M., Navarro, J.M., Roussos, S., Raimbault, M. (1992) Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in solid state fermentation system. *Process Biochem.* 27: 97-107.

Schöler, A. & Schüller, H. J. (1994) A carbon-source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3613–3622.

Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochem. Biophys. Acta* 947:1-28.

Shankaranand, V.S., Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1992) Idiosyncrasies of solid state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem* 27: 33-36.

Siedow, J. N. y Umbach, A. L. (2000) The mitochondrial cyanideresistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 1459: 432–439.

Siegel, R.S., Brierley, R.A. (1989) Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 34(3): 403-404.

Sodoyer, R. (2004) Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs* 18(1): 51-62.

Spencer, J.F., Spencer, A.L., Laluce, C. (2002) Non-conventional yeast. *App Microbiol Biotechnol* 58:147-56.

Spencer-Martiniš y Van Uden, N. (1985) Catabolite interconversion of glucose transport systems in the yeast *Candida wickerhamii*. *Biochimica et biophysica acta* 812: 168-172.

Springer, V., Berlin, H., Nohl, H. (1986) A novel superoxide radical generator in heart mitochondria. *FEBS* 214:269-273.

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. & Painter, P.R. (1987) Effect of the environment on microbial growth. *In: General Microbiology* p 207.

Stouthamer, A.H. & van Verseveld, H.W. (1987) Microbial energetic should be considered in manipulating metabolism for biotechnological purposes. *Trends in Biotechnol.* 40-46.

Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Pior, B. A. and Kilian, S.G. (1997) Characteristics of Fps-1 dependent and independent glycerol transport in *Sacharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 7790-7795.

Tempest, D.W. & Neijssel, O.M. (1984) The status of *Ynxe* and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annual Rev. Microbiol.* 38:459-486.

Thorpe, E.D., d'Anjou, M.C., Daugulis, A.J. (1999) Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant. *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 21:669–72.

Tsai, C.W., Duggan, P.F., Shimp, J., Richard, L., Miller, L.H., Narum, D.L. (2006) Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate expressed in *P. pastoris*. *JBiotechnol* 121:458–70.

Vallejo, C.G. & Serrano, R. (1989) Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 5:307-319.

Van Dijken, J.P. & Scheffers, W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:199-224.

Van Uden, N. & Madeiro (1976) Yield and maintenance relation of yeast growth in the chemostat at superoptimal temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 18:791-804.

Van Uden, N. (1984) Temperature profiles of yeasts. *Adv. Microbial Physiol.* 25:195-251.

Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1989) Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Journal of General Microbiology* 135: 2399-2406.

Van Zyl, P.J., Kilian, S.G. & Prior, B.A. (1990) The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:231-235.

Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H. & Harder, W. (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3:77-84.

Veiga, A., Arrabaca, J. D. y Loureiro-Dias, M. C. (2000) Cyanideresistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 190: 93–97.

Veiga, A., Arrabaca, J. D. y Loureiro-Dias, M. C. (2003) Cyanideresistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res* 3: 239–245.

Verduyn, C. (1991) Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 325-353.

Verduyn, C., Giuseppin, M.L.F., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1988) Hydrogen peroxide metabolism in yeasts. *Appl. Env. Microbiol.* 54:2086-2090.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136: 395-403.

Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A. y Van Dijken, J.P. (1991a) A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *A. V. Leeuwenhoek* 59:49-63.

Verduyn, C., van Wijngaarden, C.J., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1991b) Hydrogen peroxide as an electron acceptor for mitochondrial respiration in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 7:137-146.

Viegas, C.A. & Sá-Correia, I. (1991) Activation of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.* 137:645-651.

Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sá-Correia, I. & Novais, J.M. (1989) Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 21-28

Viegas, C.A., Sá-Correia, I. & Novais, J.M. (1985) Synergistic inhibition of the growth of *Saccharomyces bayanus* by ethanol and octanoic and decanoic acids. *Biotechnol. Lett.* 7:611-614.

Villaverde, A., Mattanovich, D. (2007) Recombinant protein production in the new Millennium. *Microb Cell Fact* 20: 6: 33.

Viniegra, G., Favela, E., Aguilar, C., Romero, S., Diaz, G., Augur, C. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng.* 13: 157-167.

Von Stockar, U. y Marison, I.W. (1989) The use of calorimetry in biotechnology. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 40:93-136.

Vreeland, R.H. (1987) Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 14:311-356.

Wallace, R.J. & Holms, W.H. (1986) Maintenance coefficient and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML308 at different growth temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* 37: 317-320.

Walsh, G., Headon, D. R. (1995) Protein Biotechnology. *John Wiley and Sons.* 1: 13-15.

Wang, H.Y., Cooney, C.L., Wang, D.I.C. (1979) Computer control of bakers' yeast production. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 975-995.

Warth, A.D. (1988) Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl. Env. Microbiol.* 54:2091-2095.

Warth, A.D. (1989) Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.* 135:1383-1390.

Watson, T.G. (1970) Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 64:91-99.

Winter, J.F., Loret, M.O. & Uribelarrea, J.L. (1989) Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiol.* 18:247-252.

Xie, J.L., Zhang, L., Ye, Q., Zhou, Q.W., Xin, L., Du, P. (2003) Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. *Biotechnol Lett* 25:173–7.

Xie, J.L., Zhou, Q.W., Du, P., Gan, R.B., Ye, Q. (2005) Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme Microb Technol* 36:210–6.

Yang, X.M., Xu, L., Eppstein, L. (1992) Production of recombinant human interferon-alpha 1 by *Escherichia coli* using a computer-controlled cultivation process. *J Biotechnol* 23(3): 291-301.

Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., Bol, J. (1994). A novel solid substrate fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Lett.* 16: 643-648.