

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FISIOLÓGÍA DE CRECIMIENTO DE *Pichia pastoris* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO GLICEROL O GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.B.I. JOSUÉ ZARATE BONILLA

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR DE TESIS

DRA. DIVANERY RODRÍGUEZ GÓMEZ

COORDINADOR DE TESIS

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

MEXICO D.F.

07 de Julio de 2016

México D. F. a 07 Julio de 2016

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FISIOLÓGÍA DE CRECIMIENTO DE *Pichia pastoris* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO GLICEROL O GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

que presentó

I.B.I. Josué Zarate Bonilla

Comité tutorial

Director: Dra. Divanery Rodríguez Gómez

Codirector: DR. Gustavo Viniegra González

Asesor: Marcos López Pérez

Jurado

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

**“Da el primer paso con fe. No tienes por qué ver toda la escalera.
Basta con que subas el primer peldaño” Martin Luther King**

Agradecimientos

Gracias a todas las personas involucradas en especial a mis asesores y codirectores de tesis el Dr. Gustavo Viniegra, la Dra. Divanery Rodríguez y al Dr. Marcos López quienes con sus consejos, amistad, paciencia, tiempo y dedicación en sus asesorías hicieron posible la realización de la misma, así mismo agradezco al Dr. Ernesto Favela, a la Dra. Gloria Trejo por sus acertadas asesorías así como permitirme estar en sus respectivos laboratorios. Gracias a todos mis compañeros de la planta piloto dos y del laboratorio de biología molecular en especial al buen Gregorio Juárez, Luis Víctor, Jorge Lima y Anselmo Estefes, a quienes les debo mucho por su ayuda técnica, amistad y compañerismo. Gracias a todos ellos y a la UAM Iztapalapa por el tiempo y los conocimientos adquiridos durante la especialidad

Dedicatorias

A mis padres y hermanos por su comprensión, ayuda, por compartir conmigo de un hogar, cariño, y buenos momentos como familia.

A mis amigos por sus palabras de aliento y su ejemplo de superación.

Resumen

En los últimos años *Pichia pastoris* ha destacado como un sistema de expresión de proteínas heterólogas, por lo que se ha vuelto necesario mejorar las condiciones de cultivo con el fin de incrementar la producción de proteínas de interés comercial. Actualmente se han propuesto estrategias como el aumento de la producción de biomasa como forma de incrementar la producción con *P. pastoris*, empleando sistemas de cultivo más económicos que el cultivo continuo. Por lo que en este trabajo, el principal objetivo fue la selección del sustrato idóneo que permitiera obtener la mejor producción de biomasa en EPU (Espuma de poliuretano) como soporte sólido, evaluándose el crecimiento mediante análisis fisiológicos, bioquímicos y de respiración.

Debido a que la regulación del pH es uno de los principales problemas en medio sólido, se llevó cabo la modificación del medio de cultivo propuesto en trabajos anteriores (Núñez, 2012), para lo cual se probaron diferentes concentraciones de fosfato (50, 100 y 150mM) en matraz agitado a distintas relaciones carbono nitrógeno (C/N= 6.2 y 10), escogiéndose para la formulación del medio de cultivo la concentración de 150mM de fosfatos con una relación C/N=10, debido a que se mantuvo el valor de pH por encima del valor más bajo de crecimiento (pH 3) además de la disminución del tiempo de crecimiento a solo 48 horas de cultivo. Adicionalmente, se comparó el crecimiento en medio líquido utilizando glucosa y glicerol, obteniéndose un rendimiento 47 % mayor en los cultivos con glicerol comparado con los cultivos con glucosa ($Y_{x/s} = 0.3 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$), mientras que la tasa de crecimiento de los cultivos con glucosa fue de 46 % mayor a lo obtenido con glicerol ($\mu_m = 0.12 \text{ h}^{-1}$), sin embargo en ambos casos el máximo descenso del pH estuvo en el rango del valor óptimo de crecimiento (pH 3-7).

Una vez establecida la formulación del medio de cultivo, se llevó a cabo la comparación de estos dos sustrato a diferentes concentraciones ($S_0 \text{ (g/L)} = 50, 100 \text{ y } 150$), en medio sólido empleando reactores de columna empacados con placas de espuma de poliuretano (EPU) como soporte sólido, donde se inyectó un flujo de aire húmedo a 50mL/min. Al igual que los cultivos realizados en matraz agitado con glicerol y glucosa, en medio sólido se observaron importantes diferencias en el crecimiento de *P. pastoris* empleando estos dos sustratos. En los cultivos con glicerol la producción máxima de biomasa a concentraciones iniciales, $S_0 \text{ (g/L)} = 50, 100 \text{ y } 150$ fueron 34, 58 y 54 % respectivamente mayores a lo obtenido con

glucosa, por otro lado, en los cultivos con glucosa y glicerol las tasa de crecimiento a concentraciones 100 y 150 g/L de sustrato no presentaron diferencias significativa entre sí, mientras que en los cultivos con glucosa a concentración de 50 g/L la diferencia fue del 109% comparado con los cultivos con glicerol a la misma concentración, en contraste, los valores de μ calculados a partir de los datos de producción de CO_2 y consumo de O_2 fueron mayores a los obtenidos a partir de los datos de producción de biomasa. Por otro lado, el gasto derivado a energía de mantenimiento calculado a partir de los datos de sustrato y respiración mostraron que a concentraciones de 50 y 100 g/L de glicerol se encontró el mayor gasto de mantenimiento, mientras que en los cultivos con glucosa este gasto se observó a una concentración de 150 g/L de sustrato.

Por otro lado, la respiración fue mayor en los cultivos con glucosa, así como el incremento de producción de CO_2 cuando se aumentó la concentración inicial de sustrato, obteniéndose un máximo en la respiración de $61.11 \text{ mgCO}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$, con un consumo de O_2 de $25.04 \text{ mg O}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$ a concentración de 100 g/L de glucosa, por el contrario en los cultivos con glicerol los valores de respiración máxima, fueron descendiendo conforme la concentración se incrementó alcanzando un mínimo valor de R_m igual a $17.4 \text{ mgCO}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$ con un consumo de O_2 de $17.37 \text{ mg O}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$ a una concentración de 150 g/L de glicerol.

Por otro lado, conforme la concentración inicial de glicerol y glucosa se incrementó los valores de CR variaron de su valor teórico. En el caso de los cultivos con glicerol el valor del cociente respiratorio máximo, CR_m , paso de 0.76 a 50 g/L de glicerol a 0.67 a concentración de 150 g/L, mientras que en los cultivos con glucosa el CR_m varió su valor pasando de 1.58 a 50 g/L de glucosa a 1.43 a concentración de 150g/L. dichos cambios en el valor del CR_m fueron asociados a la formación de metabolitos parcialmente oxidados. En el caso de los cultivos con glicerol estos productos fueron D- arabitol y ácido cítrico, mientras que en los cultivos con glucosa los principales compuestos fueron etanol, D-arabitol y ácido cítrico, a su vez la producción de estos compuestos se relacionó al incrementó de la concentración inicial.

Por último la relación, entre el crecimiento y la respiración se observó mediante el análisis del punto de inflexión, en el caso de los cultivos con glicerol a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50, 100 y 150 en promedio fueron 20.52, 32.91, 55.20 horas respectivamente, mientras que en los cultivo con glucosa a las mismas concentraciones fueron 20.1, 24.63, 35.79 horas,

indicando el tiempo que tardó *P. pastoris* de pasar de un metabolismo a otro en cada condición estudiada.

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1. <i>Pichia pastoris</i> : características y usos biotecnológicos	1
1.2. Metabolismo de glucosa en <i>P. pastoris</i>	3
1.3. Metabolismo de glicerol	4
1.4. Energía de mantenimiento	7
1.5. Efecto Crabtree.....	7
1.6. Cultivo en medio sólido (CMS)	9
1.7. Soportes sólido	10
1.8. Evaluación de la producción de biomasa en cultivo en medio sólido	11
1.9. Cociente respiratorio (CR)	13
2. Antecedentes.....	14
3. Justificación	14
4. Hipótesis general	15
5. Objetivo general.....	15
5.1. Objetivos particulares	15
6. Metodología.....	16
6.1. Microorganismo y preparación del inóculo	17
6.2. Conservación de la cepa a corto y largo plazo.....	17
6.3. Preparación de la composición del medio de cultivo idóneo para el crecimiento celular en medio sólido.....	17
6.3.1. Efecto de la concentración del amortiguador sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i> cultivada en medio líquido.....	18
6.3.2. Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i> cultivada en medio líquido	18
6.3.3. Efecto del tipo de sustrato en el crecimiento de <i>P. pastoris</i> cultivada en medio líquido	18
6.4. Cultivo en medio sólido.....	18
6.4.1. Formulación del medio de cultivo	18
6.4.2. Preparación del material para el cultivo en medio sólido	19
6.4.3. Sistema empleado para los cultivos en medio sólido.....	19
6.5. Procedimientos analíticos	20
6.5.1. Medición de CO ₂ en cultivos en medio sólido.....	20

6.5.2. Biomasa	20
6.5.3. Cromatografía líquida de alta presión (CLAR)	21
6.5.4. Espectrometría de masas.....	21
6.6. Balance de carbono	21
7. Resultados y discusión	22
7.1. Formulación del medio cultivo de <i>P. pastoris</i> en matraz agitado.....	22
7.1.1. Efecto de la concentración de la solución amortiguadora sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i>	22
7.1.2. Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i>	23
7.1.3. Efecto del sustrato sobre los parámetros de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en medio líquido	24
8. Crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> en cultivo en medio sólido	25
8.1. Efecto de la concentración del sustrato sobre el crecimiento.....	25
8.2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de CO ₂	30
8.3. Metabolismo de desbordamiento y balance de carbono.	43
9. Conclusiones	48
10. Perspectivas.....	49
11. Bibliografía.....	50
12. Anexos	57
12.1. Anexo 1. Curva estándar.....	57
12.2. Anexo 2. Cromatogramas y tiempos de retención.	60
12.3. Anexo 3. Espectrofotometría de masas.....	62
12.4. Anexo 4. Amortiguador de fosfatos	63
12.5. Anexo 5. Formulación del medio de cultivo.....	65
12.5. Anexo 6. Modelos matemáticos.....	67
12.6. Anexo 7. Balance de carbono.....	71

Índice de figuras

Figura 1. Rutas metabólicas de <i>P. pastoris</i> utilizando glucosa o glicerol como fuente de carbono (modificada de Soláet al., 2004). G6F, glucosa 6-fosfato; F6F, fructosa 6-fosfato; DHAF, dihidroxiacetona fosfato; G3F, gliceraldehído 3-fosfato; 3FG, 3-fosfatoglicerato; FEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; OAA, oxaloacetato; AcCoA, acetil Coenzima A; E4F, eritrosa 4-fosfato; S7F, pseudoheptulosa 7-fructosa; R5P, ribulosa 5-fosfato; Mal, malato; Fum, fumarato; Succ, succinato.	6
Figura 2. Materiales usados en el cultivo sólido, degradables y no degradables; a) residuos de fruta, b) casacarilla de arroz, c) aserrín, d) EPU, e) gránulos de arcilla y f) vermiculita.	11
Figura 3. a) Sistema de monitoreo de gases para procesos aerobios en línea, 1) tubería de aire comprimido; 2) regulador de presión de aire; 3) electroválvulas; 4) rotámetro; 5) baño de agua con temperatura controlada; 6) calentador; 7) humidificador de aire; 8) trampa de agua; 9) recirculador; 10) columnas de fermentación; 11) sondas de temperatura; 12) interface analógica numérica; 13) computadora; 14) condensador; 15) enfriador de agua; 16) columna con sílica gel; 17) analizador de CO ₂ y O ₂ ; 18) bombas. Imagen tomada de Saucedo-Castañeda <i>et al.</i> (1994).....	12
Figura 4. Metodología propuesta para este trabajo.	16
Figura 5. Sistema empleado para los cultivos en medio sólido.....	19
Figura 6. a) Producción de biomasa y b) descenso del pH a concentración de fosfato 50mM (Δ), 100mM (\circ), 150mM (\diamond) y sin amortiguador (\square). Las líneas punteadas representan el ajuste logístico para cada condición.....	22
Figura 7. a) Producción de biomasa y b) consumo de sustrato, a concentración 50mM (Δ) y 150mM (\square) de fosfatos. Las líneas punteadas representan el ajuste logístico.	23
Figura 8 a) Producción de biomasa en medio con glucosa (\square) y glicerol (\diamond), b) consumo de glucosa (\square) y glicerol (\diamond), las líneas punteadas representan los ajustes con la ecuación logística.....	24
Figura 9. a) Efecto de la concentración inicial de sustrato inicial, S ₀ (g/L)=50, 100 y 150g/L sobre a) la producción máxima de biomasa, X _m , y b) la tasa máxima de crecimiento específica, μ_m , utilizando glicerol (\equiv) o glucosa (\odot) como sustrato principal.....	25
Figura 10. Efecto de la concentración de glicerol (\equiv) y glucosa (\odot) en el rendimiento, Y _{x/s} . Comparación entre los datos a) obtenidos en este trabajo, b) López <i>et al.</i> (2010) y c) Núñez (2012).....	27
Figura 11. Curva de consumo de a) glicerol y b) glucosa, a diferentes concentraciones iniciales, S ₀ (g/L)= 50 (\square), 100 (\circ) y 150 (\diamond) (solo para glucosa). Las líneas punteadas representan el ajuste de las curvas al modelo de Pirt (1975).	28

Figura 12 Descenso del pH a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 mM (◇) en los cultivos con a) glucosa y b) glicerol.....	29
Figura 13. Tasas de producción de CO_2 utilizando a) glicerol y b) glucosa, a concentración iniciales, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 (◇). La línea punteada representa los datos de producción de CO_2 ajustados al modelo propuesto por Lareo <i>et al.</i> (2006).....	31
Figura 14. Tasa de consumo de O_2 utilizando a) glicerol y b) glucosa, a concentración iniciales, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 (◇). La línea punteada representa los datos de consumo de O_2 ajustados al modelo propuesto por Lareo <i>et al.</i> (2006).....	32
Figura 15. Rendimiento en base a a) CO_2 (Y_{x/co_2}) y b) O_2 (Y_{x/o_2}), utilizando glicerol (≡) y glucosa (⊗) a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50, 100 y 150.....	35
Figura 16. Tiempo de retardo, t_r , con a) glicerol y b) glucosa, a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 (◇).....	36
Figura 17. Relación del CR (□) con las tasas de producción de CO_2 (Δ) y consumo de O_2 (○) utilizando glicerol a diferentes concentraciones a) 50, b) 100 y c) 150g/L.....	37
Figura 18. Relación del CR (□) con las tasas de producción de CO_2 (Δ) y consumo de O_2 (○) utilizando glucosa a diferentes concentraciones S_0 (g/L)=a) 50, b) 100 y c) 150.....	39
Figura 19. Relación entre el tiempo de inflexión, t_i , obtenido a partir del CR (□) y la producción de biomasa, $d'x/dt$,(○), para los cultivos con glicerol a concentración inicial S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150. La línea punteada representa el ajuste polinomial.	41
Figura 20. Relación entre el tiempo de inflexión, t_i , obtenido a partir del CR (□) y dx/dt (○) en los cultivos con glucosa a concentración inicial de sustrato, S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150. La línea punteada representa el ajuste juste polinomial.....	42
Figura 21. Producción de ácido cítrico (□) y D- arabitol (○), utilizando glicerol como sustrato a concentraciones iniciales, S_0 (g/L)= a) 50 y b) 100.....	44
Figura 22. Producción de etanol (◇), D-arabitol (○),ácido cítrico (□), glicerol (X), ácido málico (Δ) y ácido acético (+) en EPU a concentración inicial de glucosa, S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150.....	45
Figura 23. Porcentaje de carbono recuperado en forma de biomasa, CO_2 , y metabolitos en a) glucosa y b) glicerol, a concentraciones iniciales de sustrato, S_0 (g/L)= 50 (≡) 100 (⊗) y 150 (≈)	46
Figura 24. Correlación entre número de células y densidad óptima. Valor de correlación, $R^2=0.9912$	57
Figura 25. Curva estándar obtenida por micro DNS para la cuantificación de glucosa (g/L) en los cultivos en matraz agitado. Valor de correlación, $R^2=0.989$	57

Figura 26. Curva estándar empleada en la cuantificación de glicerol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.998$	58
Figura 27. Curva estándar empleada en la cuantificación de glucosa, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9998$	58
Figura 28. Curva estándar empleada en la cuantificación de etanol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9999$	58
Figura 29. Curva estándar empleada en la cuantificación de ácido acético, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9998$	59
Figura 30. Curva estándar empleada en la cuantificación de ácido cítrico, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R_2=0.9977$	59
Figura 31. Curva estándar empleada en la cuantificación de D- arabitol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R_2=0.9999$	59
Figura 32. Cromatogramas tomados al tiempo final en los cultivos con glicerol en EPU. El tiempo de retención (t_r) para glicerol y D- arabitol fue de 18.22 y 15.1 minutos respectivamente. Abreviaciones: SA, Sulfato de amonio; AF, amortiguador de fosfatos.....	60
Figura 33. Cromatogramas tomados a las 26 horas de cultivo con glucosa en EPU. El tiempo de retención (t_r) para glucosa, glicerol, D- arabitol, ácido málico y etanol fue de 12.65, 18.22, 15.1, 14.08 y 28.33 minutos respectivamente. Abreviaciones: SA, Sulfato de amonio; AF, amortiguador de fosfatos.....	60
Figura 34. Cromatogramas tomados al tiempo final de cultivo con glicerol en EPU. El tiempo de retención (t_r) para el ácido cítrico fue de 3.66 minutos.....	61
Figura 35. Espectro de masas " <u>positivo</u> ". La molécula de D-arabitol (152.15 g/mol) sufrió dos diferentes protonaciones (H^+ y Na^+) , obteniéndose dos diferentes pesos moleculares (153.09 y 175.07 g/mol).....	62

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas con <i>P. pastoris</i>	2
Tabla 2. Levaduras Crabtree positivas y Crabtree negativas.	8
Tabla 3. Ejemplos de compuestos producidos en cultivo sólido utilizando diferentes microorganismos y soportes. Tabla modificada de Prabhakat <i>et al.</i> (2005).....	10
Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de respirometría para los cultivos con glicerol y glucosa a diferentes concentraciones. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.	33
Tabla 5. Coeficientes de mantenimiento, obtenidos a partir de los datos CO ₂ , O ₂ y sustrato, a concentraciones iniciales, S ₀ (g/L)= 50, 100 y 150.	34
Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de respirometría y producción de biomasa a las diferentes concentraciones estudiadas. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.....	40
Tabla 7. Punto de inflexión calculado a partir del modelo propuesto por Lareo <i>et al.</i> , (2006), por ajuste polinomial y por la ecuación logística en su forma diferencial. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.....	43
Tabla 8. Formulación de la solución amortiguadora de fosfatos a 50, 100 y 150 mM	64
Tabla 9. Composición del medio de cultivo sumergido a diferente relación C/N.	65
Tabla 10. Composición del medio de cultivo para las cinéticas en medio sólido	66

1. Introducción

1.1. *Pichia pastoris*: características y usos biotecnológicos

P. pastoris, recientemente reclasificada en el género *Komagataella* (Mattanovich *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 1995; www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7766181) pertenece al grupo de las levaduras metilotróficas, capaces de utilizar metanol como fuente de carbono y energía. *P. pastoris* crece en superficie formando colonias mucoides, con células en forma globosa, elipsoide u ovoide, que se reproducen por gemación. A diferencia de otras especies de levaduras como *Candida albicans* no presentan micelio ni pseudomicelio. Adicionalmente, es capaz de asimilar el metanol y L-ramnosa, mientras que su metabolismo no permite la asimilación de D-ribosa, maltosa y nitrato de potasio (Yamada *et al.*, 1995).

Inicialmente *P. pastoris* fue empleada en la alimentación de ganado como fuente de proteína, sin embargo debido al incremento del precio del metanol, que era utilizado como fuente de carbono en la producción de la biomasa, resultó ser un producto demasiado caro, aunado a esto surgieron nuevas fuentes de proteína más económicas como la soya, por lo que se dejó de producir, sin embargo, Phillips Petroleum Company, la empresa que desarrolló los protocolos de producción de biomasa, junto con Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA), comenzaron a utilizar a *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas (Cereghino and Cregg, 2000). Actualmente *P. pastoris* ha sobresalido como un importante sistema de expresión de proteínas heterólogas debido a sus múltiples ventajas como por ejemplo, su fácil manipulación genética, la presencia del promotor AOX1 altamente regulado por las concentraciones de metanol, así como un correcto plegamiento de las proteínas y la escasa producción de proteínas endógenas, característica que permite reducir los costos de purificación del producto recombinante (Bollok *et al.*, 2009). Por otro lado, la expresión heteróloga de proteínas y enzimas en su mayoría han sido realizadas utilizando cultivos en medio sumergido usando dos etapas: la primera, con glicerol, permite alcanzar densidades celulares superiores a los 100 g/L y la segunda, con metanol, en la que se induce la producción de las enzimas recombinantes en el gen *aox 1*. Hasta la fecha se ha reportado más de 400 proteínas y enzimas utilizando *P. pastoris* con este sistema (Tabla 1) (Cereghino and Cregg, 2000). Aparte de servir como sistema de expresión de proteínas heterólogas, *P. pastoris* también es utilizado como modelo

de investigación en rutas de secreción de proteínas y fisiología de peroxisomas (Payne *et al.*, 2000).

Tabla 1. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas con *P. pastoris*

Proteínas/ Enzimas	Referencia
BoNT/A(Hc) (Fragmento C de cadena pesada de la neurotoxina botulínica, serotipo A)	Zhang <i>et al.</i> ,2000
Angiostatina	Xie <i>et al.</i> , 2004
A33scFv (Fragmento del anticuerpo)	Damasceno <i>et al.</i> , 2004
Interferón humano $\alpha 2b$	Ayed <i>et al.</i> ,2007
MSP3 (Proteína de la superficie del merozoito -3)	Wang <i>et al.</i> , 2005
CBD-lipasa (Proteína de fusión)	Jahic <i>et al.</i> , 2002
rAcAP-5 (péptido anticoagulante)	Inan <i>et al.</i> , 1999
srAFP (proteína anticongelante)	Thorpe <i>et al.</i> , 1999
Fitasa	Hang <i>et al.</i> , 2010; Guo <i>et al.</i> , 2007
Lacasa	Hong <i>et al.</i> , 2002
Glicerol kinasa	Aizemberg <i>et al.</i> , 2011
α-galactosidasa	Inanand Meagher, 2001
Lacasa*	López <i>et al.</i> ,2010

Nitrato reductasa (S-NaR 1)	Barbier <i>et al.</i> ,2004
-----------------------------	-----------------------------

* Medio sólido.

1.2. Metabolismo de glucosa en *P. pastoris*

Al igual que otras levaduras Crabtree negativas que producen etanol cuando son sometidas a altas concentraciones de glucosa, (sección 1.4) *P. pastoris* presenta en la membrana plasmática un sistema de transporte de glucosa de alta afinidad “simport H⁺”, el cual, a diferencia, de la difusión facilitada presente en levaduras Crabtree positiva (*Saccharomyces cerevisiae*), restringe la entrada de glucosa a la célula evitando la formación de metabolitos principalmente etanol (metabolismo de desbordamiento) (Van Urk *et al.*, 1989).

Se ha informado, que para el consumo de glucosa *P. pastoris* regula el transporte hacia el interior de la célula mediante los genes *PIPA02561* y *PIPA00372* que codifican cada uno para un transportador de glucosa de alta afinidad (65% de similitud al transportador Hgt1 de *Kluyveromyces lactis*), así mismo posee 2 genes que codifican transportadores de baja afinidad, contrario a *S. cerevisiae* que contiene 20 genes para transportadores de glucosa de alta y baja afinidad (Mattanovich *et al.*, 2009).

Por otra parte, *P. pastoris* presenta las mismas rutas metabólicas que las ya descritas en *S. cerevisiae* (Jordá *et al.*, 2012; Solá *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2000). Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada por hexoquinasas a glucosa-6-fosfato y ésta pasa por varias reacciones para ser transformada en las triosas dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato (Figura 1), las cuales después de varias reacciones dan lugar a dos moléculas de piruvato, con la consecuente liberación de ATP.

En condiciones anaerobias, el piruvato puede ser convertido a etanol, mediante la descarboxilación del piruvato por la enzima piruvato descarboxilasa liberando CO₂, posteriormente el acetaldehído formado es reducido a etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa. Por otro lado, en condiciones aerobias, el piruvato es oxidado a CO₂ a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 1), también conocido como ciclo de Krebs, el cual es considerado como el centro del metabolismo, siendo ésta la vía de oxidación de la mayoría de los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos y a su vez generando numerosos metabolitos intermediarios de otras rutas metabólicas como el citrato,

succinato o el oxaloacetato, por lo tanto se considera como un ciclo anfibólico, es decir opera tanto catabólica como anabólicamente (Lenhinger, 1993).

Una de las rutas alternativas a la glucólisis es la vía de las pentosas fosfatos, la cual se encarga de oxidar la glucosa, principalmente anabólica con el fin de generar NADPH y pentosas. Levaduras osmotolerantes como *Debaryomyces nepalensis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Metschnikowia reukaufii* AJ14787, *Pichia miso* y *Pichia pastoris*, entre otras, utilizan esta ruta para producir D-arabitol en presencia de altas concentración de azúcares y sales inorgánicas, el cual sirve como soluto compatible con las funciones de las enzimas (Kumarand Gummadi, 2011; Baumann *et al.*, 2010; Carnicer *et al.*, 2009; Nozaki *et al.*, 2003; Morán and Witter, 1979; Onihsi, 1960). Dicha producción comienza con la desfosforilación de la D-ribulosa-5-fosfato obteniéndose D-ribulosa posteriormente esta molécula es reducida mediante la enzima D-arabitol deshidrogenasa unida a NADPH, generándose así D- arabitol (Figura 1).

Algunos análisis han mostrado que aproximadamente el 50% de la glucosa-6-fosfato es metabolizada vía glicolisis y 30% a través de la vía de las pentosas fosfato en levaduras Crabtree-negativas, sin embargo el 90% del carbono que entra a través de la ruta de las pentosas fosfato reingresa a la glicolisis en el nivel de fructosa-6-fosfato o gliceraldehido-3-fosfato (Rodríguez *et al.*, 2006).

1.2. Metabolismo de glicerol

Mientras que 2 genes codifican para el transporte de glucosa en *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2006) para el transporte de glicerol en la membrana plasmática han sido reportados 4 diferentes transportadores de alta afinidad (simportH⁺) (*PIPA00047*, *PIPA09569*, *PIPA03381* y *PIPA03357*) los cuales son altamente similares a los ya reportados para *Kleuveromyces lactis*, *Yarrowia lipolitica* y en contraste poco similares al gen St1 reportado para *S. cerevisiae* (Mattanovich *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2005).

A diferencia de la glucosa, el glicerol es un polialcohol de bajo peso molecular (92 g/mol), presentando un grado de reducción mayor al de la glucosa ($H/C_{\text{glicerol}}= 4.6$ y $H/C_{\text{glucosa}}=4.0$), con una mayor cantidad de electrones disponibles para ser transferidos al oxígeno y así mediante una serie de reacciones obtener más ATP (Verduyn *et al.*, 1991; Erickson *et al.*,

1978). Actualmente es el principal subproducto de la fabricación del biodiesel por lo que su costo es cada vez menor.

Cuando el glicerol es utilizado como sustrato accede a las mismas rutas metabólicas dentro de la célula que *S. cerevisiae*, a excepción de que su recorrido comienza con la fosforilación por la glicerol quinasa formando glicerol 3-fosfato, posteriormente es oxidado por la glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa a dihidroxiacetona fosfato, la cual entra en la vía de la glucólisis (Figura 1). A comparación de la molécula de glucosa que entra desde el inicio de la vía glucolítica, la molécula de glicerol comienza su asimilación en la parte de la generación de las triosas, es decir, entra directamente a la generación de energía y biomasa (Ren *et al.*, 2003) (Figura 1). Por otra parte, al tener un grado de reducción mayor al de la glucosa se obtiene un mayor rendimiento celular ya que no genera la misma cantidad de moles de CO₂ durante su oxidación lo cual puede llevar a que se destine una mayor cantidad de carbono a la generación de biomasa (Mathews *et al.*, 2013; Verduyn *et al.*, 1991).

Por otro lado, la síntesis de glicerol es común en algunos microorganismos (levaduras y hongos) en respuesta a ciertos tipos de estrés (osmótico, térmico y oxidante), o condiciones de cultivo (pH ácido), así como medio para mantener el balance redox (NADH, NAD, ATP y ADP) (Cronwright *et al.*, 2002; Albertyn *et al.*, 1994; Olz *et al.*, 1993). Tal proceso es regulado (en *S. cerevisiae*) principalmente por el gen GPD1 (Ansell *et al.*, 1997; Albertyn *et al.*, 1994), dicha síntesis comienza con la reducción de una molécula de dihidroxiacetona fosfato dando glicerol 3-fosfato mediante la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, posteriormente la molécula formada sufre una desfosforilización mediante la enzima glicerol 3-fosfatasa dando como resultado glicerol (Figura 1) (Cronwright *et al.*, 2002).

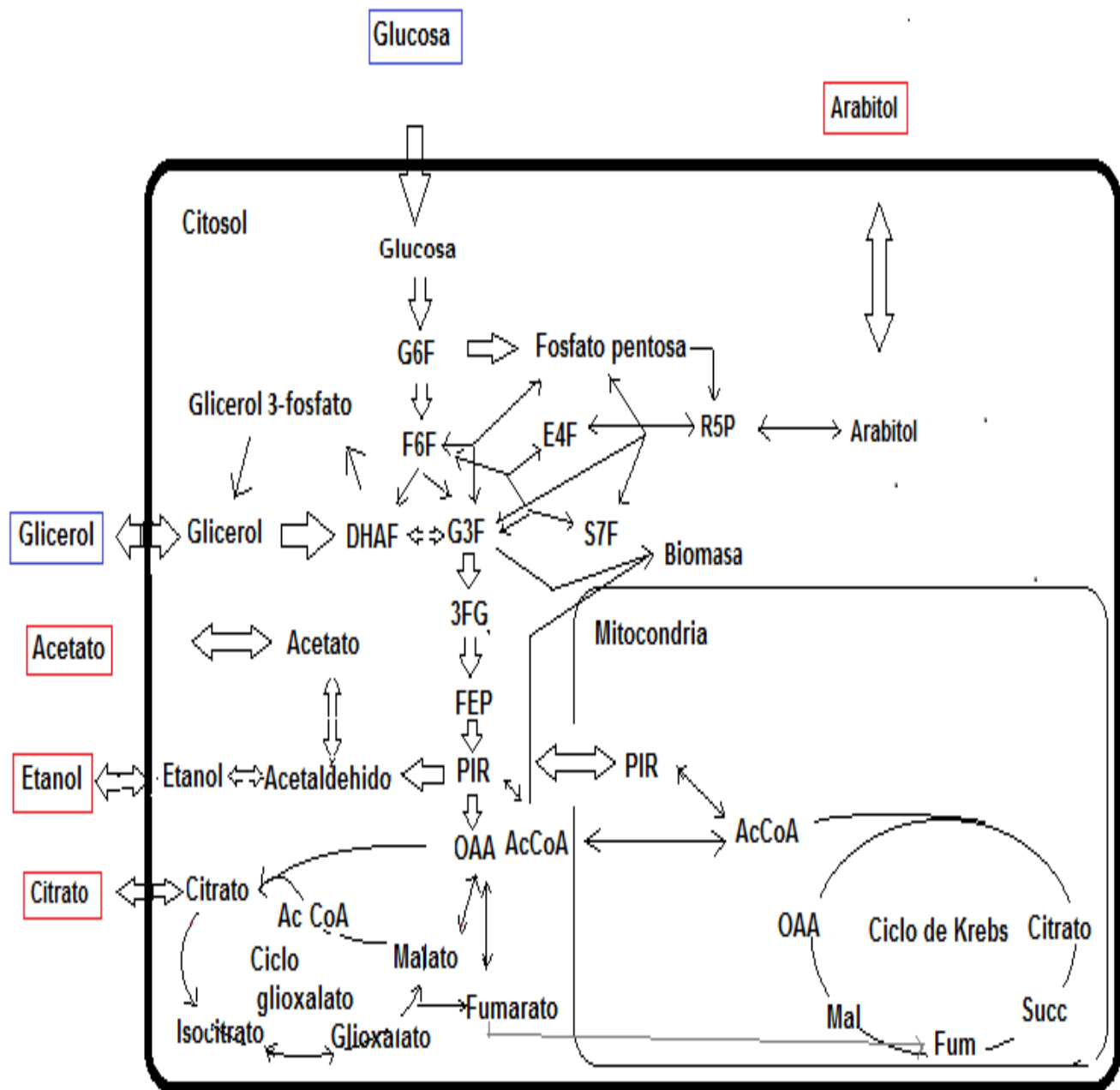


Figura 1. Rutas metabólicas de *P. pastoris* utilizando glucosa o glicerol como fuente de carbono (modificada de Soláet *al.*, 2004). G6F, glucosa 6-fosfato; F6F, fructosa 6-fosfato; DHAF, dihidroxiacetona fosfato; G3F, gliceraldehído 3-fosfato; 3FG, 3-fosfatoglicerato; FEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; OAA, oxaloacetato; AcCoA, acetil Coenzima A; E4F, eritrosa 4-fosfato; S7F, pseudoheptulosa 7-fructosa; R5P, ribulosa 5-fosfato; Mal, malato; Fum, fumarato; Succ, succinato.

1.3. Energía de mantenimiento

Durante el crecimiento los microorganismos destinan parte de la energía obtenida del consumo de sustrato a diferentes funciones biológicas o mantenimiento celular, como son: la síntesis de material celular; el mantenimiento del gradiente osmótico entre la célula y el medio, así como la conservación del pH interno y en algunos casos la motilidad celular (Imai and Ohno, 1995; Olz *et al.*, 1993; Pirt, 1975). Existen diferentes formas de calcular el coeficiente de mantenimiento y son a partir del consumo del sustrato (Pirt, 1975) y la producción de CO₂ y el consumo de O₂ (Lareo *et al.*, 2006); dicho valor puede ser influenciado por las condiciones de cultivo, como son la tasa de alimentación y la concentración de sales, etc. (Jahic *et al.*, 2002; Olz *et al.*, 1993). Además, cada tipo de microorganismo presenta diferentes valores de coeficiente de mantenimiento, así mismo entre mayor sea el coeficiente de mantenimiento menor es la concentración de biomasa obtenida, ya que se destina mayor cantidad de energía para otras funciones biológicas que para la síntesis celular. La energía destinada al mantenimiento homeostático celular debe ser entendida como la adecuación de la fisiología celular para lograr una adaptación óptima al medio donde está creciendo.

1.4. Efecto Crabtree

Inicialmente, el término Crabtree fue empleado para describir la inhibición de la capacidad respiratoria después la adición de alguna hexosa en algún tejido (Ibsen, 1961). Actualmente este término está asociado a levaduras en estado de crecimiento como *S. cerevisiae*, las cuales pasan de un metabolismo respiratorio a uno completamente fermentativo como respuesta a un incremento de la concentración de azúcar bajo condiciones aerobias (Van Urk *et al.*, 1989; Decken, 1965). Esta respuesta, que es instantánea, también es conocida como efecto Crabtree a corto plazo, y es seguido por adaptaciones a largo plazo que involucra respuesta de represión de enzimas respiratorias (Rodríguez *et al.*, 2006; Van Urk *et al.*, 1989).

Ahora bien, las levaduras que presentan esta respuesta al cambio de concentración se les conoce como levaduras Crabtree positivas, por otro lado, aquellas levaduras que no presentan dicho comportamiento son conocidas como levaduras Crabtree negativas (Tabla 2).

Tabla 2. Levaduras Crabtree positivas y Crabtree negativas.

Levaduras Crabtree positivas	Levaduras Crabtree negativas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces fragilitis</i>
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Saccharomyces italicus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Saccharomyces oviformis</i>	<i>Candida monosa</i>
<i>Saccharomyces pasteurianus</i>	<i>Trichosporon fermentans</i>
<i>Saccharomyces turbidans</i>	<i>Trichosporon sphaerica</i>
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Trichosporon sake</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Hansenula anómala</i>
<i>Debaryomyces globosus</i>	<i>Hansenula nonfermentans,</i>
<i>Brettanomyces lambricus</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Torulopsis dattila</i>	<i>Pichia stiptis</i>
<i>Torulopsis colliculosa</i>	<i>Kluveromyces marxianus</i>
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Nematospora coryli</i>	
<i>Nadsonia fulvescens</i>	

Varios trabajos se han llevado a cabo para explicar dicho comportamiento: Deken (1965) observó que las levaduras Crabtree negativas son incapaces de formar cepas mutadas con deficiencia en la capacidad respiratoria cuando son crecidas en euflavina (agente mutágeno que afecta la síntesis del citocromo a y b en las células), en contraste, las levaduras Crabtree positivas dan lugar a cepas mutadas con deficiencia respiratoria en presencia de euflavina debido a que pueden emplear un metabolismo fermentativo para obtener energía (ATP) para su crecimiento. Por otro lado, Van Urk *et al.* (1989) trabajando con 8 cepas diferentes de levaduras en medio sumergido, observaron que aquellas Crabtree negativas (*C. utilis*, *H.*

nonfermentans, *K. marxianus*, *P. stiptis*) consumían glucosa a través de un sistema activo, symport H^+ , mediante uno o varios transportadores, en contraste con las levaduras Crabtree positivas (*S.cerevisiae*, *C. glabrata*, *S.pombe*), se observó el transporte de glucosa a través de difusión facilitada, así mismo se observó la producción de etanol en este último grupo de levaduras después del aumento de la concentración de glucosa, contrario con las levaduras Crabtree negativa. Por su parte, Postman *et al.*(1989) se refieren al efecto Crabtree como una limitación de la actividad enzimática (Acetil-CoA) a altas concentraciones de glucosa y no a una represión de las enzimas respiratorias (Deken, 1965) que a su vez mediante varios procesos más da lugar a la formación de etanol.

Por último, aunque *P pastoris* es conocida como Crabtree negativa, bajo limitaciones de oxígeno, altas tasas de consumo de sustrato o altas concentraciones de sustrato, se observa cierta producción de etanol, así como producción de polioles y algunos ácidos orgánicos (Figura 1) (Baumann *et al.*, 2010; Carnicer *et al.*, 2009); sin embargo, si se mantiene una adecuada oxigenación al medio, se logra obtener cultivos con altos rendimientos celulares, $Y_{x/s}$, sin la producción de los metabolitos secundarios antes mencionados.

1.5. Cultivo en medio sólido (CMS)

Pandey (2003) define el cultivo en medio sólido como “El cultivo que involucra sólidos en ausencia (o casi ausencia) de agua libre, es decir, sobre sustratos que deben tener suficiente agua para soportar el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos”. Por su parte, Viniegra-González and Favela-Torres, (2006) dan una breve definición del cultivo en medio sólido refiriéndose a éste como “El crecimiento celular sobre la superficie sólida de materiales porosos (biodegradables o no)”.

Comparado con el cultivo en medio sumergido, el cultivo en medio sólido ofrece una gran variedad de ventajas como el empleo de desechos agroindustriales como soporte sólido o como de fuente de nutrientes lo que permite abaratar el proceso (Tabla 3) (Holker *et al.*, 2004), adicionalmente el cultivo en medio sólido permite el abaratamiento puesto que no requiere agitación. Otra ventaja interesante se circunscribe a que al exponer mayor superficie a la parte aérea del cultivo facilita una mayor disponibilidad de oxígeno, lo cual puede optimizarse en términos de altos rendimientos de producto y biomasa. Por otra parte también

ha sido descrito la ausencia de represión catabólica en estas condiciones de cultivo (Viniegra-González *et al.*, 2003; Pandey, 2003).

Tabla 3. Ejemplos de compuestos producidos en medio sólido utilizando diferentes microorganismos y soportes sólidos. Tabla modificada de Prabhakat *et al.* (2005)

Proceso/ producto	Sustrato	Micorganismo
Ácido cítrico	Bagazo de yuca	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido láctico	Bagazo de caña de azúcar	<i>Rhizopus oryzae</i>
Biopesticidas	Residuo de papa	<i>Beauveria bassiana</i>
Hormonas	Cáscara de café	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Goma de xantano	Bagazo de caña de azúcar	<i>Xanthomonas campestris</i>
Cultivo de células vegetales	Bagazo de caña de azúcar	<i>Malus prunifolia borkh</i>
Amilasas	Bagazo de yuca	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Proteasas	Torta de soja desgrasada	<i>Penicillium sp.</i>

1.6. Soportes sólidos

El cultivo en medio sólido puede ser dividido en dos grupos dependiendo de su naturaleza, en el primer grupo están aquellos que emplean los residuos agroindustriales como por ejemplo cascara de arroz, bagazo de caña, salvado de trigo, arroz, aserrín, residuos de frutas, etc., (figura 2a, 2b, 2c) los cuales sirven como soporte del crecimiento y como fuente de nutrientes, y que se caracterizan por ser susceptibles de experimentar cambios en la geometría y por ende en sus características físicas, consecuentemente la transferencia de calor y masa puede reducirse, adicionalmente se forman residuos sólidos al final del proceso (Oojkaas *et al.*, 2000). Por otro lado, están los materiales inertes no degradables como la espuma de poliuretano (EPU), amberita, vermiculita, gránulos de arcilla, cáñamo, partículas de puzolana, etc. (Figura 2d, 2e, 2f) (Zhu *et al.*, 1994; Christen *et al.*, 1993), que son utilizados como soporte del crecimiento sin formación de residuos, ya que son reusables, además desde un punto de vista comparativo respecto de los cultivos con los residuos agroindustriales, la composición nutricional del medio líquido con la que se impregna el

soporte, es definida permitiendo procesos reproducibles (Oojkaas *et al.*, 2000), así mismo, los costos en separación de estos productos son menores a lo habitual en cultivos con residuos agroindustriales.

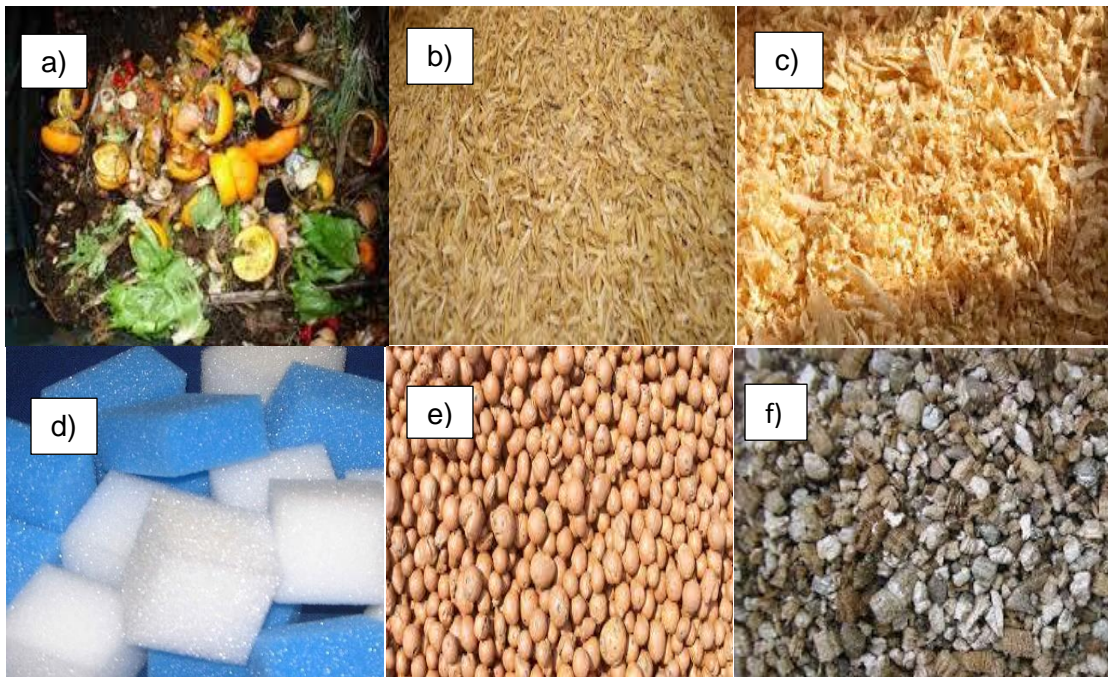


Figura 2. **Materiales usados en el cultivo sólido, degradables y no degradables; a) residuos de fruta, b) casacarilla de arroz, c) aserrín, d) EPU, e) gránulos de arcilla y f) vermiculita.**

Particularmente, la espuma de poliuretano que es un material plástico formado por la agregación de burbujas, tiene la ventaja de que a lo largo de los cultivos su geometría no varía, por lo que la transferencia de calor y masa son constantes, otra característica es que la mayoría de su volumen está ocupado por aire, esta propiedad junto a una relación área volumen de 333 cm^{-1} resulta en una apropiada difusión de gases (López *et al.*, 2010; Oojkaas *et al.*, 2000), permitiendo alcanzar altas densidades celulares mediante un metabolismo respiratorio.

1.7. Evaluación de la producción de biomasa en cultivo en medio sólido

La medición del consumo de O_2 o la producción de CO_2 han sido frecuentemente son usados como estimación indirecta de la producción de biomasa, el rendimiento celular, la tasa específica de crecimiento, además de servir como un método para evaluar el estado fisiológico de los cultivos aeróbicos, así como la eficiencia energética de crecimiento, etc. (Anderlei *et al.*, 2003; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994).

A este respecto, Saucedo-Castañeda *et al.* (1994) diseñaron un equipo con el cual se puede llevar a cabo el seguimiento en tiempo real de la producción de CO₂ y el consumo del O₂, conocido como Metabolímetro (Figura 3). Este sistema está constituido de un condensador para separar la humedad, una columna con sílica gel, analizadores individuales de O₂ y CO₂ (polarográfico e infrarrojo, modelo OM11 y LB-2 respectivamente, Sensor Medics, California, USA), bombas de membrana (Sensor Medics, California, USA), una tarjeta de interfase analógica-numérica (Digimetrix, GS-ADC12B16V4G, USA), una electroválvula (Sirall Protello, Italia) por cada tubería de entrada de aire proveniente de las fermentaciones y una computadora personalizada. El aire es suplementado a una presión de 0.2 bar.

Una de las principales características de este sistema es que se puede analizar simultáneamente la concentración de CO₂ y O₂, sirviendo como parámetros del control del proceso aeróbico.

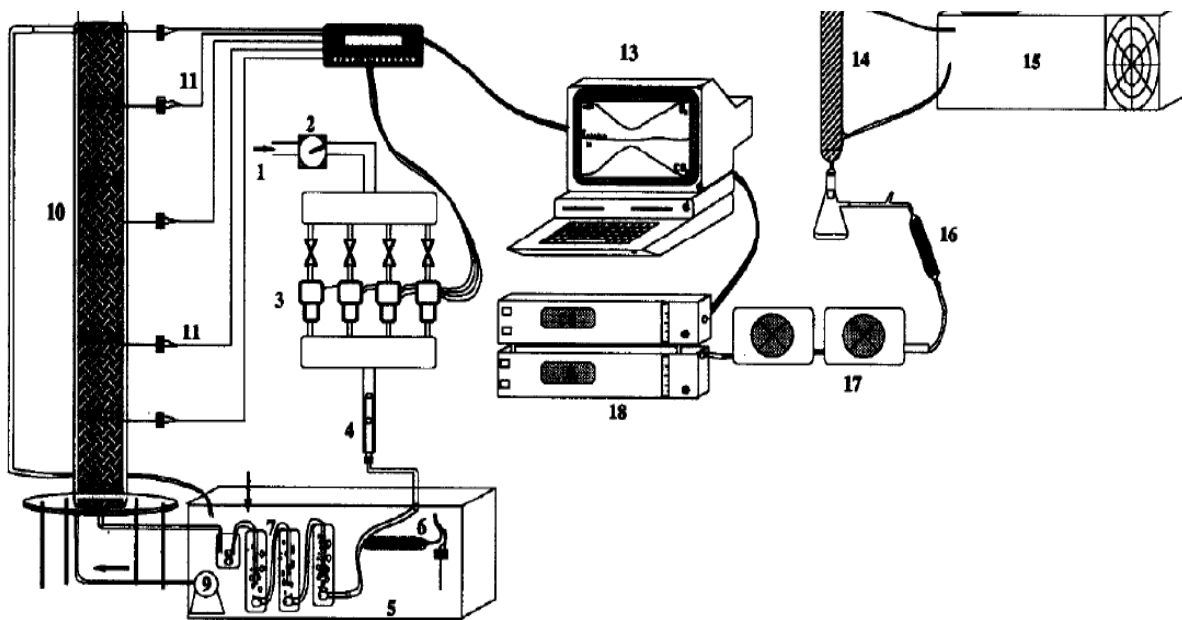
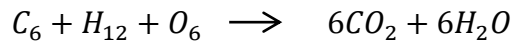


Figura 3. a) Sistema de monitoreo de gases para procesos aerobios en línea, 1) tubería de aire comprimido; 2) regulador de presión de aire; 3) electroválvulas; 4) rotámetro; 5) baño de agua con temperatura controlada; 6) calentador; 7) humificador de aire; 8) trampa de agua; 9) recirculador; 10) columnas de fermentación; 11) sondas de temperatura; 12) interface analógica numérica; 13) computadora; 14) condensador; 15) enfriador de agua; 16) columna con sílica gel; 17) analizador de CO₂ y O₂; 18) bombas. Imagen tomada de Saucedo-Castañeda *et al.* (1994).

1.8. Cociente respiratorio (CR)

Se entiende como cociente respiratorio a la relación estequiométrica entre el CO₂ producido y el O₂ consumido, este último necesario para oxidar completamente el sustrato a biomasa y CO₂, fácilmente calculado si se tiene registro de estos dos como se ilustra a continuación.

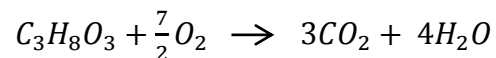
Cociente respiratorio (CR) teórico de la glucosa



$$CR = 6 \text{ mol } CO_2 \text{ producido} / 6 \text{ mol } O_2 \text{ consumido}$$

$$CR = 1$$

Cociente respiratorio (CR) teórico del glicerol



$$CR = 3 \text{ mol } CO_2 / \frac{7}{2} \text{ mol } O_2 \text{ consumido}$$

$$CR = 0.86$$

Cabe mencionar que dependiendo del microorganismo y el metabolismo que emplee se obtienen distintos valores del CR. En general cuanto más bajo es el CR de un sustrato, se consume más oxígeno por mol de carbono oxidado y mayor es el potencial de generación de energía por mol de sustrato.

Cuando existe algún tipo de limitación de O₂ en el medio, algunos microorganismos como las levaduras Crabtree negativas (*P. pastoris*) que son sensibles a tales condiciones comienzan a producir metabolitos parcialmente oxidados, como el etanol, ácido cítrico, ácido acético y arabitol (Baumann *et al.*, 2010), generando cambios en el CR.

Por tanto, el CR sirve para dar seguimiento a la fisiología de crecimiento, por ejemplo, una de las aplicaciones de este parámetro fue ilustrado por Hang *et al.* (2009) quienes llevaron a cabo una estrategia de control de producción de metabolitos por parte de *P. pastoris* en medio líquido, en donde se aseguró el metabolismo respiratorio mediante el suministro de glucosa, guiándose por las variaciones del CR, de tal forma que no hubiese represión del catabolismo por parte de la glucosa. Por su parte, los resultados reportados por Anderlei *et al.* (2004)

mostraron que al pasar de un metabolismo respiratorio a uno mixto (aerobio-fermentativo) debido a la insuficiencia de oxígeno, el cociente respiratorio en *P. stiptis* (levadura Crabtree negativa) sobrepasó el valor teórico ($CR \approx 3$). Por otro lado, Guo *et al.* (2007) trabajando con *P. pastoris* utilizaron distintos sustratos con diferentes relación H/C (glucosa y glicerol) en la etapa de crecimiento reportando distintos valores del CR, en el caso de los cultivos con glucosa, el CR pasó de 0.4 al inicio del cultivo a 0.95 ($CR \approx 1$) mientras que en los cultivos con glicerol paso de 0.1 al inicio del crecimiento a 0.65 ($CR < 0.86$). Es importante resaltar que el CR al inicio del cultivo en muchos trabajos reportados no comienza desde cero sino que presenta valores altos en una primera etapa; ahora bien, aunque no se reportan mediciones de productos en los cultivos con glicerol podemos deducir la existencia de ellos debido a los bajos rendimientos celulares reportados, teniendo un $Y_{x/s} = 0.51 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ cuando el valor teórico es de $Y_{x/s} = 0.8 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$.

2. Antecedentes

Hasta la fecha los estudios de la fisiología de *P. pastoris* han sido llevados a cabo en lote alimentado en medio líquido; sin embargo, la necesidad de mejorar las condiciones de producción hace que se aborden otros métodos de cultivo. Recientemente se ha llevado a cabo su cultivo en medio sólido utilizando EPU y como fuente de carbono glicerol o glucosa, a continuación brevemente describiremos dichos trabajos:

- ❖ López *et al.* (2010) compararon la producción en matraz agitado y en estado sólido utilizando EPU como soporte sólido y glicerol como sustrato de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* utilizando *P. pastoris* como sistema de expresión.
- ❖ Núñez (2012) estableció las condiciones de crecimiento en medio sólido en un sistema de columnas utilizando EPU y a diferentes concentraciones de glucosa, encontrando una relación entre la concentración del sustrato y el cociente respiratorio.

3. Justificación

Existe poca información sobre el comportamiento fisiológico de *P. pastoris* en medio sólido utilizando glucosa o glicerol como sustrato y las condiciones que permitan mejorar sus rendimientos celulares, esta trabajo pretende profundizar en el estudio de la fisiología microbiana de *P. pastoris*, este tipo de cultivos lo cual podría aplicarse a nivel industrial para la

producción de proteínas heterólogas de interés humano puesto que hasta la fecha solo se ha realizado en medio sumergido.

4. Hipótesis general

El bajo cociente respiratorio de *P. pastoris* en CMS en condiciones de altas concentraciones de glucosa y glicerol se relaciona con la producción de metabolitos y el bajo rendimiento de la producción de biomasa.

5. Objetivo general

- ❖ Relacionar los valores del cociente respiratorio de *P. pastoris* en CMS con la producción de metabolitos.

5.1. Objetivos particulares

- ❖ Formular el medio de cultivo idóneo para la producción de biomasa en cultivo en medio sólido.
- ❖ Realizar cinéticas de crecimiento con *P. pastoris* en medio sólido utilizando EPU como soporte y glucosa como fuente de carbono a concentraciones de 50,100 y 150g/L.
- ❖ Realizar cinéticas de crecimiento con *P. pastoris* en medio sólido utilizando EPU como soporte y glicerol como fuente de carbono a concentraciones de 50,100 y 150g/L.
- ❖ Realizar mediciones de la concentración de sustrato y metabolitos producidos en las cinéticas con glucosa o glicerol como fuente de carbono.
- ❖ Obtener los coeficientes de mantenimiento (m), para CO₂, O₂ y consumo de sustrato.
- ❖ Realizar los balances de carbono para las cinéticas con glucosa o glicerol.
- ❖ Relacionar el cociente respiratorio con los balances de carbono.

6. Metodología

La Figura 4 representa la metodología empleada en el presente trabajo. Como primera medida, se mantuvo y conservó la cepa en condiciones ideales durante todo el tiempo que llevó el trabajo experimental. En cuanto a la etapa experimental, se inició con cultivo en medio líquido con el fin de formular el medio de cultivo y tener una mejor evaluación sobre los cambios del pH. Finalmente se realizaron las cinéticas de cultivo en medio sólido.

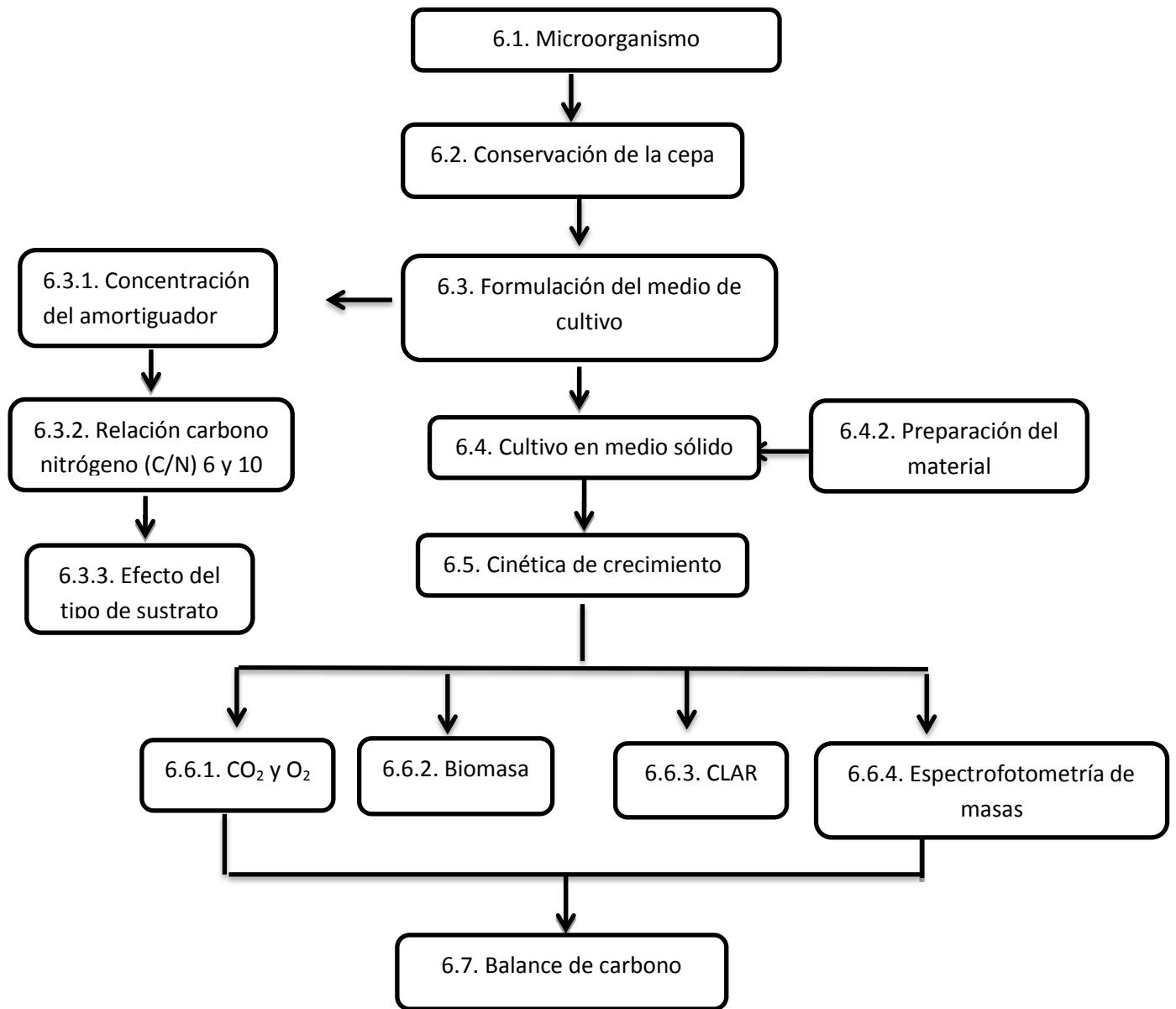


Figura 4. Metodología propuesta para este trabajo.

6.1. Microorganismo y preparación del inóculo

La cepa de *Pichia pastoris* utilizada en este trabajo fue proporcionada por la colección de microorganismos de la planta piloto de Fermentación sólida (Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa).

La activación de la cepa y los experimentos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de 150 mL con 30mL de medio YPD (g/L; extracto de levadura, 10; peptona, 10; glucosa, 10) a 30°C y 150rpm. El cultivo de activación (medio semilla) duró 24 horas. Para las cinéticas en medio líquido, el tamaño de inóculo estuvo entre 0.02 a 0.04mg_{biomasa}/mL (100µL). Para las cinéticas en medio sólido, el inóculo se obtuvo del medio semilla y fue centrifugado a 10,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente el pellet fue lavado con solución salina al 0.9% y por último se preparó por dilución el inóculo con una concentración de 2×10^7 cel/g EPU.

6.2. Conservación de la cepa a corto y largo plazo

Para la conservación a corto plazo, las células de *P. pastoris* fueron propagadas en tubos inclinados con medio YPDA (g/L; extracto de levadura, 1; peptona de carne, 2; glucosa, 2; agar bacteriológico, 2) e incubados a 30°C por 3 días, posteriormente el tubo fue almacenado a 4°C para su conservación a corto plazo.

La conservación a largo plazo se realizó en crioviales, para lo cual se tomó medio YPD con células de cultivos de 24 horas y se le adicionó 20% de glicerol estéril, posteriormente se almacenó a – 80°C hasta su activación para cada fermentación.

6.3. Preparación de la composición del medio de cultivo idóneo para el crecimiento celular en medio sólido.

El medio de cultivo fue formulado realizando una modificación del medio propuesto por Núñez (2012) (Aizemberg *et al.*, 2011). La composición general del medio de cultivo se describe en el anexo 5. La temperatura y la velocidad de agitación para las diferentes pruebas realizadas en medio líquido fueron 30 °C y 150rpm, mientras que el volumen de trabajo fue 30 de ml contenidos en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Los ajustes de pH en los cultivos en general, fueron realizados antes de llevarse a cabo la esterilización del medio de cultivo (121°C a 15lb/plg²por 15 minutos) (Anexo 5). Cada serie de pruebas fue realizada por triplicado.

6.3.1. Efecto de la concentración del amortiguador sobre el crecimiento de *P. pastoris* cultivada en medio líquido

Se probaron diferentes concentraciones de amortiguador fosfato (pH 6.0), las cuales fueron: 50, 100, 150mM y su control sin amortiguador (Anexo 4). La composición del medio de cultivo esta descrita en el anexo 5. Las cinéticas fueron realizadas bajo las condiciones de cultivo descritas en la sección 6.3. La relación carbono nitrógeno (C/N) que se utilizó en esta serie de experimentos fue de 6.2 (Anexo 5)

6.3.2. Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre el crecimiento de *P. pastoris* cultivada en medio líquido

Posteriormente, se probó la relación C/N igual a 10 (Anexo 5), a dos concentraciones de amortiguador de fosfatos (pH 6.0), 50 y 150 mM (Anexo 4). La composición del medio se describe en el anexo 5, Las condiciones de cultivo y muestreo trabajadas en esta parte se muestran en la sección 6.3.

6.3.3. Efecto del tipo de sustrato en el crecimiento de *P. pastoris* cultivada en medio líquido

Se comparó el crecimiento de *P. pastoris* utilizando glucosa o glicerol a una concentración inicial de 50 g/L, con amortiguador de fosfatos pH 6 a 150mM (Anexo 4), la relación C/N utilizada fue igual a 10 (Anexo 5). La composición química del medio de cultivo se muestra en el anexo 5. El tiempo de muestreo se redujo a 12 horas. Las condiciones de cultivo utilizadas en esta parte se presentan en la sección 6.3.

6.4. Cultivo en medio sólido

6.4.1. Formulación del medio de cultivo.

La composición del medio para realizar las cinéticas en medio sólido se describe en el anexo 5. En el caso de los medios con glucosa fue necesario esterilizar por separado el azúcar y las sales inorgánicas para evitar el efecto de caramelización del azúcar. Por otra parte, la relación C/N igual a 10 fue mantenida en cada concentración inicial de sustrato probada (Anexo 5). Las condiciones de trabajo son las descritas más adelante.

6.4.2. Preparación del material para el cultivo en medio sólido

La espuma de poliuretano usada en este trabajo fue de 0.7cm de grosor, cortada en tiras de 15x3cm y lavadas 2 veces con agua destilada, una con agua caliente y otra con agua a temperatura ambiente. Por último se secó a 60°C durante 24 horas para eliminar el agua. Posteriormente se esterilizó a 15lb/plg² a 121°C durante 15 minutos.

6.4.3. Sistema empleado para los cultivos en medio sólido.

El sistema para los cultivos en medio sólido fueron columnas de vidrio con dimensiones de 21x4cm, junto con humidificadores con dimensiones de 15x2.2cm, esterilizados a 15lb/plg² a 121°C por 15 minutos. Una vez inoculado el medio de cultivo se aplicó a cada tira de espuma en una relación de 15mL de medio por g de EPU, se aceleró la adsorción manualmente sobre una superficie plana en condiciones estériles. A cada columna de vidrio se le introdujeron 3 placas de EPU, separadas una de la otra por 2 tiras de malla plástica de 15x 3cm (Figura 5). El cultivo fue mantenido a temperatura de 30°C hasta el final de la cinética.

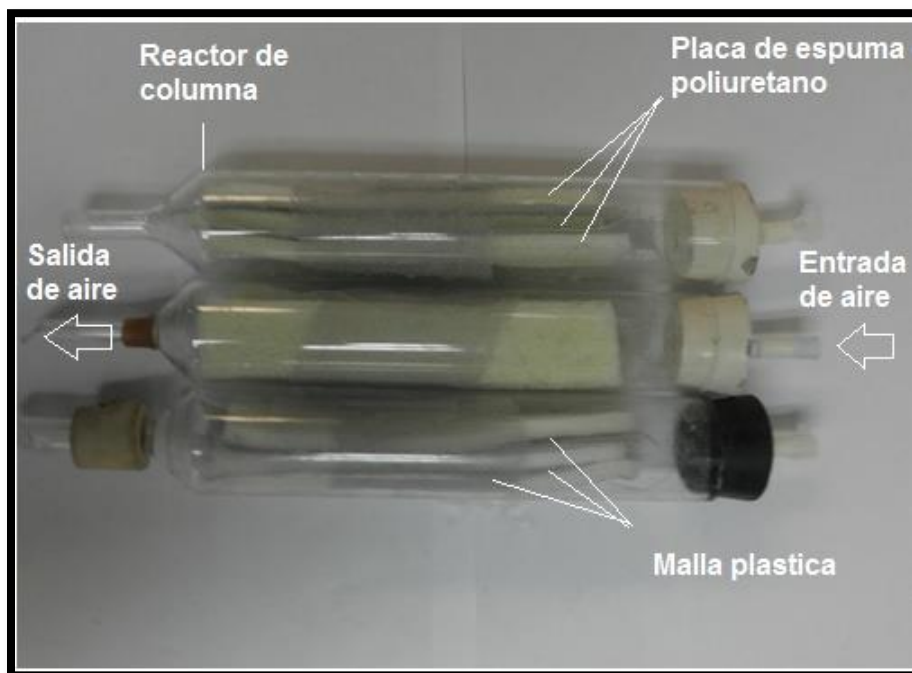


Figura 5. Sistema empleado para los cultivos en medio sólido

6.5. Procedimientos analíticos

6.5.1. Medición de CO₂ en cultivos en medio sólido

Cada columna fue conectada a una corriente de aire húmedo estéril con flujo de 50mL/min, el flujo de salida fue pasado a través de una columna con sílica para retener la humedad de la corriente del aire que a su vez es analizada por el metabolímetro (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Este equipo registra una señal eléctrica (A), y esta a su vez es procesada para arrojar datos relativos a la concentración de CO₂ y O₂ (% de gas/100mL de aire), posteriormente estos datos son capturados en Excel.

6.5.2. Biomasa

La estimación de la biomasa de los cultivos en matraz agitado y en medio sólido se llevó a cabo mediante la correlación de la turbidimetría medida con espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS, Thermo scientific) a 600 nm y el peso seco realizado usando la técnica de gravimetría por diferencias de peso respecto al filtro de membrana (diámetro de poro 0.45 µm). La curva estándar obtenida de la relación peso seco y la densidad óptica fue empleada en la determinación de la concentración de biomasa (Anexo 1).

Para la determinación de la biomasa en medio sólido, primero se realizó la extracción del medio de cultivo de una sola tira de espuma utilizando una jeringa de 50mL y posteriormente se lavó dos veces con 40mL de solución salina (0.9% NaCl), el volumen extraído fue recolectado en un tubo Falcon de 50mL, del volumen total se tomó 1mL y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, el cual se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se recolectó en un segundo tubo eppendorf para el análisis en cromatografía líquida de alta presión (sección 6.5.3), mientras que el precipitado fue lavado una vez con agua salina y nuevamente centrifugado a las mismas condiciones, la masa celular se suspendido en 1 mL de solución salina y agitado con vórtex para posteriormente medir la absorbancia (600nm), de ser necesario se diluyó la suspensión celular.

6.5.3. Cromatografía líquida de alta presión (CLAR)

La concentración de glucosa de los experimentos de la sección de cultivos en medio líquido fueron llevados a cabo mediante el método de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (Xiao *et al.*, 2004), mientras que la concentración de glicerol fue medido por CLAR (Perkin Elmer LC-250) con un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-290), utilizando una columna de intercambio iónico (Aminex HPX- 87H) a 40°C con flujo de la fase móvil (H_2SO_4 5mM) de 0.4mL/min, con un tiempo de corrida igual a 20 minutos (Ortiz-Muñiz *et al.*, 2010).

La medición de la concentración de glucosa, glicerol, etanol y ácido acético producidos en estado sólido, se realizaron por CLAR (Perkin Elmer LC-250), utilizando las condiciones descritas anteriormente. La concentración de ácido cítrico se determinó en un equipo cromatográfico Waters, con detector Waters[®] 2996 PDA (Detector de arreglo de fotodiodo), utilizando una columna C18 de fase reversa (Spherisorb ODS2 5 μ) a 30°C con flujo de la fase móvil (amortiguador de fosfatos, pH 2.4) de 1mL/min, con un tiempo de corrida de 5 minutos (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995). Las curvas estándar empleadas en la cuantificación de los sustratos y productos se presentan en el anexo 1.

6.5.4. Espectrometría de masas.

La presencia de D-arabitol en el sobrenadante del cultivo en medio sólido se confirmó por espectrometría de masas (Bruker MICROTOF II) a una presión de nebulizador de 0.3Bar, temperatura de 180°C, con flujo de gas de 4.0 mL/min, utilizando la técnica ESI-TOF (Ionización por electro-Spray), en dos diferentes modos: Ionización positiva e Ionización negativa (confirmación con el método positivo) (Anexo 3).

6.6. Balance de carbono

Una vez determinada la concentración de biomasa, producción de CO_2 y metabolitos formados en las diferentes concentraciones de glucosa y glicerol, se realizaron los balances de carbono como se describe en el anexo 7.

7. Resultados y discusión

7.1. Formulación del medio cultivo de *P. pastoris* en matraz agitado.

7.1.1. Efecto de la concentración de la solución amortiguadora sobre el crecimiento de *P. pastoris*.

En una primera etapa se probó el medio de cultivo a pH 6.0 con tres concentraciones de amortiguador de fosfatos, 50,100, 150mM y su control, con una relación carbono nitrógeno (C/N) igual a 6.2. En la figura 6a se presenta la producción de biomasa en las diferentes condiciones de cultivo, mientras que en la figura 6b se presenta el descenso del pH a lo largo del cultivo en medio líquido. Las curvas de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico, obteniéndose los valores de la producción máxima, X_m , así como las tasas máximas de crecimiento, μ_m .

La mayor concentración de amortiguador de fosfatos en el medio de cultivo mantuvo el valor del pH por encima del valor óptimo (pH 3.0), por otra parte, la adición del amortiguador de fosfatos aumentó la producción de biomasa respecto a los medios sin la solución reguladora, sobresaliendo los cultivos con una concentración de fosfatos 50mM en donde la producción de biomasa alcanzó una concentración de 26.22 g/L con una tasa de crecimiento igual a 0.03 h^{-1} , mientras que en los medios con 100 y 150mM la producción alcanzada fue 23.21 y 21.4 g/L respectivamente, con tasa de crecimiento en ambos casos de 0.06 h^{-1} , por el contrario, en los cultivos sin amortiguador la producción fue 6.67 g/L de biomasa con una tasa de velocidad igual a 0.07 h^{-1} .

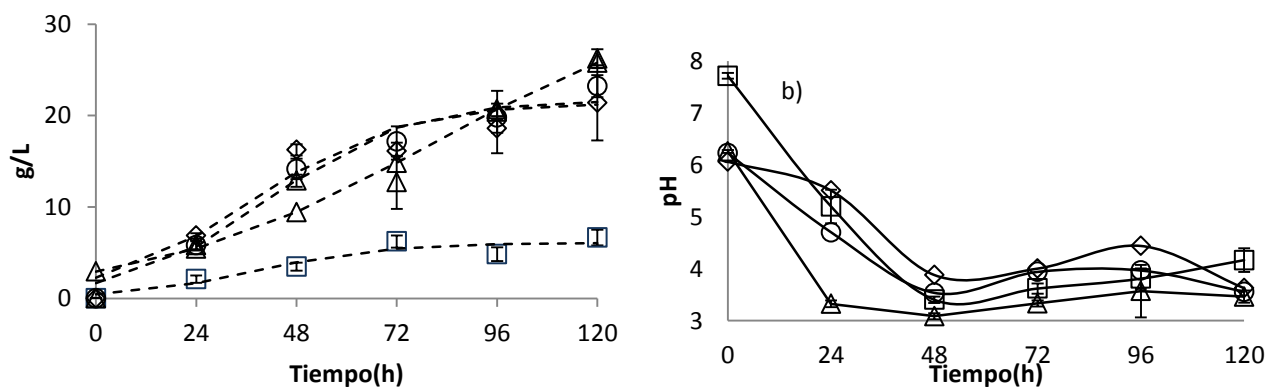


Figura 5. a) Producción de biomasa y b) descenso del pH a concentración de fosfato 50mM (Δ), 100mM (○), 150mM (◇) y sin amortiguador (□). Las líneas punteadas representan el ajuste logístico para cada condición.

7.1.2. Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre el crecimiento de *P. pastoris*

Posteriormente se analizó el efecto que ejerce una mayor relación C/N sobre la producción de biomasa, así como en el consumo de sustrato, dicho experimento fue llevado a cabo con dos concentraciones de amortiguador, 50 y 150mM, los resultados son ilustrados en las figuras 7a y 7b, los datos fueron ajustados al modelo logístico.

A una relación C/N igual a 10 el mayor crecimiento así como el consumo total del sustrato se presentaron los dos primeros días del cultivo, comparado con los cultivos con relación C/N igual a 6 que mantienen el crecimiento en el quinto día de cultivo. Por otra parte, la producción de biomasa respecto a lo encontrado en C/N de 6 se redujo un 15 y 45 % en los cultivos conteniendo amortiguador de fosfatos a concentración de 50 y 150 mM, respectivamente. Sin embargo, la mayor producción de biomasa se dio cuando se usó la concentración de 150 mM, la cual alcanzó una concentración de 18.19 g/L mientras que a concentración de 50mM se obtuvo 14.62 g/L, con una tasa de crecimiento 18 % menor a la obtenida con 150mM de fosfatos ($\mu_m = 0.55h^{-1}$). Por otro lado, el descenso del pH se mantuvo hasta un valor de 3.88 en los cultivos con 150 mM de amortiguador, contrario a lo obtenido en los cultivos a 50 mM donde el valor del pH fue de 2.98. Por último, los rendimientos, $Y_{x/s}$, obtenidos a concentración de 50mM y 150mM de amortiguador fosfatos fueron 0.30 y 0.37 $g_{biomasa} / g_{glucosa}$, respectivamente.

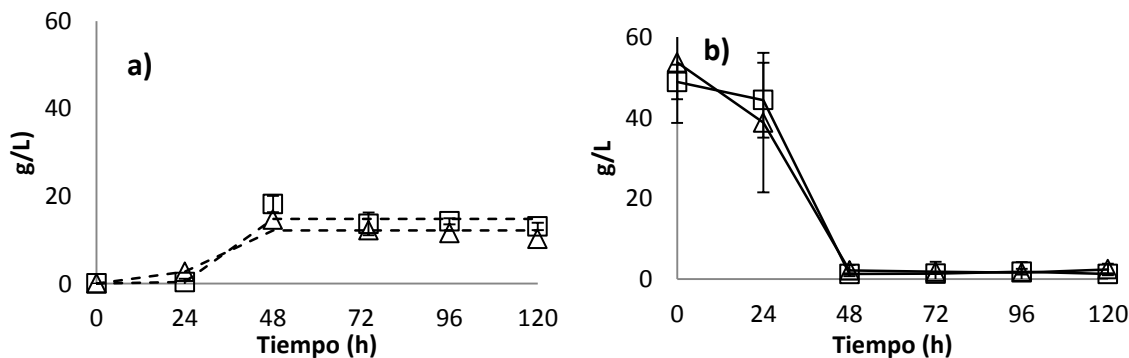


Figura 6. a) Producción de biomasa y b) consumo de sustrato, a concentración 50 mM (Δ) y 150 mM (\square) de fosfatos. Las líneas punteadas representan el ajuste logístico.

A partir de esta serie de experimentos se decidió usar el medio de cultivo con amortiguador de fosfatos a concentración de 150 mM y una relación C/N igual a 10 para todos los

experimentos sucesivos, incluyendo los cultivos con EPU, debido a su alta capacidad amortiguadora, al rápido crecimiento y al consumo total del sustrato

7.1.3. Efecto del sustrato sobre los parámetros de crecimiento de *P. pastoris* en medio líquido

Por último se comparó la cinética de crecimiento usando como sustratos glicerol o glucosa. Las figuras 8a y 8b indican el crecimiento celular y el consumo de sustrato, respectivamente. Los datos de las curvas de crecimiento se ajustaron a la ecuación logística para obtener los parámetros de X_m y μ_m .

Se observó que los cultivos con glucosa el 94 % de la producción máxima se había alcanzado durante las primeras 48 horas de crecimiento, mientras que en el caso de los cultivos con glicerol la producción máxima se alcanzó hasta las 72 horas de cultivo, correspondiendo a los valores obtenidos de μ_m siendo el más alto el obtenido con los cultivos con glucosa el cual fue 0.26 h^{-1} y en los cultivos con glicerol fue de 0.12 h^{-1} . Por otro lado, el consumo total de glucosa se dio durante las primeras 48 horas, en contraste, en los cultivos con glicerol el consumo después de las 60 horas fue del 53 % quedando 23.5 g/L de glicerol residual.

Respecto a los rendimientos obtenidos, el mayor valor calculado se presentó en los cultivos con glicerol el cual fue $0.44 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$, mientras que con glucosa el calor fue de $0.30 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$, por otra parte, el mayor descenso del pH en los cultivos con glicerol se alcanzó hasta las 72 horas (pH 3.7), mientras que en los medios con glucosa fue durante las primeras 36 horas (pH 4.91).

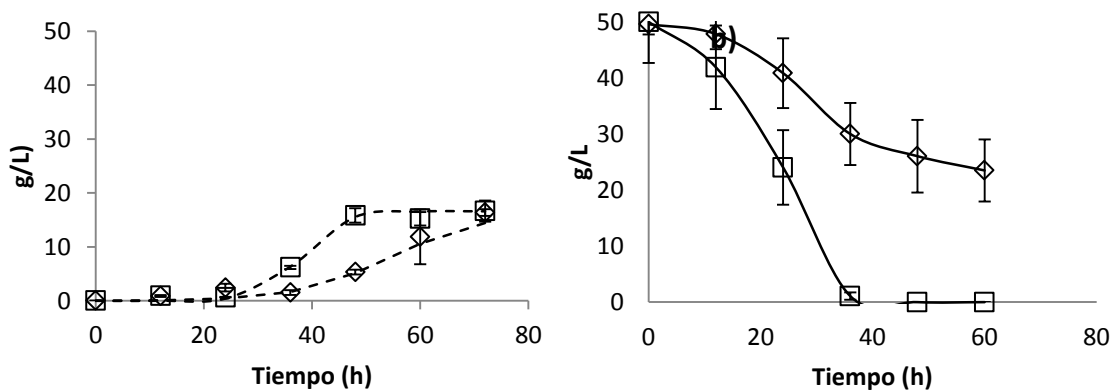


Figura 7. a) Producción de biomasa en medio con glucosa (□) y glicerol (◇), b) consumo de glucosa (□) y glicerol (◇), las líneas punteadas representan los ajustes con la ecuación logística.

Comparando los resultados con lo reportado en trabajos previos en medio líquido (Ghosalkar *et al.*, 2008; Hang *et al.*, 2009), se logró obtener hasta un 80 % del rendimiento con glicerol y glucosa, mientras que en el medio con glucosa, la tasa de crecimiento fue 61 % más alta que lo reportado por Hang *et al.* (2009) en medio sumergido.

8. Crecimiento de *P. pastoris* en cultivo en medio sólido

8.1. Efecto de la concentración del sustrato sobre el crecimiento

Se comparó el efecto que tiene la concentración de sustrato (glicerol o glucosa) a tres diferentes concentraciones: 50, 100 y 150 g/L, sobre los parámetros de crecimiento μ_m y X_m obtenidos por el ajuste al modelo logístico (Figuras 9a y 9b). Los valores de producción de biomasa fueron obtenidos con base en los gramos de soporte empleado ($g_{\text{biomasa}}/g_{\text{epu}}$).

Como se puede observar, a mayores concentraciones de sustrato se produjeron las máximas producciones de biomasa por gramo de sustrato; sin embargo, en el cultivo con 50 g/L de glucosa, la biomasa máxima se alcanzó en menos tiempo comparado con los cultivos con glicerol, se alcanzó una producción de 0.23 g/g_{epu} antes de 24 horas de cultivo, con una tasa de crecimiento igual a 0.46 h^{-1} . Por el contrario, en los cultivos con glicerol los bajos valores de μ_m reflejaron un crecimiento lento, sin embargo se obtuvieron las mayores densidades celulares (Tabla 6).

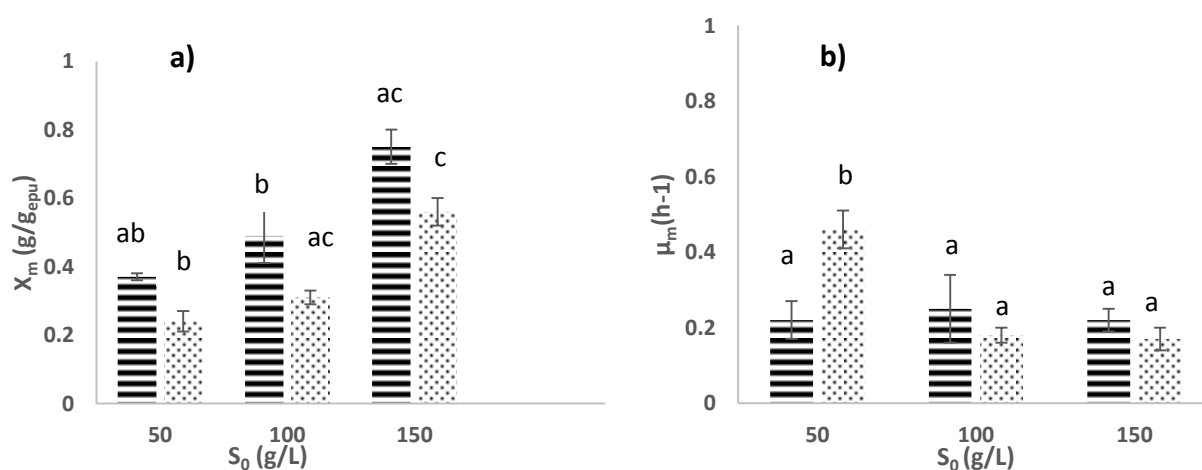


Figura 8. a) Efecto de la concentración inicial de sustrato inicial, S_0 (g/L)=50, 100 y 150g/L sobre a) la producción máxima de biomasa, X_m , y b) la tasa máxima de crecimiento específica, μ_m , utilizando glicerol (≡) o glucosa (⊙) como sustrato principal.

Comparando los resultados obtenidos en EPU a los obtenidos en matraz agitado a concentración inicial de sustrato de 50 g/L (sección 7.1.3), se observó una reducción cercana al 50 % en el tiempo de crecimiento (h) en los cultivos con glicerol y glucosa, por otra parte, en medio sólido el mayor incremento en la producción de biomasa se obtuvo en los cultivos con glicerol alcanzándose una concentración de 24.7 g/L lo que represento un aumento del 51% respecto a lo obtenido en matraz agitado, mientras que los cultivos con glucosa el incremento de la biomasa fue de solo el 10 % aproximadamente (Tabla 6).

En trabajos previos llevados en medio sumergido específicamente con *P. pastoris*, las concentraciones de sustrato ya sea glicerol o glucosa están dentro de un rango de entre 10 y 45 g/L con el fin de evitar la represión catabólica (Aizemberg *et al.*, 2011; Hang *et al.*, 2009; Gosalkar *et al.*, 2008), mientras que en los cultivos en medio sólido no se da este fenómeno (Viniegra- González and Favela-Torres, 2006; Favela-Torres *et al.*, 1998). Viniegra-González and Favela-Torres (2006) proponen que dentro de soportes sólidos como es el caso de EPU existe la creación de gradientes de concentración de sustrato, así como dentro de los agregados celulares formados (López *et al.*, 2010), creando microambientes con la concentración idónea para el crecimiento celular (5-10g/L) permitiendo alcanzar altas concentraciones de biomasa. A este respecto, López *et al.* (2010) llegaron a producir cultivos de *P. pastoris* con altas densidades celulares, de hasta 51.6 g/L, empleando glicerol a altas concentraciones (90.4 g/L), por su parte, Núñez (2012) empleando glucosa a concentraciones de 150g/L llegó a obtener producciones celulares de hasta 40 g/L, nivel que pudiera ser considerado como cultivo de alta producción celular.

Por otra parte, mediante las mediciones del sustrato residual se determinaron los valores de rendimiento celular, los cuales son presentados en la figura 10a. A su vez se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados previamente en EPU empleando glucosa y glicerol (Núñez, 2012; López *et al.*, 2010) a diferentes concentraciones iniciales (Figura 10a y 10b). Conforme se incrementó la concentración inicial del sustrato, el rendimiento celular disminuyó. Así mismo se encontró que los mayores rendimientos, $Y_{x/s}$, fueron los obtenidos con glicerol a 50 y 100 g/L los cuales fueron 0.59 y 0.39 $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{sustrato}}$ respectivamente. Ahora bien, mediante el análisis de ANOVA se constató que a excepción de los valores obtenidos a 50 g/L los demás valores de rendimiento, $Y_{x/s}$, son similares entre sí.

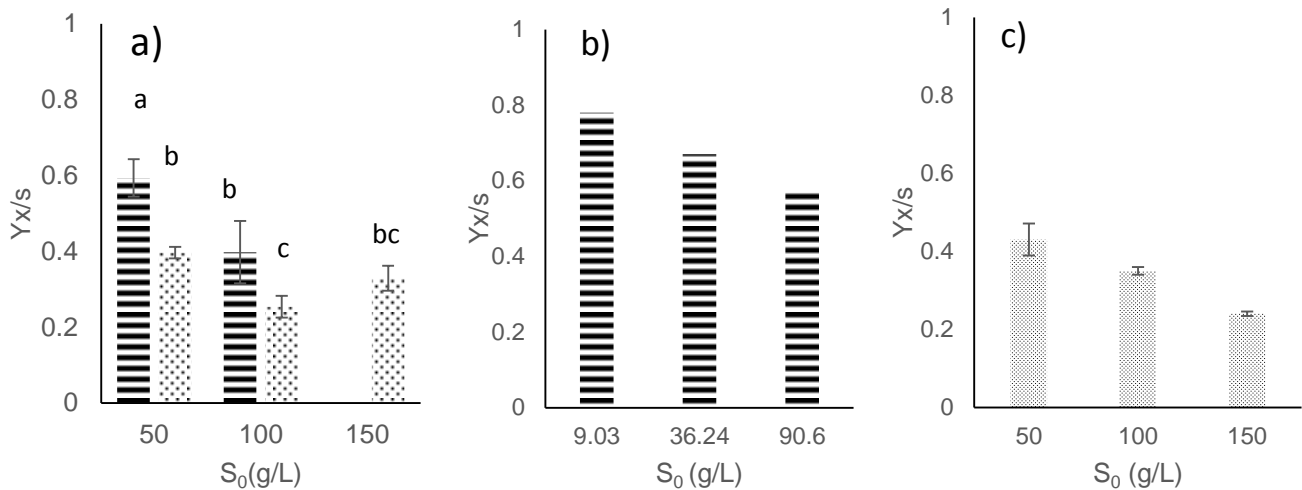


Figura 9. Efecto de la concentración de glicerol (≡) y glucosa (⊙) en el rendimiento, $Y_{x/s}$. Comparación entre los datos a) obtenidos en este trabajo, b) López *et al.* (2010) y c) Núñez (2012).

Por otro lado, a la concentración inicial de sustrato, $S_0 = 50$ g/L se compararon los rendimientos reportados anteriormente en matraz agitado con los obtenidos en EPU, observándose un incremento del 30 y 34 % con glucosa y glicerol respectivamente en los cultivos en columna, por lo que además de observarse diferencia entre el grado de reducción, se observó mejoría por el cambio del sistema de cultivo.

En concordancia, el efecto que ejerce la relación H/C o grado de reducción del sustrato sobre el rendimiento (Erickson *et al.*, 1978) se confirmó en los trabajos de López *et al.* (2010) y Núñez (2012), en donde empleando un sustrato menos reducido como la glucosa, se observaron rendimientos por debajo de lo obtenido con un compuesto más reducido como el glicerol, incluso a bajas concentraciones ($Y_{x/s} = 0.46$ g_{biomasa}/g_{glucosa}) (Figuras 10b y 10c). Tendencias similares fueron vistas por Xie *et al.* (2005), quienes compararon el crecimiento en medio líquido utilizando diferentes sustratos como glicerol, sorbitol, ácido acético y ácido láctico, observaron que el mejor rendimiento fue de 0.78 g_{biomasa}/g_{glicerol}, logrado con el sustrato más reducido, en este caso fue el glicerol.

Existen varios factores que afectan el rendimiento celular, por ejemplo, Verduyn *et al.* (1991) encontraron que el tipo de transporte afecta el rendimiento celular de los microorganismos como *Candida utilis* que utiliza transporte activo en el consumo de nutrientes, por ejemplo, su gasto de energía llega a ser de hasta 800 mmol ATP*100/ g biomasa en el consumo de

glucosa mientras que microorganismos como *S. cerevisiae* que tiene transporte por difusión facilitada en el consumo de glucosa su gasto de energía está ausente (0 mmol ATP*100/g biomasa). Otro de los factores que disminuyen el rendimiento es la diferencia que hay entre las levaduras al destinar distintas proporciones de ATP a la síntesis de aminoácidos, polimerización, y al transporte de otros nutrientes (O_2 , amonio y potasio y fosfato), por lo que se modifica la disponibilidad de energía a biosíntesis celular (Verduyn *et al.*, 1991).

Como se mencionó anteriormente, el mantenimiento celular, es todo aquel gasto de energía distinto a la formación de biomasa. Aplicando el modelo de Pirt (1975) a los datos de consumo de sustrato es posible conocer dicho valor en cada condición trabajada en medio sólido. En las figuras 11a y 11b se representa gráficamente el primer ajuste empleado en la determinación del mantenimiento, m , obtenidos con los datos de glicerol y glucosa residual, respectivamente.

En la mayoría de los cultivos el mantenimiento fue cero, pero solo en los cultivos con glicerol a 100 g/L se presentó un gasto energético en esta función ($m= 0.02 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$), sin embargo, aun con este gasto extra de energía se obtuvo un mayor rendimiento ($Y_{x/s}= 0.39 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$) comparado con lo obtenido con glucosa a la misma concentración así como a 50 y 150g/L de este sustrato. Por otra parte, aunque la glucosa y el glicerol poseen diferentes grados de reducción, los valores de mantenimiento obtenidos en este trabajo fueron nulos o bajos (tabla 5), mientras que con los parámetros X_m , μ_m y $Y_{x/s}$ presentan mayor información en la selección del sustrato idóneo para la etapa de crecimiento en EPU.

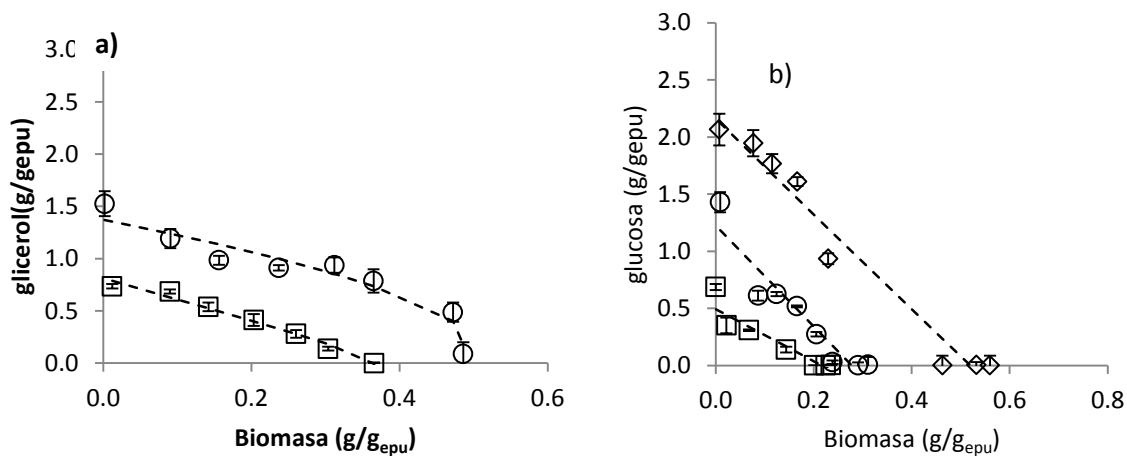


Figura 10. Curva de consumo de a) glicerol y b) glucosa, a diferentes concentraciones iniciales, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 (◇) (solo para glucosa). Las líneas punteadas representan el ajuste de las curvas al modelo de Pirt (1975).

Las figuras 12a y 12b muestran gráficamente la evolución del pH a lo largo del crecimiento en los diferentes sustratos y a las distintas concentraciones. En el caso de los cultivos con glicerol, el valor mínimo de pH fue de 3, menor que el valor óptimo de crecimiento reportado para *P. pastoris* (Inan *et al.*, 1998). Mientras que en los cultivos con glucosa, los valores de pH estuvieron por debajo de este valor. En el caso de los cultivos con glicerol donde el descenso del pH estuvo por debajo del valor óptimo no se observó detención del crecimiento en estos casos, sin embargo, si pudiera estar relacionado con la disminución observado del rendimiento, $Y_{x/s}$, por otro lado, los mayores cambios del pH se dieron aproximadamente durante las primeras 24 horas de cultivo, es decir, antes de haber alcanzado las máximas producciones de biomasa durante la fase de retardo en ambos sustratos.

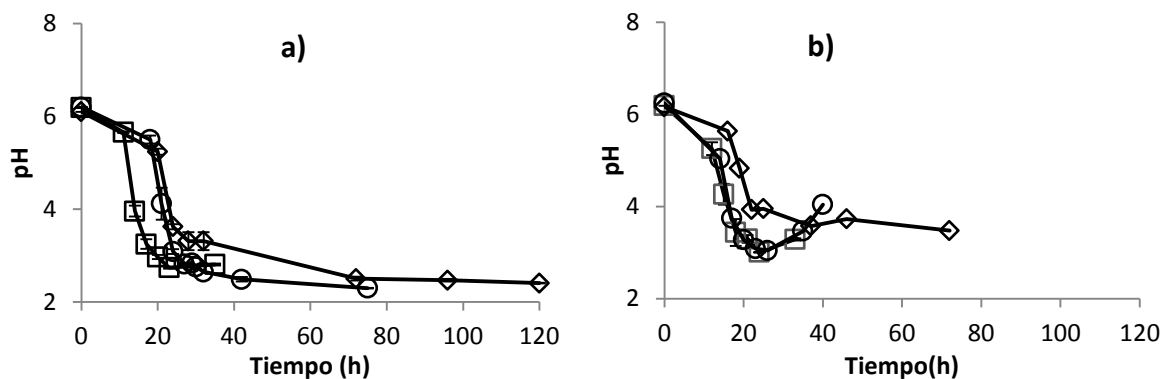


Figura 11. Descenso del pH a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50 (□), 100 (○) y 150 mM (◇) en los cultivos con a) glucosa y b) glicerol.

Este comportamiento no es exclusivo de *P. pastoris*, Christen *et al.* (1993) trabajando con *C. utilis* en amberita tratada con solución alcalina, percibieron que la mayoría de las disminuciones de los valores del pH fueron alcanzados 24 horas antes de que se alcanzara la producción máxima de biomasa. Por otro lado, Chiruvolu *et al.* (1998) encontraron la misma tendencia ya que tres días antes de alcanzar la máxima densidad celular en cultivos de cepas mutadas de *P. pastoris* (Mut- y Mut+) se observó el mayor descenso del pH. Yamashita *et al.* (2009) estudiando el fenómeno de la fase de retardo, encontraron que aquellos cultivos que son formulados a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno como sulfato de amonio (como es el caso de este trabajo), tienden a presentar altos decrementos del pH debido a una alta excreción de protones H^+ al medio por la formación de aminoácidos esenciales, que por el

contrario están presentes en los medios de cultivo suplementados con peptona o extracto de levadura (Wiame *et al.*, 1985).

8.2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de CO₂

Otro de los análisis que se realizó para evaluar el tipo de sustrato idóneo para la etapa de crecimiento de *P. pastoris* en medio sólido fue el empleo de la respirometría. Mediante el análisis de la forma continua de la producción de CO₂ y el consumo de O₂ se evaluó el estado fisiológico de la cepa a lo largo del proceso en las diferentes concentraciones. Las figuras 13a y 13b representan los valores de la tasa de producción (mg CO₂/g_{epu}*h) de CO₂ ajustadas al modelo matemático propuesto por Lareo *et al.* (2006), obteniéndose los parámetros de crecimiento asociados a la respiración (μ_{CO_2} , R_m , t_i y m_{CO_2} , etc.).

Una notable diferencia entre los cultivos con glucosa y glicerol fue la distinta producción de dióxido de carbono, en los cultivos con glicerol a concentraciones iniciales de 50, 100 y 150g/L los valores de la respiración máxima, R_m , fueron 56.25, 60.44 y 69.76 % respectivamente, siendo menores a los obtenidos en los cultivos con glucosa (Tabla 4). Por otro lado, en los cultivos con glicerol tal producción fue lenta cuando se comparó con los medios conteniendo glucosa ya que la respiración residual, R_e , en la mayoría de los cultivos se extendió más allá de la respiración máxima, R_m (Figura 13a).

Por otra parte, se visualizó que el tiempo de inflexión (t_i), donde el microorganismo cambió de metabolismo, varió con la concentración inicial de sustrato así como de un sustrato a otro (Tabla 7), siendo los cultivos con glucosa donde *P. pastoris* cambió de un metabolismo mayormente aerobio a uno mixto con un aumento en la formación de metabolitos. Otra característica que se observó en estos cultivos, fue que para ambos sustratos a la concentración inicial de sustrato de 150g/L, se observaron la formación de 2 picos y un valle en la gráfica de CO₂, por lo que un posible crecimiento diaúxico se estaría dando, ya que ahora los metabolitos formados pudieran estar sirviendo como fuente de carbono y energía.

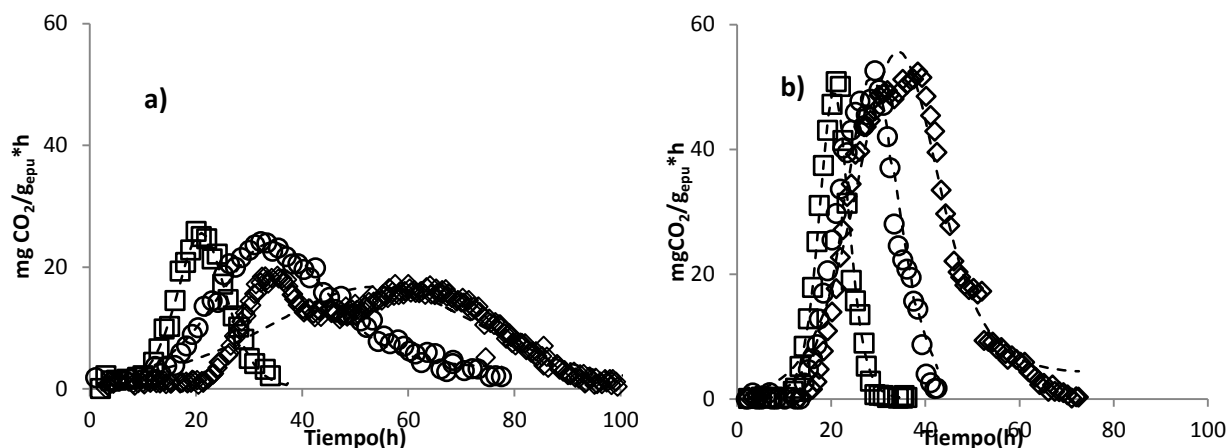


Figura 12. Tasas de producción de CO_2 utilizando a) glicerol y b) glucosa, a concentración iniciales, S_0 (g/L)= 50 (\square), 100 (\circ) y 150 (\diamond). La línea punteada representa los datos de producción de CO_2 ajustados al modelo propuesto por Lareo *et al.* (2006).

Por su parte, los datos de consumo de O_2 medidos en línea arrojaron las mismas variables cinéticas obtenidas con los datos de producción de CO_2 cuando fueron ajustados con el modelo matemático propuesto por Lareo *et al.* (2006). Las siguientes gráficas muestran la evolución del consumo de O_2 en los cultivos con glicerol y glucosa a las diferentes concentraciones trabajadas (Figura 14a y 14b), mientras que los valores encontrados de mantenimiento son resumidos en la tabla 5.

En el caso de los cultivos con glicerol, se observó una disminución en la respiración máxima, R_m , conforme la concentración inicial se incrementó, mientras que en los cultivos con glucosa se elevó dicho punto con el incremento de la concentración inicial. Por otro lado, los datos de consumo de O_2 revelaron gasto de energía a baja concentración de glicerol ($S_0= 50$ g/L), mientras que a 100g/L de glicerol la energía de mantenimiento resultó ser mayor al obtenido con los datos de producción de CO_2 , por su parte, en los cultivos con glicerol a 150g/L no se reportó mantenimiento. Respecto a los cultivos con glucosa solo a concentración inicial, $S_0= 150$ g/L se calculó mantenimiento celular, el cual fue mayor a lo obtenido con los datos de CO_2 (Tabla 5).

Por otro lado, en los cultivos con glicerol el punto máximo de la respiración, R_m , paso de 24 a 17 $\text{mg O}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$ conforme la concentración inicial se elevó, por el contrario, en los cultivos con glucosa la respiración máxima se incrementó de 25 a 29 $\text{mg O}_2/\text{g}_{\text{epu}} \cdot \text{h}$ con el incremento de la concentración inicial.

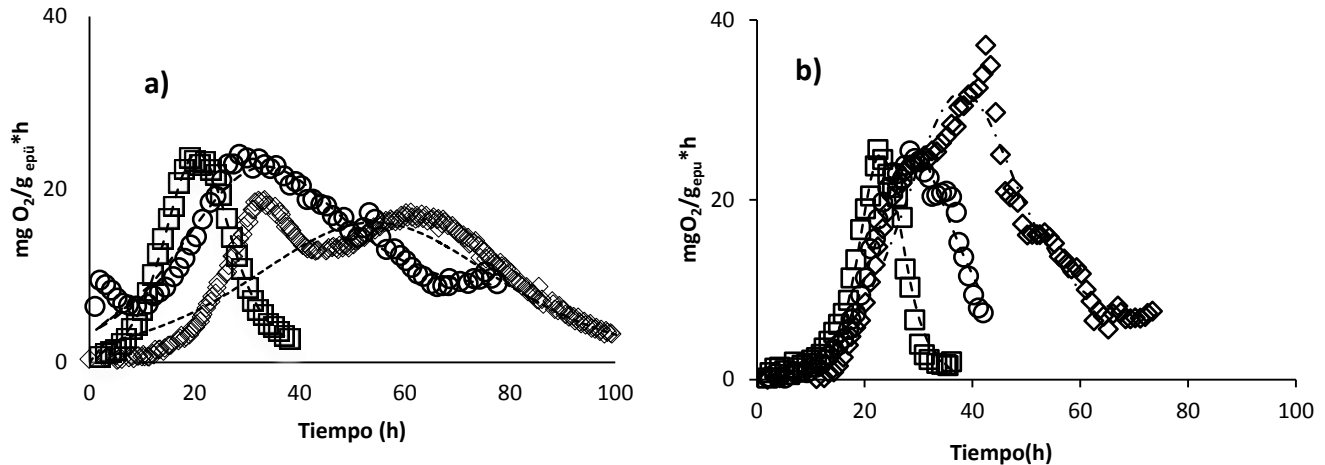


Figura 13. Tasa de consumo de O_2 utilizando a) glicerol y b) glucosa, a concentración iniciales, S_0 (g/L)= 50 (\square), 100 (\circ) y 150 (\diamond). La línea punteada representa los datos de consumo de O_2 ajustados al modelo propuesto por Lareo *et al.* (2006).

Cabe mencionar que el amplio uso de la respirometría en el estudio de la fisiología de microorganismos es debido a la no invasión del medio de cultivo (Anderlei *et al.*, 2004; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Sin embargo, la información respecto de la respirometría en el seguimiento del crecimiento en EPU de *P. pastoris* en medio sólido es casi nula, siendo el trabajo de Núñez (2012) el primero en abordarla. Mientras que con otros microorganismos se ha usado con diferentes fines, Barranco-Florido *et al.* (2002) utilizaron la tasa producción de CO_2 como criterio de selección de las cepas más patógenas de *Verticillium lecanii* crecidas en cutícula de saltamontes. También se puede establecer las mejores condiciones de cultivo como por ejemplo el tamaño de inóculo (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994), la temperatura del cultivo, la actividad de agua, a_w , (Gelmi *et al.*, 2001) o la concentración de sustrato (Lareo *et al.*, 2006), de la misma forma, es posible diferenciar fisiológicamente el crecimiento entre una levadura Crabtree negativa y una levadura Crabtree positiva (Anderlei *et al.*, 2004).

Ahora bien, los valores referentes a R_m y R_e son resumidos en la tabla 6 junto con los datos de respiración inicial, R_0 , obtenidos por ajuste con el modelo propuesto por Lareo *et al.*, (2006). En el caso de los cultivos con glicerol la respiración inicial, R_0 , fue mayor comparado con los cultivos con glucosa en las diferentes concentraciones analizadas, de la misma forma, el incremento de la respiración inicial estuvo relacionada al aumento en la concentración inicial de sustrato.

Por otro lado, los valores de respiración residual, R_e , obtenidos a partir de los datos de consumo de O_2 fueron distintos a los calculados con la producción de CO_2 , lo que explica la presencia de mantenimiento, m , para algunas concentraciones de sustrato donde no se detectó energía de mantenimiento con los datos de producción de CO_2 (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de respirometría para los cultivos con glicerol y glucosa a diferentes concentraciones. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.

	Glicerol 50g/L	Glicerol 100g/L	Glicerol 150g/L	Glucosa 50g/L	Glucosa 100g/L	Glucosa 150g/L
Producción de CO_2(mg CO_2/ h)						
R_0	0.10±0.02 ^a	0.71±0.05 ^b	1.35±0.11 ^d	0.01±0.00 ^a	0.12±0.05 ^{ac}	0.33±0.14 ^c
R_m	22.68±4.88 ^a	24.05±0.62 ^a	17.4±2.0 ^c	51.84±2.61 ^b	61.11±22.11 ^b	57.62±3.17 ^b
R_e	0±0	3.45±0.26	0±0	0±0	0±0	3.62±1.03
Consumo de O_2(mg O_2/ h)						
R_0	0.65±0.15 ^a	3.0±0.49 ^b	1.9±0.43 ^c	0.03±0.004 ^a	0.15±0.06 ^a	0.27±0.08 ^a
R_m	21.67±4.09 ^a	22.68±0.67 ^a	17.37±2.71 ^b	25.67±1.25 ^a	25.04±0.65 ^a	29.33±4.53 ^c
R_e	1.76±0.42 ^a	8.23±2.6 ^b	0±0 ^a	0±0 ^a	10.17±2.97 ^b	6.31±1.60 ^b

Por otra parte, los valores de mantenimiento, m , fueron bajos o nulos independientemente de los datos utilizados para calcular dicho parámetro, como se observa en la tabla 5. En el caso de los cultivos con glucosa el gasto bioenergético en mantenimiento sólo se vio a concentración de 150g/L, mientras que con glicerol se observó a baja e intermedia concentración ($S_0=50$ y 100g/L), en los tres grupos de datos (sustrato, CO_2 y O_2). Cabe mencionar que debido a la constante ausencia de valores de mantenimiento no se pudo encontrar diferencia entre tratamientos mediante el análisis estadístico de ANOVA por lo que solamente se presentaron los datos con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 5. Coeficientes de mantenimiento, obtenidos a partir de los datos CO₂, O₂ y sustrato, a concentraciones iniciales, S₀ (g/L)= 50, 100 y 150.

m	Glicerol 50 g/L	Glicerol 100 g/L	Glicerol 150 g/L	Glucosa 50 g/L	Glucosa 100 g/L	Glucosa 150g/L
mg CO ₂ /g epu* h	0±0	0.01±0.002	0±0	0±0	0±0	.01±0.002
mg O ₂ /g epu* h	0.003±0.001	0.02±0.003	0±0	0±0	0±0	0.010.001
mgS/g epu* h	0.02±0.005	0.07±0.06	ND	0±0	0±0	0±0

Aunque la cepa fue crecida en altas concentraciones de sustrato y sales inorgánicas destinó bajos niveles energéticos a funciones de mantenimiento, lo cual permitió obtener altas densidades celulares en un medio saturado (S₀= 150 g/L). Los bajos valores de mantenimiento obtenidos con *P. pastoris* en este trabajo siguieron la noción de que las levaduras y hongos destinan una menor cantidad de energía a mantenimiento comparado con las bacterias. Por ejemplo Verduyn *et al.* (1991) observaron en 2 distintos tipos de levaduras, *S. cerevisiae* y *C. utilis*, ausencia de valores de mantenimiento, por otro lado, Jahic *et al.* (2002) encontraron que *P. pastoris* cultivada en quimiostato destinó en mantenimiento 0.013 g_{glicerol}/g_{biomasa} *h, comparado con *Escherichia coli* que bajo las mismas condiciones de cultivo destinó 0.04 g_{sustrato}/g_{biomasa} *h. Por su parte Lareo *et al.* (2006), trabajando con *Mucor bacilliformis* en espuma de poliuretano, reportaron valores por debajo de 0.0073 g_{CO2}/g_{biomasa} *h. Por último, Laguna *et al.* (1988) encontraron que la levadura *S. cerevisiae* destinó menos del 5 % de 120 moles de ATP producidos al mantenimiento del pH interno.

Otro de los parámetros utilizados en la diferenciación entre glucosa y glicerol fue el rendimiento con base en la producción de CO₂ y al consumo de O₂ (Y_{X/CO2}, Y_{X/O2}). En las figuras 15a y 15b se observa el efecto que tiene el aumento de la concentración inicial de sustrato sobre el rendimiento en los cultivos con glicerol y glucosa, respectivamente.

Se observó que los mayores rendimientos en base a O₂ y CO₂, fueron aquellos en donde se utilizó glicerol como sustrato en las diferentes concentraciones probadas, contrario a lo

obtenido con glucosa. Así mismo como en el caso del rendimiento celular, $Y_{x/s}$, los mayores rendimientos, fueron aquellos obtenidos a bajas concentraciones de sustrato ($S_0= 50$ g/L), adicionalmente conforme la concentración inicial, S_0 , se incrementó los valores de rendimiento decrecieron.

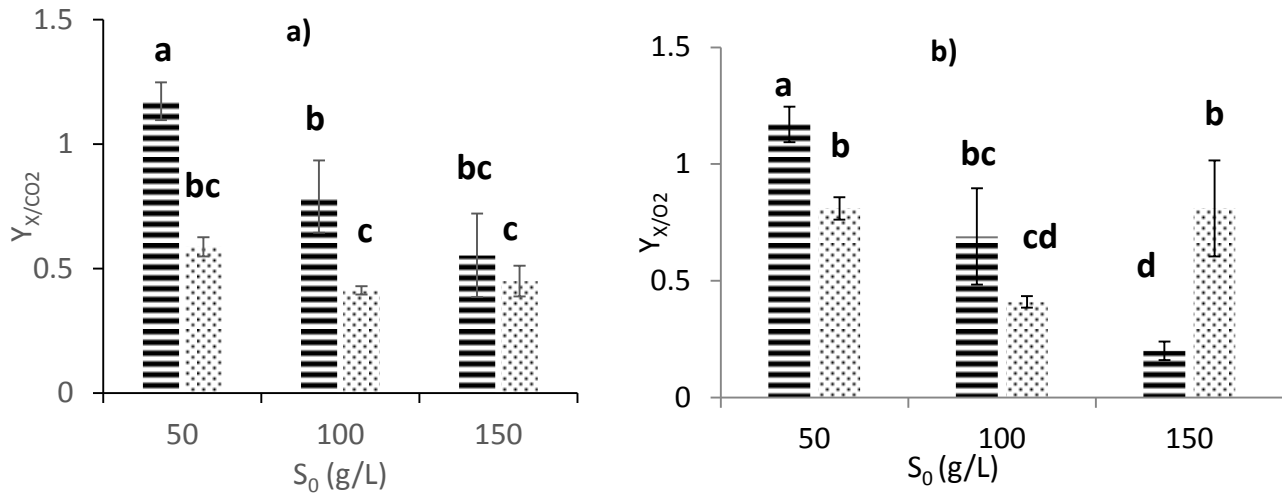


Figura 14. Rendimiento en base a a) CO_2 (Y_{x/CO_2}) y b) O_2 (Y_{x/O_2}), utilizando glicerol (≡) y glucosa (⊙) a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50, 100 y 150.

Lareo *et al.* (2006), trabajaron con *M. bacilliformis* y observaron una relación entre el incremento de Y_{x/CO_2} con el aumento de la actividad de agua (a_w) y la concentración de glucosa en EPU. De la misma forma, Gelmi *et al.* (2001) produciendo ácido giberélico (GA_3) empleando *Gibberella fujikuroi*, reportaron que la disminución en la a_w junto con un aumento de la temperatura trajeron consigo el descenso de Y_{x/CO_2} , cabe mencionar que los valores obtenidos en este trabajo estuvieron en el rango de los valores reportados para Y_{x/CO_2} en estos dos trabajos a pesar de ser reportados por dos clases distintas de hongos, pero crecidos en medio sólido.

Por otro lado, una aproximación al cálculo del tiempo que tardó el cultivo en salir de la fase de retardo fue calculado mediante el modelo logístico más retardo (Anexo 6) empleando los datos de producción de CO_2 y O_2 (solo se muestran los gráficos de CO_2). Las figuras 16a y 16b muestran dichos ajustes así como el tiempo que tarda en salir el microorganismo de la fase de retardo.

Conforme la concentración inicial aumentó, el tiempo de adaptación a altas concentraciones se incrementó. Así mismo, para los cultivos con glucosa el mayor tiempo fue de 8.2 horas a concentración inicial de 150 g/L (Figura 16b), mientras que en glicerol a la misma concentración el tiempo fue de 17.24 horas (Figura 16a). Aunado a esto, como se observó en las curvas de crecimiento, *P. pastoris* creció más rápidamente en los cultivos con glucosa que en glicerol, por lo que la producción de CO₂ nuevamente sirvió como indicativo del crecimiento (fase de retardo y exponencial).

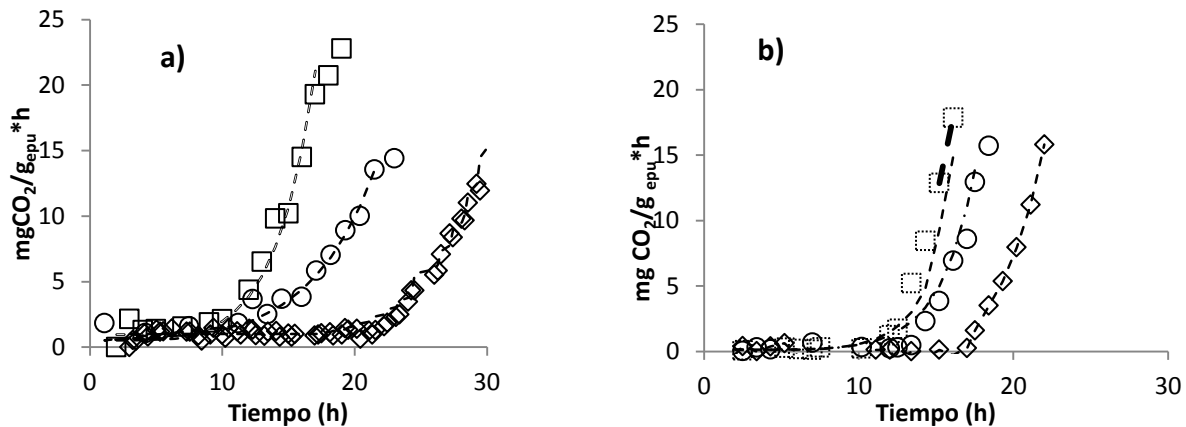


Figura 15. Tiempo de retardo, t_r , con a) glicerol y b) glucosa, a concentración inicial, S_0 (g/L)= 50 (□), 100(○) y 150 (◇).

A concentración inicial, S_0 (g/L) = 50, 100 y 150 los tiempos obtenidos con glicerol fueron 7.84, 3.09 y 17.24 h respectivamente, mientras que con glucosa fueron 6.86, 7.1 y 8.18 respectivamente. La línea punteada representa el ajuste por el modelo logístico más un retardo. Se sabe que la fase de retardo es una etapa altamente activa, en donde se sobreexpresan genes encargados del ensamble de proteínas hierro-azufre. (Rolfe *et al.*, 2011). Referente a este tema, Yamashita *et al.* (2009) encontraron que durante la fase de retardo en *P. pastoris*, existe una sobreexpresión de genes de la glucolisis, así como la expresión de proteínas encargadas de la inducción de autofagia durante dicha etapa (PpAtg11 y PpAtg17). Por su parte, Brejning and Jesperen (2002) trabajando con *S. cerevisiae* descubrieron la sobreexpresión de Ado1p (adenosida quinasa), acetaldehído deshidrogenasa (Ald6p) y (DL)-glicerol 3-fosfatasa 1, involucradas en la glucolisis, además de fragmentos de proteínas de choque térmico (Ssb1).

Utilizando la relación estequiométrica de los moles de CO₂ producidos y O₂ consumido conocido (CR) se logró relacionar el crecimiento con el metabolismo, además de evaluar el tipo de metabolismo que realizó *P. pastoris* en medio sólido. Las unidades de los datos de CO₂ y O₂ fueron convertidos de g/g_{epu}*h a mmol/g_{epu}*h para poder relacionarlos con el CR (mmol CO₂ producido/ mmol O₂ consumido), principalmente con los valores máximos (CR_m), obtenidos mediante ajuste polinomial de las curva de CR experimentalmente obtenidas.

Mediante el cálculo del CR en glicerol fue posible ver el efecto negativo en la producción de biomasa, que tuvo el incremento en la concentración inicial, S₀, sobre *P. pastoris*. Para las concentraciones iniciales, S₀ (g/L)= 50, 100 y 150 los valores obtenidos del CR_m fueron 0.76, 0.70 y 0.67, respectivamente, entendiéndose, que conforme se incrementó la concentración inicial del soluto el metabolismo pasó de ser principalmente respiratorio a uno mixto dándose la formación de metabolitos parcialmente oxidados y su reincorporación al metabolismo, como se pudo ver principalmente con la formación de un segundo pico en la figura 17c. Además, de las gráficas 17a y 17b se dio seguimiento a la fase de retardo, exponencial y decaimiento, mientras que en la gráfica 17c además se visualizó la aparición de dos picos separados entre sí, tanto en los datos de consumo de O₂ como en la producción de CO₂.

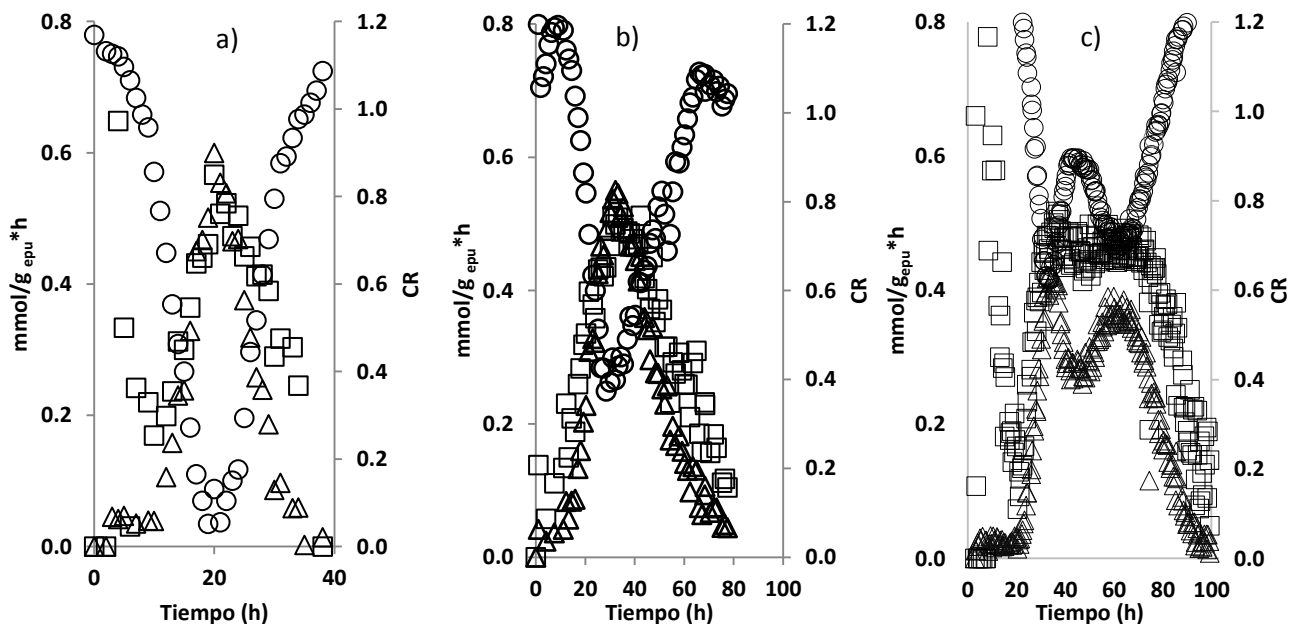


Figura 16. Relación del CR (□) con las tasas de producción de CO₂ (Δ) y consumo de O₂ (○) utilizando glicerol a diferentes concentraciones a) 50, b) 100 y c) 150g/L.

Guo *et al.* (2007) siguió el crecimiento de *P. pastoris* en quimiostato utilizando glicerol ($S_0= 40$ g/L) como sustrato en la etapa de crecimiento, reportaron que a pesar de obtener altas densidades celulares (115 g/L) mediante el control de las condiciones de oxígeno disuelto y el pH, el valor del CR fue 0.65, inferior al valor teórico para la oxidación del glicerol (CR= 0.86), posiblemente por la formación de algún compuesto parcialmente oxidado, como fue el caso de este trabajo.

De la misma forma, en este trabajo se relacionaron las variaciones del metabolismo en los cultivos con glucosa a las diferentes concentraciones con la producción y consumo de CO_2 y O_2 respectivamente en unidades de $mol/g_{epu} \cdot h$ (Figura 18a, 18b y 18c).

En el caso de los cultivos con glucosa el seguimiento de la respiración de *P. pastoris* con el CR, indicaron en cada tiempo el tipo de metabolismo seguido por este microorganismo. Por otro lado, a diferencia de los cultivos con glicerol donde los valores del CR estuvieron por debajo del valor teórico (CR= 0.86), las cinéticas con glucosa mostraron valores por encima de su valor teórico igual a 1.0 en las diferentes concentraciones trabajadas ($CR_m = 1.58, 1.63$ y 1.43 a concentración inicial, $S_0=50, 100$ y 150 g/L respectivamente), lo cual coincidió con el incremento en la producción de CO_2 , y del consumo de O_2 , estos últimos valores debido a que fueron menores equimolarmente con los valores de producción de dióxido de carbono debido a la formación de etanol, dieron consigo tal diferencia entre el valor teórico y los valores experimentales obtenidos. Como se mencionó anteriormente las variaciones en el valor del CR están relacionadas a la formación de productos parcialmente oxidados así como al aumento de producción de CO_2 y al consumo de O_2 .

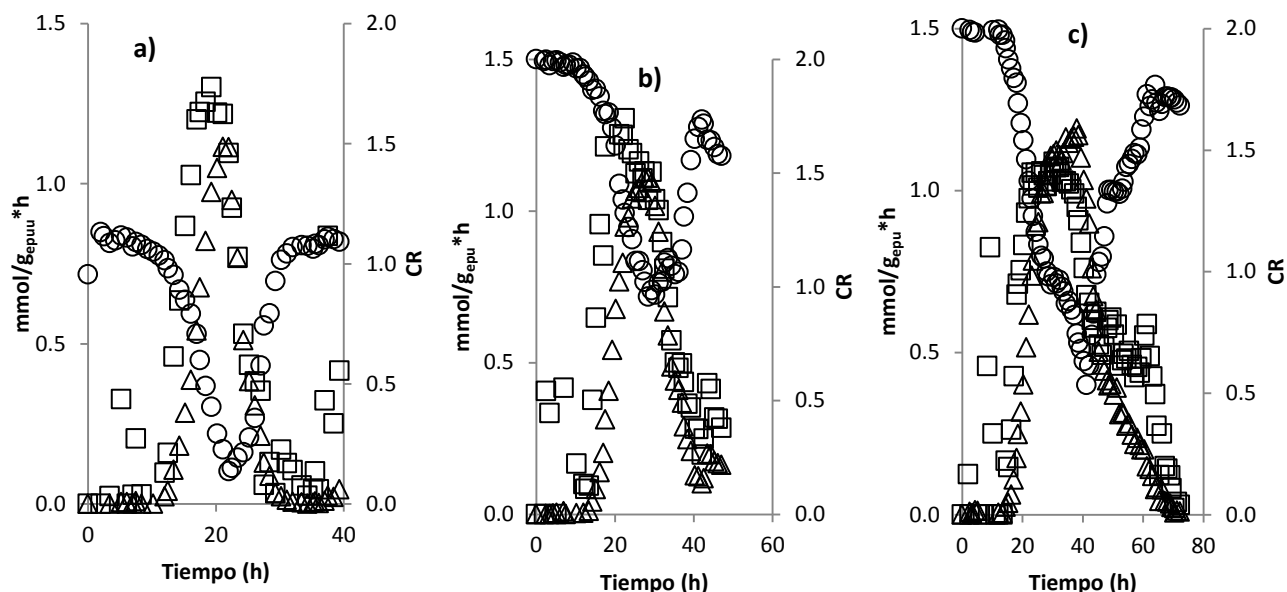


Figura 17. Relación del CR (□) con las tasas de producción de CO₂ (Δ) y consumo de O₂ (○) utilizando glucosa a diferentes concentraciones S₀ (g/L)=a) 50, b) 100 y c) 150.

Por otra parte, las diferencias vistas entre los valores del CR obtenidos con glucosa y glicerol están relacionados con el grado de reducción de dichos compuestos (Guo *et al.*, 2007), sin embargo, controlando las condiciones de cultivo, como ya se mencionó, se logra mantener constantes los valores del CR para cada sustrato, por ejemplo, Hang *et al.* (2009) mediante el control de la tasa de alimentación evitaron variaciones del CR previendo a su vez la formación de metabolitos indeseables. Así mismo, Guo *et al.* (2007) por medio del control de la oxigenación y el pH lograron obtener valores del CR iguales a 0.95, cercanos al valor teórico de la oxidación de la glucosa. Por su parte, Núñez (2012) trabajando en medio sólido con diferentes concentraciones de glucosa encontró relación entre la disminución del valor del CR y el incremento de la concentración inicial del sustrato. En contraste, aunque los valores de CR obtenidos en este trabajo estuvieron por encima del valor teórico para la glucosa (principalmente debido a la formación de etanol), se logró obtener altas concentraciones de biomasa en menos tiempo que lo reportado en medio sumergido.

Otro de los parámetros obtenidos con el modelo logístico más un retardo (Anexo 6), fue la tasa específica de producción, μ_{CO_2} y consumo de oxígeno, μ_{O_2} , para cada una de las concentraciones probadas en glicerol y glucosa. Estos valores son resumidos y comparados en la tabla 6 junto con las diferentes tasas obtenidas con los modelos antes mencionados.

Se observa que las mayores tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ fueron obtenidas a concentraciones bajas de glicerol y glucosa (S₀=50 g/L), pero conforme ésta concentración se incrementó las diferentes tasas de producción y consumo disminuyeron. Por otro lado, en el caso de los cultivos con glucosa, los valores de μ_{CO₂} y μ_{O₂} estuvieron en la mayoría de los casos por encima de los valores obtenidos con glicerol, concordando con los bajos rendimientos, Y_{x/s}, así como con la producción máxima de biomasa. Además, en los cultivos con glucosa las tasas de consumo de O₂ fueron menores a las tasas de producción de CO₂ relacionándose con el bajo consumo de O₂.

Una de las principales diferencias encontradas en EPU respecto a los experimentos con matraz agitado a S₀= 50 g/L fueron los valores μ_m (tasa máxima de crecimiento) por encima de lo obtenido en medio líquido, a concentración inicial, S₀= 50 g/L en glucosa y glicerol.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de respirometría y producción de biomasa a las diferentes concentraciones estudiadas. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.

Parámetros	Glicerol 50 g/L	Glicerol 100 g/L	Glicerol 150 g/L	Glucosa 50 g/L	Glucosa 100 g/L	Glucosa 150g/L
μ _{CO₂} (h ⁻¹)	0.32±0.01 ^a	0.14±0.004 ^b	0.07±0.01 ^c	0.51±0.01 ^d	0.30±0.04 ^e	0.19±0.02 ^f
μ _{O₂} (h ⁻¹)	0.24±0.01 ^a	0.10±0.01 ^b	0.06±0.01 ^{cd}	0.36±0.04 ^{ae}	0.26±0.09 ^d	0.16±0.02 ^{ce}
μ _m (h ⁻¹)	0.22±0.05 ^a	0.25±0.09 ^a	0.22±0.03 ^a	0.46±0.05 ^b	0.18±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a
μ _{CO₂} (retardo)	0.34±0.01 ^a	0.20±0.01 ^c	0.21±0.06 ^a ^c	0.52±0.06 ^b	0.45±0.07 ^b	0.48±0.06 ^b
μ _{O₂} (retardo)	0.21±0.01 ^a	0.05±0.01 ^b	0.14±0.01 ^c	0.22±0.02 ^a	0.22±0.01 ^a	0.26±0.04 ^d
X _m (g/g _{epu})	0.37±0.01 ^{ab}	0.49±0.08 ^b	0.75±0.05 ^{ac}	0.24±0.003 ^b	0.31±0.02 ^{ac}	0.56±0.04 ^c
X _m (mg/cm ³)	24.7±0.67	32.7±5.33	50.0±3.33	16.0±0.67	20.7±1.33	37.±2.67

Para relacionar el crecimiento celular con la respirometría (CR_m) se usó la ecuación logística en su forma derivada, d'x/dt (Anexo 3), obteniéndose las curvas correspondientes que fueron ajustadas a un modelo polinomial (2^{do} y 3^{er} grado), resultando el tiempo de inflexión (t_i). En las

figuras 19a, 19b, y 19c se ve representado el crecimiento celular y el CR de los cultivos con glicerol, ajustados por el modelo polinomial.

De acuerdo al principio de Ockham el cual menciona que “en igualdad de condiciones, la explicación más sencilla suele ser la correcta”, se decidió aplicar el modelo polinomial para calcular el tiempo de inflexión en cada una de las curvas graficadas (CR y $d'x/dt$). A excepción de los cultivos a concentración inicial, $S_0= 100$ g/L, los puntos de inflexión determinados con el ajuste polinomial fueron muy similares tanto en las curvas de CR como en las de la producción de biomasa ($d'x/dt$), a su vez estos valores están en el rango de los valores obtenidos con los datos de CO_2 y O_2 (Tabla 7), por lo que se concluye que la producción de biomasa y la respiración estuvo relacionados por el tipo de metabolismo seguido a lo largo de del crecimiento, en este caso en medio sólido.

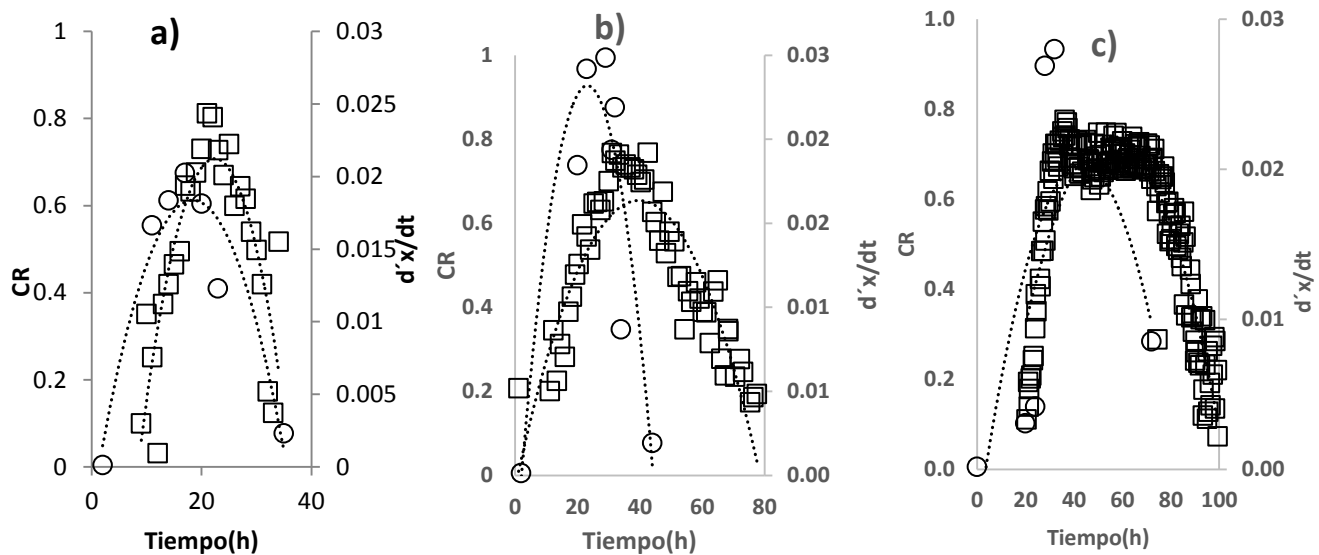


Figura 18. Relación entre el tiempo de inflexión, t_i , obtenido a partir del CR (\square) y la producción de biomasa, $d'x/dt$, (\circ), para los cultivos con glicerol a concentración inicial S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150. La línea punteada representa el ajuste polinomial.

Por otro lado, en el punto máximo del tiempo de inflexión se observó la máxima producción de metabolitos que en estos cultivos fueron D-arabitol y ácido cítrico, sin embargo pasando el punto de inflexión en la zona de decaimiento se observó también la disminución en la concentración de ambos productos posiblemente debido a un crecimiento diaúxico mediante la incorporación de estos compuestos (Hang *et al.*, 2009; Anderlei *et al* 2004)

De igual manera, las figuras 20a, 20b y 20c muestran los tiempos de inflexión, t_i , obtenidos con las curvas de crecimiento y CR en los cultivos con glucosa, los cuales fueron cercanos entre sí, incluso estos valores fueron similares a los obtenidos con los datos de CO_2 y O_2 (Tabla 7). De estas gráficas se puede observar que los valores de t_i obtenidos a partir del CR y la producción de biomasa, $d'x/dt$, son similares al rango de los valores obtenidos con los datos de producción de CO_2 y consumo de O_2 (Tabla 7), por lo que determinar el punto donde el metabolismo cambia pudiera ser realizado utilizando los valores de CO_2 producido, O_2 consumido, biomasa formada y la relación estequiométrica del cociente respiratorio.

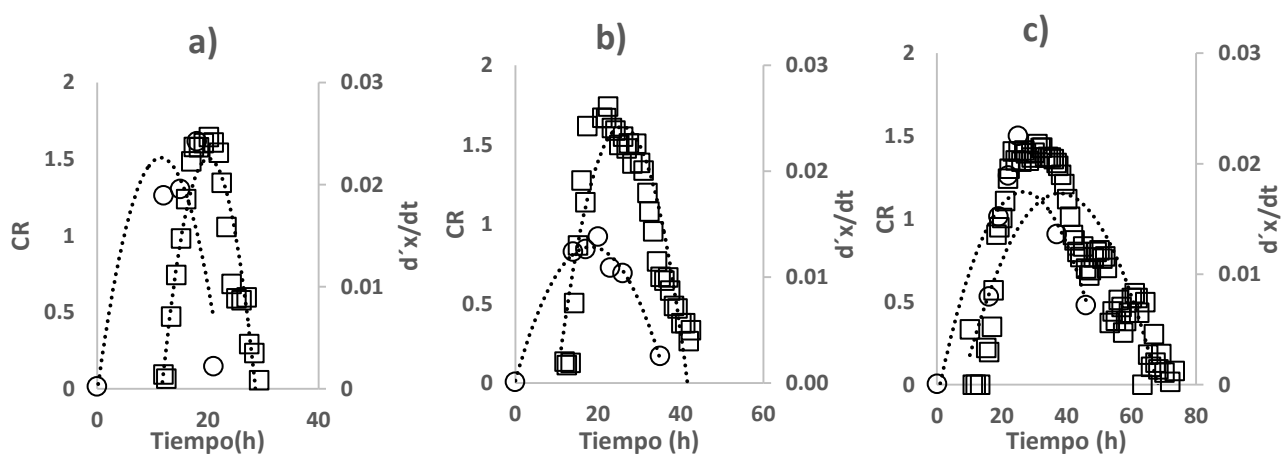


Figura 19. Relación entre el tiempo de inflexión, t_i , obtenido a partir del CR (□) y dx/dt (○) en los cultivos con glucosa a concentración inicial de sustrato, S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150. La línea punteada representa el ajuste juste polinomial.

Ahora bien, los diferentes valores del tiempo de inflexión son resumidos en la tabla 7, cada uno con su respectiva desviación estándar, así como con el análisis estadístico para cada condición trabajada.

Por otro lado, el incremento en el tiempo de inflexión respondió a un efecto osmótico debido al incremento de la concentración de sustrato, aunque también pudiera deberse al efecto que ejerció dicho aumento en la solubilidad del oxígeno (7.6 mg/L a 30 °C). Sin embargo, bajo dichos factores la producción de biomasa se llevó a cabo en un periodo de tiempo menor si se compara con lo obtenido en matraz agitado a 50 g/L de glucosa.

Tabla 7. Punto de inflexión calculado a partir del modelo propuesto por Lareo *et al.*, (2006), por ajuste polinomial y por la ecuación logística en su forma diferencial. Análisis estadístico con un nivel de confianza de 0.05.

	Glicerol (50g/L)	Glicerol (100g/L)	Glicerol (150g/L)	Glucosa (50g/L)	Glucosa (100g/L)	Glucosa (150g/L)
t_i (CO ₂)	20.87±0.84 ^a	34.43±0.78 ^b	54.53±2.01 ^d	20.56±0.96 ^a	26.49±1.18 ^c	34.37±1.13 ^b
t_i (O ₂)	20.15±0.99 ^a	33.47±1.16 ^b	54.41±2.08 ^c	22.48±0.99 ^a	28.72±1.61 ^b	37.14±1.33 ^d
t_i (CR)	22.71±1.77 ^a	40.83±4.40 ^b	53.56±6.16 ^c	20.46±0.23 ^a	25.19±0.89 ^a	35.54±3.32 ^b
t_i (d ² x/dt ²)	18.33±0.60 ^a	22.90±2.14 ^{ab}	58.33±7.64 ^c	16.90±1.82 ^a	18.11±2.01 ^a	36.11±12.06 ^b

8.3. Metabolismo de desbordamiento y balance de carbono.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución, CLAR, permitió identificar los tipos de productos formados a partir de cada sustrato en EPU, así como la concentración, la cual ayudó a determinar las principales rutas del carbono. En las figuras 21a y 21b se observa los metabolitos detectados y su evolución respecto al tiempo, a dos diferentes concentraciones iniciales, S_0 (g/L)= 50 y 100 de glicerol.

Como se puede ver en las gráficas 21a y 21b, los únicos metabolitos detectados en los cultivos con glicerol fueron D- arabitol y ácido cítrico, ahora bien, en el caso de los cultivos a concentración inicial, $S_0= 50$ g/L, se observó un descenso en la concentración de dichos compuestos después de las 25 horas, mientras que a 100 g/L de glicerol la concentración de D- arabitol se incrementó, explicando el descenso en el valor del CR_m a dicha concentración ($CR= 0.70$), sin embargo, se logró alcanzar una producción máxima de biomasa de 0.49 g/g_{epu}.

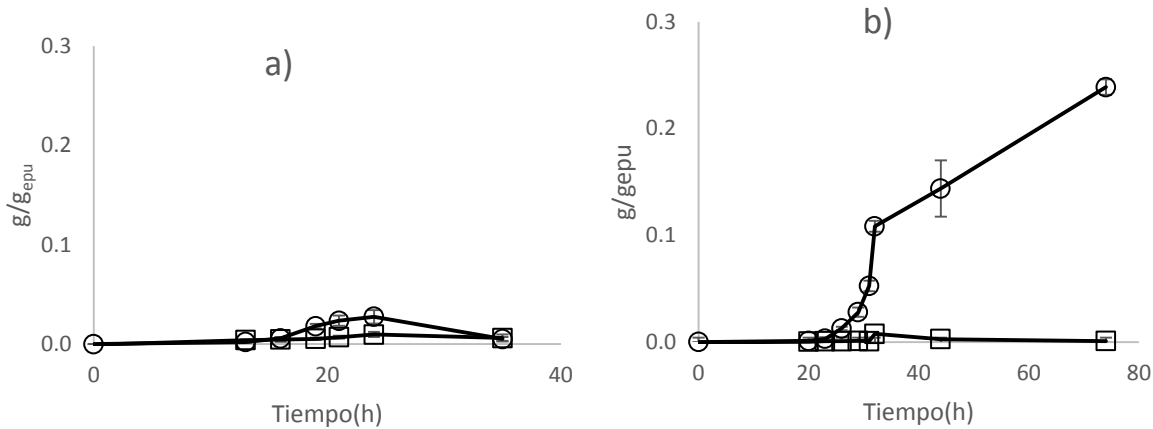


Figura 20. Producción de ácido cítrico (□) y D- arabitól (○), utilizando glicerol como sustrato a concentraciones iniciales, S₀ (g/L)= a) 50 y b) 100.

Aunque no fue el objetivo de este estudio, se vio que *P. pastoris* es una alta productora de D-arabitol a alta concentración de glicerol, el cual tiene un elevado costo en el mercado (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3381?lang=es®ion=MX>). Por otro lado, la formación de dicho compuesto tiene relación con la activación de la ruta de las pentosas-fosfato, como en el caso de las levaduras osmotolerantes, esta vía es activada a altas concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo (Kumar and Gummedi, 2011; Onishi, 1963) así como en condiciones limitantes de oxígeno (Baumann *et al.*, 2010). Por otra parte, la formación de ácido cítrico mostró la activación del ciclo del glioxilato (Solá *et al.*, 2004), aunque dicho metabolito es mayormente sintetizado por hongos filamentosos como *Aspergillus niger* a pH ácido y a altas concentraciones de nutrientes (Papagianni, 2007), en este trabajo la producción de dicho compuesto fue muy baja en las dos condiciones analizadas.

Por otra parte, en los cultivos con glucosa se observó una mayor variedad de compuestos parcialmente oxidados, siendo los principales productos formados D- arabitol, etanol y ácido cítrico, mientras que en los cultivos con 50 y 100 g/L esporádicas formaciones de glicerol, ácido acético y málico fueron detectadas. En las figuras 22a, 22b y 22c se graficaron los metabolitos detectados en las diferentes concentraciones estudiadas en medio sólido.

A comparación de los cultivos con glicerol, la variedad en los compuestos formados fue mayor así como la producción de cada uno de ellos incluso a concentración inicial, $S_0= 50$ g/L. De la misma forma, conforme la concentración de sustrato se incrementó, la producción de metabolitos aumentó consecutivamente, aunque a una concentración inicial, $S_0= 150$ g/L, la producción de metabolitos se limitó a solo dos compuestos, etanol y D-arabitol.

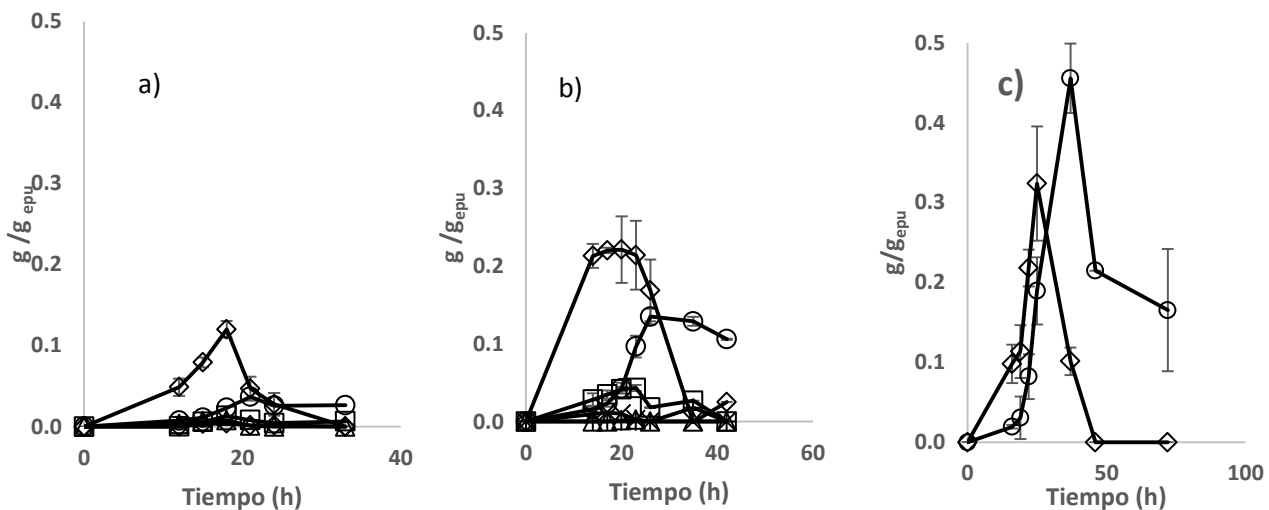


Figura 21. Producción de etanol (◇), D-arabitol (○), ácido cítrico (□), glicerol (×), ácido málico (Δ) y ácido acético (+) en EPU a concentración inicial de glucosa, S_0 (g/L)= a) 50, b) 100 y c) 150.

Ahora bien, aparte de la activación de la rutas de las pentosas fosfato y el ciclo del glioxilato para la formación de D-arabitol y ácido cítrico, respectivamente, se evidenció la formación de etanol, el cual estuvo presente en todas las fermentaciones llevadas a cabo, todos estos cambios en el metabolismo llevaron consigo el descenso del CR_m en las diferentes concentraciones probadas, así como la disminución del rendimiento, $Y_{x/s}$.

Como se mencionó anteriormente, al ser una levadura Crabtree negativa, *P. pastoris* presenta un metabolismo mayormente respiratorio, permitiéndole obtener altas densidades celulares en el medio de cultivo (Cereghino *et al.*, 2000). Sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo como limitación de oxígeno, altas tasa de dilución, estrés osmótico y variaciones del pH, etc., el metabolismo de desbordamiento es activado formando etanol, polioles y algunos ácidos orgánicos (Bauman *et al.*, 2011; Carnicer *et al.*, 2009 Chiruvolu *et al.*, 1998), así como un aumento en la respiración, incrementando la producción de CO_2 y el consumo de O_2 , trayendo consigo un decremento en el rendimiento celular, $Y_{x/s}$, debido un mayor gasto de energía y de

átomos de carbono en la formación de estos metabolitos, en lugar de dirigirse estos recursos a la formación de biomasa. . Por otro lado, tales condiciones de cultivo pudieran favorecer la producción de proteínas recombinantes (Baumann *et al.*, 2011; Solá *et al.*, 2004). En este trabajo aparte de notar la relación entre el incremento de la concentración inicial del sustrato con la producción de metabolitos secundarios, se observó que la variedad de estos productos está relacionado con el grado de reducción del sustrato empleado.

Adicionalmente es preciso destacar que las concentraciones de los metabolitos formados junto con los valores de CO₂ y biomasa producida fueron empleados en los balances de carbono para cada concentración probada. Las figura 23a y 23b muestran el porcentaje promedio de carbono recuperado proveniente del sustrato en forma de biomasa, CO₂ y metabolitos secundarios.

En el caso de los cultivos con glicerol a concentración, S₀ (g/L)= 50 y 100, la cantidad de carbono destinada a la formación de productos estuvo entre el 6 y 9% respectivamente, por otro lado el CO₂ formado representó el 28 y 31% del carbono proveniente del glicerol respectivamente, quedando como mayor producto la biomasa con un 70 y 45% del carbono suministrado en ambas concentraciones (Figura 23a),

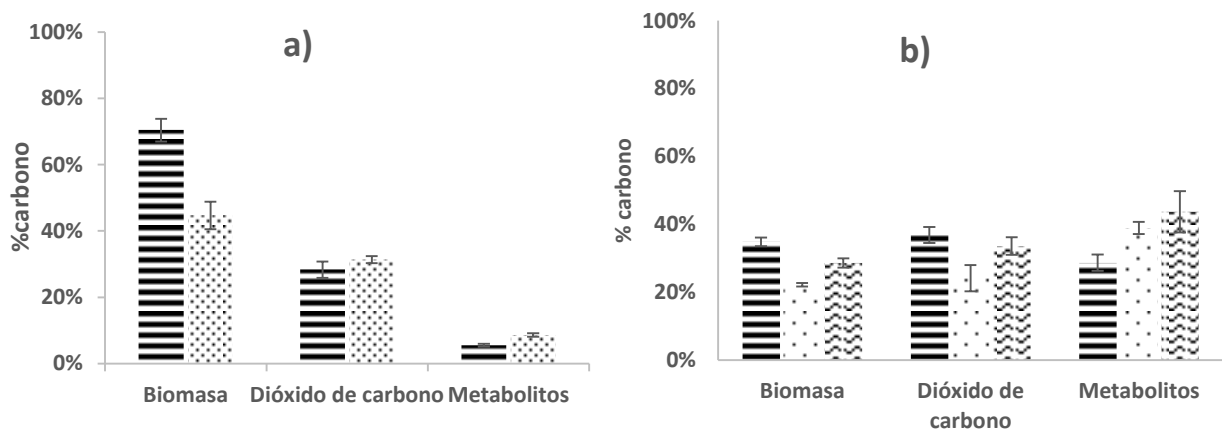


Figura 22. Porcentaje de carbono recuperado en forma de biomasa, CO₂, y metabolitos en a) glucosa y b) glicerol, a concentraciones iniciales de sustrato, S₀ (g/L)= 50 (≡) 100 (⊗) y 150 (≈)

De la misma forma, los cultivos suplementados con glucosa vieron afectado el porcentaje de carbono destinado a biomasa ya que a concentraciones iniciales, S₀ (g/L)=50, 100 y 150, la

distribución de carbono fue de 35,22 y 29 % respectivamente, valores por debajo del 50% de carbono cuando los comparamos con los datos obtenidos en glicerol, mientras que la respiración (producción de CO₂) se incrementó más del 30% respecto a los cultivos con glicerol siendo la recuperación de carbono en forma de CO₂ del 37,24, y 29% a concentración inicial de 50, 100 y 150 g/L, respectivamente. Por su parte, la generación de metabolitos se incrementó considerablemente así como la diversidad de los productos formados, tal formación de productos en las diferentes concentraciones (50, 100 y 150 g/L) fueron 29,39 y 44 % respectivamente (Figura 23b). Con base en estos resultados se observó que la producción de biomasa es más eficiente en glicerol que en los cultivos con glucosa, ahora bien como se mencionó antes, la distribución del carbono está sujeta a las condiciones de cultivo a las que es sometida *P. pastoris*.

9. Conclusiones

La adición de amortiguador fosfatos al medio de cultivo incluso a concentración de 50 mM, favoreció la producción de biomasa en presencia de glucosa como fuente de carbono.

A una concentración de fosfatos de 150mM se obtuvo el menor decremento del valor del pH en los cultivos líquidos con glucosa y glicerol.

En los cultivos líquidos con una relación C/N igual a 10 se observó una disminución del tiempo de crecimiento así como la producción de biomasa.

En medio sólido la mejor producción de biomasa en glicerol y glucosa fue la obtenida a baja concentración ($S_0 = 50$ g/L)

Utilizar un sustrato más reducido aumenta el rendimiento, $Y_{x/s}$ así como los rendimientos en base a CO_2 y O_2 (Y_{x/CO_2} y Y_{x/O_2})

Utilizar un sustrato más oxidado redujo el tiempo de crecimiento así como los rendimientos, $Y_{x/s}$, Y_{x/CO_2} y Y_{x/O_2}

P. pastoris al igual que otras levaduras y hongos, destino bajos niveles de energía a funciones de mantenimiento celular en los diferentes sustratos trabajados por lo que su efecto sobre el rendimiento celular fue mínima o nula en las diferentes concentraciones probadas.

El punto de equilibrio o inflexión del metabolismo de *P. pastoris* visto desde las curvas de crecimiento aumentó consecutivamente con el incremento de la concentración inicial, S_0 .

Bajos valores del CR en los cultivos con glicerol fueron relacionados a la formación de D-arabitol y en menor cantidad ácido cítrico.

Altos valores del CR en los cultivos con glucosa fueron relacionados a la formación de etanol D- arabitol y ácido cítrico.

En los cultivos con glicerol, el carbono fue dirigido principalmente a un metabolismo respiratorio con producción de biomasa y CO_2 , mientras que con glucosa como sustrato principal el metabolismo fue mixto con producción de biomasa, CO_2 y etanol principalmente

10. Perspectivas

Con este trabajo se pudo comprobar la eficiencia del glicerol como sustrato en la producción de biomasa en medio sólido sobre un sustrato con un mayor grado de reducción como es la glucosa, debido a la baja desviación del metabolismo respiratorio cuando se trabajó a altas concentraciones de sustrato, con una producción mínima de metabolitos indeseables en el medio de cultivo, por lo que ahora, pudiera considerarse escalar a un nivel mayor dicha producción de biomasa celular, utilizando placas de EPU de mayor tamaño, con el mismo control del metabolismo que ofreció la respirometría y el análisis metabólico, ambos efectuados en este trabajo.

11. Bibliografía

- Aizemberg, R., Terrazas, W. D., Ferreira-Dias, S., Valentini, S. R., & Gattás, E. A.** (2011). Optimal conditions for biomass and recombinant glycerol kinase production using the yeast *Pichia pastoris*. *Food Technol. Biotechnol.* 49(3) 329.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A.** (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14(6): 4135-4144.
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., and Büchs, J.** (2004). Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 17(3), 187-194.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M., and Adler, L.** (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO journal*, 16(9), 2179-2187.
- Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., and Batt, C. A.** (2004). An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 37(1), 18-26.
- Ayed, A., Rabhi, I., Dellagi, K., and Kallel, H.** (2008). High level production and purification of human interferon $\alpha 2b$ in high cell density culture of *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 42(2), 173-180.
- Barbier, G. G., Joshi, R. C., Campbell, E. R., and Campbell, W. H. B.** (2004). Purification and biochemical characterization of simplified eukaryotic nitrate reductase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 37(1), 61-71.
- Baumann, K., Carnicer, M., Dragosits, M., Graf, A. B., Stadlmann, J., Jouhten, P. and Ferrer, P.** (2010). A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC systems biology*, 4(1), 141.
- Barranco-Florido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., and Saucedo-Castañeda, G.** (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme Microb. Technol.* 30 (7), 910-915.

- Bollok M, Resina D, Valero F, and Ferrer P** (2009). Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: Expanding the toolbox for recombinant protein production. *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 192-201
- Brejning, J., and Jespersen, L.** (2002). Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 75 (1), 27-38.
- Carnicer, M., Baumann, K., Töplitz, I., Sánchez-Ferrando, F., Mattanovich, D., Ferrer, P., and Albiol, J.** (2009). Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microb. Cell. Fact.* 8(1), 65.
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M.** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- Chiruvolu, V., Eskridge, K., Cregg, J., and Meagher, M.** (1998). Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75(2-3), 163-173.
- Christen, P., Auria, R., Vega, C., Villegas, E., and Revah, S.** (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology advances*, 11(3), 549-557.
- Cronwright, G. R., Rohwer, J. M., and Prior, B. A.** (2002). Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9), 4448-4456.
- Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., and Batt, C. A.** (2004). An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 37(1), 18-26.
- De Deken, R. H.** (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), 149-156.
- Erickson, L. E., Minkevich, I. G., & Eroshin, V. K. (1978).** Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 20(10), 1595-1621.
- Favela-Torres, E., Córdova-López, J., García-Rivero, M., and Gutiérrez-Rojas, M.** (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochem.* 33 (2), 103-107.
- Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., and Gancedo, C.** (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 507-529.

Ferreira, C., Van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., and Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 16(4), 2068-2076.

Gelmi, C., Pérez-Correa, R., and Agosin, E. (2002). Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 37 (9), 1033-1040.

Ghosalkar, A., Sahai, V., and Srivastava, A. (2008). Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource technology*, 99 (16), 7906-7910

Guo, M. J., Zhuang, Y. P., Chu, J., Zhang, S. L., Xiong, A. S., Peng, R. H., and Yao, Q. H. (2007). Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* FPHY34. *Process Biochem.* 42(12), 1660-1665.

Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S., and Favela-Torres, E. (1995). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnology Letters*, 17 (2), 219-224.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J., and Van Zyl, W. H. (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 31

Hang, H., Ye, X., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, M., and Zhang, S.(2009). A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 44(4), 185-188

Holker, U., Hofer, M, and Lenz, J. (2004) Biotechnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 175-186.

Hong, F., Meinander, N. Q., and Jönsson, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng*, 79(4), 438-449.

Ibsen, K. H. (1961). The Crabtree effect: a review. *Cancer Research*, 21(7), 829-841.

Imai, T., and Ohno, T. (1995). Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J. Biotechnol.* 38(2), 165-172.

Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K. M., Vlasuk, G. P., Dickerson, K., Brown, S., and Meagher, M. M. (1999). Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 24(7), 438-445

Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K., and Enfors, S. O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), 385-393.

Jordà, J., Jouhten, P., Cámara, E., Maaheimo, H., Albiol, J., and Ferrer, P. (2012). Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose: methanol mixtures. *Microb. Cell. Fact.* 11, 57.

Kumar, S., and Gummadi, S. N. (2011). Metabolism of glucose and xylose as single and mixed feed in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: production of industrially important metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (5), 1405-1415.

Lagunas, R., and Ruiz, E. (1988). Balance of production and consumption of ATP in ammonium-starved *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology*, 134 (9), 2507-2511.

Lareo, C., Sposito, A. F., Bossio, A. L., and Volpe, D. C. (2006). Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme Microb. Technol.* 38(3), 391-399.

Lenhinger AL (1993). Bioquímica. *Ediciones Omega. Segunda Edición. Barcelona. 1117p*

López, M., Loera, O., Guerrero-Olazarán, M., Viader-Salvadó, J. M., Gallegos-López, J. A., Fernández, F. J. and Viniegra-González, G. (2010). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85(4), 435-440

Matthews, K. C., Van Holde, E. K., Ahern, G. K. (2002) Bioquímica. *Editorial Addison Wesley. Tercera edición. 1335p*

Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M. and Gasser, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*, 8(1), 29.

Morán, J. W., and Witter, L. D. (1979). Effect of sugars on D-arabitol production and glucose metabolism in *Saccharomyces rouxii*. *J. Bacteriol.* 138 (3), 823-831.

Nozaki, H., Suzuki, S. I., Tsuyoshi, N., and Yokozeki, K. (2003). Production of D-arabitol by *Metschnikowia reukaufii* AJ14787. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (9), 1923-1929.

Núñez, M. (2012). Desarrollo de un sistema de producción de *Pichia pastoris* en cultivo en medio sólido. Tesis de Maestría. UAM. México.

Olz, R. E. G. I. N. E., Larsson, K. A. T. R. I. N., Adler, L. E. N. N. A. R. T., and Gustafsson, L. E. N. A. (1993). Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J.Bacteriol.* 175(8), 2205-2213.

Ônishi, H. (1960). Studies on osmophilic yeasts. *Bulletin of the agricultural chemical society of japan*, 24(4), 386-396.

Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., and Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356-360.

Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sanchez, B., and Aguilar-Uscanga, M. G. (2010). Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *J.Chem.Technol.Biotechnol.* 85(10), 1361-1367.

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

Payne, W. E., Kaiser, C. A., Bevis, B. J., Soderholm, J., Fu, D., Sears, I. B., and Glick, B. S. (2000). Isolation of *Pichia pastoris* genes involved in ER-to-Golgi transport. *Yeast*, 16(11), 979-993.

Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25 (3), 244-263.

Postma, E., Verduyn, C. O. R. N. E. L. I. S., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. I Microbiol.* 55 (2), 468-477.

Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., & Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2), 10-16.

Pirt, S. J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications.

Ren, H. T., Yuan, J. Q., and Bellgardt, K. H. (2003). Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J. Biotechnol.* 106(1), 53-68.

Rodríguez, F., Ludovico, P., and Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 101-121). Springer Berlin Heidelberg.

Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., and Hinton, J. C. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J.Bacteriol.* 194 (3), 686-701.

Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D., and Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.*29 (1), 13-24.

Solá, A., Maaheimo, H., Ylönen, K., Ferrer, P., and Szyperski, T. (2004). Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.*271(12), 2462-2470.

Van Urk H, Postma E, Scheffers WA, and Van Dijken, J. P. (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J.Gen.Microbiol.*135 (9), 2399-2406.

Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*,59 (1), 49-63.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. D. J., Díaz-Godínez, G., and Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem.Eng.J.*, 13(2), 157-167.

Viniegra-González, G., and Favela-Torres, E. (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol.Biotechnol.*44(3), 397.

Wiame, J.-M., Grenson, M, and Arts, H. N., *Advances Microbial Physiology*, 1985, 26, 01.

Wang, J., Nguyen, V., Glen, J., Henderson, B., Saul, A., and Miller, L. H. (2005). Improved yield of recombinant merozoite surface protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* using chemically defined media. *Biotechnol.Bioeng.*90 (7), 838-847.

Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R., and Ye, Q. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme Microb.Tech.*36 (2), 210-216.

Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A. (2004). Microplate based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnol.Bioeng.* 88(7), 832-837.

Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., and Mikata, K. (1995). The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen nov.(*Saccharomycetaceae*) *Biosci Biotechnol .Biochem.* , 59(3), 439-444.

Yamashita, S. I., Yurimoto, H., Murakami, D., Yoshikawa, M., Oku, M., and Sakai, Y. (2009). Lag-phase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Genes to Cells*, 14(7), 861-870.

Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., and Meagher, M. M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Papers in Biotechnology*, 18.

Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., and Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*, 16(6), 643-648.

Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R., and Ye, Q. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiotensin production. *Enzyme Microb. Tech.* 36 (2), 210-216

12. Anexos

12.1. Anexo 1. Curva estándar

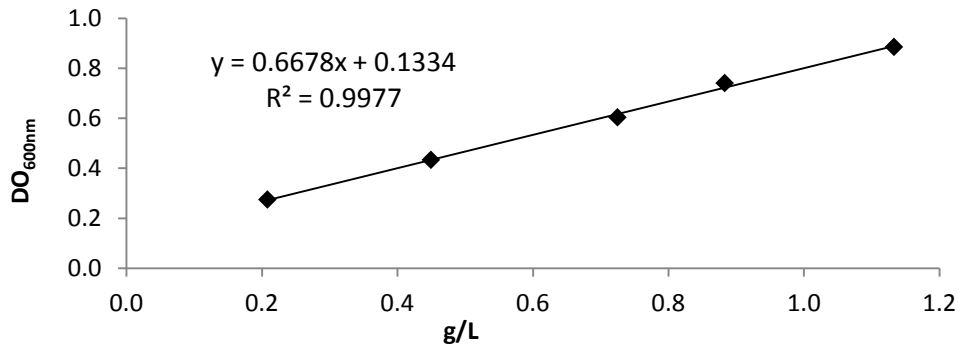


Figura 24. Curva estándar de biomasa obtenida por correlación entre absorbancia y peso seco. Valor de correlación, $R^2=0.9977$.

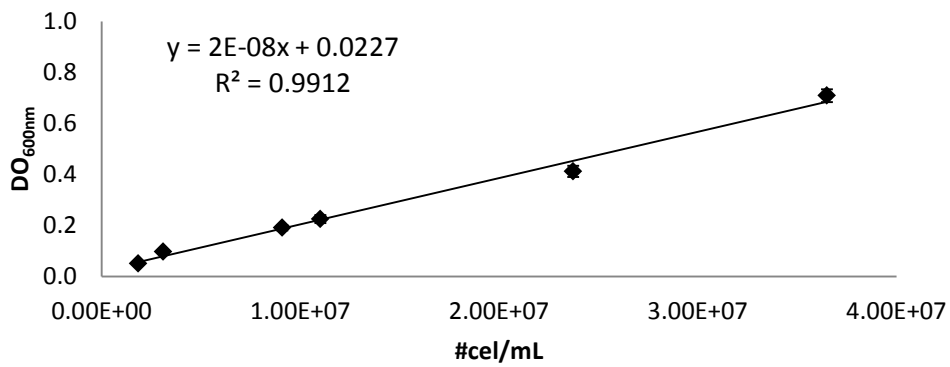


Figura 23. Correlación entre número de células y densidad óptima. Valor de correlación, $R^2=0.9912$.

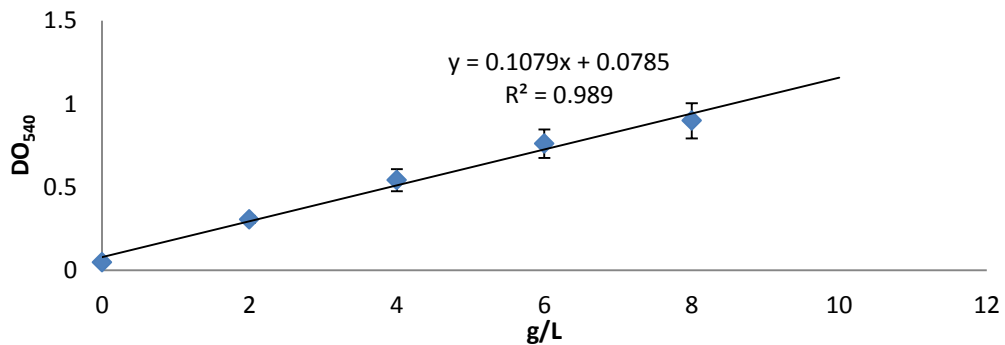


Figura 24. Curva estándar obtenida por micro DNS para la cuantificación de glucosa (g/L) en los cultivos en matraz agitado. Valor de correlación, $R^2=0.989$.

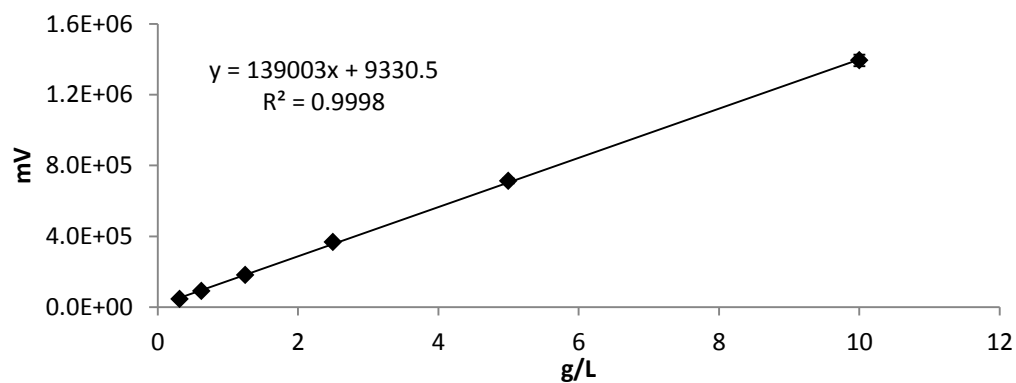


Figura 25. Curva estándar empleada en la cuantificación de glicerol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.998$.

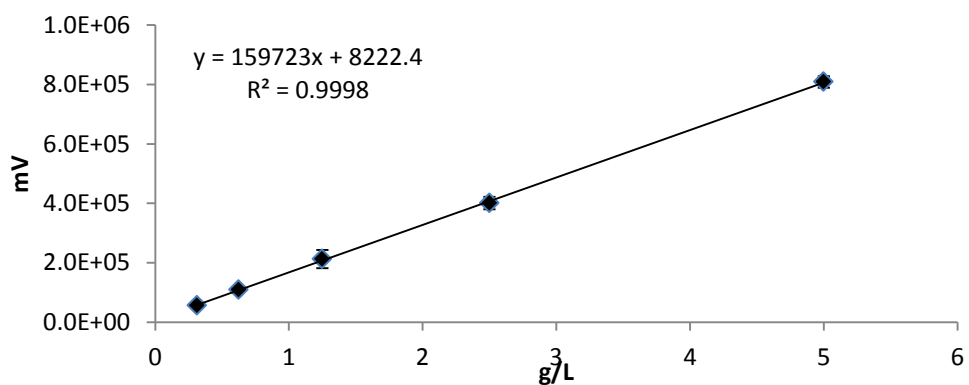


Figura 26. Curva estándar empleada en la cuantificación de glucosa, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9998$.

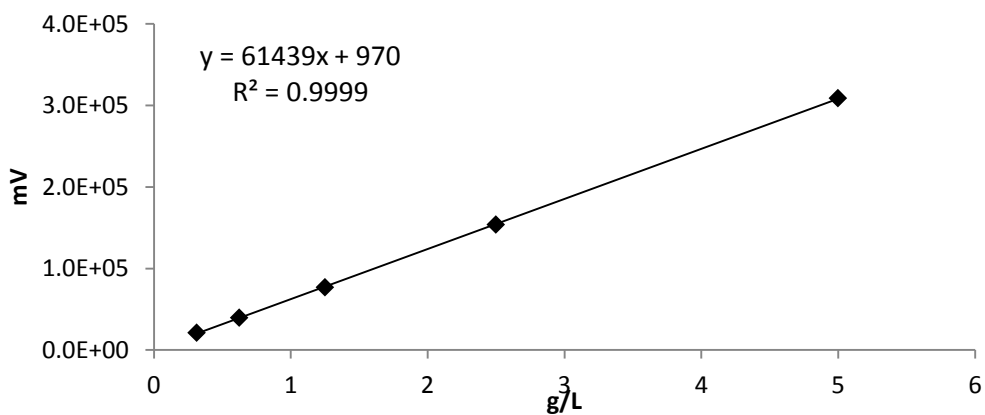


Figura 27. Curva estándar empleada en la cuantificación de etanol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9999$.

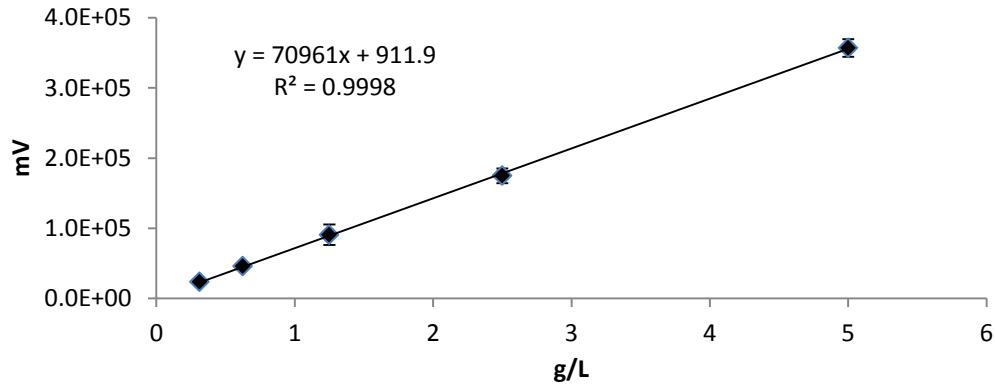


Figura 28. Curva estándar empleada en la cuantificación de ácido acético, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R^2=0.9998$.

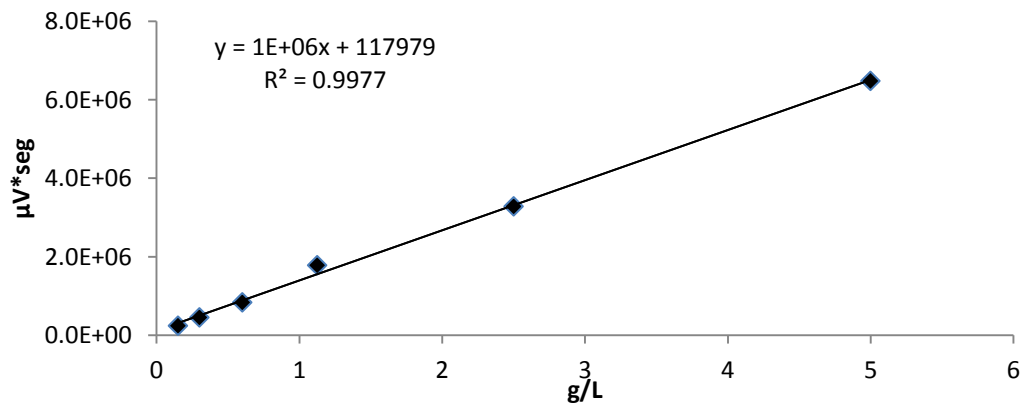


Figura 29. Curva estándar empleada en la cuantificación de ácido cítrico, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación, $R_2=0.9977$.

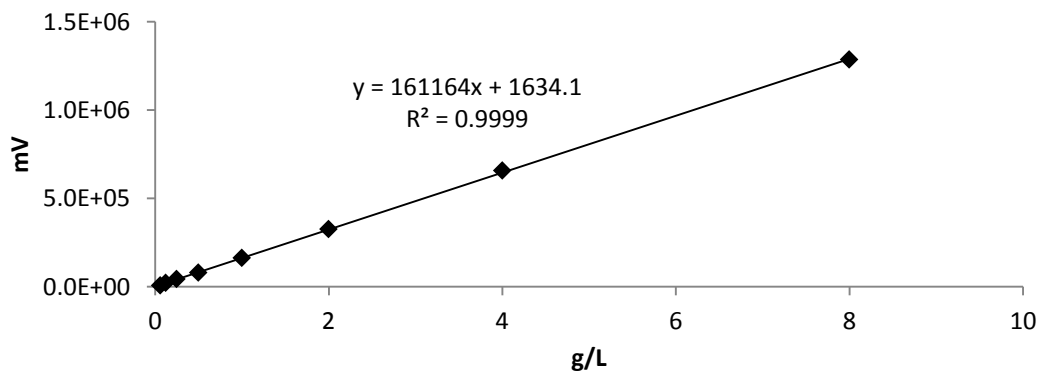


Figura 30. Curva estándar empleada en la cuantificación de D- arabitol, obtenida por cromatografía líquida. Valor de correlación $R_2=0.9999$.

12.2. Anexo 2. Cromatogramas y tiempos de retención.

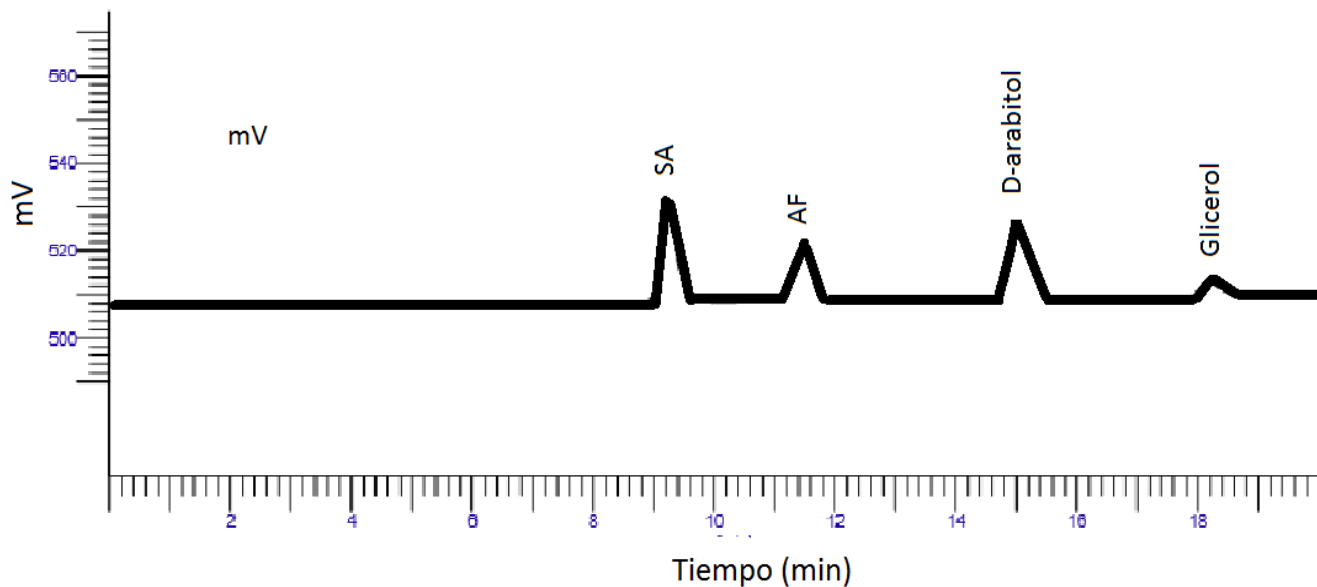


Figura 31. Cromatogramas tomados al tiempo final en los cultivos con glicerol en EPU. El tiempo de retención (t_r) para glicerol y D- arabitol fue de 18.22 y 15.1 minutos respectivamente. Abreviaciones: SA, Sulfato de amonio; AF, amortiguador de fosfatos.

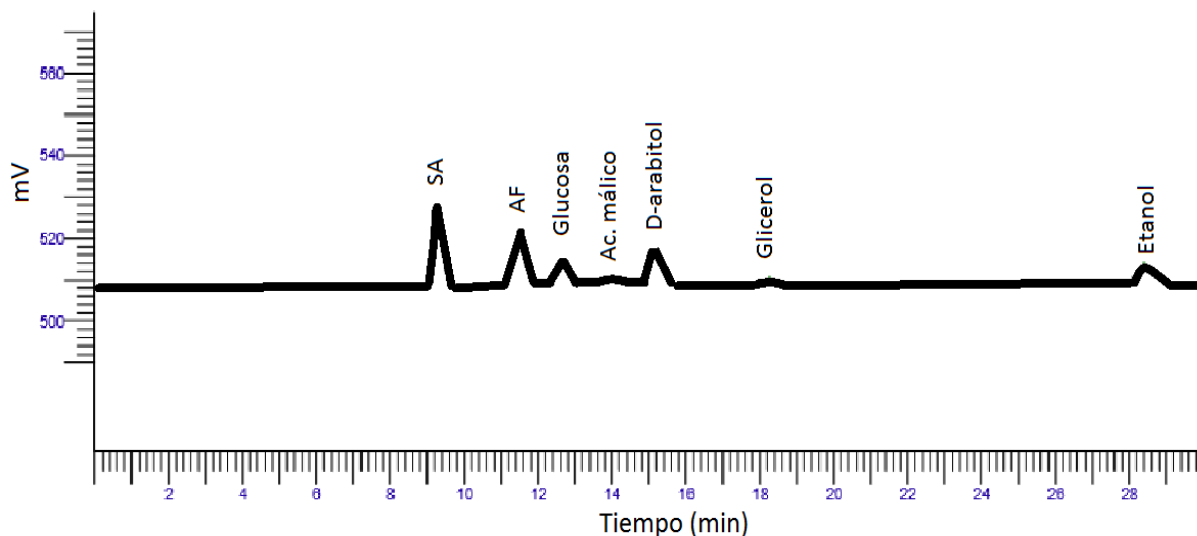


Figura 32. Cromatogramas tomados a las 26 horas de cultivo con glucosa en EPU. El tiempo de retención (t_r) para glucosa, glicerol, D- arabitol, ácido málico y etanol fue de 12.65, 18.22, 15.1, 14.08 y 28.33 minutos respectivamente. Abreviaciones: SA, Sulfato de amonio; AF, amortiguador de fosfatos.

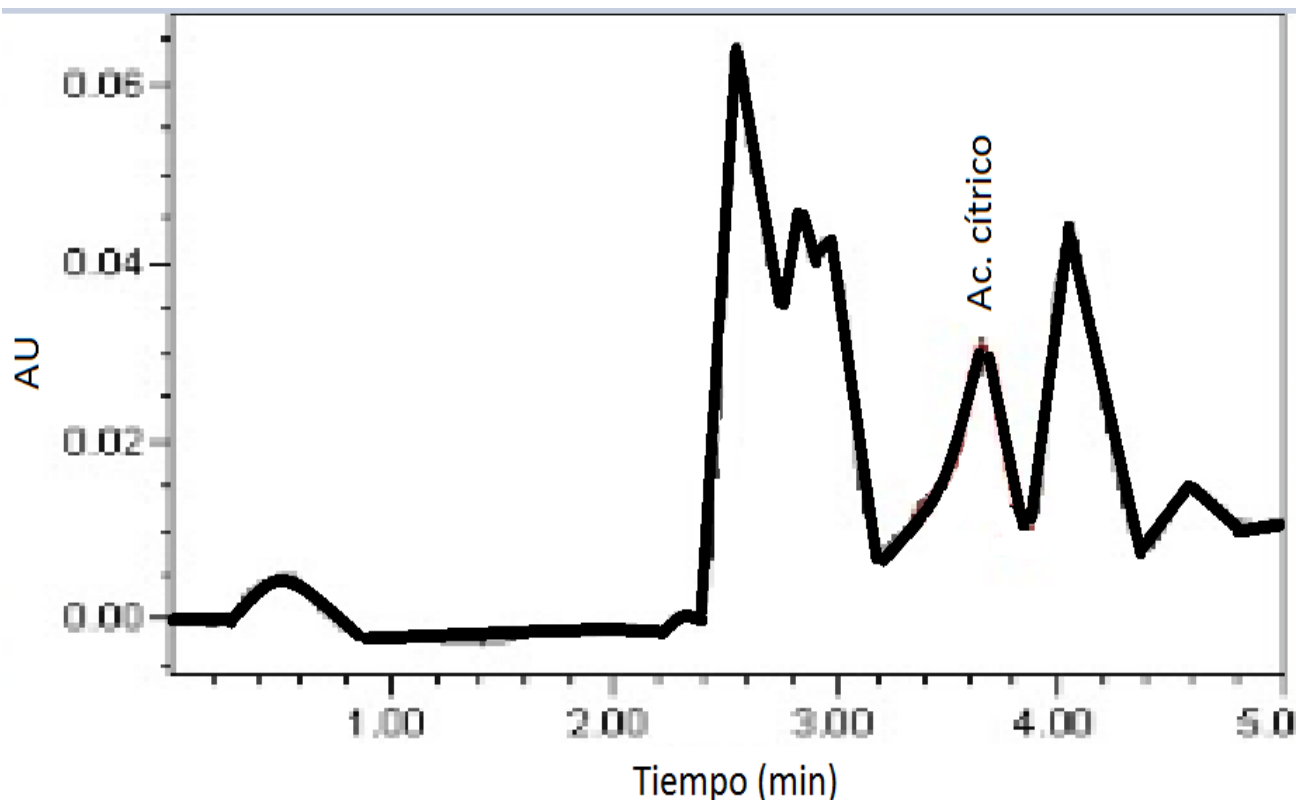


Figura 33. Cromatogramas tomados al tiempo final de cultivo con glicerol en EPU. El tiempo de retención (tr) para el ácido cítrico fue de 3.66 minutos.

12.3. Anexo 3. Espectrofotometría de masas.

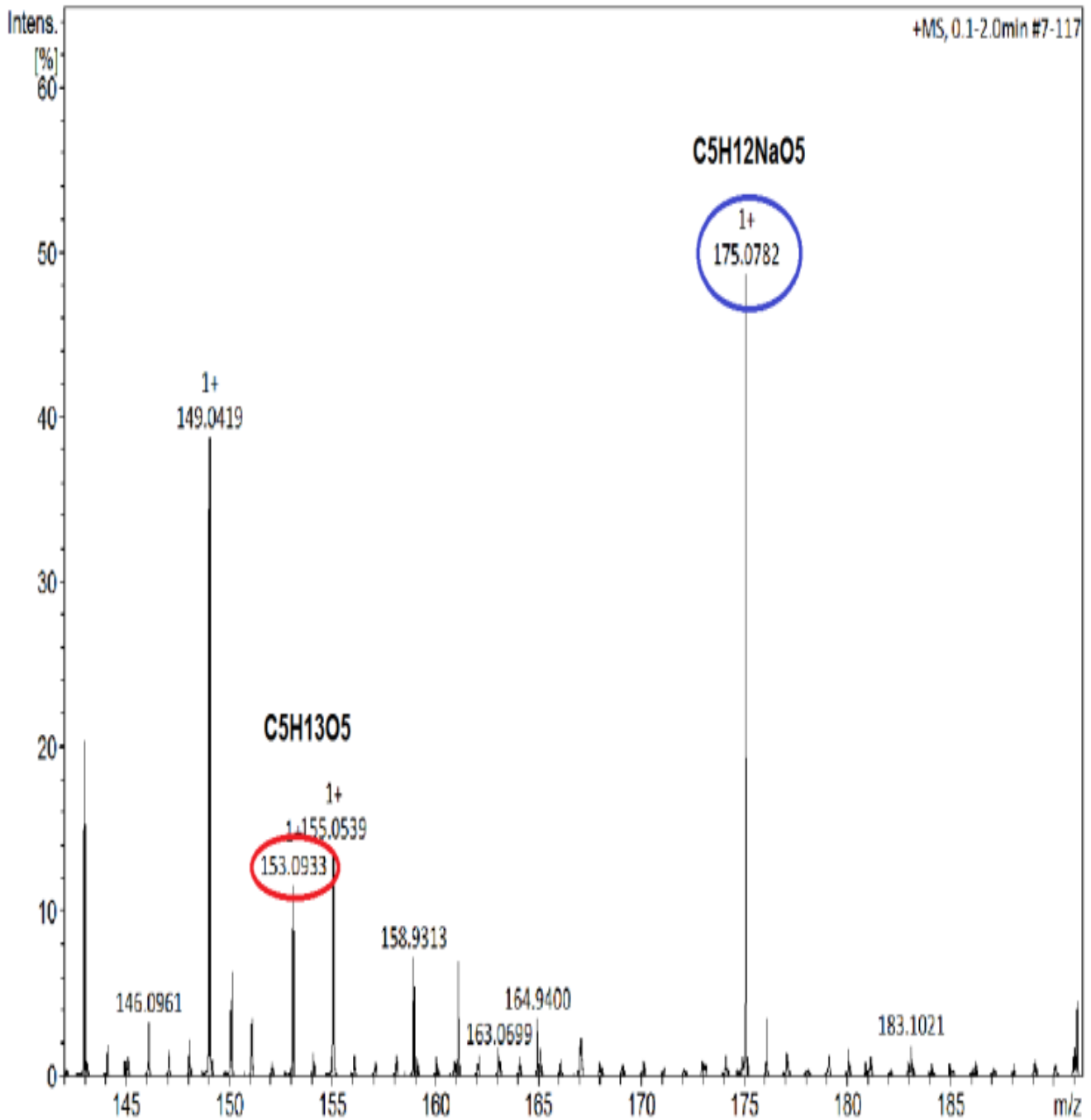


Figura 34. Espectro de masas “positivo”. La molécula de D-arabitol (152.15 g/mol) sufrió dos diferentes protonaciones (H^+ y Na^+), obteniéndose dos diferentes pesos moleculares (153.09 y 175.07 g/mol).

12.4. Anexo 4. Amortiguador de fosfatos

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 50, 100 y 150mM

Para conocer la concentración en gramos por litro de fosfato de potasio monobásico (KHPO_4) y fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4) primero se calculó la concentración molar utilizando la ecuación de Henderson- Hasselbalch (1)

$$pH = pka + \log\left(\frac{A^-}{AH}\right) \dots (1)$$

Donde, los datos disponibles para preparar la solución amortiguadora fueron: $pK_a=7.2$, $pH=6.0$, quedando como incógnitas la concentración molar de la base $[A^-]$ y la concentración molar del ácido $[AH]$, sustituyendo los valores de pH y pK_a a la ecuación (1) obtenemos:

$$0.06309[AH] = A^- \dots (2)$$

Para resolver la anterior ecuación con dos incógnitas se utilizó la siguiente suposición:

$$[AH] + [A^-] = M \dots (3)$$

Siendo M , la concentración molar (mol/L). Sustituyendo (2) en (3) y factorizando términos se obtiene:

$$[AH] = \frac{M}{[A^-]} \dots (4)$$

Sustituyendo (4) en (3) obtenemos:

$$[A^-] = M - [AH] \dots (5)$$

Con la concentración molar ahora conocida se calculó la concentración en g/L utilizando la ecuación (6) para cada uno de los compuestos.

$$g = P.M * V * M \dots (6)$$

En donde, los pesos moleculares, P.M, fueron 174.18 g/mol (K_2HPO_4) y 136.09 g/mol (KH_2PO_4), el volumen, V , fue de un 1 L y la molaridad la tomamos de (4) y (5), sustituyendo estos valores en (6) se obtuvo la composición para cada concentración molar trabajada (Tabla 8)

Tabla 8. Formulación de la solución amortiguadora de fosfatos a 50, 100 y 150mM

	50 mM	100 mM	150 mM
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
K₂HPO₄	6.4	12.8	19.2
KHPO₄	0.52	1.03	1.55

12.5. Anexo 5. Formulación del medio de cultivo.

Tabla 9. Composición del medio de cultivo sumergido a diferente relación C/N.

Compuesto	C/N 6.2	C/N 10	C/N 10
Glucosa	50	50	-
Glicerol	-	-	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.78	5.66	6.95
Urea	2.85	1.88	1.045
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.47	0.47	0.47
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	0.036	0.036
Extracto de levadura	0.5	0.5	0.5
Solución Biotina *	1 mL/L	1 mL/L	1 mL/L
Solución de elementos traza	1.2mL/L	1.2mL/L	1.2mL/L
Elementos traza			
Compuesto	Concentración (%)	Concentración (%)	Concentración (%)
CuSO ₄	0.6	0.6	0.6
KI	0.008	0.008	0.008
MnSO ₄	0.3	0.3	0.3
NaMoO ₄	0.02	0.02	0.02
H ₃ BO ₃	0.002	0.002	0.002
CoCl ₂	0.05	0.05	0.05
ZnCl ₂	2	2	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.5	6.5	6.5
H ₂ SO ₄ (v/v)	5	5	5
Biotina			
Biotina (% p/v)	0.02	0.02	0.02

*La solución de biotina se esterilizó por filtración utilizando filtros de membrana estériles con tamaño de poro de 0.45 µm y posteriormente se adicionó al medio esterilizado. Abreviaturas: EL, extracto de levadura; SB, solución de biotina; SET, solución de elementos trazas.

Tabla 10. Composición del medio de cultivo para las cinéticas en medio sólido

Compuesto	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Glucosa	50	100	150			
Glicerol				50	100	150
(NH₄)₂SO₄	5.66	11.32	16.426	6.95	13.85	20.775
Urea	1.88	3.76	5.4	1.045	2.09	3
MgSO₄·7H₂O	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
CaCl₂·2H₂O	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036
EL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
SB*	1.2mL/L	1.2mL/L	1.2mL/L	1.2mL/L	1.2mL/L	1.2mL/L
SET	1mL/L	1mL/L	1mL/L	1mL/L	1mL/L	1mL/L
C/N	10	10	10	10	10	10

*La solución de biotina se esterilizó por filtración utilizando filtros de membrana estériles con tamaño de poro de 0.45 µm y posteriormente fue adicionada al medio esterilizado. Abreviaturas: EL, extracto de levadura; SB, solución de biotina; SET, solución de elementos trazas.

12.5. Anexo 6. Modelos matemáticos

Medición y evaluación de los parámetros cinéticos

Para el seguimiento de la producción de biomasa se utilizó la ecuación logística de Velhurst-Pearl:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \left[1 - \frac{X}{X_m} \right] X \dots (7)$$

Donde X_m es la concentración máxima de la biomasa (gX/g_{epu}), y μ_m la tasa de crecimiento específico máxima (h⁻¹). Integrando la ecuación anterior obtenemos:

$$X(t) = \frac{X_m}{1 + ((X_m - X_0)/X_0) * exp^{-\mu t}} \dots (8)$$

Los parámetros μ , X_m y X_0 fueron estimados por minimización de la suma de mínimo cuadrado del error residual entre los valores estimados por la ecuación integrada, $X(t)$ y los valores experimentales. Los datos estimados fueron ajustados con el programa Solver® de Excel.

Respirometría y coeficientes de mantenimiento

La producción de CO₂ y el consumo de O₂ fueron seguida a partir de la ecuación:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/c}} \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} X \dots (9)$$

Donde $Y_{x/c}$, es el rendimiento de biomasa (g X/g CO₂), m_{CO_2} representa el coeficiente de mantenimiento (gS/gCO₂*h), el cual se refiere a la energía que no está relacionada a la síntesis celular. Sustituyendo (7) y (8) en (9) obtenemos:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \left[\frac{\mu_m}{Y_{x/c}} * \left(1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{X_m - X_0}{X_0} \right) * exp^{-\mu t}} \right) + m_{CO_2} \right] * \left(\frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m - X_0}{X_0} \right) * exp^{-\mu t}} \right) \dots (10)$$

Factorizando términos y realizando cambio de variables, obtenemos:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{RA \left(\frac{1}{1+u} + m^* \right)}{1+u} \dots (11)$$

Donde, U es un número adimensional ($\frac{X_m - X_0}{X_0} * e^{-\mu t}$), R_A representa la tasa de respiración (g $CO_2 * h^{-1}$) ($\frac{X_m * \mu}{Y \frac{x}{CO_2}}$), y m^* representa otro número adimensional ($\frac{Y \frac{x}{CO_2} * m}{\mu}$), por otro lado, derivando

U en dt de (11) obtenemos

$$dt = \frac{1}{\mu} \frac{du}{U} \dots (12)$$

Sustituyendo (12) en (11) obtenemos:

$$dCO_2 = -\frac{R_A}{\mu} \int \frac{U^{-1+U} + m^*}{U(1+U)} dU \dots (13)$$

Utilizando el programa en línea "WolframAlpha®" (<http://www.wolframalpha.com>) se integró (13), obteniendo la siguiente integral indefinida:

$$\Delta CO_2 = -\frac{R_A}{\mu} [m^* \ln U - m^* \ln (1 + U) - \frac{1}{1+U} + C] \dots (14)$$

En donde C es constante, por otro lado, suponiendo que $m=0$ y $t=\infty$, entonces se resuelve (14) de la siguiente manera:

$$Q = \Delta CO_2 = \frac{R_A}{\mu} \left[\frac{A}{1+A} \right] \dots (15)$$

Siendo Q un nuevo término empleado para la producción acumulada de CO_2 (g CO_2) exclusivamente obtenida del crecimiento, A es un número adimensional ($\frac{X_m - X_0}{X_0}$). Sustituyendo

$R_A = \frac{X_m * \mu}{Y \frac{x}{CO_2}}$ en (15) se obtuvo:

$$Q = \frac{X_m}{Y \frac{x}{CO_2}} \left[\frac{A}{1+A} \right] \dots (16)$$

Si $A \gg 1$ ($X_m \gg X_0$) entonces se sustituye (15) en (16), simplificando el cálculo de Y_{X/CO_2} y X_m se obtiene:

$$Y \frac{x}{CO_2} = \frac{\mu * X_m}{R_A} \dots (17)$$

$$X_m = \frac{R_A * Y_{X/S}}{\mu} \dots (18)$$

Consumo de sustrato

La concentración de sustrato fue modelada utilizando el modelo de Pirt, (1975)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + mX \dots (19)$$

Donde S, es la concentración de sustrato (g S/g_{epu}), m es el coeficiente de mantenimiento (g S/gX*h), Y_{X/S}, el coeficiente de rendimiento de biomasa (g X/g S) y x es la concentración de la biomasa producida (g/g_{epu}). Rea reglando (19) obtenemos:

$$-\frac{d\left(s - \frac{x}{Y_{X/S}}\right)}{dt} = mX \dots (20)$$

Posteriormente dividimos (20) por (7) para obtener:

$$-\frac{d\left(s - \frac{x}{Y_{X/S}}\right)}{dx} = \frac{m}{\mu m \left(1 - \frac{xm}{X_0}\right)} \dots (21)$$

Integrando (21) obtenemos:

$$S(X) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{X/S}} - \frac{m * X_m}{\mu m} * \ln\left[\frac{X_m - X_0}{X_m - X}\right] \dots (22)$$

Donde X₀ es la concentración inicial del sustrato.

Punto de inflexión a partir de las curvas de CR y d'x/dt

Las curvas de CR y d'x/dt fueron ajustadas a un modelo polinomial, dependiendo del valor arrojado del coeficiente de correlación, R^2 , fue el grado de ajuste empleado, en la mayoría de los casos las curvas se ajustaron a una ecuación de segundo grado, de la forma:

$$y = ax^2 + bx + c \dots (23)$$

Derivando a (23) nos queda:

$$y' = ax + b \dots (24)$$

Igualando a cero (24) y despejando x obtenemos:

$$x = b/a \dots (25)$$

Posteriormente sustituimos X en (25) para calcular el valor de y, obteniendo el tiempo de inflexión y el máximo valor del CR o de d'x/dt.

12.6. Anexo 7. Balance de carbono

Balance de carbono

Para calcular los gramos de carbono provenientes del sustrato que fue destinado a CO₂, metabolitos, y biomasa se utilizaron diferentes fracciones de carbono, para el cálculo de los gramos de carbono presentes en el dióxido de carbono medido para cada cultivo, la relación fue la siguiente:

$$\frac{g_{CO_2}}{g_{epu}} * \frac{12 g_{carbonoCO_2} / 1molCO_2}{44 g_{CO_2} / 1molCO_2} = g_{carbono CO_2} / g_{epu}$$

Dependiendo de cada metabolito se utilizaron diferentes fracciones de carbono para el cálculo de los gramos de carbono presentes en cada metabolito, como vemos a continuación:

$$\frac{g_{etanol}}{g_{epu}} * \frac{24 g_{carbonoetanol} / 1moletanol}{46 g_{etanol} / 1moletanol} = g_{carbono etanol} / g_{epu}$$

$$\frac{g_{arbitol}}{g_{epu}} * \frac{60 g_{carbonoarabitol} / 1molarabitol}{151 g_{arabitol} / 1molarabitol} = g_{carbono arabitol} / g_{epu}$$

$$\frac{g_{ac.citrico}}{g_{epu}} * \frac{72 g_{carbonoac.citrico} / 1molac.citrico}{196 g_{ac.citrico} / 1molac.citrico} = g_{carbono ácido cítrico} / g_{epu}$$

La fracción de carbono proveniente de la biomasa formada varía según la fuente de carbono (Jordán *et al.*, 2010, Solá *et al.*, 2013, Santos de Jesús, 2008), debido a la falta de análisis de la composición de carbono de la biomasa formada en ambas condiciones (glucosa y glicerol), se utilizaron los valores reportados por Jordán *et al.*, (2014) para los cultivos con glicerol (CH_{1.772}N_{0.144}O_{0.612}) mientras que para los cultivos con glucosa (CH_{1.761}N_{0.143}O_{0.635}) se usaron los valores publicados por Santos de Jesús, (2010) con estos valores se procedió a calcular la cantidad de carbono presente en la biomasa en ambas condiciones, como a continuación se ejemplifica:

Cultivos con glucosa:

$$\frac{g_{biomasa}}{g_{epu}} * \frac{12 g_{carbono biomasa} / 1mol biomasa}{25.923 g_{biomasa} / 1mol biomasa} = g_{carbono de biomasa} / g_{epu}$$

Cultivos con glicerol:

$$\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ epu}} * \frac{12 g \text{ carbono biomasa} / 1 \text{ mol biomasa}}{25.58 g \text{ biomasa} / 1 \text{ mol biomasa}} = g \text{ carbono de biomasa} / g \text{ epu}$$

Por último, para determinar el porcentaje de carbono del sustrato que se destinó a biomasa, CO₂ y productos primero se calculó el consumo de sustrato de la siguiente forma:

$$\Delta S = S_f - S_i \dots (26)$$

Donde S_f, es la concentración de carbono residual (g/g_{epu}), y S_i, la concentración de sustrato inicial (g/g_{epu}). Posteriormente se dividen los gramos de carbono de biomasa, CO₂ y metabolitos individualmente por el consumo de sustrato.

$$\frac{g \text{ carbono}}{\Delta S} * 100\% \dots (27)$$