

Treball de Fi de Grau Experimental

**Monitorització dels paràmetres respiratoris
de cultius en bioreactors del
llevat *Pichia pastoris***

Joan Marc Navarro Catot i Jordi Vendrell Puigmitjà

Grau en Biotecnologia

Tutor: Dr. Xavier Garcia Ortega

Vic, juny de 2021

Agraïments

Agraïm al Dr. Xavier Garcia Ortega l'oportunitat de poder participar en aquest projecte. Ha estat molt important per a nosaltres poder veure de primera mà la col·laboració del món acadèmic amb la indústria. Estem molt agraïts d'haver pogut participar de forma tan activa en les proves d'equipament d'última generació per a cultius en bioreactor. Creiem que aquest treball ha marcat un abans i després en la nostra futura trajectòria professional.

Aprofitem per agrair també tot l'equip dels laboratoris de biociències de la facultat de ciències i tecnologia de la UVic. Moltes gràcies a la Cristina Martín, en Guillem Masó i la Montserrat Masoliver per la seva paciència amb nosaltres i tota l'ajuda que ens han proporcionat al desenvolupament d'aquest treball, sense ells encara seguiríem buscant els reactius pel primer cultiu.

Per últim, volem donar moltes gràcies a les nostres famílies i amics per tot el suport que ens han estat donant durant aquests mesos.

Divisió del treball

A causa de la naturalesa del treball i disseny experimental, les tasques han estat repartides de forma equitativa entre els dos integrants del grup. Els diversos cultius realitzats segueixen el mateix protocol general, les tasques dutes a terme per un integrant del grup seran realitzades per l'altre integrant en el següent cultiu. S'ha pres aquesta decisió amb l'objectiu d'aconseguir que els dos integrants del grup adquireixin totes les competències experimentals. S'ha seguit la mateixa divisió del treball per al tractament de dades.

La redacció del TFG s'ha portat a terme en conjunt. El TFG exposat a continuació és el resultat del treball i revisió conjunta de tots els apartats.

Resum

Títol: Monitorització dels paràmetres respiratoris de cultius en bioreactors del llevat

Pichia pastoris

Autors: Joan Marc Navarro Catot, Jordi Vendrell Puigmitjà

Tutor: Dr. Xavier Garcia Ortega (UVic-UCC)

Data: Juny 2021

Paraules clau: Bioprocessos, proteïnes recombinants, analitzador de gasos, cabal d'alimentació.

La producció de proteïnes recombinants ha esdevingut una de les aplicacions de la biotecnologia més importants. Un dels majors reptes per la indústria biotecnologia és garantir l'estabilitat i reproductibilitat dels processos per aconseguir la producció de forma continuada i segura. En les últimes dècades s'han desenvolupat i millorat sistemes de control per als bioprocessos i automatitzacions que permeten monitoritzar els paràmetres dels cultius. El desenvolupament i implementació de sistemes de control més precisos suposa un pas clau en la millora de l'eficiència dels bioprocessos.

Paràmetres essencials com la temperatura, el pH o l'oxigen dissolt disposen de sensors i sistemes de control molt estandarditzats. No obstant encara es necessiten desenvolupar tècniques més precises per analitzar paràmetres més complexos sent l'estat metabòlic un exemple clar. Tradicionalment l'estat del creixement del cultiu s'analitza prenent mostres manuals i realitzant diferents tipus d'anàlisis com podria ser: determinació de biomassa, de substrats o productes, etc. Aquesta metodologia requereix la constant supervisió per part dels operaris i augmenta els riscos de contaminació. Altrament, només s'obté informació puntual a temps determinats però no monitoratge constant a temps real, també dit on-line. Recentment s'han desenvolupat alternatives automatitzades i menys invasives per controlar l'estat metabòlic del cultiu i tenir informació sobre el seu creixement. L'analitzador de gasos és una de les millors opcions per al seguiment de l'estat metabòlic dels cultius de forma no invasiva i automàtica. Addicionalment, també és una metodologia fàcilment escalable.

Els cultius en continu afegeixen complexitat a les eines de monitoratge dels cultius, ja que se suma el control precís dels cabals d'entrada de medi i sortida del brou a tots els altres paràmetres esmentats anteriorment. La naturalesa de les bombes peristàltiques i dels tubs utilitzats en aquestes fa que les calibracions típiques de les bombes siguin altament imprecises i causin desviacions significatives en els perfils d'alimentació del cultiu. Per aquest motiu cal desenvolupar estratègies com l'ús de balances de precisió per assegurar que els cabals són constants i precisos al llarg de tots els experiments.

En aquest projecte de final de grau s'ha treballat conjuntament amb l'empresa Bionet (Múrcia, Espanya) per realitzar les proves dels seus equips d'anàlisis de gasos i control de cabal. Tanmateix, s'han realitzat proves prèvies de calibració de la balança utilitzada per controlar el cabal d'alimentació amb un llaç de control tancat. Posteriorment s'han realitzat cultius en continu de tipus chemostat (limitats per font de carboni) per comprovar la seva fiabilitat, precisió i adaptabilitat en condicions estacionàries. En propers passos del projecte es preveu avaluar l'ús d'aquest sistema de control de l'addició de substrat amb un cultiu dinàmic de tipus fed-batch.

Summary

Title: Respiratory parameters monitoring of bioreactor cultures of the yeast *Pichia pastoris*.

Author: Joan Marc Navarro Catot, Jordi Vendrell Puigmitjà

Supervisor: Dr. Xavier Garcia Ortega (Uvic)

Date: June 2021

Keywords: Bioprocessing, recombinant proteins, gas analyzer, feeding flow.

The production of recombinant proteins has become one of the most important applications of biotechnology. One of the greatest challenges for the biotechnology industry is to ensure the stability and reproductivity of the processes for continued and safe production. Over the past decades, control systems for bioprocesses and automation have been developed and improved, allowing the monitorization of the most relevant culture parameters. The development and implementation of more precise control systems is currently considered a key step to improve the bioprocesses efficiency.

Essential parameters such as temperature, pH, or dissolved oxygen have highly standardized sensors and control systems. However, more precise techniques are still needed to analyze more complex parameters being the metabolic state being a clear example. Traditionally, the growth and state of the culture are characterized by taking manual samples and performing different types of analysis as it might be: Determination of biomass, substrates or products, etc. This methodology requires constant supervision by operators and increases the risks of contamination. Furthermore, only point information is obtained and not constant real-time monitoring. Automated and less invasive alternatives have recently been developed to control the metabolic state of the culture and to have information about its growth. Gas analyzers are one of the best options for monitoring the metabolic state of cultures non-invasively and automatically. Additionally, it is also an easily scalable methodology.

Continuous cultures add further complexity to the bioprocess, as they add precise control of the media input and output flow rates to the parameters mentioned above. The nature of the peristaltic pumps and the silicon tubes used in them makes the typical calibrations of the pumps not accurated enough and causes significant deviations in the feeding profiles of the cultures. For this reason, strategies such as the use of precision scales to ensure that feeding is constant and accurate throughout the experiment are being developed.

In this final degree project, we have worked together with the company Bionet (Murcia, Spain) to perform the tests of their gas analyzer and flow control equipment. Various culture strategies have been tested to check the time response and accuracy. Continuous cultures of chemostat (carbon-limited) types have subsequently been performed to check the reliability, accuracy, and adaptability in stationary conditions of the gas analyzer and feeding system. In the next steps of the project, it is planned to evaluate the use of this substrate addition control system with a dynamic culture of fed-batch type.

Glossari

BCU: Bioreactor Control Unit

Q: Cabal d'addició del medi

CER: Carbon dioxid emission rate

CHO: Cèl·lules d'ovari de hámster xinès

FDA: Food and Drug Administration

HEK: Human Embryonic Kidney

NGS: Next Generation Sequencing

OUR: Oxygen uptake rate

OTR: Oxygen transfer rate

RQ: Respiratory quotient

μ : taxa específica de creixement

$\mu_{màx}$: taxa específica de creixement màxima

YPG: Yeast extract, Peptone, Glicerol

YPD: Yeast extract, Peptone, Dextrose

Llistat de figures

<i>Figura 1 Mecanisme molecular de la biotransformació realitzada per l'esterasa Yte.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2 Evolució teòrica de la concentració cel·lular, l'oxigen dissolt i la font de carboni respecte al temps en un cultiu batch.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3 Evolució teòrica de la concentració cel·lular, l'oxigen dissolt i la font de carboni respecte al temps en un cultiu fed-batch limitat per carboni.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 4 Evolució teòrica de la concentració cel·lular i la font de carboni respecte al temps en un cultiu en continu.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5 Rutes metabòliques del glicerol.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6 Diagrama del vector pPICZαA-YTE1.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 7 Diagrama del vector pGAPZαA-YTE1.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 8 Incubador a 165 rpm i 25°C amb dos falcons en el seu interior.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 9 Representació gràfica del canvi de color durant l'assaig enzimàtic i base molecular d'aquest assaig.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10 Gràfica de la cinètica de creixement del clon #16.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11 Gràfica de la cinètica de creixement del clon #13.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12 Paràmetres d'anàlisi de les condicions del cultiu 1.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 1.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 14 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER) del cultiu 1.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 15 Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 1.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 16 Gel d'electroforesi 1 del cultiu 1.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 17 Gel d'electroforesi 2 del cultiu 1.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 18 Condicions generals del cultiu 2.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 19 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 2.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 20 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER) del cultiu 2.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 21 Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 2.....</i>	<i>44</i>

<i>Figura 22 Gel d'electroforesi 1 del cultiu 2.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 23 Gel d'electroforesi 2 del cultiu 2.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 24 Condicions generals del cultiu 3.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 25 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 3.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 26 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 27 Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 3.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 28 Gel d'electroforesi 1 del cultiu 3.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 29 Gel d'electroforesi 2 del cultiu 3.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 30 Condicions generals del cultiu 4.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 31 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 4.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 32 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 33 Paràmetres off-line del cultiu 4.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 34 condicions generals del cultiu 5.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 35 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 4.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 36 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 37 Paràmetres off-line del cultiu 5.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 38 Comparació de les velocitats específiques de creixement per la fase batch del mètode Off-line.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 39 Comparació de les velocitats específiques de creixement per la fase batch del mètode On-line.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 40 Comparació de l'activitat enzimàtica dels cultius 1, 2 i 3.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 41 Assaig del cabal.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 42 Paràmetres d'anàlisi pel cultiu en continu.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 43 Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu continu.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 44 Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 45 Representació gràfica de l'activitat enzimàtica i la OD del cultiu continu.....</i>	<i>66</i>

<i>Figura 46 Evolució de la precisió del cabal al llarg del cultiu continu 1.</i>	<i>67</i>
<i>Figura 47 Components del medi batch pel cultiu 1.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 48 Components del medi batch pel cultiu 2.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 49 Components del medi batch pel cultiu 3.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 50 Components del medi batch pel cultiu 4.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 51 Components del medi batch pel cultiu 5.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 52 Components del medi batch pel cultiu 6.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 53 Components del medi continu pel cultiu 6.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 54 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 4.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 55 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 5.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 56 Taxa específica de creixement abans del canvi metabòlic causat per l'efecte Crabtree.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 57 Assaig del cabal amb perfil exponencial fase 1-2.5 g/min.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 58 Assaig del cabal amb perfil exponencial fase 2.5-3.83 g/min.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 59 Assaig del cabal constant amb profile pre-programat.....</i>	<i>94</i>

Llistat de taules

<i>Taula 1: Comparació entre els diferents sistemes d'expressió de proteïnes heteròlogues.....</i>	<i>3</i>
<i>Taula 2: Avantatges de P. pastoris com a plataforma d'expressió de proteïnes heteròlogues.....</i>	<i>5</i>
<i>Taula 3: Llegenda dels paràmetres utilitzats a les fórmules.....</i>	<i>14</i>
<i>Taula 4: μ_{max} de les fases batch amb Glicerol.....</i>	<i>60</i>
<i>Taula 5: μ_{max} de les fases batch amb Glucosa.....</i>	<i>60</i>
<i>Taula 6: μ dels polsos durant la fase Fed-batch.....</i>	<i>61</i>
<i>Taula 7: μ teòrica vs μ real pel cultiu en continu.....</i>	<i>67</i>
<i>Taula 8: Absorbàncies (OD_{600}) de cada volum inoculat respecte al temps de cultiu.....</i>	<i>86</i>
<i>Taula 9: Absorbàncies (OD_{600}) del volum inoculat respecte al temps de cultiu.....</i>	<i>86</i>
<i>Taula 10: Absorbàncies (OD_{600}) del cultiu 1.....</i>	<i>87</i>
<i>Taula 11: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 1.....</i>	<i>87</i>
<i>Taula 12: Assaig proteïna total del cultiu 1.....</i>	<i>87</i>
<i>Taula 13: Absorbàncies (OD_{600}) cultiu 2.....</i>	<i>88</i>
<i>Taula 14: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 2.....</i>	<i>88</i>
<i>Taula 15: Assaig proteïna total del cultiu 2.....</i>	<i>88</i>
<i>Taula 16: Absorbàncies (OD_{600}) cultiu 3.....</i>	<i>89</i>
<i>Taula 17: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 3.....</i>	<i>89</i>
<i>Taula 18: Assaig proteïna total del cultiu 3.....</i>	<i>89</i>
<i>Taula 19: Absorbàncies (OD_{600}) cultiu 4.....</i>	<i>90</i>
<i>Taula 20: Assaig proteïna total del cultiu 4.....</i>	<i>90</i>
<i>Taula 21: Absorbàncies cultiu 5.....</i>	<i>90</i>
<i>Taula 22: Assaig proteïna total del cultiu 5.....</i>	<i>91</i>
<i>Taula 23: Temps respecte l'absorbància a 600 nm.....</i>	<i>92</i>

<i>Taula 24: Activitat enzimàtica del cultiu en continu.....</i>	92
<i>Taula 25: Diferència de pes d'inici fins al punt mig.....</i>	94
<i>Taula 26: Diferència de pes del punt mig fins al final.....</i>	94

ÍNDEX

1. Introducció	1
1.1 Biotecnologia Industrial.....	1
1.2 Comparació de les diferents plataformes d'expressió de proteïnes recombinants	1
1.3 <i>Pichia pastoris</i> com organisme d'expressió per a la indústria	4
1.4 Proteïna expressada	6
1.5 Vectors utilitzats.....	6
1.6 Equació de Monod	7
1.7 Modes d'operació dels cultiu en bioreactor	8
1.8 Fonaments de l'anàlisi de gasos.....	12
2. Objectius.....	15
3. Materials i mètodes	16
3.1 Medis de cultiu.....	16
3.2 Descripció dels vectors utilitzats	19
3.3 Clons productors utilitzats de <i>Pichia pastoris</i>	21
3.4 Preparació dels ciostocks	21
3.5 Assajos de cinètica de creixement	23
3.6 Muntatge i posada a punt del Bioreactor	24
3.7 Manteniment i posada a punt prèvia a la inoculació del bioreactor	24
3.8 Implementació de cultius Fed-Batch senzills	26
3.9 Estructura utilitzada en els cultius Batch-Fed Batch.....	26
3.10 Cultius en continu	29
3.11 Anàlisi de les mostres dels cultius	30
3.12 Mètodes de monitorització On-line	33
3.13 Neteja del bioreactor	33
3.14 Tractament dels residus generats.....	34
4. Resultats.....	35
4.1 Cinètiques de creixement	35
4.2 Cultiu fed-batch 1: Batch Glicerol + Fed-batch Glicerol	37
4.3 Cultiu fed-batch 2: Batch Glucosa + Fed-batch Glucosa	41
4.4 Cultiu fed-batch 3: Batch Glucosa + Fed-batch Glucosa	46
4.5 Cultiu fed-batch 4: Batch Glicerol + Fed-batch Metanol.....	51
4.6 Cultiu fed-batch 5: Batch Glicerol + Fed-batch Metanol.....	55
4.7 Comparativa de les taxes específiques de creixement obtingudes durant la fase batch .	59
4.8 Comparativa de l'activitat enzimàtica.....	61

4.9 Test del sistema de control en llaç tancat pel control de l'addició del substrat per cultius en continu.	62
4.10 Implementació de cultiu en continu de tipus quimiòstat	63
5. Discussió	68
5.1 Cultius fed-batch	68
5.2 Implementació del llaç de control tancat per a controlar el substrat d'entrada als cultius	71
5.3 Cultiu en continu	71
6. Conclusions.....	73
6.1 Cinètiques de creixement i cultiu dels clons	73
6.2 Analitzador de gasos	73
6.3 Assaig enzimàtic	73
6.4 Cultiu en continu	74
7. Treball futur.....	75
7.1 Cultius batch.....	75
7.2 Cultius en fed-batch	75
7.3 Cultius en continu.....	75
8. Bibliografia	76
9 Annex A: Metodologia.....	80
9.1 Lots medi batch	80
9.2 Lots medi continu.....	83
9.3 Protocol electroforesi Gels SDS-PAGE.....	84
9.4 Protocol Tinció Gels SDS-PAGE.....	85
10 Annex B: Resultats.....	86
10.1 Cinètica de creixement de la soca #16.....	86
10.2 Cinètica de creixement de la soca #13.....	86
10.3 Taules anàlisi Off-line cultiu 1	87
10.4 Taules anàlisi Off-line cultiu 2	88
10.5 Taules anàlisi Off-line cultiu 3	89
10.6 Taules anàlisi Off-line cultiu 4	90
10.7 Taula assaig de proteïna total cultiu 5	90
10.8 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 4	91
10.9 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 5	91
10.10 μ abans del canvi metabòlic del cultiu 3	92
10.11 Taules paràmetres Off-line cultiu en continu	92
10.12 Gràfiques assaig cabal del sistema d'addició en llaç tancat.....	93

10.13 Gràfica profile amb diferents cabals	94
--	----

1. Introducció

1.1 Biotecnologia Industrial

El progrés de la humanitat i les seves capacitats estan intrínsecament lligades al desenvolupament tecnològic. Al llarg de la història els descobriments s'han anat succeint a un pas cada cop més accelerat, aquest també és el cas de la biotecnologia. La història de la biotecnologia té uns inicis poc definits; els processos de fermentació utilitzats a la Xina fa més de cinc mil anys, el tractament dels productes làctics, la fabricació de cervesa i vi, o la millora de les espècies cultivades per selecció artificial podrien ser interpretats com els inicis de la biotecnologia. La visió actual de la biotecnologia dista molt dels exemples anteriorment esmentats, sent la diferència principal la comprensió dels processos que hi ha darrere de les transformacions que veiem.

El segle XIX és considerat el segle de la química i el segle XX el segle de la física. La maduració d'aquestes ciències va permetre el desenvolupament de tècniques analítiques sofisticades, com per exemple les tècniques de difracció de rajos X, sense la qual no es podria haver descobert la doble hèlix d'ADN, un dels punts claus per a l'inici de la biotecnologia moderna. A principis dels anys setanta es va aconseguir aplicar la tecnologia del DNA recombinant en un primer plasmidi i al 1977 Herbert Boyer i el seu equip van expressar per primera vegada un pèptid recombinant a partir d'un plasmidi. El mateix equip expressava l'any següent insulina a partir de bacteris modificats. Aquests descobriments obrien les portes a la tecnologia de proteïnes recombinants per primera vegada. L'any 1990 s'iniciava el projecte del genoma humà i durant els deu anys que aquest va durar les tecnologies van canviar radicalment, des de la seqüenciació de Sanger fins als inicis de la Next Generation Sequencing (NGS). La millora de les tècniques de seqüenciació i edició genètica van permetre trobar gens d'interès i expressar-los de manera molt més eficient i econòmica, permetent doncs un increment en les aplicacions i possibilitats de la biotecnologia.

1.2 Comparació de les diferents plataformes d'expressió de proteïnes recombinants

Les proteïnes recombinants han esdevingut una aplicació clau de la biotecnologia avui en dia. Aquestes poden ser emprades en un rang molt ampli d'aplicacions des molècules terapèutiques o de diagnòstic al seu ús com enzims industrials. No obstant, no existeix cap plataforma d'expressió universal que sigui perfecte per tots els casos. La selecció de l'hoste és clau en el disseny del bioprocés. Per fer-la correctament cal tenir en compte les propietats i requeriments del producte així com l'economia del bioprocés a l'hora d'escollir una plataforma d'expressió. Per aquest motiu és indispensable dur a terme tasques d'investigació prèvia en qualsevol projecte d'expressió de proteïnes recombinants abans de començar amb els dissenys i treballs experimentals.

1.2.1 Bacteris com a organisme d'expressió

Els bacteris constitueixen l'alternativa més senzilla per expressar proteïnes recombinants, les qualitats dels quals són: el seu curt temps de generació, relativa facilitat per escalar els cultius, baix cost dels cultius i resiliència a la contaminació. Aquestes qualitats han fet dels bacteris una de les plataformes d'expressió de proteïnes recombinants més utilitzades en l'actualitat. [1] [2] [3]

Escherichia coli (*E. coli*) ha esdevingut un dels organismes de referència quan es parla d'expressió de proteïnes en bacteris; el seu genoma està descrit, és fàcilment accessible i manipulable i compleix amb totes les qualitats descrites a l'inici d'aquest paràgraf.

Tot i els avantatges prèviament descrits, *E. coli* i les bacteris presenten problemes propis de la seva naturalesa. La incapacitat per part d'*E. coli* i la resta de bacteris d'incorporar modificacions post-traduccionals pròpies de les cèl·lules eucariotes dificulta el seu ús en algunes aplicacions en les que aquestes siguin essencials. Aquestes modificacions poden variar des de glicosilacions, fosforilacions, acetilacions o ponts disulfur. La falta d'aquestes modificacions en les proteïnes provoca plegaments incorrectes, falta d'activitat o immunogenicitat entre d'altres. Un dels problemes greus associats a la incapacitat de secretar la proteïna al medi és la formació de cossos d'inclusió formats per agregats de la proteïna d'interès. La disrupció cel·lular i la purificació necessària per obtenir la proteïna d'interès augmenten significativament el cost i complexitat de l'operació. [4] Cal esmentar també que *E. coli* pot produir proteases i endotoxines que contaminin o degradin el producte final. Durant els últims anys s'han produït avenços per solucionar alguns dels inconvenients esmentats anteriorment i la FDA (Food and Drug Administration dels EUA) ha aprovat alguns productes per al seu ús farmacèutic com per exemple la producció d'insulina recombinant entre d'altres. [5] [6] [7] [8] No obstant, la producció de certes proteïnes recombinants amb bacteris presenta certs desavantatges respecte a les altres opcions disponibles.

1.2.2 Cèl·lules de mamífers com a organisme d'expressió

Les cèl·lules de mamífers presenten característiques totalment oposades a les descrites pels bacteris. El seu temps de cultiu és llarg [9], el cost és elevat, són altament sensibles a la contaminació i presenten múltiples complicacions per a l'escalat dels cultius. A diferència dels bacteris o els llevats, el patró de glicosilació de les proteïnes produïdes és similar als mamífers superiors i per tant als humans. En aquest sentit, la capacitat de realitzar altres modificacions post-traduccionals complexes és elevada. Algunes de les línies cel·lulars més utilitzades per a la producció de productes farmacèutics són les cèl·lules d'ovari de hámster xinès (conegudes com a CHO) o HEK (Human Embryonic Kidney). [10]

La producció de proteïnes recombinants utilitzant cèl·lules de mamífers es prefereix quan la seguretat del producte i la qualitat són característiques prioritàries. [6] Tot i els avantatges descrits per aquesta plataforma, queda lluny de l'ideal per a la producció d'enzims o realitzar biotransformacions a escala industrial. [11] [12] Cal afegir que la complexitat de generar noves línies cel·lulars és elevada i costosa.

Un inconvenient a l'hora de produir productes per a la indústria farmacèutica és la sensibilitat del cultiu als canvis ambientals. Canvis en l'ambient poden portar a concentracions molt inferiors de productes, canvis en les propietats físiques dels productes que alterin la farmacocinètica o a la producció de metabòlits secundaris no desitjats. [12] Mantenir les condicions dins d'uns marges estrictes representa un desafiament per a la indústria.

1.2.3 Llevats com a organisme d'expressió

Els llevats com a plataforma d'expressió de proteïnes recombinats han esdevingut organismes de referència en la indústria biotecnològica ja que combinen les avantatges de ser microorganismes, per tant amb un creixement ràpid i senzill, i ser organismes eucariotes, i per tant poder realitzar modificacions post-traduccionals. Organismes com *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* o *Pichia pastoris* són alguns dels llevats més habituals utilitzats per a la producció de proteïnes recombinants. Actualment es poden trobar exemples de proteïnes terapèutiques aprovades per a la comercialització així com d'enzims industrials. [13] Els llevats creixen ràpidament, tenen un cost de manteniment baix, tenen un metabolisme ideal per a les fermentacions i són fàcilment manipulables. A diferència dels bacteris, els llevats generalment no produeixen endotoxines. El genoma de moltes espècies està ben caracteritzat, fet que ha permès que la comunitat científica desenvolupi moltes tècniques avançades per la modificació genètica (incloent CRISPR/cas9)[14]. Aquesta plataforma presenta un alt rendiment i l'habilitat de secretar la majoria de proteïnes al medi reduint així els costos de downstream. Aquestes dues característiques combinades fan dels llevats una plataforma excel·lent en termes econòmics. [11] [15]

Cal remarcar que els llevats tenen patrons de glicosilació substancialment diferents dels humans. *S. cerevisiae* presenta hypermannosilació en les glicoproteïnes mentre que els eucariotes superiors presenten cadenes laterals O-Àcid siàlic. Aquesta modificació pot comportar plegaments incorrectes, falta d'estabilitat, falta d'activitat i immunogenicitat. [16] També s'ha observat en *S. cerevisiae* que algunes proteïnes pateixen degradació proteolítica en vacúols. [16] En contrast, *P. pastoris* té un patró de glicosilació més similar al dels eucariotes superiors. Tot i això, també presenta hyperglicosilacions. Tenint en compte tots els avantatges que aquesta plataforma aporta es pot considerar una de les millors opcions per a la producció a escala industrial de proteïnes recombinants en comparació amb les altres plataformes descrites (Taula 1).

Taula 1: Comparació entre els diferents sistemes d'expressió de proteïnes heteròlogues¹Assistida per la co-expressió de proteïnes reguladores. [17]

Sistema d'expressió	Cost	Temps de producció	Escalabilitat	Qualitat de les Glicosilacions	Risc de contaminació
Bacteris	Baix	Curt	Alt	Negligible	Baix
Llevats	Mitjà	Curt	Alt	Alt ¹	Baix
Cèl·lules animals	Alt	Llarg	Baix	Alt	Alt

1.3 *Pichia pastoris* com organisme d'expressió per a la indústria

El llevat metilotròfic¹ *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ha esdevingut un dels organismes de referència a l'hora d'expressar proteïnes heteròlogues. *P. pastoris* va ser introduïda com a plataforma per a l'expressió de proteïnes recombinants de la mà de Phillips Petroleum després del seu ús comercial en la producció de Single Cell Protein (SCP) destinada a l'alimentació en la ramaderia. L'estratègia utilitzada per Phillips Petroleum consistia a obtenir cultius d'elevada concentració cel·lular mitjançant metanol com a substrat. No obstant, la crisi del petroli de 1973 va augmentar dràsticament el preu del substrat i va implicar la inviabilitat econòmica del projecte. Durant la dècada dels vuitanta es van desenvolupar sistemes d'expressió de proteïnes recombinants per *P. pastoris* sota la influència del promotor induïble per metanol P_{AOX1} . [18] Les tècniques de cultiu desenvolupades per al projecte de SCP conjuntament amb el promotor induïble P_{AOX1} van proporcionar una plataforma d'expressió amb uns nivells d'expressió de proteïna excepcionals. Durant la dècada dels anys noranta van aparèixer les primeres aplicacions industrials, essent un dels primers exemples descrits la producció de hidroxinitrile lyase pròpia de l'arbre de la goma tropical *Hevea brasiliensis* a una concentració de 20 g de proteïna recombinant per litre de cultiu. [19]

Al llarg de la història de *P. pastoris* també és important l'aprovació de la FDA per primera vegada d'un producte produït amb aquesta plataforma, fosfolipase C, per a la seva utilització en l'alimentació de la ramaderia. [20] Més important és l'aprovació per la FDA del producte biofarmacèutic (Kalbitor®, Dyax, MA, USA), un inhibidor de la Kallikrein. [21] Aquest esdeveniment obria les portes a la producció destinada a la indústria farmacèutica utilitzant *P. pastoris*.

Al llarg dels anys l'interès de la comunitat científica ha augmentat i amb això les eines desenvolupades per aquesta plataforma d'expressió. [22] [23] [24] [25] [26]

Els llevats presenten una de les millors combinacions de característiques com a organisme d'expressió de proteïnes recombinants. Actualment es reconeixen aproximadament 1500 espècies de llevats, escollir l'espècie adequada per a cada bioprocés és essencial per l'èxit en la producció. [27] Tradicionalment, a més de *P. pastoris*, també s'han utilitzat espècies com *S. cerevisiae* i *H. polymorpha* per produir proteïnes recombinants que han arribat al mercat. En aquesta introducció volem remarcar les característiques de *P. pastoris* davant de l'organisme de referència *S. cerevisiae*.

- *S. cerevisiae* presenta l'inconvenient d'un efecte Crabtree molt elevat. L'efecte Crabtree consisteix en la producció de metabòlits secundaris (lactat, etanol, arabitol) en condicions aeròbiques quan la concentració de glucosa en el medi és elevada, fet que redueix la producció de biomassa. Contràriament *P. pastoris* és Crabtree negatiu, el que implica que rarament es produeix etanol en condicions aeròbiques tot i que té la capacitat de fer-ho. [28]

¹ S'enten per metilotròfic aquell organisme que és capaç d'utilitzar compostos d'un sol carboni reduïts com el metanol o el metà com a font de carboni per al seu creixement

A banda de la disminució significativa del rendiment de biomassa, la producció de subproductes com l'etanol pot produir canvis en la cinètica del creixement del cultiu així com contaminació del producte.

- Els vectors episomals, aquells que són allotjats i replicats en el citoplasma de la cèl·lula hoste, encara són predominants en la producció de proteïnes recombinants utilitzant *S. cerevisiae*. En *P. pastoris* predominen els vectors integratius, aquells que s'insereixen en el genoma de la cèl·lula hoste. Els vectors integratius augmenten l'estabilitat i la conservació del cassette d'expressió en les generacions successives dins del mateix cultiu. [29]
- La ruta de secreció de *P. pastoris* és més similar a la dels eucariotes superiors en comparació amb la de *S. cerevisiae*. Aquesta diferència influeix en el plegament i característiques de la proteïna produïda i és de gran importància en la indústria farmacèutica. Recentment s'ha aconseguit millorar la qualitat del plegament de les proteïnes produïdes en *P. pastoris* mitjançant la co-expressió de proteïnes reguladores del plegament (Pdi1, Hac1) o eliminant l'expressió de certes proteïnes pròpies de *P. pastoris* involucrades en el plegament i secreció. [30]
- *P. pastoris* no introdueix tantes hiperglicosilacions com *S. cerevisiae* de forma natural. Les proteïnes produïdes amb *P. pastoris* tenen patrons de glicosilació més similars als dels eucariotes superiors. En els darrers anys s'han desenvolupat estratègies per substituir la via de les N-glicosilacions pròpia de *P. pastoris* amb la una via humanitzada per produir proteïnes amb glicosilacions més similars a les dels humans. [16]

Taula 2: Avantatges de *P. pastoris* com a plataforma d'expressió de proteïnes heteròlogues.

Enginyeria genètica	Qualitat de la proteïna	Bioprocés
Edició genètica simple i estable	Capacitat de realitzar plegaments i modificacions pròpies dels eucariotes	Creixement no fermentatiu en glucosa
Disponibilitat de promotors eficients	Capacitat de secretar la proteïna d'interès de forma eficient	Tècniques de cultiu ben descrites
Diversitat de tècniques per l'edició genètica	Hiperglicosilacions reduïdes	Densitats cel·lulars en cultiu superiors a les de <i>S. cerevisiae</i>
Disponibilitat de soques comercials		

1.4 Proteïna expressada

La proteïna d'interès escollida per ser expressada és la Palmitoyl-protein hydrolase 1 [31] (*Yte1* pel nom del gen). Aquesta esterasa és aïllada del fong *Candida rugosa*, posteriorment es va sintetitzar una seqüència del gen codificant optimitzat per a l'ús de codó de *P. pastoris* i es va procedir a la clonació a la clon de X-33. Per obtenir la seqüència d'interès, el genoma de *C. rugosa* va ser seqüenciat pel servei de genòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona mitjançant la plataforma seqüenciadora MiSeq® d'Illumina Inc. Posteriorment es van identificar la regió codificant per a *Yte1*. Aquest treball previ és realitzat pel Dr. Xavier Garcia-Ortega, el Dr. Francisco Valero i el Dr. Pau Ferrer i s'exposa en aquest treball de forma merament informativa.

Yte1 és una esterasa que catalitza la transformació del S-hexadecanoyl-L-cysteinyl en hexadecanoate + L-cysteinyl més altres subproductes propis de les esterases, podem observar aquesta reacció en la figura 1.

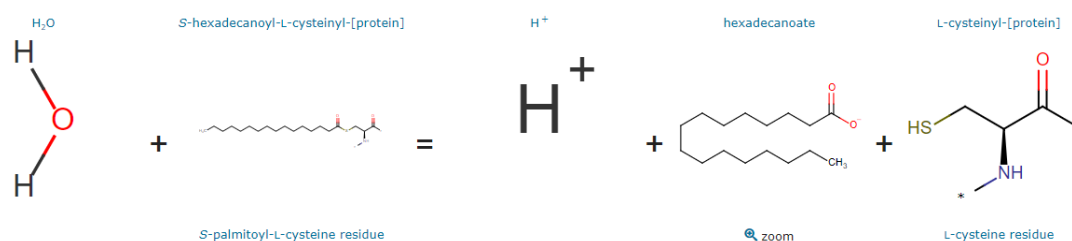


Figura 1: Mecanisme molecular de la biotransformació realitzada per l'esterasa *Yte1*.

Aquesta proteïna és escollida per la seva capacitat d'hidrolitzar un àcid gras. *Yte1* realitza una transformació similar a la dels enzims utilitzats en detergents. La indústria dels detergents representa el 25% de les vendes mundials de proteases, i per aquest motiu era una bona candidata d'exemple real de producció.

Utilitzant la seqüència de *Yte1* (no mostrada al ser confidencial) es pot calcular el punt isoelèctric de la proteïna mitjançant la calculadora en línia de ExPASy proveïda per l'institut de bioinformàtica de Suïssa.

Aquesta dada és altament important, ja que ens indica si la nostra proteïna es pot veure afectada pel pH d'operació del cultiu i si s'hi han d'aplicar mesures alternatives per evitar la seva pèrdua d'activitat. El punt isoelèctric teòric per a *Yte1* calculat mitjançant ExPASy és de 5, aquest valor cau dins del rang adequat de pH si el valor durant el cultiu és de pH 6.

1.5 Vectors utilitzats

Per expressar la proteïna d'interès es van utilitzar dos tipus de vectors integratius per a *P. pastoris*, pPICZ α A-YTE1 i pGAP α A-YTE1. Els vectors integratius permeten integrar el vector en el genoma de la clon hoste. Aquest tipus de vectors mantenen l'integrat millor que els vectors no integratius (episomals) i per tant, són preferits en cèl·lules que hauran de duplicar-se un gran nombre de vegades. [32] [33]

1.5.1 Promotors “Methanol Free” vs Promotors dependents de Metanol

Els dos vectors esmentats anteriorment han estat escollits per fer la comparació entre el comportament dels cultius derivat de l'ús de promotors induïbles o constitutius. L'ús del promotor induïble P_{AOX1} permet decidir en quin moment del cultiu volem que la proteïna d'interès sigui expressada, no obstant això, la pròpia naturalesa del metanol comporta certs desavantatges significatius. [34]

A causa de la naturalesa inflamable i volàtil del metanol, el transport o emmagatzematge d'aquest compost resulta altament perillós i costós. Les mesures de prevenció i l'equipament extra suposen un increment en la complexitat i cost de l'operació. Addicionalment, l'increment de la temperatura i consum d'oxigen del cultiu quan s'utilitza metanol com a substrat també representen un inconvenient important, ja que també augmenten el cost i complexitat de l'operació, sobretot a escala industrial. [35]

Tot i que els promotors de la família P_{AOX} són àmpliament emprats de forma efectiva i recurrent, la indústria tendeix a buscar alternatives que evitin l'ús del metanol, i en aquest sentit el promotor constitutiu P_{GAP} ofereix una alternativa viable i actualment el seu ús, de igual forma que altres promotors *methanol-free*, està augmentant. [36]

L'ús de diferents estratègies d'expressió suposa un canvi en el disseny del cultiu i les estratègies de cultiu que se segueixen. Un dels objectius d'aquest treball es poder observar aquestes diferències en el comportament del cultiu amb de l'analitzador de gasos.

1.6 Equació de Monod

P. pastoris, com a microorganisme unicel·lular segueix una cinètica de creixement de Monod. [37] Aquest fet ens permetrà tractar les dades de densitat òptica (OD_{600} i CO_2 per trobar la velocitat específica de creixement (μ) o taxa específica de creixement màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$) durant el treball experimental descrit en aquest TFG.

L'equació de Monod (equació 1) és una fórmula matemàtica empírica que serveix per determinar el creixement d'un microorganisme en concret. Va ser descrita per James Monod, que va proposar-la relacionant el creixement dels microorganismes en funció de la concentració del substrat limitant. [38]

$$\mu = \mu_{m\grave{a}x} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (1)$$

On:

- μ taxa específica de creixement d'un microorganisme.
- $\mu_{m\grave{a}x}$ taxa específica de creixement màxima d'un microorganisme.
- $[S]$ concentració del substrat limitant ple creixement.
- K_s valor d' $[S]$ quan $\mu/\mu_{m\grave{a}x} = 0.5$

Sabent doncs que *P. pastoris* segueix una cinètica de creixement de Monod, s'obtenen les fórmules per poder calcular la μ experimentalment. [39]

L'equació que defineix la fase exponencial en un bioreactor discontinu de tanc agitat és la següent (2):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2)$$

S'aplica la integral a aquesta fórmula (3):

$$\int_{t_{lag}}^t \frac{dX}{dt} = \int_{x_0}^x \mu X \quad (3)$$

Finalment s'obté la següent equació (4), que correspon a l'equació d'una recta (5):

$$\ln X = \ln X_0 - \mu t_{lag} + \mu t \quad (4)$$

$$y = b + ax \quad (5)$$

On:

- $\ln(X)$ és el logaritme neperià de la densitat òptica (OD_{600}).
- $\ln(X)_0$ és el logaritme neperià de la densitat òptica (OD_{600}) a l'instant inicial.
- μ és la taxa específica de creixement d'un microorganisme.
- t_{lag} és el temps de latència del microorganisme.
- t és el temps de cultiu.

Així doncs, seguint l'equació d'una recta (5) i l'equació obtinguda per la fase exponencial (4), la pendent resultant d'una gràfica de $\ln(X)$ respecte el t és la μ .

Durant la fase batch s'assumeix que la μ calculada és la $\mu_{m\grave{a}x}$. Aquest fet parteix de la base que durant l'interval en què es mesura la μ experimental del cultiu la concentració de substrat és varies vegades superior a l'ordre de magnitud de la K_s descrita per *P. pastoris* (0.2 g/L). Les divergències que es puguin observar en els resultats són causades per la complexitat i variabilitat del cultiu en conjunt a l'error analític propi dels equips.

1.7 Modes d'operació dels cultiu en bioreactor

La producció industrial de productes utilitzant microorganismes ha evolucionat des dels seus inicis a principis de segle fins a l'actualitat. Ha augmentat la diversitat de productes i els camps d'aplicació des de la producció a escala industrial d'àcid cítric (1919) i penicil·lina (1941) fins a la gran varietat de productes que actualment es poden trobar com són anticòssos, enzims comercials, antibiòtics, vacunes proteiques, bluk chemicals, hormones, etc. La competència per produir aquests productes de forma més eficient ha implicat també l'evolució de les estratègies de cultiu.

Els fermentadors actuals, equipats amb sistemes d'esterilització automàtica, control virtual dels paràmetres del cultiu i equips auxiliars disten molt dels erlenmeyers utilitats per produir penicil·lina durant els primers anys de producció.

1.7.1 Cultiu Batch

En un cultiu en mode batch, tots els nutrients s'afegeixen al principi del cultiu, sense afegir-ne més al llarg del bioprocés posterior. Durant tot el bioprocés, al tractar-se d'un sistema tancat, només s'afegeix aire a través de l'sparger per assegurar la disponibilitat d'oxigen i àcids i/o bases per controlar el pH. El cultiu se sol fer durar fins que es consumeixen els nutrients, o algun d'essencial esdevé limitant (normalment la font de carboni). A partir d'aquest punt el cultiu entraria en fase de creixement estacionària.

Aquesta estratègia és adequada per a experiments ràpids com la caracterització del clon o l'optimització del medi de cultiu. Els desavantatges d'aquest mètode són les limitacions en la biomassa que es poden assolir per les possibles inhibicions per altes concentracions de substrat. Com que la font de carboni sol ser limitant, els organismes no estan en la fase de creixement exponencial durant molt de temps.

Després del final d'un cultiu batch, la biomassa i el medi són recollits i són processats adequadament per obtenir el producte desitjat. La biomassa es produeix per etapes, ja que el procés s'interromp repetidament a causa de la neteja i l'esterilització. Aquestes interrupcions necessàries per al manteniment i neteja dels equips implica un rendiment més baix causat pels períodes de no producció. Aquests problemes poden ser solucionats amb l'ús de modes d'operació en continu. A més del baix rendiment de la biomassa, els cultius batch també tenen un major risc per a la inhibició de substrat o producte. Aquest fenomen esdevé quan hi ha interferència de l'activitat enzimàtica per la presència d'alta concentració de substrat o producte, el que pot induir la retroalimentació metabòlica que pot reduir dràsticament el rendiment.[40]

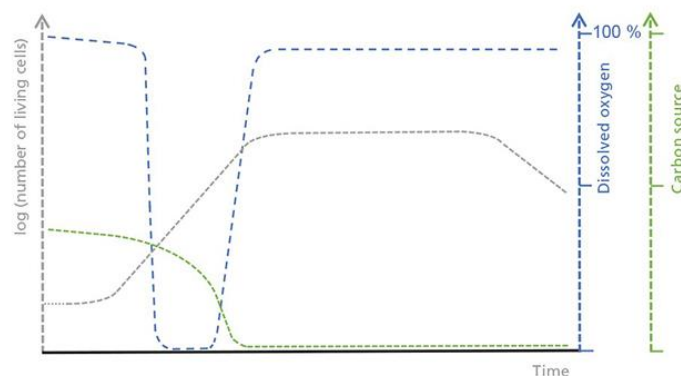


Figura 2: Evolució teòrica de la concentració cel·lular, l'oxigen dissolt i la font de carboni respecte al temps en un cultiu batch. [40]

1.7.2 Cultiu Fed-Batch

Una manera d'evitar que els nutrients es converteixin en un factor limitant és subministrar-los progressivament durant el cultiu. Aquest mode d'operació s'anomena fed-batch o discontinu alimentat, i es tracta d'un sistema parcialment obert. L'avantatge de l'alimentació constant és que durant el cultiu es poden obtenir quantitats més altes de biomassa i per tant també de productes.

Generalment, el substrat és transportat des de l'ampolla de subministrament al reactor a través d'un tub de silicona mitjançant una bomba, habitualment peristàltica. Es pot establir manualment l'alimentació amb diferents estratègies (constant, lineal, exponencial, pols per pols), o afegir nutrients quan es compleixen condicions específiques, com quan s'arriba a una certa concentració de biomassa o quan s'esgota un dels nutrients.

El procés ofereix una àmplia gamma d'estratègies de control i també és adequat per a aplicacions industrials en les que es vol aconseguir una alta concentració de producte. No obstant, pot augmentar el temps de processament i potencialment conduir a una possible inhibició per producte. Així doncs, cal tenir una comprensió més profunda dels bioprocessos per realitzar aquest tipus de cultiu.

A causa dels seus avantatges, els cultius fed-batch s'utilitzen en totes les àrees de producció biotecnològica, en particular per a la producció de proteïnes recombinants i metabòlits. [40]

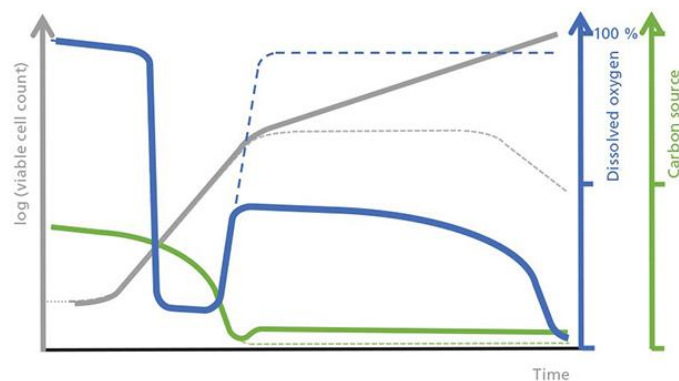


Figura 3: Evolució teòrica de la concentració cel·lular, l'oxigen dissolt i la font de carboni respecte al temps en un cultiu fed-batch limitat per carboni. [40]

1.7.3 Cultiu en continu

Després d'una fase de cultiu batch, s'assoleix una concentració cel·lular adequada per iniciar el cultiu en continu. En aquestes condicions, s'afegeix constantment tant medi de cultiu fresc com s'extreu brou de cultiu. Aquests cultius són particularment adequats quan es pot produir inhibició per substrat o producte. En un procés continu, el rendiment dels processos es pot millorar en comparació amb el d'un cultiu batch o fed-batch perquè s'eviten els temps morts de muntatge i desmuntatge. No obstant això, el llarg període de cultiu també augmenta el risc de contaminació i els canvis a llarg termini en les cèl·lules del cultiu.

Cal tenir una comprensió més profunda dels bioprocessos per realitzar aquest tipus de cultiu de forma adequada. Els cultius continus són eines ideals per obtenir una millor comprensió del procés, ja que al treballar en estat estacionari (no dinàmic), tots els paràmetres del procés romanen constants quan el sistema funciona correctament.

Per al treball experimental desenvolupat en aquest TFG s'ha escollit treballar amb una estratègia de cultiu en quimiòstat. Un quimiòstat és un bioreactor al qual s'afegeix contínuament el medi fresc, mentre que el brou de cultiu que conté els productes finals metabòlics i els microorganismes s'elimina contínuament a la mateixa velocitat per mantenir constant el volum del cultiu. Canviant el cabal amb el qual s'afegeix el medi al bioreactor la taxa de creixement específica del microorganisme es pot controlar fàcilment, ja que està limitada per la font de carboni.

Una de les característiques més importants dels quimiòstats és que els organismes es poden cultivar en un estat fisiològic estable sota condicions ambientals constants. En aquest estat estable, el creixement es produeix a una velocitat de creixement constant i tots els paràmetres del cultiu són estàtics (volum del cultiu, concentració d'oxigen dissolt, concentració de nutrients i productes, pH, densitat cel·lular, etc.). [40] [41]

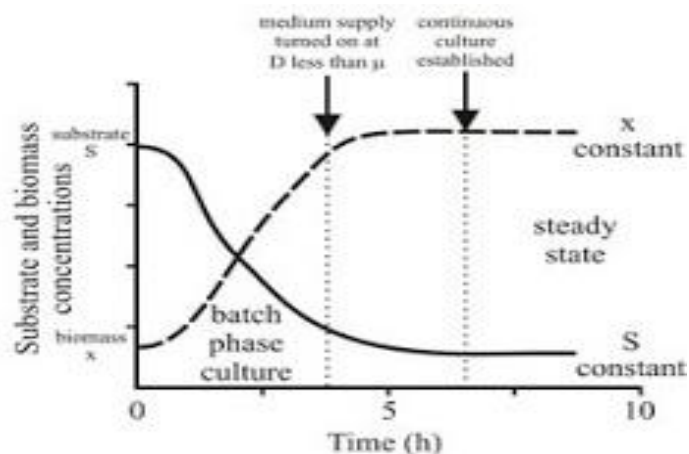


Figura 4: Evolució teòrica de la concentració cel·lular i la font de carboni respecte al temps en un cultiu en continu. [42]

1.8 Fonaments de l'anàlisi de gasos

El control integral dels bioprocessos és un element essencial en la indústria biotecnològica. Controlar els paràmetres del cultiu permet aconseguir el màxim rendiment d'aquest, tenir en compte les possibles incidències i augmentar la reproductibilitat del procés. Els paràmetres essencials que habitualment es controlen en cultius en bioreactors són el pH, la temperatura, l'oxigen dissolt (DO/ pO_2). Si es tracta d'un cultiu en continu o fed-batch també caldrà controlar el cabal d'entrada del medi. El pH, el DO i la temperatura són paràmetres tradicionalment controlats utilitzant sondes i llaços de control estandarditzats.

L'activitat metabòlica està directament relacionada amb els gasos produïts pel cultiu. Per cada mol de glicerol es generen quantitats diferents de substrats pel cicle de Krebs, la cadena de fosforilació oxidativa o altres rutes metabòliques depenent de l'estat metabòlic del cultiu.

A causa de la diferència de substrats produïts per cada ruta metabòlica, la producció de CO_2 i consum d' O_2 variarà significativament. Aquesta variació pot ser detectada per l'analitzador de gasos i proporciona informació a temps real sobre el comportament metabòlic del cultiu. Aquestes diferències també poden ser observades utilitzant glucosa o metanol com a substrat.

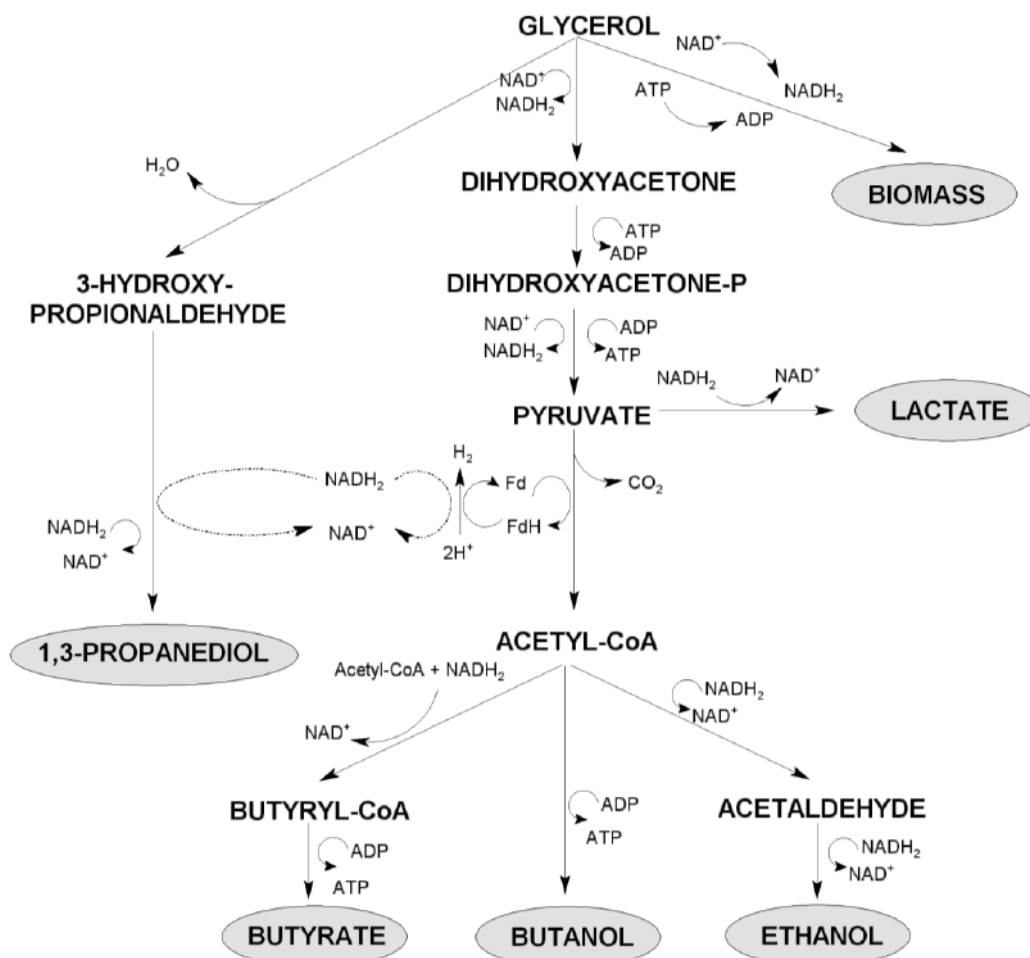


Figura 5: Rutes metabòliques del glicerol.

El control de l'estat metabòlic del cultiu mitjançant l'anàlisi de gasos (O₂/CO₂) de sortida del bioreactor presenta una opció innovadora. Aquests tipus d'analitzadors tenen l'avantatge de no ser invasius, s'adapten a l'escala del cultiu i tenen un temps de resposta excel·lent.

- En analitzar els gasos de sortida del bioreactor i eliminar la necessitat d'extreure brou de cultiu s'elimina la possibilitat de contaminació del cultiu durant la presa de mostra.
- Els sensors estàndard utilitzats pel control de la densitat òptica del cultiu tenen la limitació de que perden precisió a densitat cel·lulars elevades.
- La capacitat d'escalat del sistema d'anàlisi de gasos és superior als sistemes tradicionals de seguiment de biomassa, ja que es treballa amb la proporció de CO₂ i O₂ a la sortida del bioreactor. El mateix sistema pot ser utilitzat per diversos processos, no ha de ser adaptat per treballar amb un organisme, concentració cel·lular o volum concret.

1.8.1 Paràmetres respiratoris principals

Els paràmetres analitzats dels gasos de sortida del bioreactor són el CO₂ i l'O₂. Aquests paràmetres permeten diferenciar de forma clara a temps real les diferents fases dels cultius així com possibles interferències durant els cultius.

1.8.2 Paràmetres respiratoris derivats

Carbon dioxid emission rate (CER), Oxygen uptake rate (OUR) i Respiratory quotient (RQ) són paràmetres importants, ja que permeten transformar les dades bàsiques de CO₂ i O₂ en valors que mostren el metabolisme del cultiu.

- **Carbon dioxid emission rate (CER)**

Com es pot observar en la fórmula 6 el càlcul del CER està format per dues parts principals. La primera part consisteix en el càlcul de paràmetres que adequen el càlcul a les condicions de cultiu. La segona part consisteix essencialment en un balanç entre el valor del CO₂ a l'entrada i el valor a la sortida del bioreactor. Aquest paràmetre ens mostra el CO₂ produït en [mol/ L * h]. Llegenda dels paràmetres a la Taula 3.

$$CER = \underbrace{\frac{V_G^\alpha * p^\alpha}{V_F * R * T}}_1 * \underbrace{\left(\frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} * y_{CO_2}^\omega - y_{CO_2}^\alpha \right)}_2 \quad (6)$$

- **Oxygen uptake rate (OUR)**

Com es pot observar en la fórmula 7 el càlcul del OUR està format per dues parts principals. La primera part consisteix en el càlcul de paràmetres que adequen el càlcul a les condicions de cultiu. La segona part consisteix essencialment en un balanç entre el valor del O₂ a l'entrada i el valor a la sortida del bioreactor. Aquest paràmetre ens mostra l'O₂ consumit en [mol/ L * h]. Llegenda dels paràmetres a la Taula 3.

$$OUR = \underbrace{\frac{V_G^\alpha * p^\alpha}{V_F * R * T}}_1 * \underbrace{\left(y_{O_2}^\alpha - \frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} * y_{O_2}^\omega \right)}_2 \quad (7)$$

- **Respiratory quotient (RQ)**

L'RQ mostra la relació entre el CO₂ produït i l'O₂ consumit que s'observa a la fórmula 8.

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (8)$$

Taula 3: Llegenda dels paràmetres utilitzats a les fórmules.

V_G^α	Cabal d'aire	[L/h]
p^α	Pressió normal de l'atmosfera	1.0133 bar
V_F	Volum de cultiu	[L]
R	Constant del gas	$3.314 * 10^{-2}$ bar*L/K*mol
T	Temperatura	273.15 K
$y_{O_2}^\alpha$	Oxigen a l'entrada	0.2097
$y_{O_2}^\omega$	Oxigen a la sortida	Valor mesurat/100
$y_{CO_2}^\alpha$	Diòxid de carboni a l'entrada	0.0004
$y_{CO_2}^\omega$	Diòxid de carboni a la sortida	Valor mesurat/100

Aquests càlculs són realitzats de forma on-line i a temps real pel software de monitorització del fermentador, en el nostre cas anomenat ROSITA (Bionet, Múrcia, Espanya)

2. Objectius

L'objectiu principal del treball experimental realitzat al llarg d'aquest TFG és avaluar l'ús de l'analitzador de gasos B-breath de Bionet i el sistema de d'addició de substrat controlat per un llaç de control tancat basat en una balança. Per determinar si els valors proporcionats per l'analitzador de gasos són adequats s'ha proposat realitzar cultius amb diferents condicions. El pH, el DO i la temperatura són controlats utilitzant sondes i llaços de control estandarditzats. L'estat metabòlic del cultiu serà controlat mitjançant l'analitzador de gasos B-breath que actualment es troba en desenvolupament i implementació. S'utilitzarà una tècnica de llaç de control tancat mitjançant una balança per controlar la precisió de l'addició de substrat cultius alimentats (continu o fed-batch), eliminant possibles errors en els cabals implementats únicament a partir de bombes peristàltiques treballant en llaços de control oberts.

Per assolir l'objectiu principal s'han establert els següents objectius secundaris:

- Caracteritzar la cinètica de creixement de les soques a utilitzar de *P. pastoris* diferents tipus de cultius.
- Realitzar cultius batch per recollir dades sobre la resposta de l'analitzador de gasos.
- Realitzar fases de cultiu fed-batch per recollir dades sobre la resposta de l'analitzador de gasos en cultius més dinàmics.
- Comprovar el correcte funcionament de l'anàlisi de gasos interpretant les dades transformades amb el programa SigmaPlot.
- Implementar el sistema d'addició de substrat en llaç de control tancat format per la balança i la unitat de control del bioreactor.
- Comprovar el correcte funcionament del sistema d'addició de substrat mitjançant la realització de cultius en continu de tipus quimiòstats (limitats per la font de carboni).

3. Materials i mètodes

3.1 Medis de cultiu

El medi de cultiu és la barreja de diferents nutrients que permeten el creixement de les cèl·lules d'interès. Els tres medis més importants que s'han utilitzat en aquest treball són el medi YPG (Yeast extract / Peptone / Glicerol), el medi pel cultiu batch i el medi d'aliment per cultius en quimiòstat.

3.1.1 Medi YPG

El medi complex YPG és l'utilitzat en cultius erlenmeyer pel creixement de les cèl·lules de *P. pastoris*. Els cultius en erlenmeyer han estat utilitzats per realitzar diverses proves de les soques que disposem; entre elles determinar la cinètica de creixement de les soques, preparar criostocks o realitzar cultius senzills per testejar assajos enzimàtics.

La composició d'aquest medi és la següent:

- 1% (w/w) de Yeast extract
- 2% (w/w) de Peptone
- 2% (w/w) de Glicerol

A causa de la quantitat que es necessita i per motius pràctics aquest medi es prepara en lots de 3 litres utilitzant 6 ampolles pyrex de 500 mL. Les quantitats necessàries són afegides en 1 litre d'aigua destil·lada en un vas de precipitats de 5 litres amb agitació magnètica. Una vegada dissolts els components s'enrasa fins a 3 litres i es procedeix a separar el medi en les 6 ampolles pyrex prèviament esmentades. Finalment s'autoclaven les ampolles a 121 °C durant 30 minuts.

3.1.2 Medi Batch

El medi batch és l'utilitzat per a la fase batch dels cultius. Les fases batch han servit per observar l'evolució dels gasos al llarg del cultiu i obtenir la concentració cel·lular adequada per a l'inici dels cultius en continu. D'aquests cultius s'extreu informació important com la taxa específica de creixement ($\mu / \mu_{m\grave{a}x}$).

La composició d'aquest medi en g/L i mL/L és la següent:

- 40 g/L Glucosa dependent de l'estratègia de cultiu a seguir
- 1.8 g/L d'àcid cítric
- 12.6 g/L diamoni fosfat ((NH₄)₂HPO₄)
- 0.5 g/L sulfat de magnesi penta-hidratat (MgSO₄ * 7 H₂O)
- 0.9 g/L clorur de potassi (KCl)
- 0.02g/L clorur de calci di-hidratat (CaCl₂ * 2 H₂O)
- 4.6 mL/L sals traça (apartat 3.1.4)

- 2 mL/L de biotina 0.2g/L
- 0.2 mL/L d'antiescumant Struktol
- Enrasar la resta de volum necessari amb aigua destil·lada.

El volum preparat d'aquest medi dependrà dels volum utilitzat en cada cultiu. Cal remarcar que les sals traça i la biotina són afegides després d'autoclavar el bioreactor, ja que al autoclau es podrien donar interferències entre diferents elements de les sals traça. De forma equivalent, quan la glucosa es la font de carboni del batch aquesta també s'autoclava per separat. Finalment s'ajusta el medi a pH 6. Els valors exactes dels components del medi per a cada lot poden ser consultats a l'Annex A, Secció 9.1.

El medi és separat en dues fraccions, 200 mL són guardats en una ampolla pyrex de 250 mL i seran utilitzats en el protocol d'inoculació del bioreactor. La resta del medi batch és introduït en el fermentador. El bioreactor i l'ampolla pyrex de 250 mL que conté la resta del medi batch s'autoclaven a 121 °C durant 30 min.

3.1.3 Medi continu

El medi continu és el medi que es fa servir per realitzar cultius en continu. Els components són els mateixos que el medi batch, però es troben en diferents concentracions.

La composició d'aquest medi en g/L i mL/L és la següent:

- 50 g/L Glicerol o glucosa depenent de l'estratègia de cultiu a seguir
- 0.9 g/L d'àcid cítric
- 4.35 g/L de diamoni fosfat ((NH₄)₂HPO₄)
- 0.65 g/L de sulfat de magnesi penta-hidratat (MgSO₄ * 7 H₂O)
- 1.7 g/L de clorur de potassi (KCl)
- 0.01 g/L de clorur de calci di-hidratat (CaCl₂ * 2 H₂O)
- 1.6 mL/L de sals traça
- 1 mL/L de biotina 0.2g/L
- 0.2 mL/L d'antiescumant Struktol
- Enrasar la resta de volum necessari amb aigua destil·lada.

D'aquest medi es preparen 11 L, que s'aniran afegint al bioreactor un cop preparats.

A l'ampolla d'11 L es prepara aigua destil·lada + 0.2 mL/L d'struktol i s'autoclava a 121°C durant 30 minuts. El filtre Sartorius SARTOPORE 2 Sterile Midicap utilitzat per filtrar el medi i les connexions de tubs corresponents són autoclavats juntament amb l'ampolla on hi ha aigua destil·lada + struktol. La resta de components són afegits a l'ampolla a través del filtre, i un cop s'ha afegit tot el medi s'addiciona aigua destil·lada fins enrasar als 11 L. Els valors exactes dels components del medi per a cada lot poden ser consultats a l'Annex A, Secció 9.2.

3.1.4 Sals Traça

Les sals traça són micronutrients que formen part del medi batch i continu i són essencials pel creixement de *P. pastoris*. Aquestes sals contenen agents tòxics i han de ser preparades en una campana de gasos.

La composició d'aquest suplement en g/L i mL/L és la següent:

- 5 mL/L d'Àcid Sulfúric (H_2SO_4 (95-98%))
- 65g/L de Sulfat de Ferro hepta-hidratat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- 20 g/L de Clorur de Zinc (ZnCl_2)
- 6 g/L de Sulfat de Coure penta-hidrtat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- 3.36 g/L de Sulfat de Magnesi hidratat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 0.82 g/L de Clorur de Cobalt hexa-hidratat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- 0.2 g/L de Moldibat de Sodi doble hidratat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 0.08 g/L de Iodur de Sodi (NaI)
- 0.02 g/L d'Àcid Bóric (H_3BO_3)
- Enrasar la resta de volum necessari amb aigua destil·lada.

Per motius pràctics es preparen 500 mL de sals traça i s'autoclaven en un pyrex de 500 mL. Un cop autoclavat cal protegir l'ampolla pyrex de la llum, ja que els reactius són fotosensibles. L'ampolla es guarda a la nevera per preservar les seves propietats durant més temps.

Per tal d'agafar el volum necessari per a cada cultiu s'utilitzarà una xeringa estèril i posteriorment es posa un filtre Sartorius amb els porus d'un diàmetre igual o inferior a $0.22 \mu\text{m}$ per assegurar-ne l'esterilitat quan aquestes siguin introduïdes al bioreactor. Aquest procediment es realitzarà en condicions d'esterilitat dins la cabina de flux laminar. La quantitat necessària de sals traça serà afegida al bioreactor a través del sèptum un cop aquest hagi estat autoclavat i previ a la inoculació.

3.1.5 Biotina

La biotina és una vitamina essencial per al correcte desenvolupament del cultiu, està comprovat bibliogràficament que la concentració de biotina afecta significativament al creixement de *P. pastoris*. [43]

Es prepara una solució de biotina a 0.2 g/L a partir de la solució d'stock que es trobava al 100% de concentració.

Per agafar el volum necessari per a cada cultiu s'utilitza una xeringa estèril i posteriorment es posa un filtre PALL amb els porus de diàmetre igual o inferior a $0.22 \mu\text{m}$ per assegurar-ne l'esterilitat quan la biotina sigui introduïda al bioreactor. Aquest procediment es realitza en condicions d'esterilitat dins la cabina de flux laminar. La quantitat necessària de biotina és afegida al bioreactor a través del sèptum un cop aquest hagi estat autoclavat i previ a la inoculació.

3.2 Descripció dels vectors utilitzats

3.2.1 Vector induïble pPICZ α A-YTE1

El vector pPICZ α A-YTE1 conté l'origen de replicació del propi vector, pUC ori, que és utilitzat per a l'ampliació del vector en *E. coli* previ a la transformació en *P. pastoris*. A continuació es troba l'inici del cassat d'expressió; el promotor induïble P_{AOX1} utilitzat per a l'expressió de la proteïna, seguit pel factor de secreció alfa que permet a *P. pastoris* secretar la proteïna directament al medi de cultiu. El següent element que es troba és la seqüència codificant per la proteïna Yte1 acabada amb un codó STOP. Més endavant es troben les seqüències de purificació C-myc i 6xHis, però no es tradueixen. Per tancar el cassat d'expressió es troba la seqüència terminal AOX1 que atura la transcripció. L'últim element del vector és la seqüència que codifica per a la resistència a la Zeocina, el marcador de selecció. Aquesta característica és utilitzada per a la selecció dels clons correctament transformats i pels cultius en erlenmeyer.

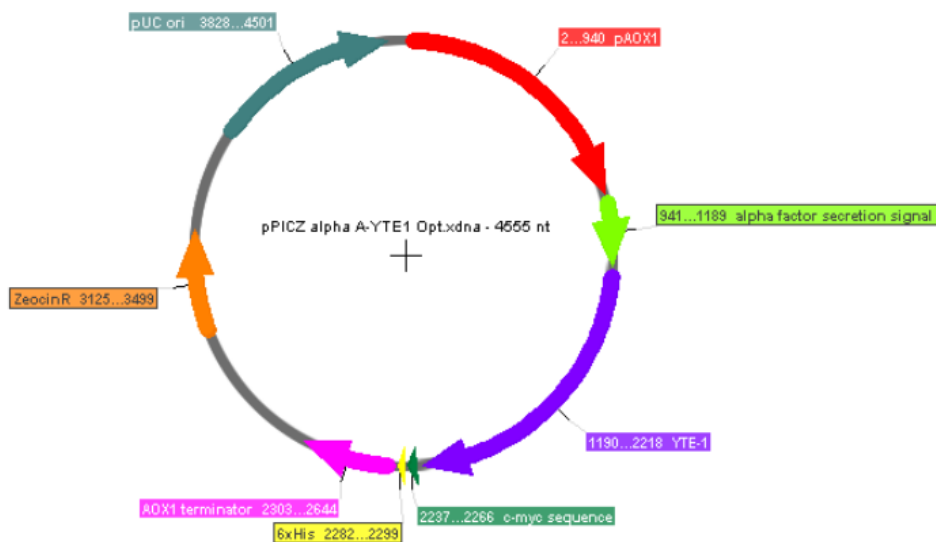


Figura 6: Diagrama del vector pPICZ α A-YTE1.

3.2.2 Vector pGAPZ α A-YTE1

El vector pGAPZ α A-YTE1 conté l'origen de replicació del propi vector, pUC ori, que és utilitzat per a l'ampliació del vector en *E. coli* previ a la transformació en *P. pastoris*. A continuació es troba l'inici del cassat d'expressió; el promotor constituïu P_{GAP} utilitzat per a l'expressió de la proteïna, seguit pel factor de secreció alfa que permet a *P. pastoris* secretar la proteïna directament al medi de cultiu. El següent element que es troba és la seqüència codificant per la proteïna Yte1 acabada amb un codó STOP. Més endavant es troben les seqüències de purificació C-myc i 6xHis, però no es tradueixen. Per tancar el cassat d'expressió es troba la seqüència terminal AOX1 per aturar la transcripció. L'últim element del vector és la seqüència que codifica per a la resistència a la Zeocina, el marcador de selecció. Aquesta característica és utilitzada per a la selecció dels clons correctament transformats i pels cultius en erlenmeyers.

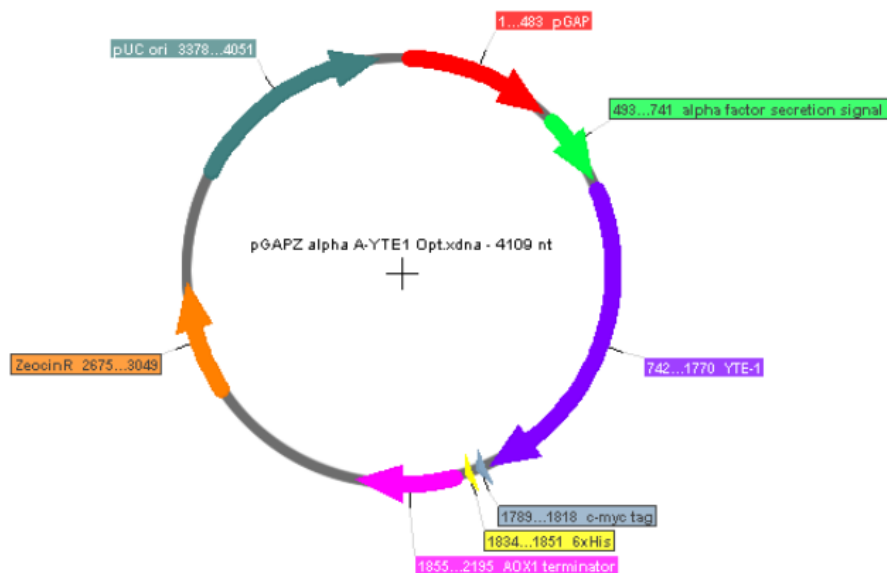


Figura 7: Diagrama del vector pGAPZ α A-YTE1.

3.3 Clons productors utilitzats de *Pichia pastoris*

Les soques utilitzades en aquest TFG són cedides pel Grup d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisis Aplicada dirigit pel Dr. Francisco Valero al Departament d'Enginyeria Química Biològica i Ambiental (DEQBA) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Aquests clons contenen els vectors descrits en l'apartat anterior (3.2). Els clons són numerats durant el procés de creació i s'ha mantingut la nomenclatura per qüestions pràctiques.

A continuació enumerem les soques disponibles:

- **Promotor induïble P_{AOX1} :**
Clon #13 conté el vector pPICZ α A-YTE1.

- **Promotor constitutiu P_{GAP} :**
Clons #16, # 10 i #5 contenen el vector pGAPZ α A-YTE1.

3.4 Preparació dels ciostocks

Inicialment les soques estaven sembrades en una placa de petri amb medi YPD (Yeast extract 1%, Peptone 2% i Dextrose 2%) + Zeocina (1 μ L/mL). Per a poder desenvolupar els cultius previstos en aquest TFG es crea un reservori cel·lular estable a -80°C per cada clon productor. Aquest reservori serveix per poder realitzar els experiments partint de la mateixa concentració cel·lular i del mateix moment del cicle cel·lular per a cada clon.

3.4.1 Cultius en placa de petri i falcon

Es procedeix a sembrar els clons en una nova placa que conté medi YPD + Zeocina en condicions estèrils per millorar la seva viabilitat. Aquesta placa és incubada durant 24 hores a 30 °C.

Seguidament es procedeix a inocular cada clon en un tub falcon de 50 mL utilitzant 10 mL de medi YPG + Zeocina 1 μ L/mL YPG. S'inocula una quantitat desconeguda de biomassa utilitzant la nansa de kolle en condicions estèrils. Aquests falcons són incubats a 25 °C i 165 revolucions per minut (rpm) durant 24 hores. Els falcons es col·loquen de forma diagonal per augmentar la superfície de transferència d'oxigen. Tanmateix els taps dels falcons es descaragolen lleugerament per permetre l'entrada d'aire. Els falcons són col·locats al incubador com es pot observar en la figura 8.

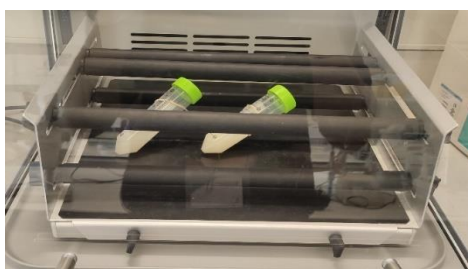


Figura 8: Incubador a 165 rpm i 25°C amb dos falcons en el seu interior.

3.3.2 Cultius en Shake Flask

Partint dels cultius en falcon explicats en l'apartat anterior, es procedeix a inocular els clons en en shake flasks. Els shake flasks són erlenmeyers especialment dissenyats per a realitzar cultius. Aquests erlenmeyers tenen bafles a la part inferior per crear turbulències al líquid quan aquest està en agitació i així millorar-ne la transferència d'oxigen. Addicionalment, els taps dels shake flask tenen membranes que permeten la millor circulació de l'aire i protegeixen el cultiu de contaminacions. Aquestes característiques tenen com a objectiu augmentar la densitat cel·lular a la qual els cultius poden arribar. Es comprova la densitat òptica de cada falcon per assegurar que el cultiu es troba en fase de creixement exponencial; es considera fase de creixement exponencial quan els valors de la densitat òptica del cultiu es troben entre 10 i 20 OD₆₀₀ (determinat experimentalment). Realitzant la inoculació dels shake flasks durant la fase de creixement exponencial del cultiu previ ens permet evitar la fase de latència en el següent cultiu.

La densitat òptica dels falcons és controlada entre les 19 i 24 hores de cultiu a intervals d'una hora per determinar l'inici de la fase de creixement exponencial. A causa del fet que en aquest punt del desenvolupament del projecte encara no es coneix la cinètica de creixement de les soques, s'opta per inocular els shake flask a una OD₆₀₀ de 0.05 per evitar complicacions en el cultiu.

S'utilitza la fórmula 9 per calcular el volum necessari del cultiu previ utilitzat per inocular els shake flask.

$$OD_1 * V_1 = OD_2 * V_2 \quad (9)$$

Cada clon és inocular en un shake flask de 250 mL amb 40 mL de medi YPG + Zeocina 1 µL/mL YPG. Aquests cultius són incubats 24 hores a 25 °C i 165 rpm. La densitat òptica dels cultius és comprovada entre les 19 i 24 hores a intervals d'una hora per determinar l'inici de la fase de creixement exponencial.

3.4.3 Preparació de Criostocks

L'última fase del procés de preparació de criostocks compren la concentració i congelació. La biomassa és recollida del shake flask i concentrada per centrifugació. Seguint la formula 9 es calcula el volum necessari de medi YPG per assolir 90 unitats de OD₆₀₀. Es descarta el sobrenedant i es concentra el pellet amb la quantitat de medi YPG fresc calculat. A continuació s'afegeix 1 mL de biomassa concentrada a cada criovial + 0.5 mL de glicerol 50% per augmentar-ne la viabilitat.

Els criovials són emmagatzemats a - 80 °C.

3.5 Assajos de cinètica de creixement

Els assajos de cinètica de creixement permeten determinar com serà el patró de creixement dels microorganismes. Conèixer la cinètica de creixement de les soques que s'utilitzaran en cultius a escala de laboratori és de gran importància per al correcte desenvolupament del treball experimental, ja que permet planificar les etapes dels cultius de forma precisa.

L'assaig de cinètica de creixement consisteix en inocular shake falsks de 250 mL que contenen 40 mL de medi YPG + Zeocina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ YPG amb volums diferents de cada clon. Els shake falsks són inoculats a partir dels criostocks prèviament preparats. S'afegeix una quantitat determinada del criostock a cada shake flask preparat. Els cultius són incubats 24 hores a 25 °C i 165 rpm. La OD_{600} dels cultius és comprovada entre les 19 i 24 hores a intervals d'una hora. Mitjançant les dades de OD_{600} i el temps de cultiu es pot crear un patró que servirà per dissenyar els futurs experiments.

A causa del disseny del futur treball experimental es decideix realitzar cinètiques de creixement el clon #13 que conté el vector **pPICZ α A-YTE1** i del clon #16 que conté el vector **pGAPZ α A-YTE1**.

3.5.1 Assaig cinètic del clon #16

Quatre shake flask de 250 mL que contenen 40 mL de medi YPG + Zeocina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ YPG són inoculats amb diferents volums del criostock del clon #16. Aquests cultius són incubats 24 hores a 25 °C i 165 rpm.

L'estructura de l'experiment és la següent:

- Shake flask 1: 25 μL del criostock del clon #16.
- Shake flask 2: 50 μL del criostock del clon #16.
- Shake flask 3: 100 μL del criostock del clon #16.
- Shake flask 4: 250 μL del criostock del clon #16.

La OD_{600} dels cultius és comprovada entre les 19 i 24 hores a intervals d'una hora.

3.5.2 Assaig cinètic de la clon #13

Partint de les dades obtingues en l'apartat 3.5.1 es decideix inocular un únic shake flask que conté 40 mL de medi YPG + Zeocina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ YPG amb 25 μL del criostock de la clon #13. Aquest cultiu és incubat durant 24 hores a 25 °C i 165 rpm.

La densitat òptica del cultiu és comprovada entre les 19 i 24 hores a intervals d'una hora.

3.6 Muntatge i posada a punt del Bioreactor

Durant la primera setmana de treball experimental es duen a terme tasques d'instal·lació, calibració i configuració del sistema format pel bioreactor, la BCU (Bioreactor Control Unit), l'analitzador de gasos i el chiller (equip emprat per controlar la temperatura de l'aigua del circuit de la camisa i el condensador del fermentador).

Un cop es va rebre l'equip, es procedeix a instal·lar la BCU on s'hi connecta l'entrada d'aire comprimit, la corrent, l'internet i el chiller (situat sota la taula). Un cop comprovades totes les entrades i sortides es procedeix a actualitzar el software Rosita (utilitzat pel control del bioreactor) i l'aplicació AnyDesk que serveix per al control remot del bioreactor.

Seguidament s'acobla la cuba del bioreactor amb coberta i s'instal·len tots els perifèrics necessaris. A continuació s'omple la cuba, el chiller, i la camisa d'aigua amb aigua destil·lada per assajar les capacitats d'intercanvi tèrmic. El temps de resposta del chiller i de la resistència interna del bioreactor son provats realitzant canvis de temperatura entre 10 °C i 40 °C; posteriorment es prova l'estabilitat de la temperatura mantenint-la a 25 °C durant tres hores.

El següent pas és comprovar que el tub del sparger i la pressió de l'aire funcionen de forma correcta. Es proven diferents cabals d'entrada d'aire per comprovar el temps i precisió de la resposta de la BCU. En aquest punt s'ajusta l'alçada de les pales agitadores Rushton per adaptar-ho als volums esperats de treball.

Finalment es comprova que l'analitzador de gasos funciona de forma correcta i la connectivitat d'aquest amb la BCU.

3.7 Manteniment i posada a punt prèvia a la inoculació del bioreactor

Cal mantenir unes bones pautes de manteniment i preparació per al correcte desenvolupament dels cultius.

3.7.1 Tasques prèvies a l'autoclavat

➤ **Assecatge de la sílica per a la columna d'assecatge:**

La sílica utilitzada en la columna d'assecatge dels gasos de sortida del bioreactor ha de ser assecada després de cada cultiu. El procediment estàndard utilitzat consisteix a col·locar la sílica en un vas de precipitats dins de l'estufa a 150 °C per eliminar-ne la humitat. Previ a la connexió de la columna d'assecatge amb el bioreactor es procedeix a omplir la columna amb la sílica seca.

➤ **Revisió de la integritat dels tubs i les connexions:**

Els tubs de silicona i les juntes entre aquests són revisats per detectar fugues que puguin comprometre el cultiu. Cal prestar atenció a les seccions dels tubs que estan en contacte amb les bombes peristàltiques, ja que són les que pateixen més desgast.

- **Calibració de les bombes peristàltiques:**
Les bombes peristàltiques han de ser calibrades abans de cada cultiu. Moure els tubs per netejar-los i el desgast propi del seu ús provoca que la calibració sigui altament inexacte.
- **Manteniment i assecatge dels filtres d'aire:**
Els filtres destinats a filtrar l'aire d'entrada i sortida del bioreactor juntament amb els filtres de les ampolles pyrex són comprovats en cerca d'obstruccions. En cas de trobar filtres obstruïts aquests són substituïts per filtres nous. Si els filtres són reutilitzats cal que aquests s'assequin prèviament a l'autoclavat. Per assecar els filtres es dipositen dins d'una estufa de cultiu a 37 °C durant 48 h.
- **Revisió de la integritat del sèptum:**
Cal revisar que el sèptum del bioreactor no estigui danyat ni contingui matèria orgànica o restes químiques. En cas de trobar-lo en mal estat ha de ser substituït per un de nou.
- **Introducció del medi de cultiu batch:**
S'introdueix el medi de cultiu batch a la cuba del bioreactor.
- **Calibració del sensor de pH:**
La sonda de pH ha de ser calibrada seguint el protocol estàndard de calibració de sondes de pH. Aquesta calibració es duu a terme quan el bioreactor conté el medi de cultiu per evitar l'assecament de la sonda.

3.7.2 Tasques posteriors a l'autoclavat

- **Purga i reabastiment del sistema de refrigeració:**
El chiller és reabastit amb aigua destil·lada nova per compensar la pèrdua de l'aigua de la camisa del bioreactor. Un cop la cuba del bioreactor s'ha connectat al sistema de refrigeració es procedeix a omplir la camisa i purgar d'aire el sistema.
- **Addició de les sals traça i la biotina:**
Cal afegir les sals traça i la biotina preparades en l'apartat 3.1.4 i 3.1.5 respectivament. Aquests components són introduïts a través del sèptum. L'addició es realitza prèviament a la calibració del sensor d'oxigen dissolt, ja que altera les propietats del medi de cultiu.
- **Calibració del sensor d'oxigen dissolt:**
Per realitzar la calibració del sensor d'oxigen dissolt se satura el medi de cultiu d'oxigen a afegint aire al sistema i augmentant l'agitació fins a un 80% la seva velocitat màxima, fet que augmenta la taxa de transferència d'oxigen al medi (OTR). A continuació s'utilitza el protocol estàndard del programa Rostia per realitzar aquesta calibració.

➤ **Connexió dels perifèrics:**

La sonda de pH i d'oxigen dissolt són connectades a la BCU, el sensor de temperatura és col·locat a la cànula corresponent, es connecten tots els tubs d'addició a les bombes peristàltiques, es connecta l'entrada i sortida d'aire del bioreactor i finalment es connecta la refrigeració del condensador.

3.8 Implementació de cultius Fed-Batch senzills

Amb l'objectiu d'aprofitar els cultius batch i optimitzar el temps de treball experimental es decideix allargar els cultius realitzant cultius de tipus fed-batch senzills després de cada fase de cultiu batch. Un cop finalitza cada batch es realitza un període d' starving per assegurar que tota la font de C ha estat consumida. Aquesta segona fase del cultiu fed-batch permeten comprovar la capacitat de resposta de l'analitzador de gasos en cultius on els canvis es produeixen de manera més freqüent i en major intensitat. Els substrats utilitzats per les simulacions fed-batch són: Glicerol, Glucosa i Metanol.

Cal remarcar que els polsos amb metanol impliquen haver d'utilitzar una estratègia diferent dels polsos amb glicerol o glucosa. La ruta metabòlica que s'activa per la glucosa i el glicerol és la glicòlisi. La ruta metabòlica de degradació del metanol està basada en la conversió de metanol a àcid fòrmic, fet que consumeix molt O₂. [44] Les fases de cultiu batch es realitzen amb glucosa o glicerol, i per tant, quan s'utilitza metanol per als polsos cal adoptar una estratègia progressiva per donar temps al clon a què adapti les rutes metabòliques. Els primers polsos tenen una concentració de metanol baixa mentre que en els polsos posteriors la concentració s'augmenta. Aquesta estratègia permet a les cèl·lules adaptar-se i mitigar l'estrès que suposa l'adaptació metabòlica.

3.9 Estructura utilitzada en els cultius Batch-Fed Batch

Els experiments realitzats són enumerats seguint l'ordre en què es van fer. Les condicions generals d'operació són iguals per a tots els cultius:

- pH: 6
- Temperatura: 25 °C
- Volum d'aire: 1vvm (volum d'aire/volum de medi per minut)
- Agitació: Variable segons requeriments del cultiu

Cultiu 1

Soca utilitzada: *P. pastoris* X33 + pGAPZαA-YTE1 #16

Volum del cultiu: 1.5 litres

Fonts de carboni pel cultiu 1:

- Cultiu batch: Glicerol (40g/L)
- Polsos fed-batch:
 - Dos polsos de glicerol (10g/L)
 - Una addició a cabal constant 0.3 mL/min de glicerol 400g/L

Cultiu 2

Soca utilitzada: *P. pastoris* X33 + pGAPZ α A-YTE1 #16

Volum del cultiu: 2 litres

Fonts de carboni pel cultiu 2:

- Cultiu batch: Glucosa (40g/L)
- Polsos fed-batch:
 - Dos polsos de glucosa (10g/L)
 - Una addició exponencial a $\mu=0.3 \text{ h}^{-1}$ de feeding glucosa 400g/L.

Cultiu 3

Soca utilitzada: *P. pastoris* X33 + pGAPZ α A-YTE1 #16

Volum del cultiu: 2 litres

Fonts de carboni pel cultiu 3:

- Cultiu batch: Glucosa (40g/L)
- Polsos fed-batch:
 - Dos polsos de glucosa (10g/L)
 - Una addició exponencial a $\mu=0.03 \text{ h}^{-1}$ de glucosa 400g/L.

Cultiu 4

Soca utilitzada: *P. pastoris* X33 + pPICZ α A-YTE1 #13

Volum del cultiu: 1.5 litres

Fonts de carboni pel cultiu 4:

- Cultiu batch: Glicerol (40g/L)
- Polsos fed-batch: Tres polsos de metanol (1g/L) (5g/L) (10g/L)

Cultiu 5

Soca utilitzada: *P. pastoris* X33 + pPICZ α A-YTE1 #13

Volum del cultiu: 1.5 litres

Fonts de carboni pel cultiu 5:

- Cultiu batch: Glicerol (40g/L)
- Polsos fed-batch: Tres polsos de metanol (1g/L) (5g/L) (10g/L)

3.9.1 Glicerol afegit durant el fed-batch

Els dos primers polsos amb glicerol són de 10 g/L cada un, a partir d'una solució de glicerol 400 g/L. Per saber quant se n'ha de tirar es calcula els mL que han d'entrar dins el bioreactor i amb la bomba peristàtica s'addicionen aquests mL al bioreactor. Per addicionar-los el software Rosita permet posar un valor de cabal de la bomba i gràcies a això es pot saber quants mL s'estan addicionant al bioreactor.

El càlcul es realitza sabent que es vol 10 g/L de glicerol en el bioreactor, i dins el bioreactor hi ha 1.5 L de medi. Per tant, es necessita addicionar 15 g de glicerol al bioreactor.

Sabent que el glicerol de l'ampolla de feeding està a concentració 400 g/L, s'haurà d'afegir 37.5 mL de l'ampolla de feeding per obtenir 15 g de glicerol al bioreactor.

La tercera addició és un feeding constant a 0.3 mL/min de l'ampolla de feeding amb glicerol 400 g/L.

3.9.2 Glucosa afegida durant el fed-batch

Els dos primers polsos amb glucosa són de 10g/L cada un, a partir d'una solució de glucosa 400g/L. Per saber quant se n'ha de tirar es calcula els mL que han d'entrar dins el bioreactor i amb la bomba peristàltica s'addicionen aquests mL al bioreactor. Per addicionar-los el software Rosita permet posar un valor de cabal de la bomba i gràcies a això es pot saber quants mL s'estan addicionant al bioreactor.

El càlcul es realitza sabent que es vol 10 g/L de glucosa en el bioreactor, i dins el bioreactor hi ha 1.5L de medi. Per tant, es necessita addicionar 15 g de glucosa al bioreactor. Sabent que la glucosa de l'ampolla de feeding està a concentració 400 g/L, s'haurà d'afegir 37.5 mL de l'ampolla de feeding per tenir 15 g de glucosa al bioreactor.

La tercera addició és un feeding exponencial amb una velocitat específica de creixement de 0.03 h⁻¹ de l'ampolla de feeding amb glucosa 400 g/L.

El feeding exponencial és calculat a partir de la fórmula 10, on Q és el cabal a calcular, Q_0 el cabal anterior, μ la velocitat específica de creixement i t el temps que ha passat entre Q i Q_0 .

$$Q = Q_0 * e^{\mu * t} \quad (10)$$

El software Rosita té aquesta equació integrada en l'opció de feeding exponencial i afegeix el cabal corresponent en cada moment.

3.9.3 Metanol afegit durant el fed-batch

El primer pols amb metanol és d'1 g/L a partir d'una solució de metanol 400g/L. Per saber quant se n'ha de tirar es calcula els mL que han d'entrar dins el bioreactor i amb la bomba peristàltica s'addiciona aquests mL al bioreactor. Per addicionar-los el software Rosita permet posar un valor de cabal de la bomba i gràcies a això es pot saber quants mL van a dins el bioreactor.

El càlcul es realitza sabent que es vol 1 g/L de metanol en el bioreactor, i dins el bioreactor hi ha 1.5L de medi. Per tant, es necessita addicionar 1.5 g de metanol al bioreactor. Sabent que la metanol de l'ampolla de feeding està a concentració 400 g/L, s'haurà d'afegir 3.75 mL de l'ampolla de feeding per tenir 1.5 g de metanol dins el bioreactor.

Els segon pols amb metanol és de 5 g/L a partir d'una solució de metanol 400g/L. S'afegiran 18.75 mL de l'ampolla de feeding.

Els tercer pols amb metanol és de 10 g/L a partir d'una solució de metanol 400g/L. S'afegiran 37.5 mL de l'ampolla de feeding.

3.10 Cultius en continu

Un cop realitzats varis cultius fed-batch, s'inicien els cultius en continu. Aquests es basen en l'entrada d'un cabal constant de medi per mantenir una μ concreta en el cultiu mentre que a la vegada està sortint medi del bioreactor amb el mateix cabal.

El sistema està format per una balança on reposa un pyrex d'11 L amb el medi estèril pel continu. Es programa un cabal al software Rosita per a que afegixi una quantitat en g/min al brou de cultiu. Una cànula connectada a una bomba peristàltica amb un cabal superior al d'entrada que extreu el medi per mantenir el volum de cultiu. Aquesta cànula està col·locada a 1 L del brou de cultiu, per tant en condicions ideals el volum dins el bioreactor serà sempre de 1 L.

3.10.1 Calibració de les bombes

Per calibrar les bombes s'utilitza una balança i es mesura la quantitat de líquid transvasat en un determinat període de temps amb una potencia determinada. Aquest assaig es realitza amb cada bomba utilitzant el tub de silicona amb el diàmetre adequat per a cada funció. El programa Rosita inclou una funció per realitzar aquesta calibració i on introduir les dades per ajustar el rang de les bombes.

Es realitza la comparació del pes afegit per la bomba peristàltica durant les 19 hores de prova respecte el pes teòric calculat. El cabal inicial és de 1 g/min i a partir del feeding exponencial amb $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$, a les 19 hores s'arriba a un cabal final de 3.84 g/min.

3.10.2 Calibració de la cànula i la balança

La cànula ha estat ajustada a l'altura adequada per mantenir el volum de treball dels cultius en continu a 1 L. Per calibrar l'alçada de la cànula s'han provat diferents altures de la cànula omplint el bioreactor amb 1.1 L d'aigua destil·lada i connectant el sistema d'extracció de medi. Al cap de 19 hores de funcionament del sistema s'extreu l'aigua i es pesa per comprovar si el volum restant és d'1 L considerant la densitat de l'aigua destil·lada 1 g/mL. Aquest procés s'ha repetit fins que s'ha aconseguit mantenir el volum estable a 1 L.

La cànula ha estat marcada a l'altura adequada per mantenir un punt de referència i s'ha mesurat la part exterior de la cànula amb un peu de rei per tenir dades en cas que la marca es degradés.

3.10.3 Ajust del cabal per l'alimentació en continu

Al laboratori es mesura de la densitat del medi de cultiu, aquesta densitat serveix per realitzar els càlculs de cabal a afegir en funció de la μ que es vulgui mantenir pel cultiu.

$$D = \frac{Q}{V} \quad (11)$$

A partir de la fórmula 11 es calcula el cabal en L/h que s'ha d'afegir per a una μ concreta.

Se sap que $D = \mu$, per tant un cop decidida la μ a afegir, es resol l'equació tenint en compte que el volum del cultiu és 1 L i s'obté el cabal en L/h. Aquest cabal és transformat a mL/min i finalment a g/min, ja que són les unitats que el programa Rosita accepta. Per aquesta última conversió és necessari saber la **densitat del medi**, que és **1.02 g/mL**.

3.10.4 Estructura del cultiu en continu

L'estructura pel cultiu en continu realitzat és la següent:

Clon utilitzat: *P. pastoris* X33 + pGAPZ α A-YTE1 #16

Volum del cultiu: 1 L

- Fase batch per assolir una quantitat de biomassa considerable.
- Dues condicions: dos cabals concrets per mantenir dues μ .
 - $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$; $Q = 2.55 \text{ g/L}$
 - $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$; $Q = 1.4 \text{ g/L}$

Cada condició del continu dura 5 temps de residència, que és el temps estàndard en que el cultiu es considera que ha tingut temps a establir-se. Un temps de residència és definit com el temps que es tarda a canviar tot el medi inicialment contingut al reactor per medi nou afegit. Per calcular quant dura un temps de residència s'ha de fer la inversa de la D.

En la primera condició un temps de residència dura: $1/0.15 \text{ h}^{-1} = 6.66 \text{ h}$. Per tant, 5 temps de residència corresponen a 33.33 h. És llavors quan es canvia de condició.

En la segona condició un temps de residència dura: $1/0.07 \text{ h}^{-1} = 14.29 \text{ h}$. Per tant, 5 temps de residència corresponen a 71.42 h.

3.11 Anàlisi de les mostres dels cultius

Amb la finalitat d'obtenir dades sobre la progressió dels cultius i poder-les comparar amb les dades obtingudes de l'analitzador de gasos, es duen a terme diversos anàlisis partint de mostres preses durant el cultiu.

Les mostres del brou de cultiu s'emmagatzemen en falcons de 15 mL. D'aquesta mostra 2 mL són centrifugats i el sobrenedant es guardat en dos eppendorf de 1.5 mL. Aquestes mostres són congelades per al seu posterior anàlisi a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Els experiments realitzats són: **seguiment de la densitat òptica, assaig Bradford, gels SDS-PAGE i assaig d'activitat enzimàtica.**

3.11.1 Seguiment de la densitat òptica (OD₆₀₀) Off-line

Al llarg del desenvolupament dels cultius es prenen mostres per a poder seguir l'evolució de la biomassa al llarg cultiu mitjançant tècniques espectrofotomètriques ja que la concentració de biomassa és proporcional a l'absorbància. Les mostres són analitzades a 600 nm utilitzant l'espectrofotòmetre UV3100-PC de la marca VWR.

Els valors de OD₆₀₀ que s'obtenen durant la fase de creixement exponencial es transformen als seus corresponents logaritmes neperians i linealitzats. Assumint una cinètica de creixement de Monod, el pendent resultant de la linealització de les dades proporciona el valor de la taxa màxima específica de creixement ($\mu_{m\grave{a}x}$) per l'interval de temps graficat.

3.11.2 Assaig de determinació de proteïna total

Utilitzant plaques multiwell 96 es realitza la detecció de proteïna total del sobrenedant centrifugat provenint del brou de cultiu. Mitjançant el reactiu de Bradford que s'ha diluït 1:5 amb aigua destil·lada per a poder ser llegit correctament per l'espectrofotòmetre, es determinen diferents concentracions del sobrenedant per detectar la presència de proteïna total i quantificar-la. Es prepara una recta patró de concentració de 2 g/L amb albúmina de sèrum boví (BSA) que és utilitzada en tots els assajos. La recta patró contempla diferents concentracions d'albúmina de sèrum boví fetal, que va des de 0.2 g/L fins a 2 g/L. S'afegeix a cada pou de la placa 7 μ L de mostra + 200 μ L de reactiu de Bradford diluït 1:5.[45]

La densitat òptica de les mostres és detectada per l'equip Multiskan EX de Thermo Scientific a 595 nm.

3.11.3 Gels SDS-PAGE

Posterior a la confirmació de la presència de proteïna en el sobrenedant es procedeix a realitzar un gel SDS-PAGE per confirmar la presència de la proteïna recombinant.

Es segueix el protocol estàndard per realitzar aquest assaig. [46] (veure Annex A, Secció 9.3, per consultar el protocol d'electroforesi).

Els gels estan compostos per acrilamida al 10% en el running gel i al 4% en l'stacking gel. A cada pou la capacitat màxima és de 20 μ L, que seran separats en 10 μ L de tampó reductor + 10 μ L de mostra calculada i H₂O destil·lada (fins arribar als 10 μ L). Aquests 20 μ L són incubats a 95 $^{\circ}$ C durant 10 minuts seguint el protocol d'electroforesi. [46] Tots els gels segueixen el mateix patró: per cada cultiu es realitzen dos gels, el primer conté quatre carrils amb 6 μ L de volum de mostra i els altres quatre carrils amb 3 μ L de mostra. El segon gel conté quatre carrils amb 0.5 μ g de proteïna i quatre carrils més amb 1 μ g de proteïna. Els μ L a afegir es calculen a partir de la concentració de proteïna obtinguda a l'assaig de determinació de proteïna total. A tots dos gels s'afegeix al primer carril 20 μ L del marcador de pes comercial BioRad Precision Plus ProteïnTM.

Les cubetes d'electroforesi utilitzades són les estàndard de BioRad. Un cop s'afegeix el tampó d'electroforesi i els gels, es fa córrer els gels durant 45 minuts aproximadament i llavors s'extreuen els gels per a la posterior tinció d'aquests. [46] (veure Annex A, Secció 9.4, per consultar el protocol de tinció).

Bibliogràficament la proteïna té un pes de 37 kDa, no es posa referència ja que es confidencial. Comparant les bandes resultants amb el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™ es determina la presència específica de la proteïna Yte1.

3.11.4 Assaig d'activitat enzimàtica

Posteriorment a la detecció de la nostra proteïna d'interès mitjançant el gel SDS-Page es realitza la quantificació específica de la proteïna d'interès mitjançant un assaig d'activitat enzimàtica.

Aquest assaig consisteix en la transformació del *p*-nitrophenyl ester (substrat) per part de l'enzim Yte1 en *p*-nitrophenol (producte) que genera color groc i pot ser monitoritzat per tècniques espectrofotomètriques (veure figura 9). El *p*-nitrophenyl ester s'ha de conservar a -20 °C ja que sinó es degrada i perd la seva funció.

L'assaig es duu a terme a 37°C barrejant 980 µL de tampó: tampó fosfat (ph 7, 50 mM) + Triton X-100 (0.32 % (w/v)) + *p*-nitrophenyl ester (1mM), amb 20 µL de mostra. Per l'assaig es llegeix l'absorbància al llarg de 3 minuts a 348 nm des de l'inici de la reacció, ja que el *p*-nitrophenol és un cromòfor l'absorbància màxima del qual es troba a 348 nm. Utilitzant el software en línia UV-VIS analyst incorporat a l'espectrofotòmetre UV3100-PC es pot seguir l'augment de la densitat òptica causat per l'aparició del producte al llarg de 3 minuts.

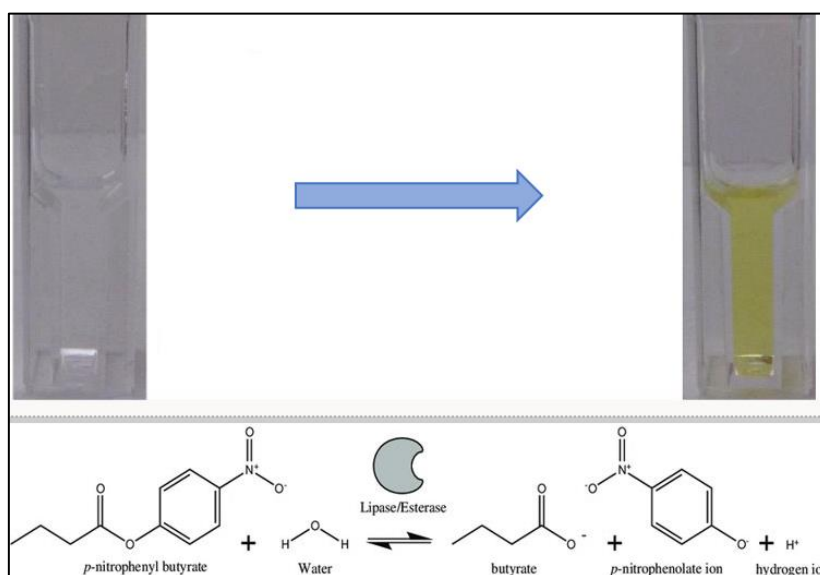


Figura 9: Representació gràfica del canvi de color durant l'assaig enzimàtic i base molecular d'aquest assaig.

3.12 Mètodes de monitrotizació On-line

Durant els cultius en bioreactor s'han obtingut dades de l'analitzador de gasos i de les mostres que s'han anat prenent durant el cultiu. Aquests mètodes permeten observar la taxa màxima específica de creixement (μ_{\max}) durant el batch de cada cultiu. Posteriorment es comparen els dos mètodes per saber si l'analitzador de gasos proporciona valors fiables per calcular la velocitat específica de creixement de qualsevol moment del cultiu. En els cultius que es realitzen es compara només el moment de fase exponencial del batch ja que és el moment d'on es tenen mostres.

3.12.1 Analitzador de gasos

L'analitzador de gasos llegeix els paràmetres respiratoris del cultiu: CO_2 , O_2 , RQ, OUR i CER. Amb el CO_2 es pot veure en directe com la població cel·lular creix, ja que al créixer respiren més i per tant produeixen més CO_2 .

Un cop obtinguts els valors de cada paràmetre respiratori, es tracten les dades de CO_2 per poder obtenir la velocitat específica de creixement de la fase batch per cada cultiu i pels polsos.

Els valors del percentatge del CO_2 durant la fase de creixement exponencial es transformen als seus corresponents logaritmes neperians per a ser linealitzats. Assumint una cinètica de creixement de Monod el pendent resultant de la linealització de les dades proporciona el valor de la taxa específica de creixement (μ) per l'interval de temps graficat.

Amb l'analitzador de gasos també es tracten les dades d'RQ, OUR i CER. El que es fa és graficar aquests paràmetres respecte al temps per comprovar poder extreure informació rellevant del cultiu.

3.12.2 Comparació entre els mètodes On-line i Off-line

Després d'obtenir les velocitats específiques de creixement durant la fase exponencial del batch, es compara les μ_{\max} en el mateix interval de temps pels dos mètodes (On-line i Off-line).

El procediment és graficar els logaritmes neperians de cada mètode durant el mateix interval de temps de la fase batch. Seguidament s'extreuen les equacions de cada recta on la pendent representa la velocitat específica de creixement. En el mètode On-line es realitzarà la gràfica del logaritme pel percentatge de CO_2 , i en el mètode Off-line es realitzarà la gràfica del logaritme per les dades de densitat òptica.

3.13 Neteja del bioreactor

Un cop acabat el cultiu la cuba del bioreactor és netejada. El brou de cultiu és descartat i serà posteriorment tractat com un residu. Per la neteja de la cuba s'utilitza aigua destil·lada. Cal remarcar que no s'utilitzen detergents, ja que les restes d'aquests interfereixen en el creixement cel·lular i generen escumes.

La tapa del bioreactor és netejada per separat, cal prestar atenció en els punts de neteja complicats com són les pales del impeller, els baffles, la molla del motor i la sortida d'aire. Tots els perifèrics són desmuntats i netejats amb aigua destil·lada per separat. Els tubs de silicona són netejats amb aigua d'estilada a pressió i assecats amb l'ajuda d'una xeringa.

Les sondes són netejades amb aigua destil·lada i posteriorment assecades amb paper de laboratori. Un cop seques són desades en les fundes protectores.

3.14 Tractament dels residus generats

El brou de cultiu dels cultius 1 i 2 és emmagatzemat en garrafes de 5 litres i posteriorment entregat a l'empresa Bionet per al seu ús en experiments de filtració tangencial. Els brous de cultiu de la resta de cultius són emmagatzemats en ampolles pyrex d'un litre i posteriorment autoclavades.

L'aigua destil·lada utilitzada pel rentatge del bioreactor es deixa reposar en vasos de precipitat de 5 litres amb lleixiu i es disposa posteriorment. Si l'aigua destil·lada conté agregats de biomassa considerables, s'emmagatzema en ampolles pyrex d'un litre i posteriorment s'autoclava.

En cas que sobri medi de cultiu aquest és afegit a la fracció de brou de cultiu i s'autoclava conjuntament.

4. Resultats

4.1 Cinètiques de creixement

Amb l'objectiu de poder controlar els timings del cultiu es realitzen cinètiques de creixement dels criostocks preparats per tal d'inocular el bioreactor quan el cultiu en shake flask es trobi en fase exponencial. D'aquesta manera, s'intenta reduir la fase de latència un cop s'inocula el fermentador i així es guanya precisió en els càlculs que permeten determinar la durada de la fase batch. Aquests timings seran importants per organitzar properes fases del cultiu ja siguin en mode fed-batch o quimiòstat.

4.1.1 Clon constutiu *GAP* #16

Els resultats pel clon #16 són els següents (la taula de valors es troba a l'annex B subíndex 10.1):

Tenint en compte que es coneix que la fase exponencial en cultius en YPG de *P. pastoris* arriba fins a OD₆₀₀ al voltant de 20, aquests resultats permetran estimar la quantitat de criostock que s'ha d'inocular als cultius de pre-inòcul perquè aquests estiguin en plena fase exponencial en el temps desitjat.

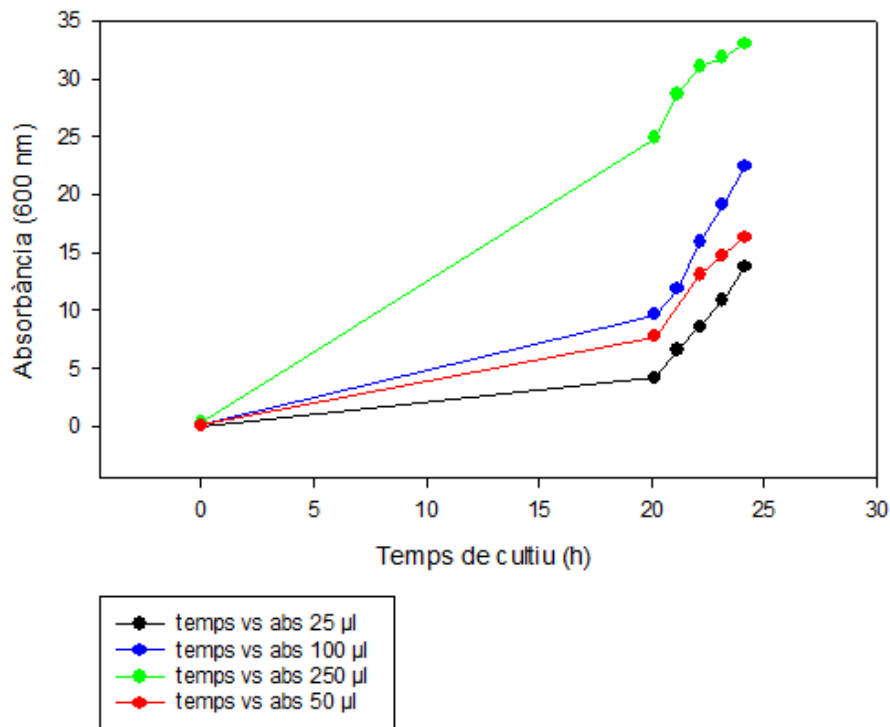


Figura 10: Gràfica de la cinètica de creixement del clon #16.

4.1.2 Clon induïble per metanol AOX1#13

Guiats per la cinètiques del clon constitutiu #16, només s'inocula un erlenmeyer amb 25 µL.

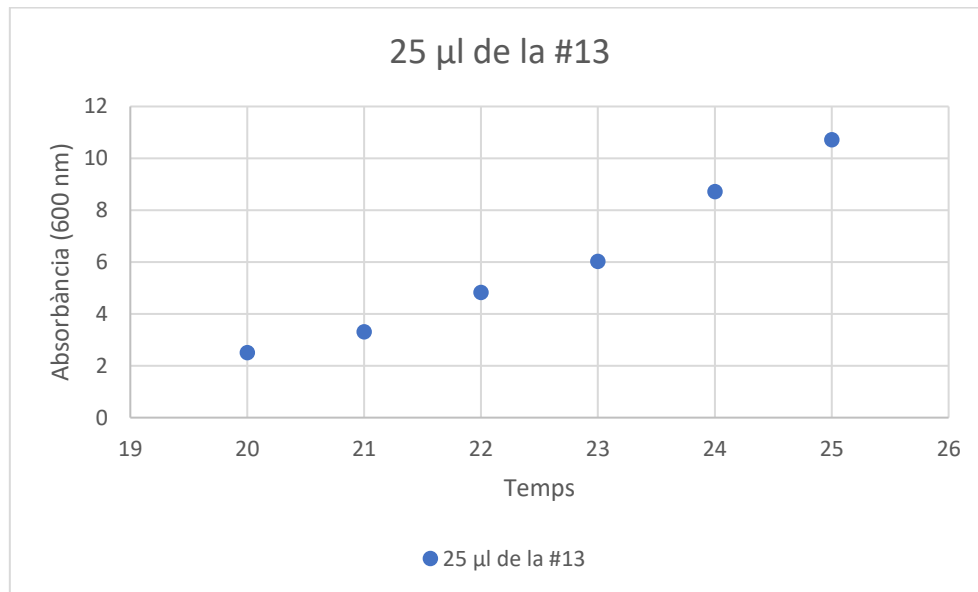


Figura 11: Gràfica de la cinètica de creixement del clon #13.

L'erlenmeyer inoculat amb 25 µL del criostock arriba a fase exponencial a les 25 h. (la taula es troba a l'annex B subíndex 10.2)

4.2 Cultiu fed-batch 1: Bacth Glicerol + Fed-batch Glicerol

El primer cultiu es va realitzar amb glicerol com a font de carboni ja que és la més habitual per la fase batch en cultius de *Pichia*. [28]

4.2.1 Condicions del cultiu

En la gràfica que s'observa a continuació (figura 12) hi ha tots els paràmetres del cultiu que es van monitoritzar. En aquest cas s'inclouen tots els paràmetres en una sola figura ja que no es va poder desmar les dades del cultiu per al posterior tractament d'aquestes a causa d'un error tècnic.

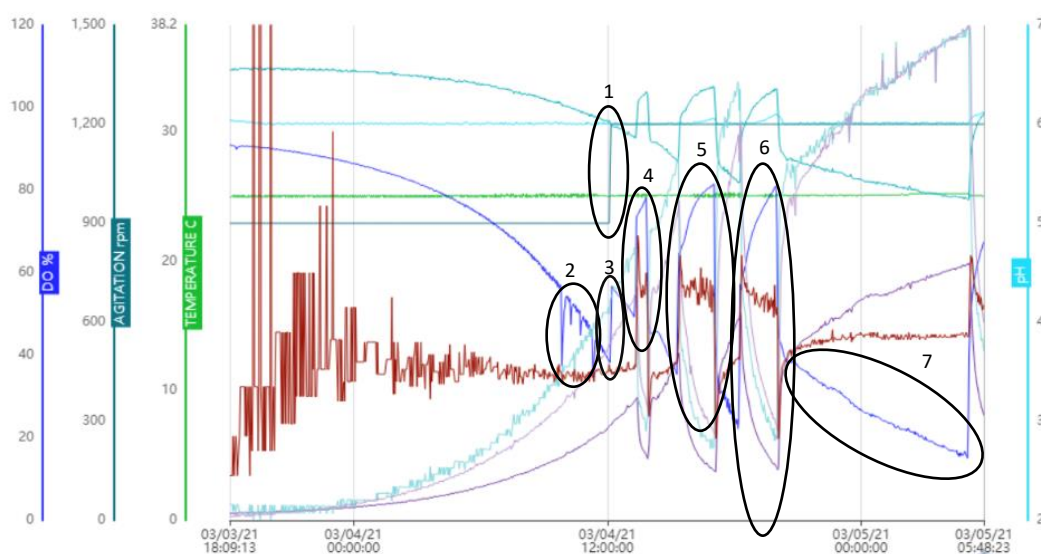


Figura 12: Paràmetres d'anàlisi de les condicions del cultiu 1.

El **pH** (línia blau fluix) i la **temperatura** (TEMPERATURE C, línia verda) són paràmetres que s'han pogut mantenir constants al llarg del cultiu. A la figura 12 s'observa com el pH es manté a 6 mentre que la temperatura es manté a 25°C. L'**agitació** (AGITATION rpm, línia turquesa) es manté a 900 rpm constant fins que a les 20 hores de cultiu s'augmenten les rpm a 1200 per tal de baixar el nivell d'espuma del bioreactor (es pot veure el pic d'augment a la rodona 1) i augmentar la transferència d'oxigen al medi de cultiu. Les 1200 rpm es mantenen constants fins al final del cultiu.

El **pO₂** (DO%) (línia blau fort) durant la fase batch disminueix exponencialment. Durant aquesta fase hi ha pics de disminució del pO₂ (rodona 2) que corresponen a l'addició d'antiespumant. A les 20 hores de cultiu, hi ha un pic d'augment de pO₂ (rodona 3) corresponent a la pujada d'agitació de 900 a 1200 rpm. A les 21.5 hores de cultiu el batch finalitza i es veu un pic on augmenta el pO₂ (rodona 4). A les 22 hores de cultiu s'afegeix el primer pols de glicerol i es veu un pic on disminueix el pO₂ (rodona 4). A les 23.5 hores de cultiu hi ha un pic d'augment de pO₂ (rodona 5) que indica la fi del pols. A les 25 hores de cultiu hi ha un pic de disminució del pO₂ (rodona 5) corresponent a l'addició del segon pols. A les 26 hores de cultiu hi ha un pic d'augment de pO₂ (rodona 6) que indica la fi del segon pols. A les 28 hores de cultiu hi ha un últim pic de disminució del pO₂ (rodona 6) que correspon a l'addició de l'últim pols.

Finalment, s'estabilitza la disminució de pO_2 (rodona 7) al final del cultiu degut l'addició de substrat de forma constant (0.3 mL/min).

4.2.2 Paràmetres respiratoris

Durant el cultiu s'enregistren els paràmetres respiratoris més importants com són el CO_2 i l' O_2 .

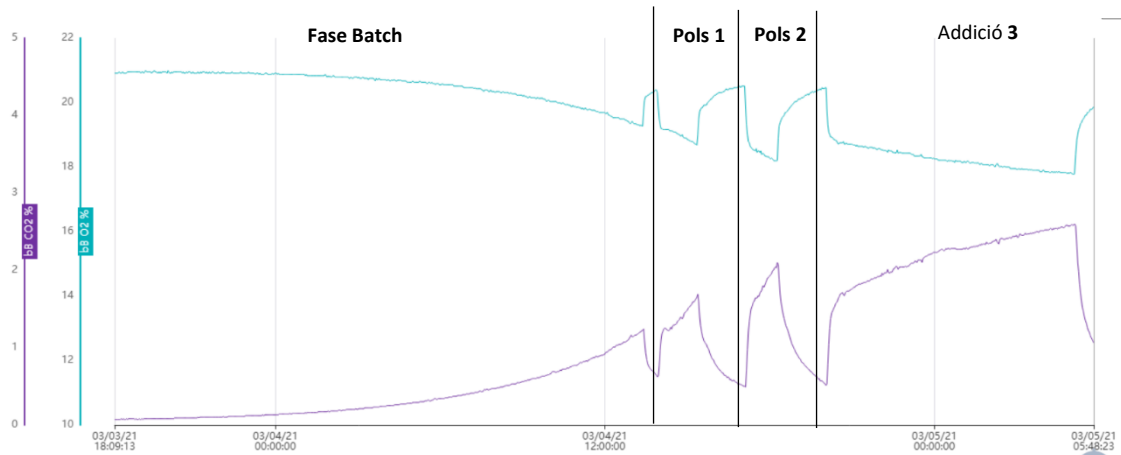


Figura 13: Paràmetres respiratoris principals (O_2 i CO_2).

Durant la **fase batch** el CO_2 augmenta i l' O_2 baixa exponencialment. Quan aquesta fase s'acaba a les 21.5 hores de cultiu, hi ha un pic de disminució del CO_2 i augment d' O_2 .

A les 22 hores de cultiu s'addiciona el **primer pols** de 10 g/L de glicerol. En aquest moment, de nou, el CO_2 augmenta mentre que l' O_2 disminueix. A les 23.5 hores de cultiu, el CO_2 baixa i l' O_2 puja.

A les 25 hores de cultiu s'afegeix el **segon pols** de 10 g/L de glicerol. En aquest moment el CO_2 augmenta mentre que l' O_2 disminueix. A les 26 hores hi ha un pic de disminució en el CO_2 i augment en l' O_2 .

Finalment, a les 28 hores de cultiu, es realitza la tercera addició de substrat amb cabal de **feeding constant** a 0.3 mL/min. S'aprecia un augment de CO_2 i una disminució de O_2 constant.

Amb les dades de CO_2 i O_2 obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER.

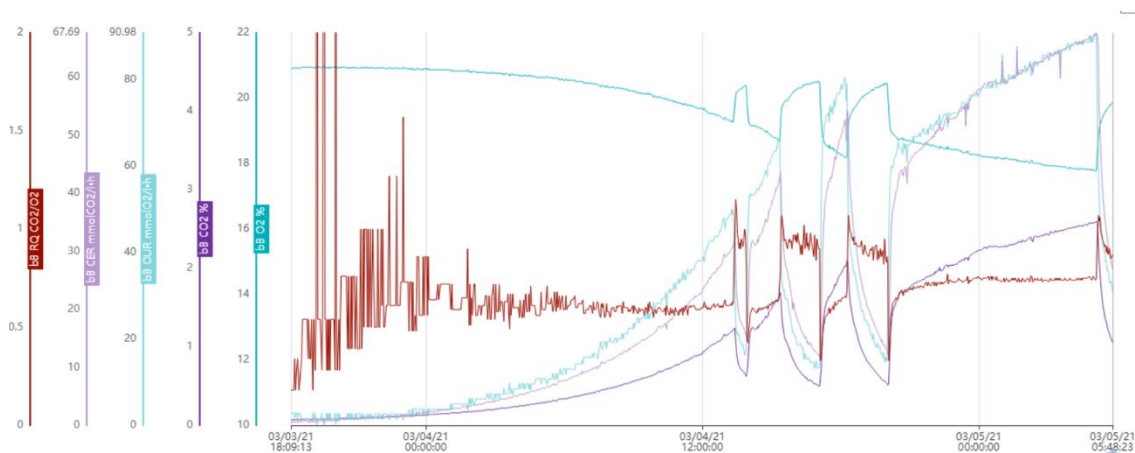


Figura 14: Paràmetres respiratoris del cultiu 1.

L'OUR i el CER segueixen la mateixa tendència que el CO₂. L'RQ té un comportament lògic al llarg del cultiu considerant els valors de CER i OUR.

4.2.3 Anàlisi de paràmetres off-line del cultiu

Un cop realitzat l'assaig de determinació de proteïna total i l'assaig d'activitat enzimàtica del primer cultiu, es fa la gràfica de les dades obtingudes en aquests dos assajos juntament amb les dades de la densitat òptica. (Figura 15)

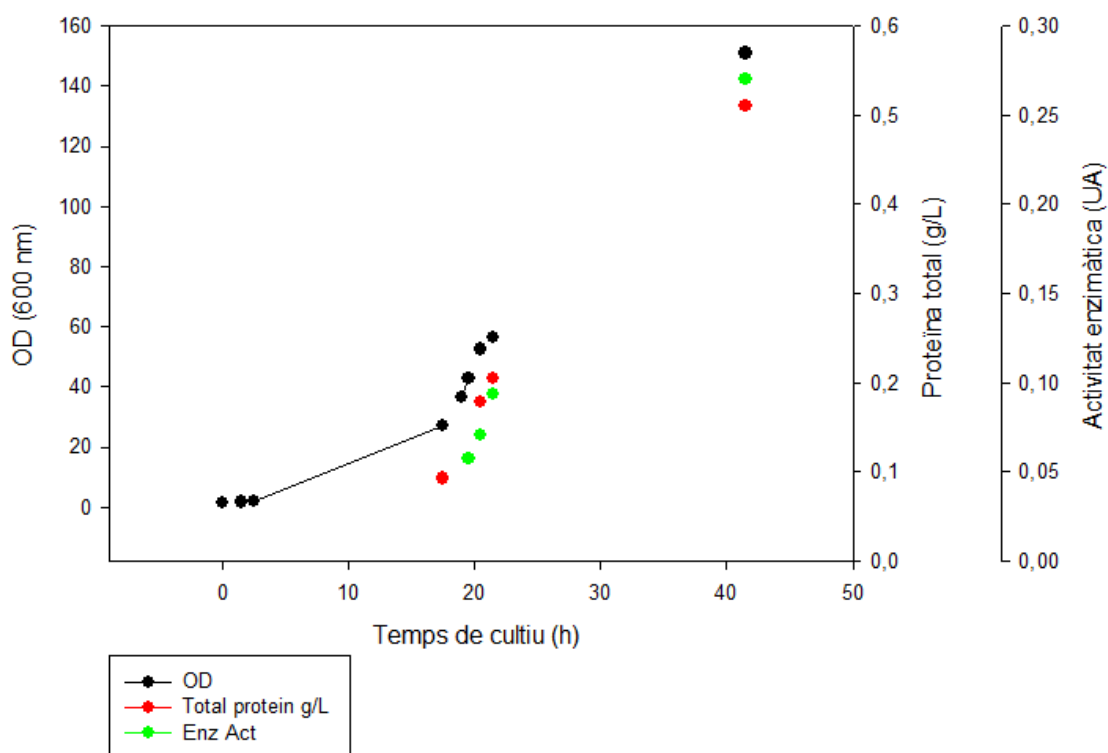


Figura 15: Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 1.

S'observa un perfil ascendent en la **OD₆₀₀** degut a l'increment de biomassa del cultiu. Entre la mostra 3 i la 4 no es van poder prendre mostres ja que va ser durant la nit. No obstant, la planificació correcta del cultiu va permetre poder caracteritzar la fase final de la cinètica del batch. A les 21,5 hores, moment en què acaba la fase de cultiu batch, la OD₆₀₀ és de 56,5. A les 41,5 hores el cultiu finalitza, és en aquest punt on la OD₆₀₀ és de 151 després que el cultiu hagi consumit tot el glicerol afegit durant el fed-batch. (visitar l'annex B apartat 10.3 per veure la taula de OD₆₀₀ pel cultiu 1)

S'observa que la **quantitat de proteïna total** augmenta al llarg del cultiu. En el punt final de la base de batch la concentració de proteïna total és de 0,21 g/L, mentre que al final del cultiu assoleix una concentració de 0,5 g/L. (visitar l'annex B apartat 10.3 per veure la taula de quantitat de proteïna total pel cultiu 1)

L'**activitat enzimàtica** augmenta directament proporcional a la quantitat de proteïna total. (visitar l'annex B apartat 10.3 per veure la taula d'activitat enzimàtica pel cultiu 1)

4.2.4 Gels d'electroforesi SDS – PAGE

Es realitzen els gels d'electroforesi per comprovar que la proteïna Yte1 és expressada i secretada al brou de cultiu correctament. La proteïna Yte1 té un pes molecular aproximadament de 37 kDa.

Gel 1

En el primer i últim carril es troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Després del primer carril hi ha 3 mostres de la fase Batch del cultiu corresponents a les 17.5 h, 20.5 h i 21.5 h de cultiu. En el cinquè carril del gel s'hi troba la mostra final dels polsos, que és presa a les 41.5 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però hi ha més volum de cadascuna. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 3 µl de cada mostra i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 6 µl de cada mostra.

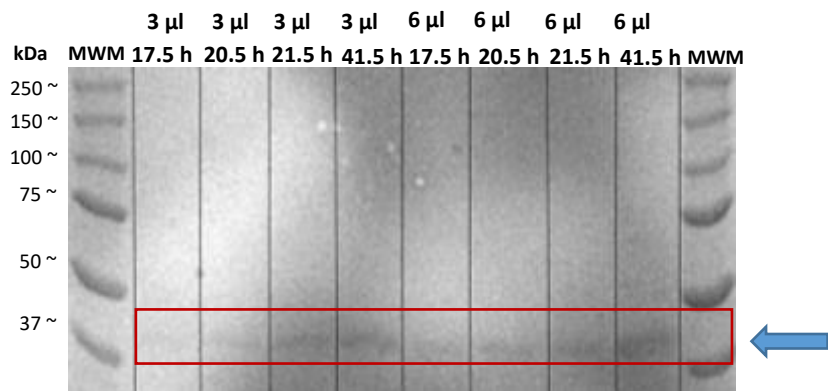


Figura 16: Gel d'electroforesi 1 del cultiu 1.

Gel 2

En el primer i últim carril s'hi troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Després del primer carril hi ha 3 mostres de la fase Batch del cultiu corresponents a les 17.5 h, 20.5 h i 21.5 h de cultiu. En el cinquè carril del gel s'hi troba la mostra final dels polsos, que és presa a les 41.5 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però menys concentrades. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 1 µg de proteïna de cada mostra i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 0.5 µg de proteïna de cada mostra. Càlculs realitzats a partir de l'anàlisi de Bradford.

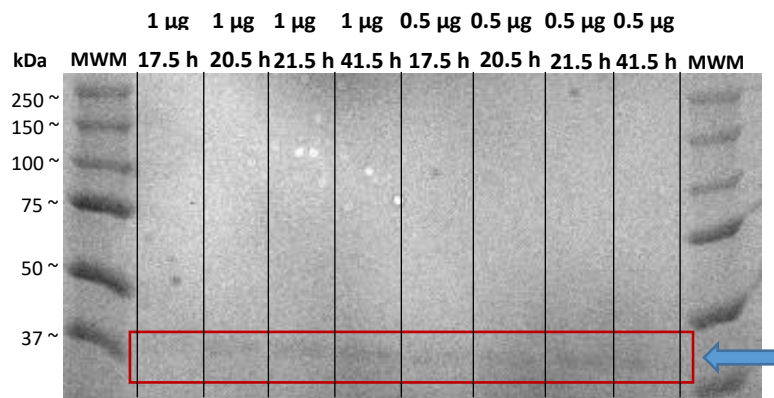


Figura 17: Gel d'electroforesi 2 del cultiu 1.

4.3 Cultiu fed-batch 2: Batch Glucosa + Fed-batch Glucosa

El segon cultiu es va realitzar amb glucosa com a font de carboni per tal de comparar les possibles diferències respecte a l'ús de glicerol. En aquest cultiu es va produir un error operacional durant la implementació del perfil d'addició exponencial de substrat fet que va portar a obtenir resultats no significatius al final del cultiu. No obstant, els resultats de les fases anteriors sí que es consideren d'interès.

4.3.1 Condicions del cultiu

S'analitzen els paràmetres generals del cultiu realitzat, els quals són el pH, la temperatura, l'agitació i el pO₂.

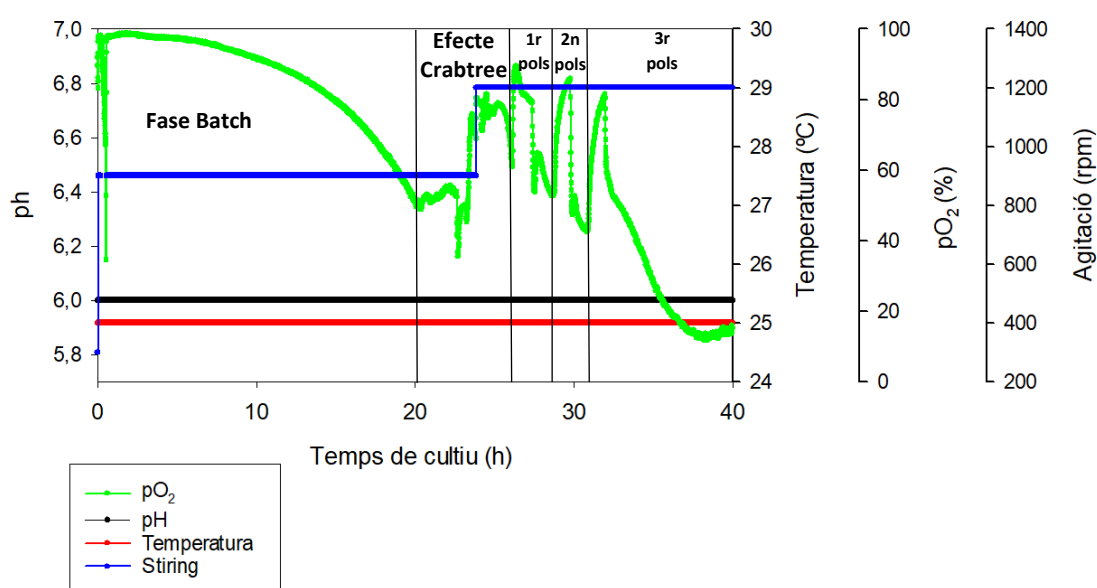


Figura 18: Condicions generals del cultiu 2.

El **pH** i la **Temperatura** són paràmetres que s'han mantingut constants. Com es pot observar a la figura 18 el cultiu es manté constant a pH 6 mentre que la temperatura es manté constant a 25 °C. L'**agitació** es manté a 900 rpm constant fins que a les 24 hores de cultiu s'augmenten les rpm a 1200 per tal de disminuir el nivell d'espuma del bioreactor i augmentar la transferència d'oxigen al medi de cultiu. Les 1200 rpm es mantenen constants fins al final del cultiu.

El **pO₂** disminueix exponencialment fins les 20 hores. De les 20 a les 24 hores de cultiu es comença a estabilitzar el valor de pO₂ comporten de forma anòmala (canvi metabòlic observat en creixement sobre glucosa). A les 24 hores de cultiu la fase batch finalitza i augmenta l'oxigen dissolt. A les 28 hores de cultiu s'afegeix el primer pols de glucosa, disminueix el pO₂ degut al consum d'aquesta. A les 28,8 hores de cultiu hi ha un pic d'augment de pO₂ que indica la fi del substrat del pols. A les 30 hores de cultiu hi ha un pic de disminució del pO₂ corresponent a l'addició del segon pols. A les 31 hores de cultiu hi ha un pic d'augment de pO₂ que indica la fi del substrat del segon pols. A les 33 hores de cultiu hi ha un últim pic de disminució del pO₂ que correspon a l'addició del feeding exponencial per $\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$.

4.3.2 Anàlisi dels paràmetres respiratoris

Durant el cultiu s'enregistren els paràmetres respiratoris més importants com són el CO₂ i l'O₂.

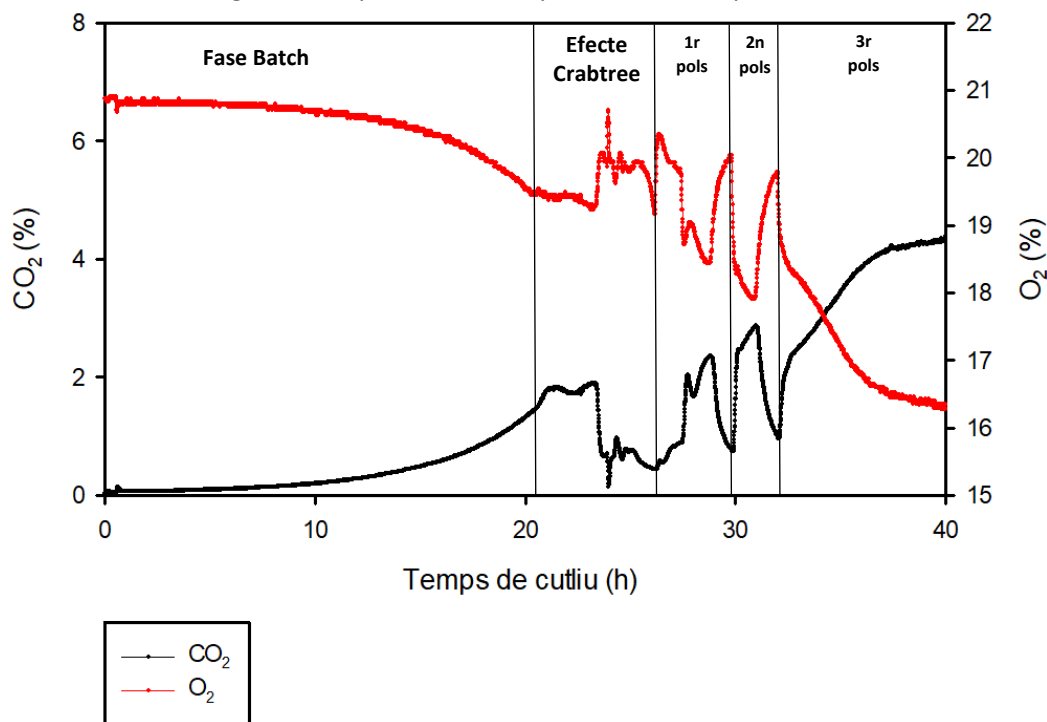


Figura 19: Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 2.

Durant la **fase batch** el CO₂ augmenta i l'O₂ baixa exponencialment. Quan aquesta fase s'acaba a les 24 hores de cultiu, hi ha un pic de disminució del CO₂ i augment d'O₂. Entre les 20 i les 27 hores l'O₂ i el CO₂ es comporten de forma inesperada degut a l'efecte Crabtree.

A les 28 hores de cultiu s'addiciona el **primer pols** de 10 g/L de glucosa. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 28.8 hores de cultiu, el CO₂ baixa i l'O₂ puja.

A les 30 hores de cultiu s'afegeix el **segon pols** de 10 g/L de glucosa. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 31 hores hi ha un pic de disminució en el CO₂ i augment en l'O₂.

Finalment, a les 33 hores de cultiu es realitza el feeding exponencial a $\mu=0.3 \text{ h}^{-1}$. S'estableix una tendència creixent per al CO₂ i decreixent per a l'O₂.

Amb les dades de CO_2 i O_2 obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER.

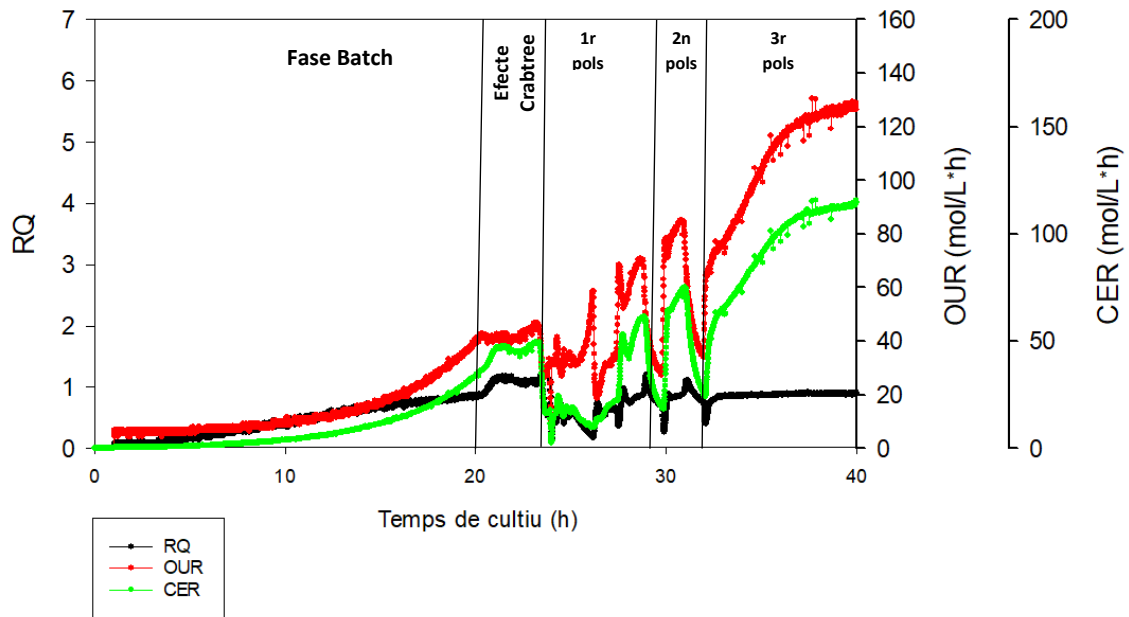


Figura 20: Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER) del cultiu 2.

L'OUR i el CER es comporten de forma anòmla a causa de l'aparició de l'efecte Crabtree del consum de metabòlits secundaris. L'RQ té un comportament lògic al llarg del cultiu considerant que està obtingut a partir dels valors de CER i OUR.

4.3.3 Anàlisi de paràmetres off-line del cultiu

Un cop realitzat l'assaig de determinació de proteïna total i l'assaig d'activitat enzimàtica pel segon cultiu, es fa la gràfica de les dades obtingudes en aquests dos assajos juntament amb les dades de la OD₆₀₀ referent a la concentració de biomassa (figura 21).

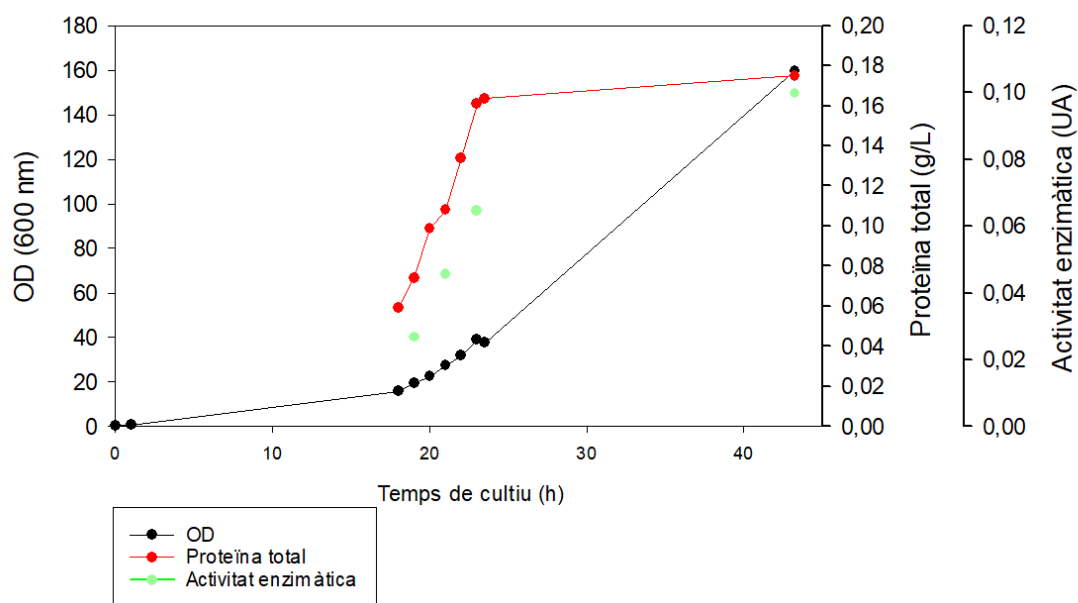


Figura 21: Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 2.

S'observa l'evolució esperada en la OD₆₀₀ per l'increment de biomassa del cultiu. A les 24 hores, moment en què acaba la fase de cultiu batch, la densitat òptica és de 39. A les 43,25 hores el cultiu finalitza, és en aquest punt on la densitat òptica arriba a 151. (visitar l'annex B apartat 10.4 per veure la taula d'OD₆₀₀ pel cultiu 2)

S'observa que la **quantitat de proteïna total** augmenta al llarg del cultiu. En el punt final de la fase de batch la concentració de proteïna total és de 0,16 g/L, mentre que al final del cultiu assoleix una concentració de 0,174 g/L. (visitar l'annex B apartat 10.4 per veure la taula de quantitat de proteïna total pel cultiu 2)

L'activitat enzimàtica augmenta directament proporcional a la quantitat de proteïna total. (visitar l'annex B apartat 10.4 per veure la taula d'activitat enzimàtica pel cultiu 2)

En aquest cultiu va haver una acumulació molt important d'escumes al cultiu que va fer que el brou arribés a sortir del reactor per la sortida del condensador durant la segona nit del cultiu (abans de les 40h). Aquesta acumulació d'escumes juntament amb la tendència de les lipases i esterases de trobar-se en les escumes, fan que els resultats de proteïna al final del cultiu no siguin representatius.

4.3.4 Gels d'electroforesi SDS – PAGE

Es realitzen els gels d'electroforesi per comprovar que la proteïna Yte1 és expressada correctament. La proteïna Yte1 té un pes molecular aproximadament de 37 kDa.

Gel 1

En el primer carril s'hi troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Seguidament hi ha 3 mostres de la fase Batch del cultiu corresponents a les 19 h, 21 h i 23 h de cultiu. En el cinquè carril del gel s'hi troba la mostra final dels polsos, que és presa a les 43.25 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però hi ha més volum de cadascuna. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 3 µL de cada mostra, i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 6 µL de cada mostra.

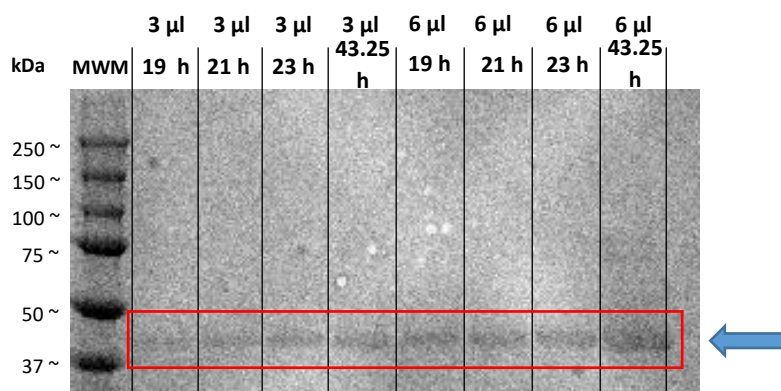


Figura 22: Gel d'electroforesi 1 del cultiu 2.

Gel 2

En el primer carril s'hi troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Després del primer carril hi ha 3 mostres de la fase Batch del cultiu corresponents a les 19 h, 21 h i 23 h. En el cinquè carril del gel s'hi troba la mostra final dels polsos, que és presa a les 43.25 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però menys concentrades. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 1 µg de proteïna de cada mostra, i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 0.5 µg de proteïna de cada mostra.

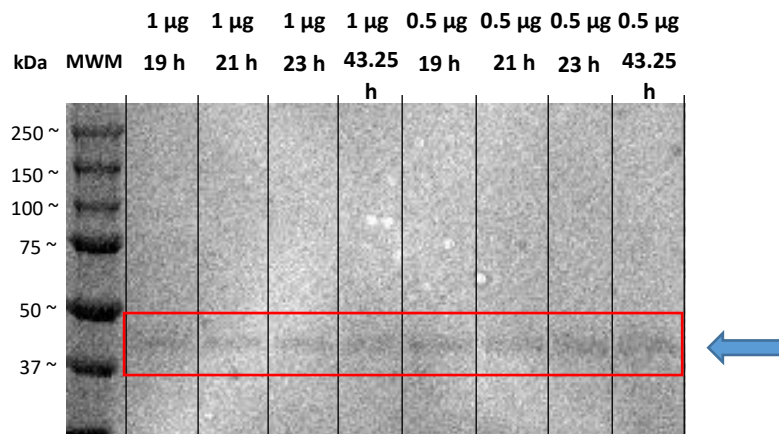


Figura 23: Gel d'electroforesi 2 del cultiu 2.

4.4 Cultiu fed-batch 3: Batch Glucosa + Fed-batch Glucosa

Tenint en compte el problema operacional observat al segon cultiu, el tercer cultiu es va realitzar també amb glucosa com a font de carboni per tal de comparar les possibles diferències respecte a l'ús de glicerol.

4.4.1 Condicions del cultiu

En primer lloc s'analitzen les condicions generals de cultiu com són el pH, la temperatura, l'agitació i el pO_2 .

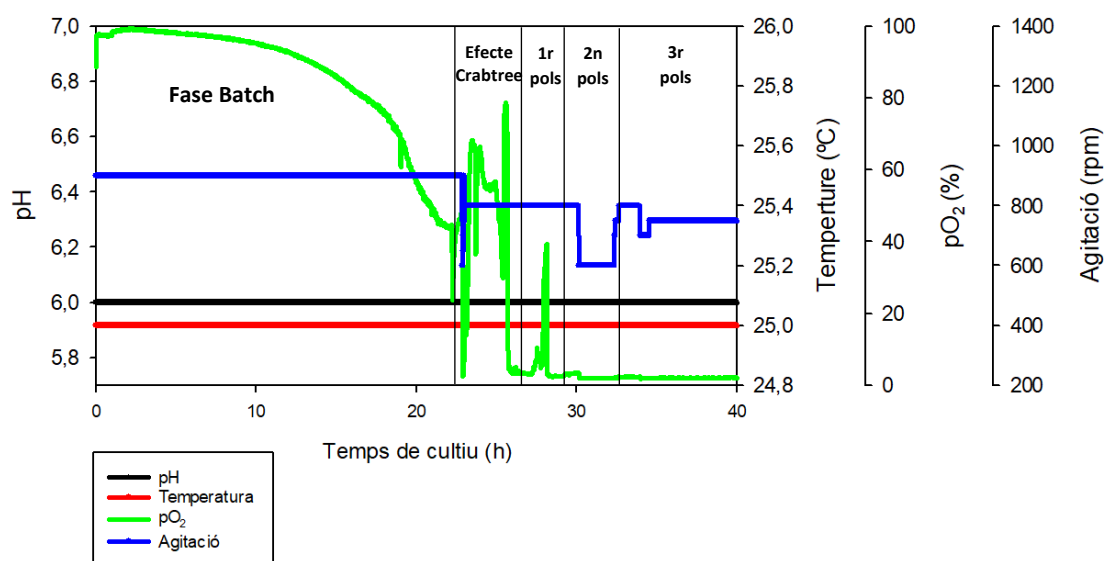


Figura 24: Condicions generals del cultiu 3.

El **pH** i la **Temperatura** són paràmetres mantinguts constants al llarg del cultiu. Com es pot observar a la figura 24 el cultiu es manté constant a pH 6 mentre que la temperatura es manté constant a 25 °C. **L'agitació** es manté constant a 900 rpm fins que a les 23 hores la velocitat és disminuïda a 800 rpm amb l'objectiu de baixar el nivell d'espuma del bioreactor. En aquest cas no es va decidir pujar com als casos anteriors perquè no hi havia la necessitat d'augmentar la transferència d'oxigen. A les 31 hores de cultiu es disminueix la velocitat fins a les 600 rpm amb l'objectiu de baixar el nivell d'espuma del bioreactor. A les 34,5 hores, després de variar la velocitat per comprovar el comportament de l'espuma, s'augmenta la velocitat d'agitació fins a les 750 rpm per a mantenir estable el nivell d'oxigen dissolt (pO_2).

Durant la fase de cultiu batch el **pO₂** tendeix a disminuir de forma exponencial. Aquesta tendència acaba a les 23 hores. Entre les 23 i les 25 hores el pO_2 es comporta de forma anòmla a causa del consum de metabòlits secundaris. A partir de les 25 hores el pO_2 augmenta indicant el final del consum d'aquests metabòlits secundaris i seguidament disminueix a causa de l'addició de substrat del primer pols. Entre les 25,5 i les 27,6 hores el pO_2 es manté baix a causa de l'activitat metabòlica. A partir de les 27,6 hores el pO_2 augmenta indicant el final del consum del primer pols, seguidament disminueix a causa de l'addició de substrat del tercer pols. A partir de les 32 hores el pO_2 s'estabilitza a causa de l'addició constant de medi.

4.4.2 Paràmetres respiratoris

Durant el cultiu s'enregistren els paràmetres respiratoris més importants com són el CO₂ i l'O₂.

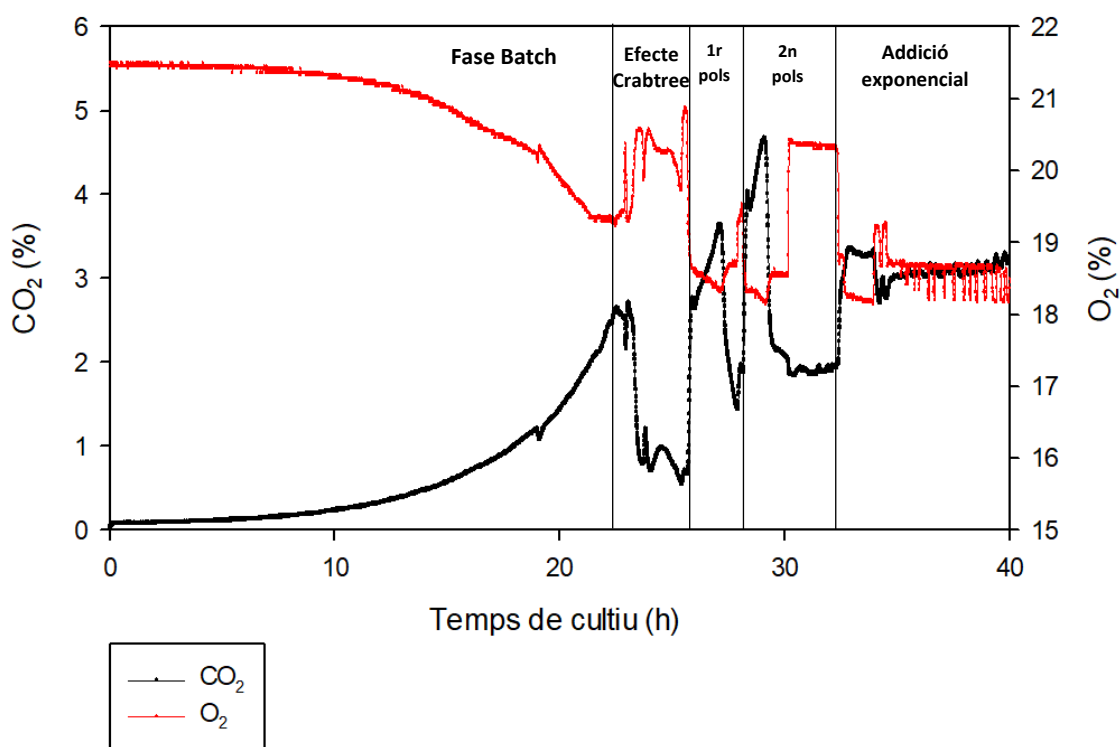


Figura 25: Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 3.

Durant la **fase batch** el CO₂ augmenta i l'O₂ baixa exponencialment. Quan aquesta fase s'acaba a les 25 hores de cultiu, hi ha un pic de disminució del CO₂ i augment d'O₂. Entre les 23 i les 25 hores l'O₂ i el CO₂ amb una dinàmica diferent a la de la resta del batch per l'efecte Crabtree.

A les 25.5 hores de cultiu s'addiciona el **primer pols** de 10 g/L de glucosa. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 27.6 hores de cultiu, el CO₂ baixa i l'O₂ puja.

A les 27.8 hores de cultiu s'afegeix el **segon pols** de 10 g/L de glucosa. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 29 hores hi ha un pic de disminució en el CO₂ i augment en l'O₂.

Finalment, a les 32 hores de cultiu, es realitza el feeding exponencial a $\mu=0.03 \text{ h}^{-1}$. S'estableix una tendència creixent per al CO₂ i decreixent per a l'O₂.

Amb les dades de CO₂ i O₂ obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER.

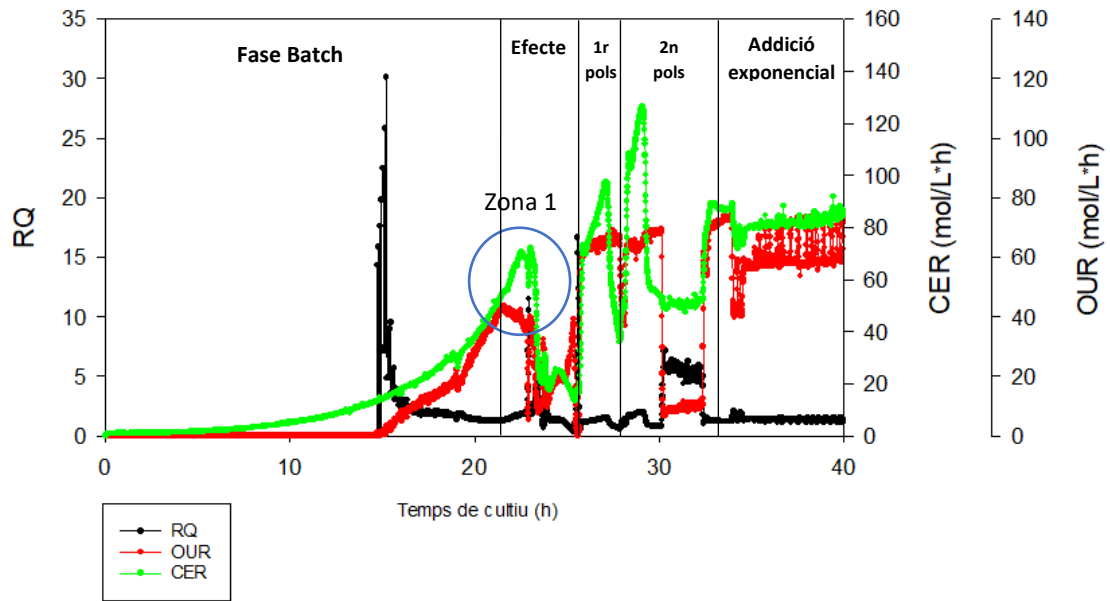


Figura 26: Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).

L'OUR i el CER segueixen la mateixa tendència que el CO₂ en condicions normals. Com es pot veure en la zona 1 designada en la figura 26 el CER segueix augmentant mentre que l'OUR es manté estable. La diferència indica que s'està generant més CO₂ mentre que el consum d'oxigen es manté constant. Aquest fenomen es coneix amb el nom de Crabtree effect. L'efecte també va poder ser observat però amb menys claredat al cultiu 2.

4.4.3 Anàlisi de paràmetres off-line del cultiu

Utilitzant les dades de l'assaig de determinació de proteïna total i l'assaig d'activitat enzimàtica s'obté l'evolució de la concentració de producte al llarg del temps de cultiu juntament amb la biomassa. (Figura 27)

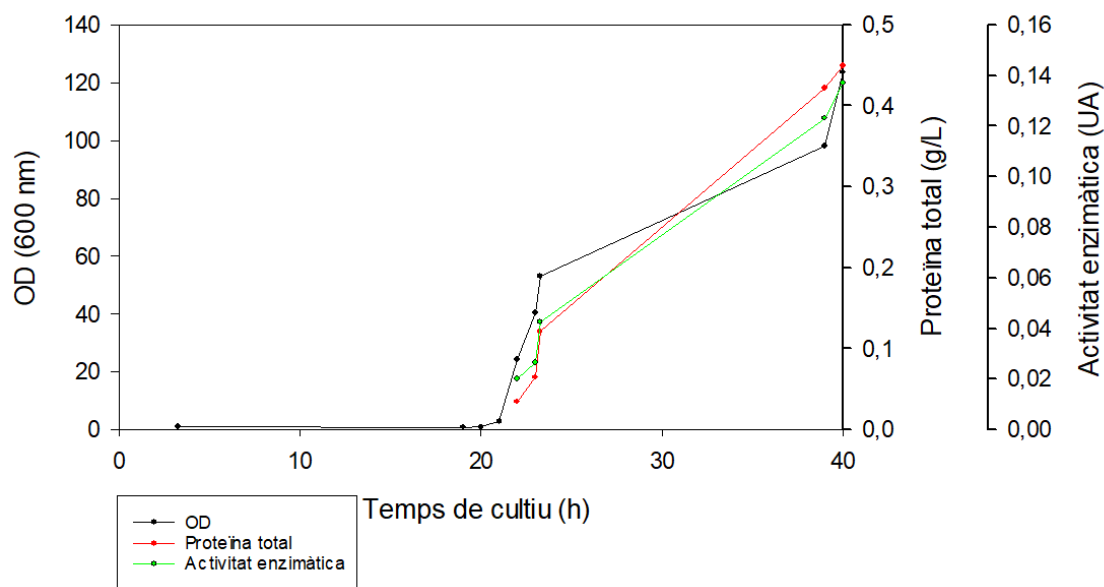


Figura 27: Representació gràfica de l'activitat enzimàtica, la OD i la proteïna total del cultiu 3.

S'observa una tendència positiva en l'evolució de la **OD₆₀₀** deguda a l'increment de biomassa del cultiu. A les 23 hores, moment en què acaba la fase de cultiu batch, la densitat òptica és de 53. A les 40 hores el cultiu finalitza, és en aquest punt on la densitat òptica arriba a 124. La densitat òptica final no és similar a la densitat òptica del cultiu anterior, que arriba fins a 151. (visitar l'annex B apartat 10.5 per veure la taula d'OD₆₀₀ pel cultiu 3)

S'observa que la **quantitat de proteïna total** augmenta al llarg del cultiu. En el punt final de la base de batch la concentració de proteïna total és de 0.042 g/L, mentre que al final del cultiu assoleix una concentració de 0.13 g/L. (visitar l'annex B apartat 10.5 per veure la taula de quantitat de proteïna total pel cultiu 3)

L'activitat enzimàtica augmenta directament proporcional a la quantitat de proteïna total. (visitar l'annex B apartat 10.5 per veure la taula d'activitat enzimàtica pel cultiu 3)

4.4.4 Gels d'electroforesi SDS – PAGE

Es realitzen els gels d'electroforesi per comprovar que la proteïna Yte1 és expressada correctament. La proteïna Yte1 té un pes molecular aproximadament de 37 kDa.

Gel 1

En el primer carril s'hi troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Després del primer carril hi ha 2 mostres de la fase batch del cultiu corresponents a les 21 i 23 hores de cultiu. En el quart i cinquè carril del gel s'hi troben les mostres del final dels polsos, que són preses a les 43 i 45 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però hi ha més volum de cadascuna. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 3 µL de cada mostra, i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 6 µL de cada mostra.

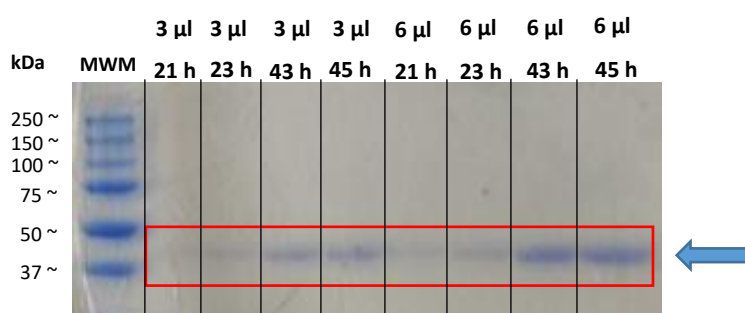


Figura 28: Gel d'electroforesi 1 del cultiu 3.

Gel 2

En el primer carril s'hi troba el marcador de pes comercial BioRad Precision Plus Protein™. Després del primer carril hi ha 2 mostres de la fase batch del cultiu corresponents a les 21 i 23 hores de cultiu. En el quart i cinquè carril del gel s'hi troben les mostres del final dels polsos, que són preses a les 43 i 45 hores de cultiu. En els 4 carrils posteriors s'hi troben les mateixes mostres però més concentrades. Del carril 2 al 5 s'hi ha afegit 0.5 µg de proteïna de cada mostra, i del carril 6 al 9 s'hi ha afegit 0.75 µg de proteïna de cada mostra.

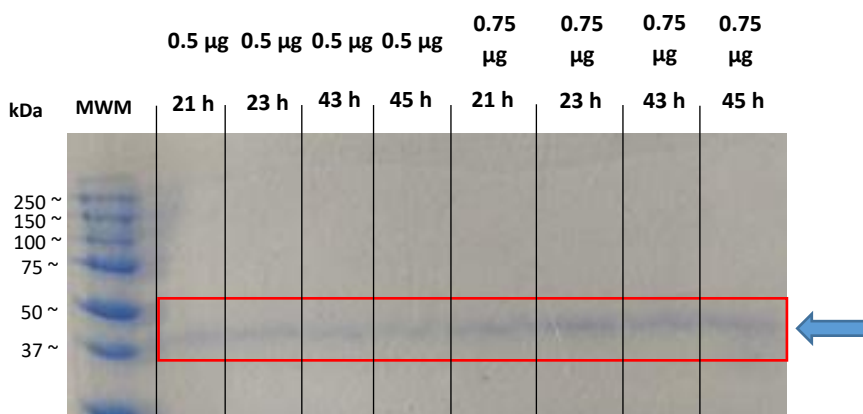


Figura 29: Gel d'electroforesi 2 del cultiu 3.

4.5 Cultiu fed-batch 4: Batch Glicerol + Fed-batch Metanol

En aquest cas es va realitzar un cultiu amb la soca #13 on l'expressió recombinant és regulada pel promotor del gen *AOX1* per provar les diferències fisiològiques de creixement sobre metanol i la producció de la soca sota en aquest substrat.

En aquest cas es va cometre l'error experimental de no afegir la biotina + sals traça al principi del cultiu i això va provocar que el cultiu durés 10 hores més del que es va calcular que duraria.

4.5.1 Condicions del cultiu

En primer lloc s'analitzen les condicions de cultiu com són el pH, la temperatura, l'agitació i el pO_2 .

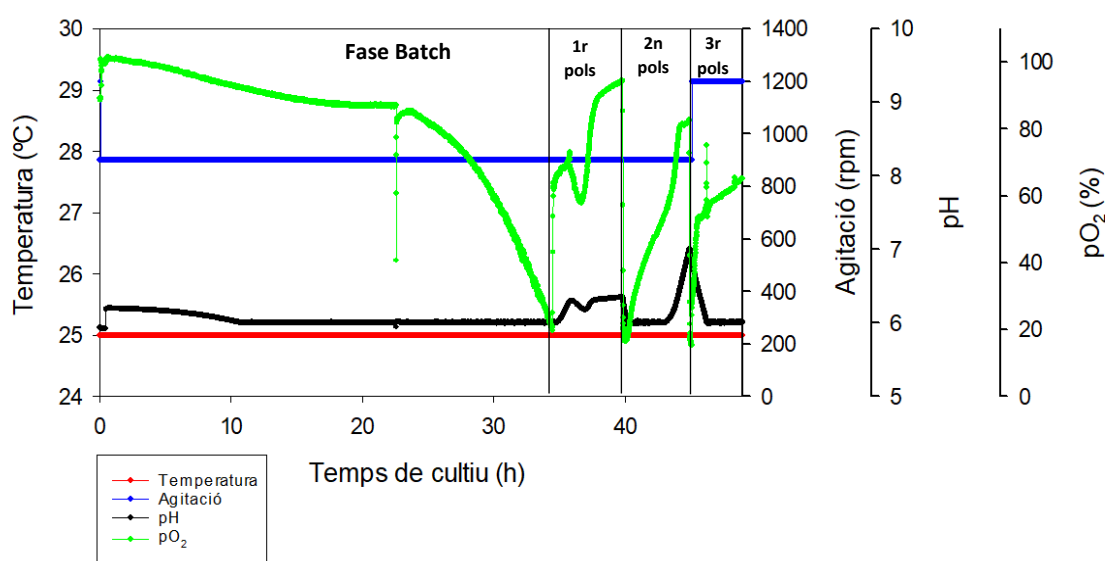


Figura 30: condicions generals del cultiu 4.

El **pH** i la **Temperatura** són paràmetres mantinguts constants. Com s'observa a la figura 30 el cultiu es manté pràcticament constant a pH 6 mentre que la temperatura es manté constant a 25 °C. Com a conseqüència que *P. pastoris* produeix certs àcids associats al creixement, cal afegir base al cultiu per mantenir aquest pH constant. Aquest paràmetre també ens serveix com a indicador indirecte del creixement del cultiu. En cultius anteriors no s'ha pogut presentar l'evolució d'aquest paràmetre per limitacions amb el software. En alguns moments no hi ha creixement significatiu de la biomassa i el consum d'aquests àcids pot ser que el pH presenti petits augments. **L'agitació** es manté constant a 900 rpm fins que a les 45 h s'augmenta a 1200 rpm amb l'objectiu de baixar el nivell d'espuma i augmentar l'oxigen dissolt.

El **pO_2** disminueix de forma poc significativa durant les primeres 22.8 hores de cultiu a causa de la falta de biotina i sals traça, és llavors quan s'afegeixen els dos components restants del medi. Durant la fase de cultiu batch el pO_2 disminueix de forma exponencial. Aquesta tendència acaba a les 34 hores on augmenta de forma significativa indicant el final del consum de substrat i per tant de la fase batch. A les 36 hores s'observa una disminució del pO_2 causada per l'addició del primer pols de metanol d'1 g/L. Aquest pols acaba a les 37 hores.

A les 40 hores s'observa una disminució del pO_2 causada per l'addició del segon pols de metanol de 5 g/L. Aquest pols acaba a les 40.5 hores. A les 45 hores s'observa una disminució del pO_2 causada per l'addició del tercer pols de metanol de 10 g/L. Aquest pols acaba a les 45.5 hores.

4.5.2 Paràmetres respiratoris

Durant el cultiu es monitoritzen els paràmetres respiratoris.

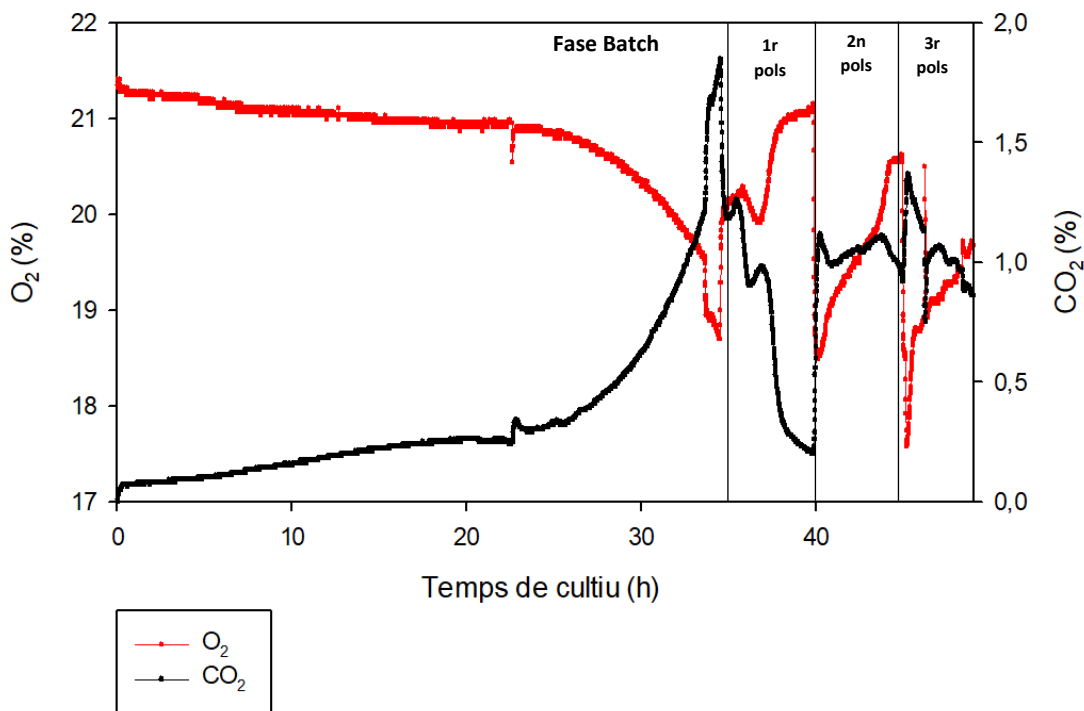


Figura 31: Paràmetres respiratoris principals (CO_2 i O_2) del cultiu 4.

Durant la **fase batch** el CO_2 augmenta i l' O_2 baixa de forma poc significativa durant les primeres 22.8 hores de cultiu degut a la falta de sals traça i biotina. A partir de llavors el CO_2 augmenta i l' O_2 baixa de forma exponencial fins les 34 hores de cultiu degut a que el cultiu ja pot créixer correctament. És en aquest moment que hi ha un pic de disminució del CO_2 i augment d' O_2 . A les 33.2 hores de cultiu hi ha una baixada d'oxigen i un augment de CO_2 sobtat. Aquest fet és degut a que es va canviar el valor d'aeració de 2 L/min a 1.5 L/min.

A les 36 hores de cultiu s'addiciona el **primer pols** de metanol 1 g/L. En aquest moment el CO_2 augmenta mentre que l' O_2 disminueix. A les 37 hores de cultiu, el CO_2 baixa i l' O_2 puja.

A les 40 hores de cultiu s'afegeix el **segon pols** de metanol 5 g/L. En aquest moment el CO_2 augmenta mentre que l' O_2 disminueix. A les 40.5 hores hi ha un pic de disminució en el CO_2 i augment en l' O_2 .

Finalment, a les 45 hores de cultiu, es realitza el **tercer pols** de metanol 10 g/L. moment el CO_2 augmenta mentre que l' O_2 disminueix. A les 45.5 hores de cultiu, el CO_2 baixa i l' O_2 puja.

Amb les dades de CO_2 i O_2 obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER.

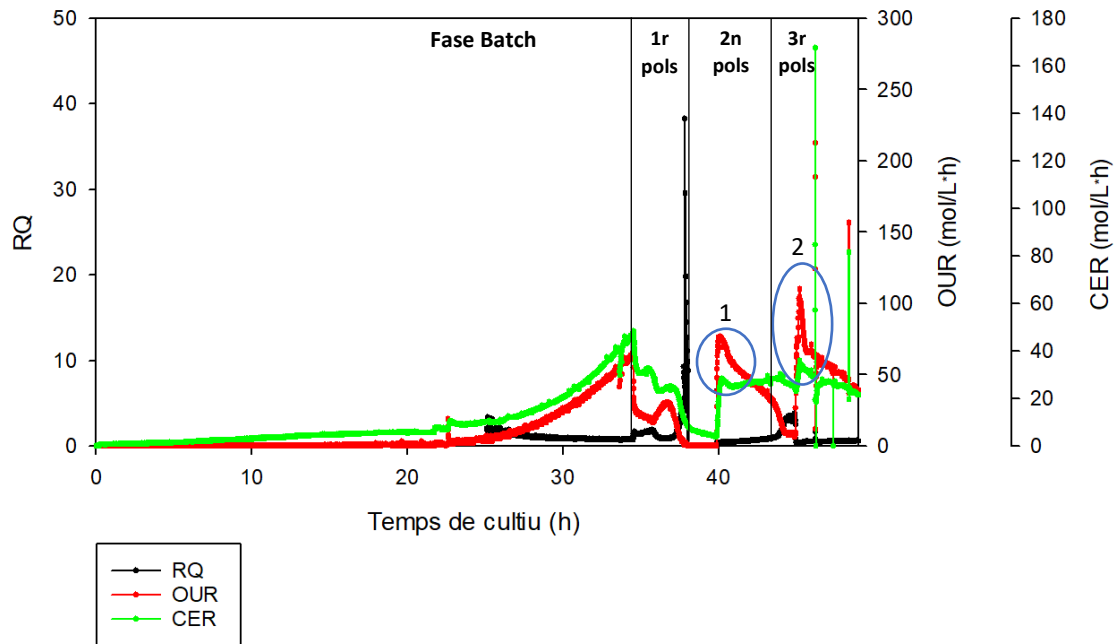


Figura 32: Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).

L'OUR i el CER segueixen la mateixa tendència que el CO_2 . Com es pot veure en les zones 1 i 2 designades en la figura 32, l'OUR presenta un augment sobtat que després va disminuint mentre que l'CER es manté estable. Aquesta diferència indica que s'està consumint O_2 en major mesura respecte al CO_2 que es genera. Aquest fenomen encaixa amb la informació bibliogràfica disponible sobre l'augment del consum d' O_2 provocat per l'ús de metanol com a substrat. [35]

4.5.3 Anàlisi de paràmetres off-line del cultiu

En la realització de l'assaig de determinació de proteïna total no es detecta proteïna de forma significativa en el sobrenedant del cultiu. Els valors obtinguts suggereixen que no es produeix proteïna recombinant durant el cultiu, tal i com es mostra a la figura 33 (visitar l'annex B apartat 10.6 per veure la taula de quantitat de proteïna total pel cultiu 4). Es realitza l'assaig enzimàtic per la última mostra del cultiu amb l'objectiu de confirmar els resultats de l'assaig de proteïna total. (visitar l'annex B apartat 10.8 per veure la figura corresponen a l'assaig enzimàtic de la última mostra del cultiu 4)

S'observa una tendència positiva en l'evolució de la OD_{600} deguda a l'increment de biomassa del cultiu. A les 45.5 hores, quan el cultiu finalitza, la densitat òptica és de 83.2. (visitar l'annex B apartat 10.6 per veure la taula d' OD_{600} pel cultiu 4).

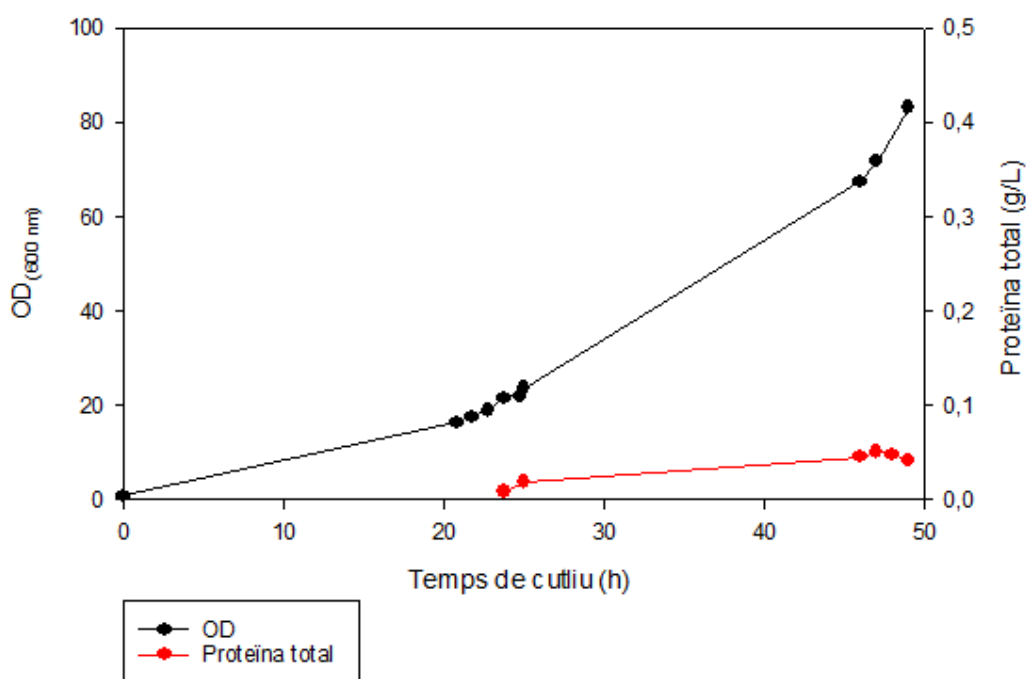


Figura 33: Paràmetres off-line del cultiu 4.

4.6 Cultiu fed-batch 5: Batch Glicerol + Fed-batch Metanol

Aquest cultiu realitzat amb la soca on l'expressió recombinant regulada pel promotor del gen *AOX1* es va repetir per tal de veure si l'efecte de la no addició de biotina i sals traça havia provocat un impacte en el cultiu que hagués impedit que aquest després es pogués desenvolupar correctament.

4.6.1 Condicions del cultiu

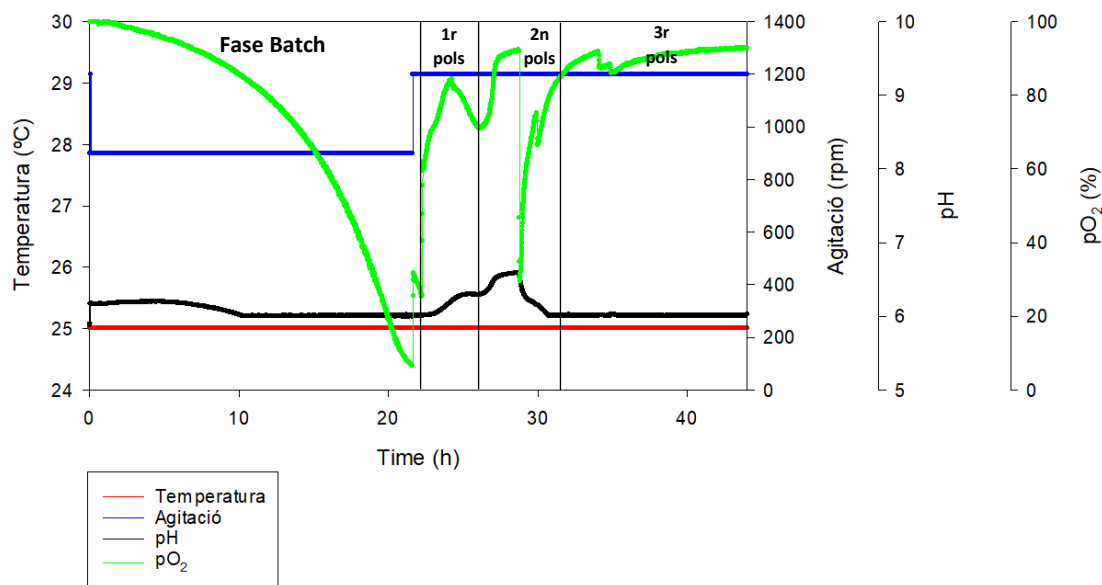


Figura 34: Condicions generals del cultiu 5.

El **pH** i la **Temperatura** són paràmetres mantinguts de forma constants. Com es pot observar a la figura 34 el cultiu es manté pràcticament constant a pH 6 mentre que la temperatura es manté constant a 25 °C. L'augment de pH correspon al consum d'àcids que produeix *P. Pastoris* quan creix. L'**agitació** es manté constant a 900 rpm fins que a les 21 hores de cultiu s'augmenta a 1200 rpm amb l'objectiu d'augmentar la transferència d'oxigen al medi de cultiu.

Durant la fase de cultiu batch el **pO₂** disminueix de forma exponencial. Aquesta tendència acaba a les 22.2 h on augmenta de forma significativa indicant el final del consum de substrat i per tant de la fase batch. A les 24.2 h s'observa una disminució del pO₂ causada per l'addició del primer pols de metanol d'1 g/L. Aquest pols acaba a les 26.7 h.

A les 28.7 h s'observa una disminució del pO₂ causada per l'addició del segon pols de metanol de 5 g/L. Immediatament després el pO₂ augmenta de forma significativa. Aquest fenomen sembla indicar que no hi ha activitat metabòlica. A les 34 h s'afegeix un tercer pols de 5 g/L per observar la resposta del cultiu.

A les 44 h s'afegeix un pols de glicerol per observar la resposta del cultiu, com es pot observar el cultiu no va respondre a l'addició del substrat.

4.6.2 Paràmetres respiratoris

Durant el cultiu es monitoritzen els paràmetres respiratoris.

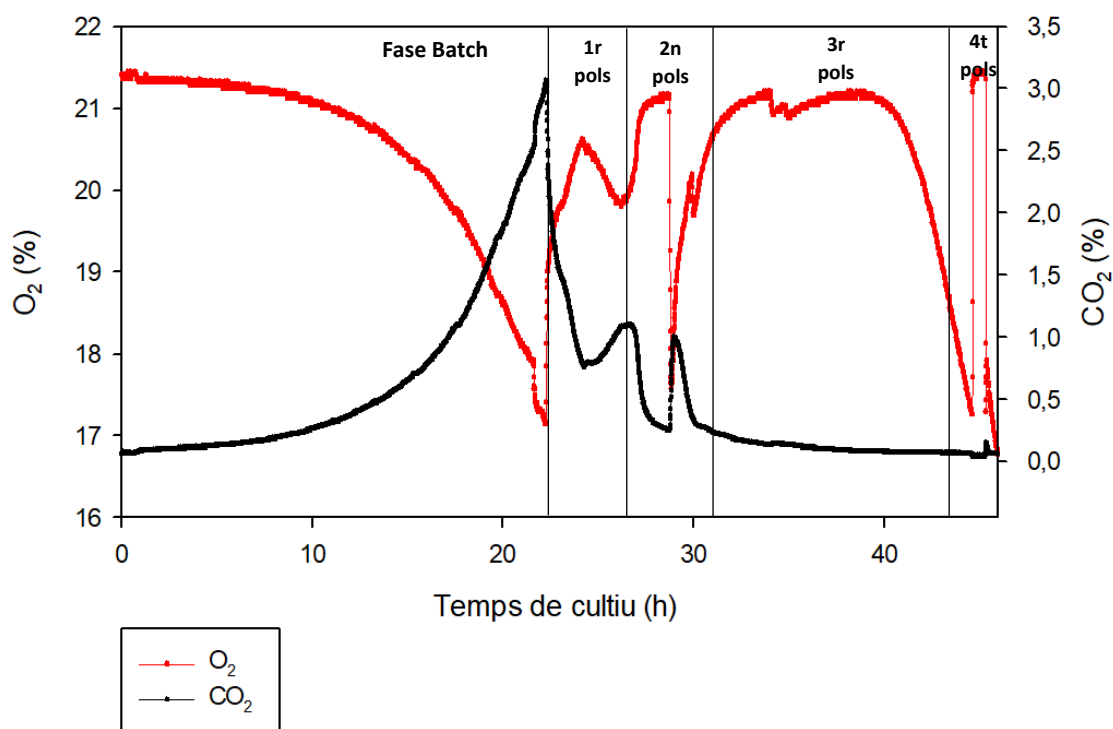


Figura 35: Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu 4.

Durant la **fase batch** el CO₂ augmenta i l'O₂ baixa de forma exponencial fins les 22,2 hores de cultiu, corresponents al final de la fase batch. És en aquest moment que hi ha un pic de disminució del CO₂ i augment d'O₂.

A les 24,2 hores de cultiu s'addiciona el **primer pols** de metanol 1 g/L. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 26,7 hores de cultiu, el CO₂ baixa i l'O₂ puja.

A les 28,7 hores de cultiu s'afegeix el **segon pols** de metanol 5 g/L. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. A les 29,2 hores hi ha un pic de disminució en el CO₂ i augment en l'O₂.

A les 34 hores de cultiu, es realitza el **tercer pols** de metanol 10 g/L. No s'aprecia cap resposta en el CO₂ relacionada amb el creixement cel·lular i consum de metanol. No obstant, sí que s'observa una disminució i esperada i progressiva del pO₂.

Per últim, a les 44 hores de cultiu es realitza un **quart pols** de glicerol 10 g/L per comprovar l'estat del cultiu. S'observa un augment d'O₂ que no s'ha aconseguit justificar amb un comportament esperable.

Amb les dades de CO_2 i O_2 obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER.

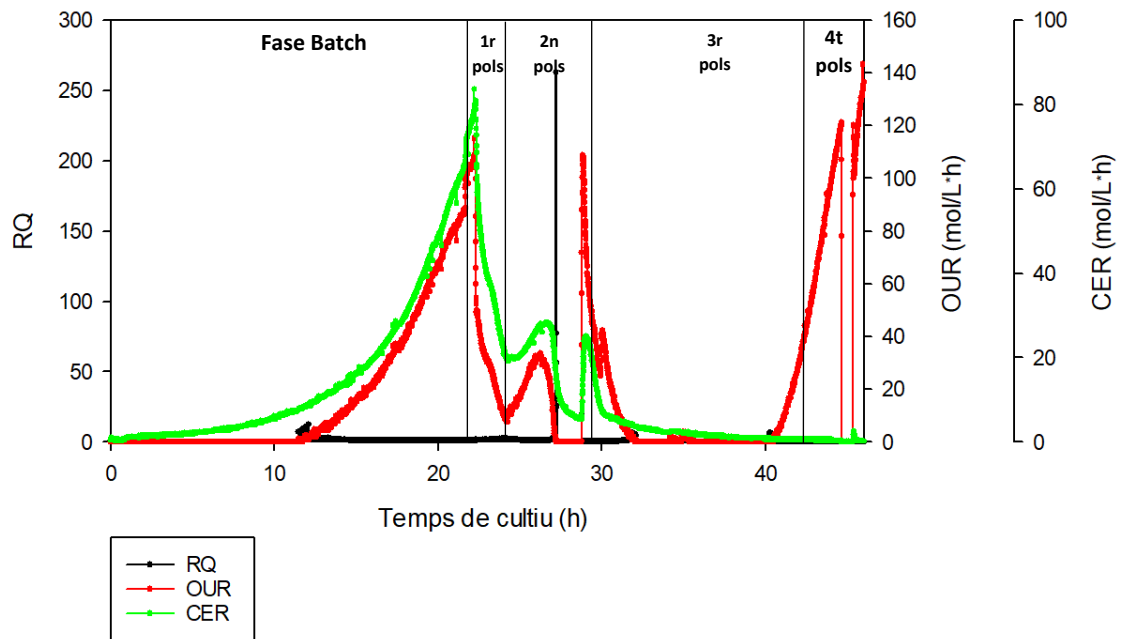


Figura 36: Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).

L'OUR i el CER segueixen la mateixa tendència que el CO_2 . En aquesta figura 36, al igual que l'anterior, es veu que l'evolució dels paràmetres respiratoris durant el fed-batch amb metanol no ha sigut l'esperat. Aquest fet fa pensar que el cultiu va col·lapsar per alguna raó indeterminada, fet que es confirma amb el no augment de la CER al afegir glicerol al final del cultiu.

4.6.3 Anàlisi de paràmetres off-line del cultiu

En la realització de l'assaig de determinació de proteïna total no s'ha detectat proteïna de forma significativa en el sobrenedant del cultiu. Els valors obtinguts suggereixen que no es produeix proteïna recombinant durant el cultiu, tal i com es mostra a la figura 37 (visitar l'annex B apartat 10.7 per veure la taula de quantitat de proteïna total pel cultiu 5). Davant d'aquesta evidència no es procedeix a fer gels SDS-PAGE per les mostres d'aquest cultiu. Es realitza l'assaig enzimàtic per l'última mostra del cultiu amb l'objectiu de confirmar els resultats de l'assaig de proteïna total. (visitar l'annex B apartat 10.9 per veure la figura corresponent a l'assaig enzimàtic de la última mostra del cultiu 5)

S'observa una tendència positiva en l'evolució de la OD_{600} deguda a l'increment de biomassa del cultiu. A les 45.5 hores, quan el cultiu finalitza, la densitat òptica és de 62. Aquesta quantitat de biomassa és menor en aquest cultiu respecte el cultiu anterior (realitzat amb les mateixes condicions i soca) ja que les cèl·lules han mort i a partir de llavors no hi ha més biomassa. (visitar l'annex B apartat 10.7 per veure la taula d' OD_{600} pel cultiu 4).

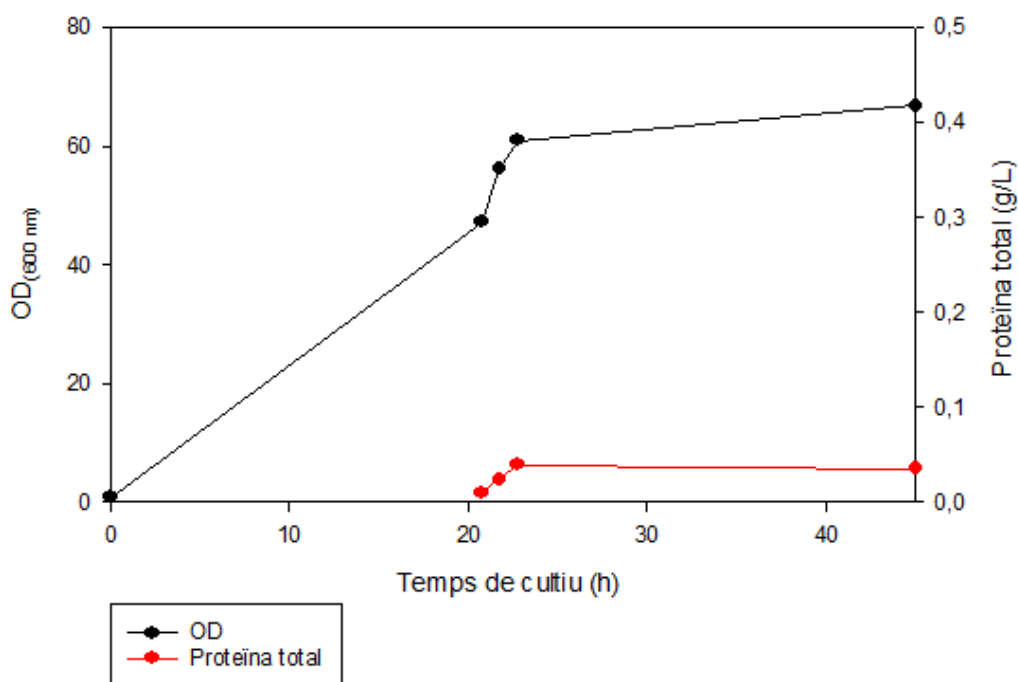


Figura 37: Paràmetres off-line del cultiu 5.

4.7 Comparativa de les taxes específiques de creixement obtingudes durant la fase batch

A partir de la regressió lineal aplicada a les dades obtingudes durant els cultius s'han pogut determinar les taxes específiques de creixement (μ) per cada cultiu durant la fase batch. Com s'ha indicat a la introducció, aquests valors poden ser considerats com taxes específiques de creixement màximes (μ_{max}) ja que s'han determinat a valors de substrat entre 10-100 ordres de magnitud de la K_s . Les dades linealitzades Off-line són les de concentració de biomassa a través de la OD_{600} i les dades On-line les dels percentatges de CO_2 mesurats en el corrent de gasos de sortida del sistema.

Regressió lineal de la biomassa

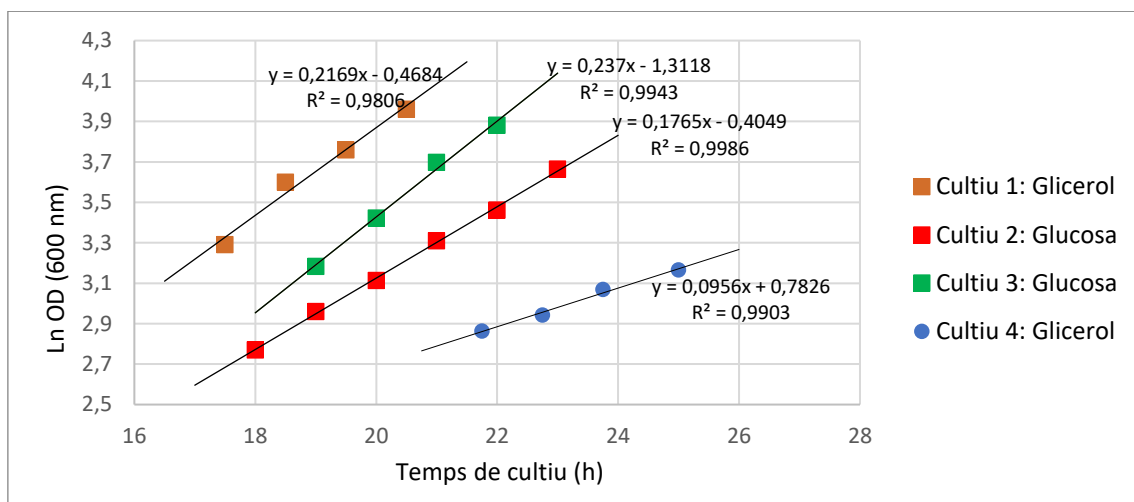


Figura 38: Comparació de les velocitats específiques de creixement per la fase batch del mètode Off-line.

Degut a un error experimental a l'hora de calcular la durada del batch, no es disposa de dades Off-line suficients del cultiu 5 per calcular la μ durant la fase exponencial.

Regressió lineal del percentatge del CO_2

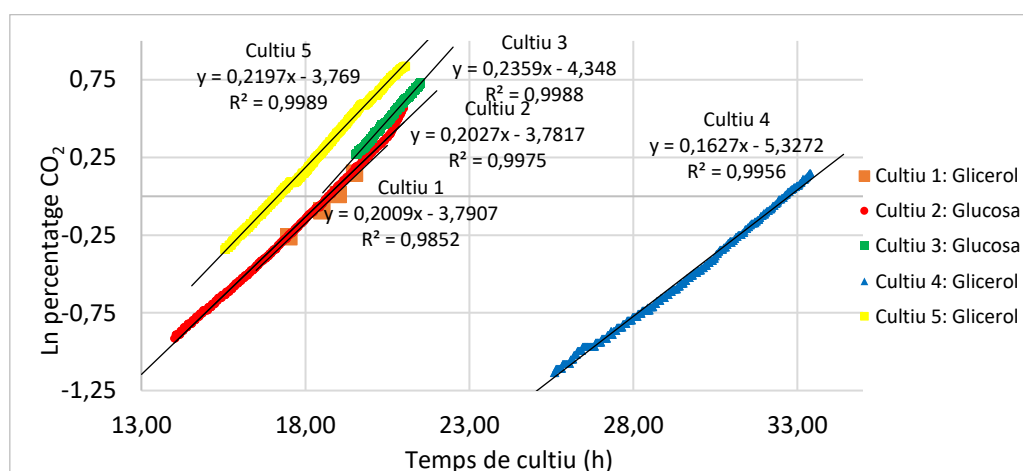


Figura 39: Comparació de les velocitats específiques de creixement per la fase batch del mètode On-line.

4.7.1 Determinació de la μ durant la fase batch amb Glicerol

Els cultius realitzats amb glicerol són el cultiu 1, 4 i 5.

Taula 4: μ_{max} de les fases batch amb Glicerol.

CULTIU	FASE BATCH	
	Off-line μ (h^{-1})	On-line μ (h^{-1})
1	0,22	0,20
4	0,09	0,16
5	-	0,22

- **Cultiu 4:** Es considera que les dades del cultiu 4 no són representatives ja que la falta de biotina i sals traça a l'inici del cultiu afecta la velocitat específica de creixement de *P. pastoris* durant la fase batch.
- **Cultiu 5:** No es disposa de dades Off-line suficients del cultiu 5 per calcular la μ durant la fase de cultiu batch de forma representativa, ja que es el batch va acabar abans del previst i no es van poder prendre mostres off-line.

4.7.2 Determinació de la μ durant la fase batch amb Glucosa

Els cultius realitzats amb glucosa són el cultiu 2 i 3.

Taula 5: μ_{max} de les fases batch amb Glucosa.

CULTIU	FASE BATCH	
	Off-line μ (h^{-1})	On-line μ (h^{-1})
2	0,18	0,19
3	0,237	0,19 / 0,236

- **Cultiu 3:** S'observen dos valors pel mètode On-line ja que es detecta que el canvi metabòlic que proporciona dues taxes específiques de creixement. A l'annex B subíndex 10.10 s'hi troba la gràfica corresponent abans del canvi metabòlic per obtenir el valor de $0.19 h^{-1}$.

4.7.3 Determinació de la μ durant els polsos afegits en fase Fed-batch

Es van aprofitar els polsos afegits durant la fase fed-batch dels cultius per calcular també les μ durant aquestes fases de creixement a partir de l'evolució dels paràmetres respiratoris, concretament a partir de l'evolució de CO_2 .

Taula 6: μ dels polsos durant la fase Fed-batch.

CULTIU	POLS 1	POLS 2	ADDICIÓ
			CONSTANT/EXPONENCIAL
	On-line CO_2	On-line CO_2	On-line CO_2
	μ (h^{-1})	μ (h^{-1})	μ (h^{-1})
1: GLICEROL	0,29	0,28	0,08
2: GLUCOSA	0,24	0,25	0,16
3: GLUCOSA	0,26	0,38	0,01
4: METANOL	0,14	0,13	0,04
5: METANOL	0,26	-	-

4.8 Comparativa de l'activitat enzimàtica

Els cultius que van produir proteïna són l'1, el 2 i el 3; tots ells realitzats amb la clon #16 de *P. pastoris* basat en el sistema d'expressió constitutiu amb el promotor *GAP*, ja que amb els cultius basats en metanol no es va aconseguir detectar activitat enzimàtica. Els pendents es troben a l'annex B subíndex 10.3, 10.4 i 10.5 a les taules de les pendents de l'activitat enzimàtica pels cultius 1, 2 i 3.

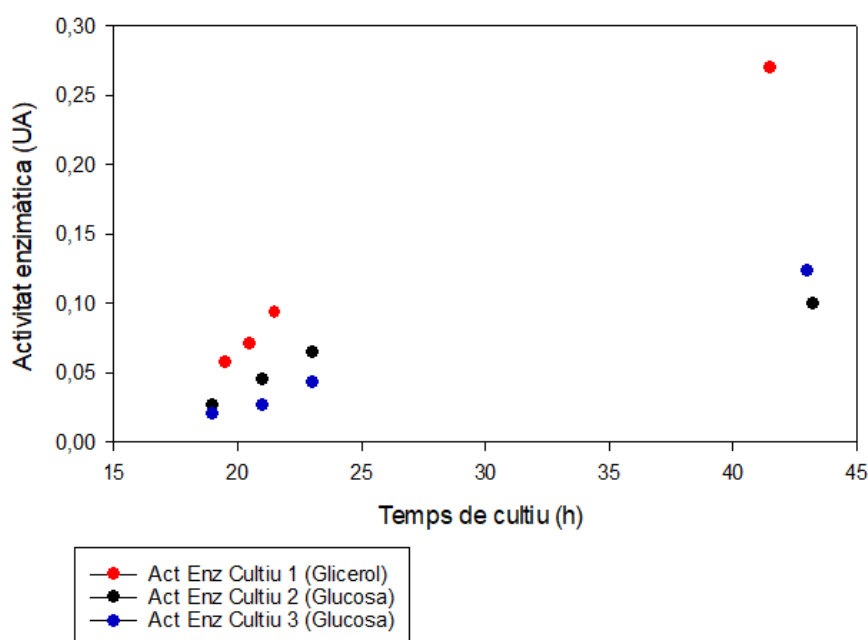


Figura 40: Comparació de l'activitat enzimàtica dels cultius 1, 2 i 3.

Com era d'esperar, l'activitat enzimàtica obtinguda va anar augmentant amb el temps al acumular-se dins del sistema. Comparant els diferents experiments realitzats, s'observa que amb el cultiu amb 1 la producció va ser significativament superior a l'activitat obtinguda amb els cultius 2 i 3. La discussió d'aquests resultats s'inclou a la discussió del treball.

4.9 Test del sistema de control en llaç tancat pel control de l'addició del substrat per cultius en continu.

Després d'haver realitzat una calibració de la bomba peristàltica es va testear la precisió del control d'addició de substrat través d'un llaç de control tancat basat en l'ús d'una balança de precisió. Les proves realitzades amb la bomba peristàltica ens han proporcionat dades sobre l'exactitud del cabal d'addició en condicions similars a les que es volen implementar per a cultius en continu (cabal constant) i en fed-batch (perfil exponencial del cabal)

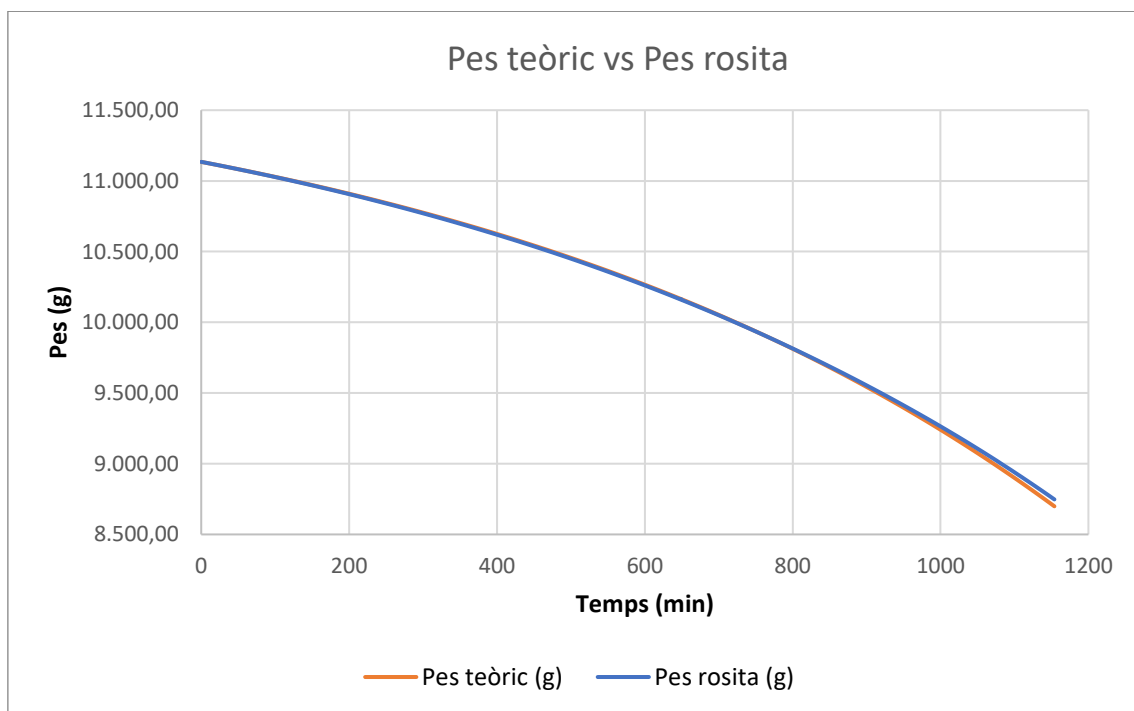


Figura 41: Assaig del cabal.

S'augmenta el cabal des de 1 g/min fins a 3.83 g/min, seguint un feeding exponencial de $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$.

El resultat mostra com a més cabal, més diferència hi ha entre el pes teòric i el pes obtingut pel software Rosita.

4.10 Implementació de cultiu en continu de tipus quimiòstat

4.10.1 Condicions del cultiu

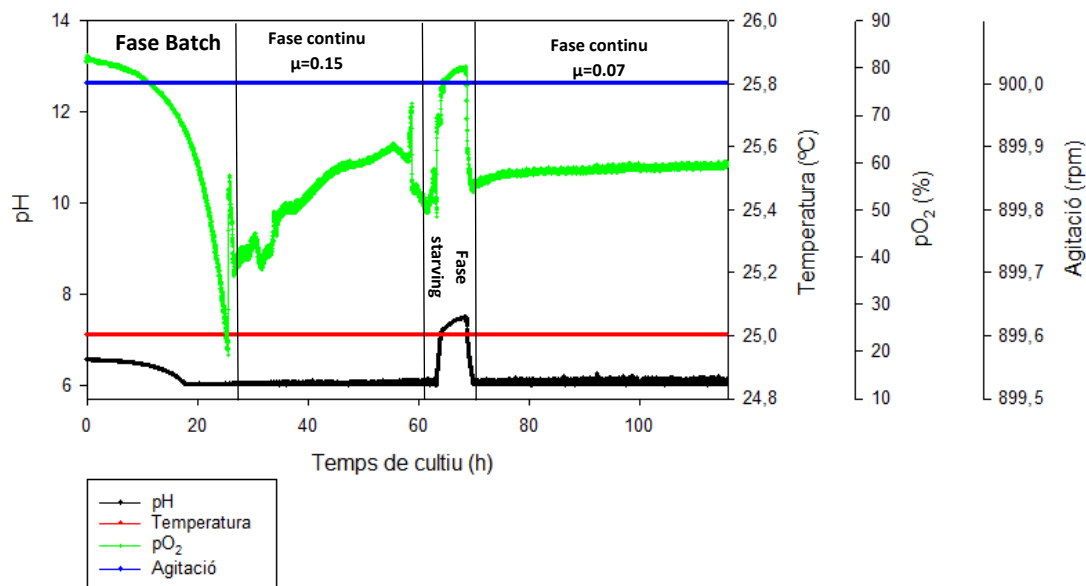


Figura 42: Paràmetres d'anàlisi pel cultiu en continu.

El **pH**, la **Temperatura** i l'**agitació** són paràmetres virtualment constants. Com es pot observar a la figura 42 el cultiu es manté pràcticament constant a pH 6, la temperatura es manté constant a 25 °C i l'agitació a 900 rpm. Es pot observar com durant l'interval de de 63-69 h el pH augmenta. L'acumulació d'àcids durant el creixement són consumits en la fase d' starving fent que el pH augmenti com a resultat de la base afegida per compensar aquests àcids prèviament.

Durant la fase de cultiu batch el **pO₂** disminueix de forma exponencial. Aquesta tendència acaba a les 25.5 h on augmenta de forma significativa indicant el final del consum de substrat i per tant de la fase batch. A les 27 h s'observa una disminució del pO₂ causada per l'inici de la primera condició del continu a $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$, amb cabal 2.55 g/min. A partir de les 27.3 hores de cultiu el pO₂ tendeix a augmentar fins les 62.5 hores de cultiu, que és quan es deixa d'addicionar medi de cultiu. Aquest no és el comportament esperable per un continu on se suposa que els paràmetres del cultiu s'haurien de mantenir constants al estar en estat estacionari.

A les 70 hores de cultiu es reprèn la segona condició del continu, $\mu=0.07 \text{ h}^{-1}$, amb cabal 1.19 g/min. De les 70 fins les 116 hores el pO₂ es manté estable. En aquest cas, aquest paràmetre si que es comporta com era d'esperar en un cultiu en estat estacionari.

4.10.2 Paràmetres respiratoris

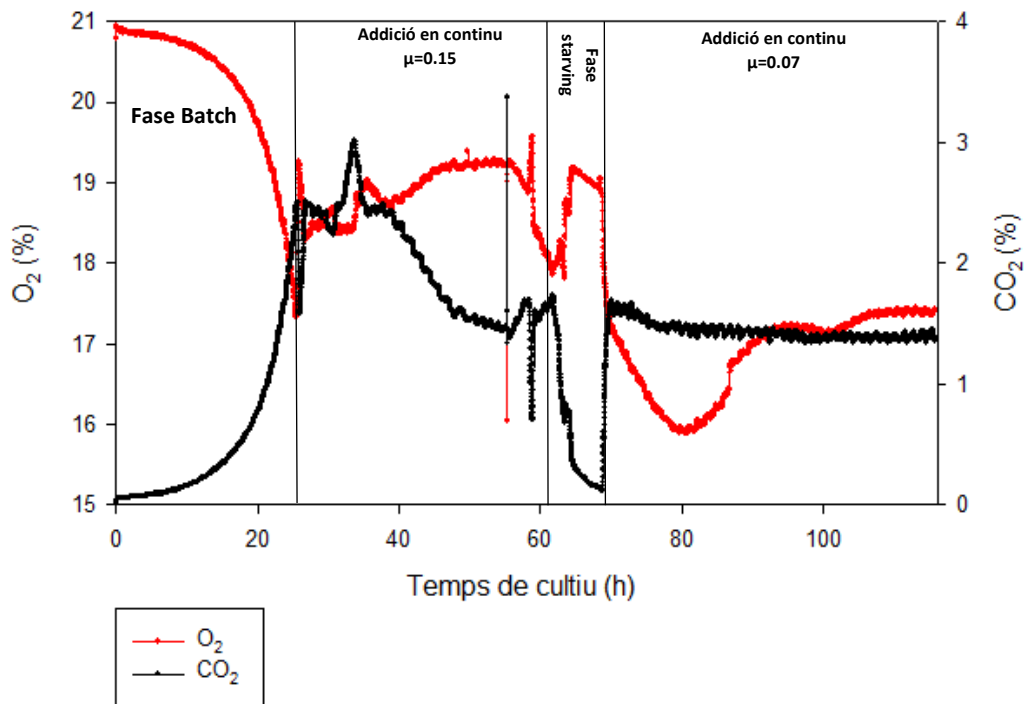


Figura 43: Paràmetres respiratoris principals (CO₂ i O₂) del cultiu continu.

Durant la **fase batch** el CO₂ augmenta i l'O₂ baixa de forma exponencial fins les 25.5 hores de cultiu, corresponents al final de la fase batch. És en aquest moment que hi ha un pic de disminució del CO₂ i augment d'O₂.

A les 27 hores de cultiu s'inicia la primera condició del continu a $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$. En aquest moment el CO₂ augmenta mentre que l'O₂ disminueix. De les 27.3 a les 62.5 hores el CO₂ disminueix i l'O₂ augmenta. Aquest no és el comportament esperable per un continu on se suposa que els paràmetres del cultiu s'haurien de mantenir constants al estar en estat estacionari.

De les 62.5 hi ha un pic d'augment d'O₂ i un de disminució de CO₂. A les 70 hores de cultiu l'O₂ disminueix i el CO₂ augmenta com a conseqüència de la fase d' starving.

De les 70 a les 116 hores de cultiu els valors de CO₂ es manté constant i l'O₂ fa una variació del 18% al 16%, fins que torna a augmentar al 17.4% per mantenir-se estable. Aquest interval de temps correspon a la segona condició del continu; $\mu=0.07 \text{ h}^{-1}$. En aquest cas, aquests paràmetres sí que es comporten com era d'esperar en un cultiu en estat estacionari.

Amb les dades de CO₂ i O₂ obtingudes, es calcula l'RQ, l'OUR i el CER. Els perfils són conseqüència dels anàlisis dels gasos del sortida del fermentador.

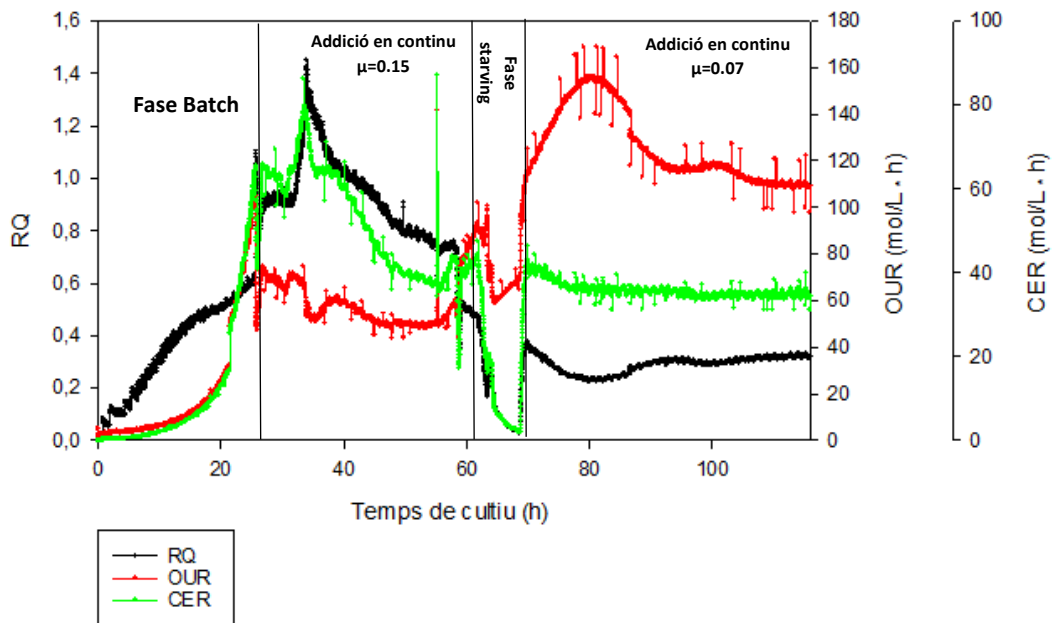


Figura 44: Paràmetres respiratoris derivats (RQ, OUR i CER).

Durant la fase de batch s'observa un comportament lògic de l'OUR i CER.

Durant l'addició en continu $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$ s'observa una reducció significativa i constant de CO₂. Aquest no és el comportament lògic per a un cultiu en fase estacionària.

Durant l'addició en continu $\mu=0.07 \text{ h}^{-1}$ s'observa una tendència constant dels paràmetres. Al principi l'OUR augmenta, ja que hi ha una adaptació a la nova condició. A mesura que progressa el cultiu aquest valor s'estabilitza i acaba constant.

4.10.3 Anàlisi off-line

Utilitzant les dades de l'assaig d'activitat enzimàtica s'obté l'evolució de la concentració de producte al llarg del temps de cultiu en funció de la biomassa. (Figura 45)

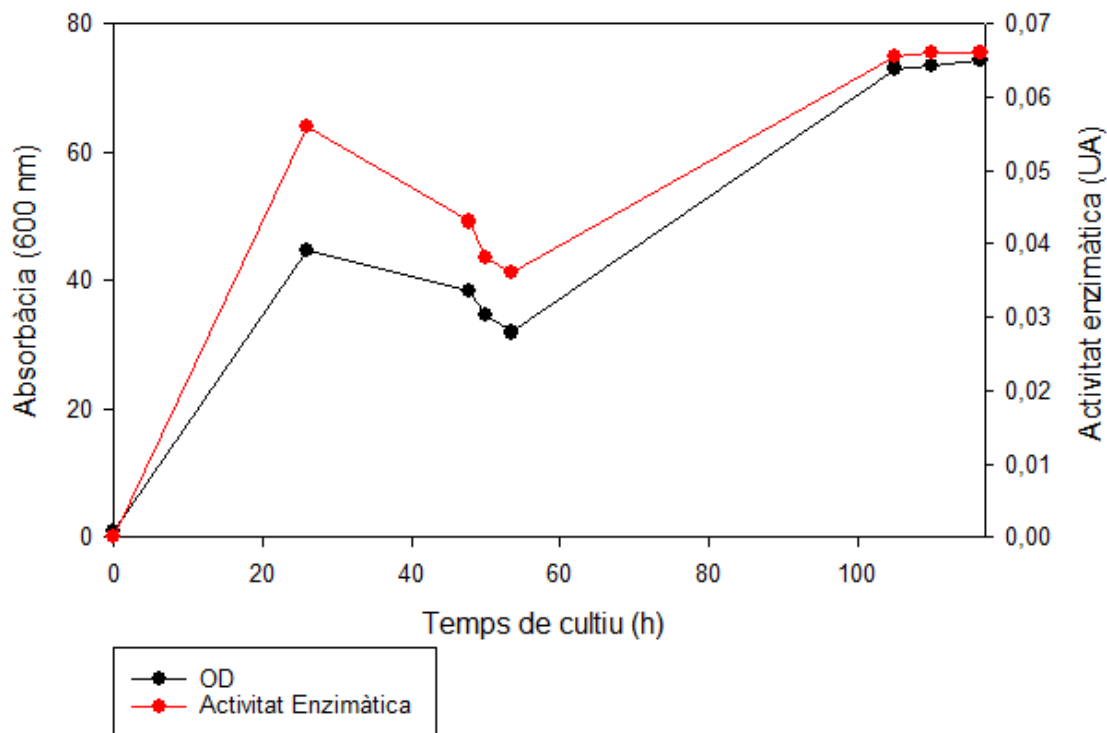


Figura 45: Representació gràfica de l'activitat enzimàtica i la OD del cultiu continu.

S'observa una tendència positiva en l'evolució de la **densitat òptica** durant la fase batch. Un cop aquesta fase acaba, es disminueix la densitat òptica durant la primera condició del cultiu. Aquest no és el comportament esperable per un continu on se suposa que els paràmetres del cultiu s'haurien de mantenir constants al estar en estat estacionari. (Les hores del cultiu i els valors de la densitat òptica corresponents es troben a l'annex B secció 10.11)

Un cop s'inicia la segona condició del continu la densitat òptica augmenta fins arribar a 74 OD. **L'activitat enzimàtica** segueix la mateixa tendència que la densitat òptica. En aquest cas els valors es van mantenir constants, el que és coherent amb els resultats observats amb l'anàlisi dels paràmetres fisiològics. (Els valors d'activitat enzimàtica corresponents es troben a l'annex B secció 10.11)

4.10.4 Càlcul de la μ real pel cultiu en continu

Partint de la informació visual de les gràfiques del cultiu en el que clarament es veu que els paràmetres claus del cultiu no es mantenen constant com seria d'esperar d'un quimiòstat que treballa en estat estacionari s'arriba a la conclusió que durant la primera condició del continu es va estar rentant el bioreactor (s'extreuen cèl·lules a un ritme superior a la capacitat màxima de duplicació). El raonament serà explicat amb més detall a la discussió. En finalitzar el cultiu es procedeix a mesurar el volum del brou de cultiu del bioreactor, que és de 836 ml. Partint del volum exacte es re-calculen les μ que s'han utilitzat durant les diverses fases del cultiu.

Taula 7: μ teòrica vs μ real pel cultiu en continu.

μ teòrica	μ real
0.15 h ⁻¹	0.18 h ⁻¹
0.07 h ⁻¹	0.084 h ⁻¹

4.10.5 Seguiment de la precisió del cabal amb el control en llaç tancat

Al llarg del cultiu s'ha comparat el pes teòric de l'ampolla de medi obtingut amb una simulació mitjançant Excel, calculat a partir del pes inicial i les hores de funcionament de cada cabal, amb el pes a temps real proporcionat per la balança. S'ha decidit no incloure l'Excel utilitzat pel seguiment del pes a l'apartat d'annexos, ja que conté aproximadament 6.000 files.

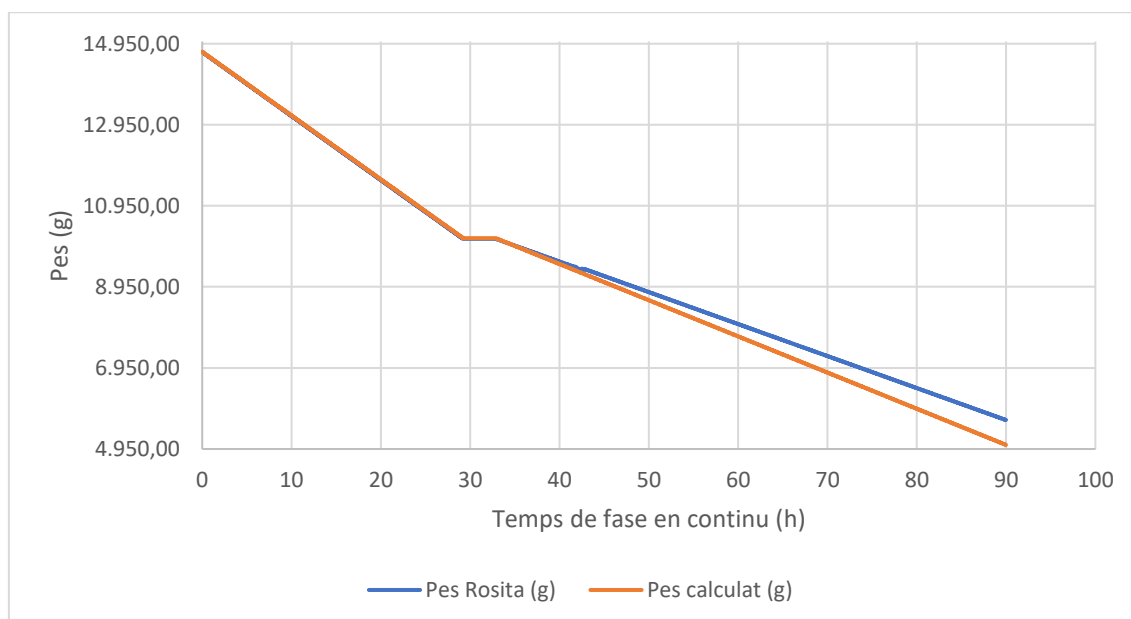


Figura 46: Evolució de la precisió del cabal al llarg del cultiu continu 1.

S'observa que a menys cabal, més diferència entre el pes real i el pes obtingut pel software Rosita. Aquesta diferència és constant i s'acumula al llarg del temps.

5. Discussió

5.1 Cultius fed-batch

5.1.1 Cinètiques de creixement

Un cop realitzades les cinètiques de creixement per la clon #16 (P_{GAP}) i el clon #13 (P_{AOX1}), s'arriba a la conclusió que el volum ideal a inocular del clon tenint en compte els horaris de treball quan es realitzi el pre-inòcul serà de 25 μ L del criostock per 40 mL de medi YPG. Així doncs, després de cultivar aquests clons ON (over night), al dia següent a l'hora d'inocular el reactor les cèl·lules estaran en fase exponencial i es tindrà una quantitat de biomassa suficient per tal que el batch tingui la durada desitjada.

S'ha de tenir en compte que la proporció volum criostock/volum medi YPG als shake flasks s'ha de mantenir. En cas d'utilitzar volums de medi més grans o més petits cal ajustar també el volum del inòcul. D'aquesta manera la cinètica de creixement serà equivalent.

Excepte en el cas del cultiu 5, es considera que s'ha aconseguit controlar de forma més que acceptable la durada de la fase batch dels cultius. Per tant, considerem que la metodologia és adequada i que ha estat implementada de forma exitosa.

5.1.2 Paràmetres respiratoris

Com era d'esperar, excepte els casos concrets en què s'ha observat resultats incoherents, a tots els cultius el CO_2 augmenta quan es consumeix substrat i es produeix creixement de la biomassa, mentre que l' O_2 disminueix com a conseqüència també dels requeriments d'oxigen del cultiu.

Per la majoria dels cultius el CO_2 augmenta quan es consumeix substrat, mentre que l' O_2 disminueix. És per això que durant la fase batch de cada cultiu el CO_2 i l' O_2 es comporten seguint la mateixa dinàmica. Aquest fenomen té lloc de forma molt clara, ja que les cèl·lules estan consumint el substrat que s'hi ha afegit. Com que el consum i producció d'aquests compostos estan associats directament al creixement cel·lular, el perfils que es veuen tant de producció de CO_2 com de consum d' O_2 són exponencials i poden ser relacionat de forma relativament directa al creixement de la biomassa i de l'activitat metabòlica del cultiu.

Els cultius amb glucosa tenen un tret diferencial als cultius amb glicerol. Al final de la fase batch dels cultius amb glucosa es produeix un canvi de la tendència exponencial a una tendència molt més irregular. Això és degut a un canvi metabòlic que presenten molts llevats quan creixen sobre glucosa, l'efecte Crabtree². Aquest efecte el que fa és una transició d'un metabolisme respiratori a un respiro-fermentatiu en el que tot i haver un excés d'oxigen en el medi de cultiu ($pO_2 > 20\%$), els llevats comencen a produir subproductes com l'etanol o l'àcid acètic. Aquest fet, que provoca una certa inestabilitat a la fase final del cultiu, es veuen reflexats canvis significatius en els perfils de pO_2 , CO_2 , O_2 , etc.

² L'efecte Crabtree es defineix com a la formació de subproductes quan hi ha glucosa en excés com a Font de carboni en el cultiu. És el resultat del consum de glucosa via glucòlisi a alta velocitat, fent que el cicle de Krebs no es pugui dur a terme. L'augment no proporcional de glucòlisi respecte cicle de Krebs fa que no s'activi la fosforilació oxidativa ni la cadena d'e- proporcional al piruvat produït. Aquest fet resulta en poc consum d' O_2 i producció de CO_2 . Aquest fenomen produeix lactat, acetat o arabitol.

A la zona 1 de la figura 26, s'observa clarament un canvi metabòlic en què *P. pastoris* passa de consumir oxigen durant la fase batch, a deixar-ho de fer al final de la fase batch.

A part d'estudiar el comportament dels gasos durant la fase batch, també s'ha volgut estudiar com els paràmetres respiratoris poden proporcionar informació sobre cultius de tipus fed-batch senzills basats en polsos o perfils d'addició de substrat constant i/o exponencials.

Quan s'han implementat, s'ha observat que els gasos segueixen la mateixa tendència que la fase batch. En tots els cultius (tret dels que han sorgit resultats incoherents) la tendència és que amb l'addició del pols el CO₂ augmenta, indicant consum de substrat. En el moment en que les cèl·lules han consumit el substrat del pols, el CO₂ disminueix i l'O₂ augmenta de manera considerable.

En el primer cultiu, l'addició exponencial mostra un fet rellevant que és l'aparició de CO₂ mentre se li afegeix substrat de forma constant. Seguint la lògica, si les cèl·lules s'acaben tot el substrat del batch, quan s'afegeix més substrat aquest passa a ser limitant sempre i quan no se n'afegeixi una quantitat més elevada que la que les fa créixer a μ_{max} . Per tant, la producció de CO₂ hauria de ser sempre constant, però en la gràfica (figura 12) es veu com el CO₂ augmenta. El que passa en el moment és que s'addiciona una quantitat de substrat és tan elevada que supera la μ_{max} a la que les cèl·lules poden créixer provocant acumulació de substrat. S'observa l'augment de CO₂ de forma no constant, ja que hi ha més cèl·lules consumint tot el substrat afegit més l'acumulat.

Els cultius realitzats amb metanol com a font de carboni durant la fase fed-batch han generat resultats considerats poc coherents amb les tendències esperades. Caldria fer més proves experimentals per tal de comprovar que el clon pot créixer correctament sobre metanol com a única font de carboni. No obstant, pel que respecta a aquest treball, els resultats no es consideren representatius.

5.1.3 Anàlisi enzimàtic

Tot i que en aquest treball sobre tot s'ha prioritzat la monitorització dels cultius de *P. pastoris* a través de l'anàlisi dels gasos del corrent de sortida del sistema, cal tenir en compte que l'aplicació principal és la producció de proteïnes recombinants secretades al medi. En aquest sentit, durant aquest treball s'ha produït de forma recombinant l'esterasa Yte1 de *C. rugosa*. La producció d'aquest enzim s'ha caracteritzat a través de tres anàlisis complementaris: determinació de proteïna total (Bradford) i activitat enzimàtica, així com anàlisi dels sobrenedant de cultiu per SDS-PAGE.

L'assaig enzimàtic realitzat proporciona valors de la quantitat d'enzim produït. Durant el treball s'ha presentat l'activitat com a pendent en els assajos enzimàtics. Per poder expressar aquesta activitat en forma de activitat enzimàtica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) caldria fer una calibració de l'assaig d'activitat que no ha estat possible realitzar per motius de temps.

Se sap que com més elevada és la pendent més activitat enzimàtica, i per tant quantitat d'enzim hi ha en la mostra analitzada. Comparant els diferents assajos enzimàtics es pot detectar quin cultiu ha produït més proteïna. Aquests resultats són complementaris als detectats per l'assaig de Bradford, que determinen la concentració de proteïna total, així com obtinguts per SDS-PAGE, que mostren totes les proteïnes presents a la mostra. Els resultats dels tres anàlisis al llarg del treball han mostrat sempre molta coherència. Una major activitat enzimàtica s'ha vist

reflexada en una quantitat de proteïna total superior i amb una intensitat de banda més elevada al gel.

Com es veu a la figura 40 el primer cultiu (Glicerol) té una pendent molt més elevada al final del cultiu respecte als altres dos cultius (Glucosa), i per tant ha produït més proteïna d'interès.

Cal comentar que pel cultiu 2, les úniques dades són les de la fase batch, ja que un error en la μ del feeding exponencial (0.3 h^{-1} en comptes de 0.03 h^{-1}) va alterar el cultiu. L'excés de feeding va provocar la producció d'espuma, fent que el brou de cultiu sortís del bioreactor i causant la pèrdua de proteïna recombinant amb l'escuma.

Comparant les dades dels cultius 1, 2 i 3 es pot observar que els cultius realitzats amb glucosa produeixen menys proteïna que el cultiu realitzat amb glicerol. Aquesta observació, però, no ha pogut ser corroborada estadísticament, ja que no es disposen de dades suficients per a cada condició.

Pel que fa als resultats obtinguts amb SDS-PAGE, s'ha pogut comprovar que *P. pastoris* és capaç de secretar de forma eficient la proteïna d'interès al brou de cultiu (Yte1 - 37 kDa). En aquest medi no es troben quantitats significatives d'altres proteïnes de *P. pastoris* secretades al medi. Per tant, aquest fet confirma la gran avantatge dels bioprocessos basats en *P. pastoris* amb els quals es pot obtenir una gran quantitat de proteïna secretada al medi amb un grau de puresa relativament elevat (>80%). Aquesta observació és a simple vista, per tal de poder-ho realitzar quantitativament s'hauria d'utilitzar el software d'anàlisi de gels Densitometria. Tot i així s'ha trobat bibliogràficament que el grau de puresa de proteïna secretada amb *P. pastoris* és com a molt del 80%. [47]

5.1.5 Comparativa de les μ_{\max} / μ obtingudes

Si es compara bibliogràficament, la μ_{\max} dels cultius amb glicerol és més alta que la μ_{\max} de l'article referenciat ($0.197 \text{ h}^{-1} \pm 0.002$) [28]. Probablement la desviació observada en la μ_{\max} és deguda a la complexitat dels cultius realitzats, a més de la precisió i error dels equip d'anàlisi emprats per obtenir les dades (espectrofotòmetre i b-Breath). Un altre factor a tenir en compte és la falta de dades per fer una comparació estadística robusta. No obstant, la complexitat d'aquest cultius ha impedit realitzar més rèpliques biològiques de les diferents condicions durant la realització d'aquest treball.

En els cultius amb glucosa la μ_{\max} és molt similar a l'obtinguda bibliogràficament ($0.19 \text{ h}^{-1} \pm 0.002$). [28]

Inicialment, s'observa que els cultius amb glicerol no estan afectats per l'efecte Crabtree i per tant la μ_{\max} és constant durant tota la fase exponencial del batch. En canvi els cultius amb glucosa pateixen el canvi metabòlic de l'efecte Crabtree i això influeix a la μ . En el cultiu 3 s'observa un canvi de μ_{\max} , abans del canvi metabòlic la μ és 0.19 h^{-1} a després d'aquest canvi, que la μ és 0.236 h^{-1} . Aquest canvi de μ provoca inestabilitat al cultiu mentre dura l'efecte.

Pel que fa als anàlisis fets durant les fases alimentades (fed-batch), s'ha observat que les μ obtingudes són més elevades que la μ_{\max} calculada per la fase batch del propi cultiu, així doncs aquests valors no es consideren representatius. La durada de les fases de creixement realitzades a través dels polsos no és suficient per a obtenir dades estables i fiables de l'analitzador de gasos. L'error propi de l'analitzador en conjunt amb la durada del pols causa desviacions greus en el

càlcul de la μ . Les μ calculades a partir dels polsos són superiors a la μ_{\max} bibliogràfica que es fa servir de referència. S'opta per descartar aquestes dades i no prosseguir amb l'anàlisi.

5.2 Implementació del llaç de control tancat per a controlar el substrat d'entrada als cultius

Al llarg de les proves realitzades s'observa que la imprecisió del sistema augmenta a mesura que augmenta el cabal. Tot i que els resultats es consideren molt bons tenint en compte que és un sistema que s'estava implementat per primera vegada en casos reals, també cal esmentar que a partir de cabals superiors a 2.5 g/min s'observa que les imprecisions es fan més significatives.

A l'annex B subíndex 10.12 es troben les gràfiques de comparació del pes calculat amb el pes real obtingut del programa. Observant-les es comprova que a cabals més a partir de 2.5 mL/min l'error és més elevat, concretament de 2.5 mL/min a 3.8 mL/min l'error és de 4.3 % entre el pes real respecte el pes teòric. En canvi, des d'un cabal d'inici d'1 mL/min fins a 2.5 mL/min l'error és de 0.09 %. Aquests valors es poden trobar a les taules de l'annex B subíndex 10.12.

A l'annex B subíndex 10.13 es troba el perfil realitzat amb diferents cabals. Aquest suggereix que el software Rosita calcula bé els pesos que s'han d'afegir, però l'acció de l'actuador (bomba peristàtica) no es manté estable, la potència de la bomba varia molt dins d'una condició en concret en lloc d'estabilitzar-se a una potència concreta quan ha d'afegir un cabal constant. Aquesta observació s'ha discutit en diverses reunions amb la empresa Bionet i és quelcom que actualment s'està millorant en termes de software.

5.3 Cultiu en continu

Totes les dades extretes en el primer continu realitzat durant aquest TFG mostren que durant la primera condició de cabal continu de $D=0.15 \text{ h}^{-1}$ no es va poder assolir l'estat estacionari. Això es va veure reflexat en la inestabilitat dels paràmetres monitoritzats i que va representar un decreixement significatiu de la biomassa al llarg del temps. Això provoca que el CO_2 disminueixi, que l' O_2 augmenti i que la producció d'enzim sigui cada cop menor mentre dura la condició. Aquest fet indica que el bioreactor s'està rentant, és a dir, que **la velocitat de dilució és superior a la velocitat màxima de creixement de la soca observada durant la fase batch.**

El que va passar és que la cànula que extreu medi constantment del bioreactor que ha d'estar l'alçada per mantenir el volum a 1L, està més baixa i manté el volum a 0.836 L. Això suposa un 16.4 % d'error en els càlculs, i en comptes d'estar afegint cabal per mantenir una taxa específica de creixement de 0.15 h^{-1} , s'està afegint un cabal de 2.55 g/min, corresponents a 0.18 h^{-1} pel volum de 0.836 L. La soca creix a $\mu_{\max} 0.19 \text{ h}^{-1}$, amb una velocitat de dilució 0.18 h^{-1} el sistema està funcionant massa al límit, fet que provoca que no es puguin mantenir les condicions estacionàries. La biomassa del sistema no és capaç de duplicar-se prou ràpid i això provoca que surtin més cèl·lules de les que s'estan generant, i per tant es va produir el rentat del bioreactor. És per això que els resultats durant la primera condició del continu indiquen una disminució significativa de la concentració de biomassa i de la producció de CO_2 .

La segona condició, en canvi, es manté constant ja que la μ , tot i no ser la que s'havia calculat (0.07 h^{-1}), és 2.4 vegades menor a la μ_{\max} fet que evita el rentat del bioreactor.

Contrari als resultats dels test del sistema d'addició de substrat, els resultats sobre l'evolució de la precisió del cabal durant el cultiu indiquen que a cabals inferiors la bomba és més imprecisa. No s'ha arribat a una explicació plausible per aquesta discrepància. L'aturada de l'addició de medi en conjunt amb la pèrdua de medi com a resultat d'una junta defectuosa en el sistema de tubs poden haver afectat la precisió.

6. Conclusions

6.1 Cinètiques de creixement i cultiu dels clons

Realitzar les cinètiques de creixement suposa una avantatge organitzatiu. Disposar de les cinètiques de creixement permet programar el moment d'inoculació del bioreactor i planificar el final de la fase batch dels cultius. Conèixer les cinètiques de cada clon ens permet no haver de perdre temps experimental.

També es pot observar que l'ús de glicerol com a font de carboni durant els cultius batch proporciona major estabilitat i evita esdeveniments metabòlics com l'efecte Crabtree que poden alterar els timings dels cultius. Aquesta evidència ha estat trobada també bibliogràficament per a poder ser reforçada. [28]

6.2 Analitzador de gasos

L'analitzador de gasos proporciona dades sobre la composició de CO_2 i O_2 en la sortida del bioreactor. A partir d'aquesta composició de l'aire extraïem els resultats corresponents que són de gran utilitat per saber quan comencen les diverses fases del cultiu (fase batch, polsos, etc) i quan s'acaben. Transformant les dades de CO_2 i O_2 en paràmetres derivats (OUR, CER, RQ) ens permet veure quan s'estan produint canvis metabòlics com l'efecte Crabtree, consum de metabòlits secundaris, etc.

Les mesures de CO_2 , poden ser transformades per saber la taxa específica de creixement d'un interval concret, eliminant la necessitat de prendre mostres manuals de forma regular per obtenir aquesta dada sempre i quan es pugui demostrar que aquestes dades són extrapolables.

Al llarg de l'apartat de resultats es mostren les gràfiques dels paràmetres OUR, CER, RQ, CO_2 i O_2 . S'han pogut distingir clarament totes les fases dels cultius i diferents esdeveniments metabòlics. La informació d'aquests paràmetres a temps real permet realitzar ajustos durant el cultiu i resoldre incidències que d'altra forma no hauríem detectat.

6.3 Assaig enzimàtic

L'assaig enzimàtic ens proporciona informació rellevant sobre si la proteïna d'interès s'està produint i si ho fa en més o menys proporció respecte els altres cultius.

Partint de les dades obtingudes s'observa que el cultiu batch amb glicerol ha produït més proteïna recombinant que els cultius amb glucosa. No obstant caldria realitzar més repliques per poder fonamentar estadísticament aquests resultats.

6.4 Cultiu en continu

Per primera vegada, el sistema de control d'addició de substrat va ser implementat de forma exitosa en cultius en continu amb el llevat *P. pastoris* amb molt bons resultats. No obstant, el control d'addició encara pot ser millorat per tal de reduir les diferències en la potència a la que treballa la bomba d'addició del sistema quan el cabal és constant.

Les dades analitzades de la primera condició del continu en conjunt amb el volum real mesurat al final del cultiu ens permeten arribar a la conclusió que el cultiu es va estar rentant, i per tant els paràmetres claus del cultiu no es van mantenir com era d'esperar en un sistema que treballa en estat estacionari.

No obstant, la segona condició a $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$ sí que es va assolir correctament i això es va veure reflexat en el comportament constant al llarg del temps dels paràmetres claus del cultiu (pO_2 , CO_2 , O_2 i els seus equivalents CER i OUR) així com dels anàlisis off-line realitzats (OD_{600} i activitat enzimàtica).

Un cop identificat la causes de l'error experimental, aquestes s'han pogut subsanar i actualment ja s'estan realitzant cultius en els que efectivament s'ha aconseguit treballar en condicions estacionàries a una $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$.

Les dades de l'analitzador de gasos també són rellevants, ja que són dades en directe del cultiu. Gràcies a l'analitzador de gasos s'ha pogut observar a temps real el rentat del bioreactor i això suposa un avantatge respecte a optimització del procés, ja que si es detecta un problema com aquest, es pot actuar ràpidament per evitar-ho o directament parar el cultiu per tornar a començar.

7. Treball futur

7.1 Cultius batch

Caldria realitzar més cultius batch amb les fonts de carboni glucosa i glicerol per obtenir dades suficients per a realitzar una comparació estadística robusta entre la μ del mètode On-line i l'Off-line.

7.2 Cultius en fed-batch

Un cop s'ha aconseguit realitzar amb èxit cultius en continu amb el sistema d'addició de substrat amb un llaç de control tancat caldria aplicar aquest sistema a cultius en fed-batch. La diferència principal és que el llaç de control serà molt més exigent per part de l'estratègia de cultiu. Durant els continus l'addició de substrat es realitza de forma constant però en els cultius en fed-batch limitats per la font de C per mantenir una μ determinada, l'addició del substrat haurà de seguir un perfil d'addició exponencial pre-programat.

Els resultats d'aquests cultius en termes de producció de proteïna recombinant també seran molt interessants tant per la possible publicació d'un article científic com per a l'obtenció de grans quantitats de l'enzim Yte1 que després pugui ser emprat per a treballs de biocatàlisi aplicada.

7.3 Cultius en continu

Caldria realitzar més cultius continus per obtenir dades suficients dels cabals per a realitzar la comparació estadística dels cabals respecte al pes proporcionat per la balança. Actualment s'està portant a terme un segon cultiu en continu que no s'inclou en aquest TFG, ja que encara no es tenen les dades.

Aquests cultius en continu podran permetre obtenir informació molt robusta sobre el comportament del sistema a diferents μ i com afecta això a la productivitat del bioprocés.

8. Bibliografia

- [1] S. Sahdev, S. K. Khattar, and K. S. Saini, "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 307, no. 1–2, pp. 249–64, Jan. 2008, doi: 10.1007/s11010-007-9603-6.
- [2] C. P. Chou, "Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 3, pp. 521–32, Sep. 2007, doi: 10.1007/s00253-007-1039-0.
- [3] P. Jonasson, S. Liljeqvist, P.-A. Nygren, and S. Ståhl, "Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 35, no. 2, pp. 91–105, Apr. 2002, doi: 10.1042/ba20010099.
- [4] F. A. O. Marston and D. L. Hartley, "Solubilization of protein aggregates.," *Methods Enzymol.*, vol. 182, no. C, pp. 264–76, 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)82022-t.
- [5] J. R. Swartz, "Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 195–201, Apr. 2001, doi: 10.1016/s0958-1669(00)00199-3.
- [6] L. Andersen, D. C., & Krummen, "Recombinant Protein Expression," in *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004, pp. 117–123.
- [7] C.-J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–99, Mar. 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [8] M. N. Baeshen *et al.*, "Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 953–962, Jul. 2015, doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
- [9] F. Wurm and A. Bernard, "Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2, pp. 156–9, Apr. 1999, doi: 10.1016/s0958-1669(99)80027-5.
- [10] L. Chu and D. K. Robinson, "Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 180–7, Apr. 2001, doi: 10.1016/s0958-1669(00)00197-x.
- [11] J. Báez, D. Olsen, and J. W. Polarek, "Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 69, no. 3, pp. 245–52, Dec. 2005, doi: 10.1007/s00253-005-0180-x.
- [12] M. Rai and H. Padh, "Expression systems for production of heterologous proteins," *Curr. Sci.*, vol. 80, no. 9, pp. 1121–1128, 2001.
- [13] T. U. Gerngross, "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1409–14, Nov. 2004, doi: 10.1038/nbt1028.
- [14] T. Gassler, L. Heisting, D. Mattanovich, B. Gasser, and R. Prielhofer, "CRISPR/Cas9-Mediated Homology-Directed Genome Editing in *Pichia pastoris*," *Methods Mol. Biol.*,

- vol. 1923, pp. 211–225, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_9.
- [15] M. W. T. Werten, T. J. van den Bosch, R. D. Wind, H. Mooibroek, and F. A. de Wolf, “High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*,” *Yeast*, vol. 15, no. 11, pp. 1087–1096, Aug. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199908)15:11<1087::AID-YEA436>3.3.CO;2-6.
- [16] S. Wildt and T. U. Gerngross, “The humanization of N-glycosylation pathways in yeast.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 2, pp. 119–28, Feb. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1087.
- [17] K. De Pourcq, K. De Schutter, and N. Callewaert, “Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 5, pp. 1617–1631, Aug. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2721-1.
- [18] J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler, and K. R. Madden, “*Pichia pastoris* as a Host System for Transformations,” vol. 5, no. 12, pp. 3376–3385, 1985.
- [19] M. Hasslacher *et al.*, “High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts.,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 11, no. 1, pp. 61–71, Oct. 1997, doi: 10.1006/prep.1997.0765.
- [20] V. Ciofalo, N. Barton, J. Kreps, I. Coats, and D. Shanahan, “Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil.,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 45, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.yrtph.2006.02.001.
- [21] C. A. Thompson, “FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema.,” *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, vol. 67, no. 2, p. 93, Jan. 2010, doi: 10.2146/news100005.
- [22] J. L. Cereghino and J. M. Cregg, “Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 45–66, Jan. 2000, doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
- [23] S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, and L. M. Harvey, “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system.,” *Yeast*, vol. 22, no. 4, pp. 249–70, Mar. 2005, doi: 10.1002/yea.1208.
- [24] R. Daly and M. T. W. Hearn, “Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production.,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 18, no. 2, pp. 119–38, Mar. 2005, doi: 10.1002/jmr.687.
- [25] F. Jin, X. Xu, W. Zhang, and D. Gu, “Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 49, no. 1, pp. 39–46, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.pep.2006.03.008.
- [26] D. Gasser, B. Prielhofer, R. Marx, H. Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., ... Mattanovich, “*Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research,” *Генетика*, vol. 49, no. 4, pp. 454–460, 2013, doi: 10.7868/S0016675813040115.
- [27] C. P. Kurtzman and J. W. Fell, “Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology,” in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, no. C, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, pp. 11–30.
- [28] X. Garcia-Ortega, P. Ferrer, J. L. Montesinos, and F. Valero, “Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 79, pp. 172–181, Oct. 2013, doi:

10.1016/j.bej.2013.07.013.

- [29] S. Zucca, L. Pasotti, N. Politi, M. Cusella De Angelis, and P. Magni, "A standard vector for the chromosomal integration and characterization of BioBrick™ parts in *Escherichia coli*," *J. Biol. Eng.*, vol. 7, no. 1, p. 12, 2013, doi: 10.1186/1754-1611-7-12.
- [30] B. Gasser *et al.*, "Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview," *Microb. Cell Fact.*, vol. 7, no. 1, p. 11, 2008, doi: 10.1186/1475-2859-7-11.
- [31] "YTE1 - Palmitoyl-protein hydrolase 1 - *Komagataella phaffii* (strain ATCC 76273 / CBS 7435 / CECT 11047 / NRRL Y-11430 / Wegner 21-1) (Yeast) - YTE1 gene & protein." <https://www.uniprot.org/uniprot/F2QQY1> (accessed Jun. 09, 2021).
- [32] C. Taxis and M. Knop, "System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechniques*, vol. 40, no. 1, pp. 73–8, Jan. 2006, doi: 10.2144/000112040.
- [33] N. A. Da Silva and S. Srikrishnan, "Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 197–214, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x.
- [34] "CDC - The Emergency Response Safety and Health Database: Systemic Agent: METHANOL - NIOSH." https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750029.html (accessed Jun. 05, 2021).
- [35] W.-C. Liu, T. Gong, Q.-H. Wang, X. Liang, J.-J. Chen, and P. Zhu, "Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 18439, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep18439.
- [36] A. L. Zhang *et al.*, "Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 36, no. 6, pp. 1611–1619, 2009, doi: 10.1007/s11033-008-9359-4.
- [37] C. Panchiga, B. Jörgen, W. Yaowapha, P. Jindarat, and T. Anan, "Development of simple kinetic models and parameter estimation for simulation of recombinant human serum albumin production by *Pichia pastoris*," *African J. Biotechnol.*, vol. 15, no. 39, pp. 2156–2165, Sep. 2016, doi: 10.5897/AJB2015.15121.
- [38] J. Monod, "a Certain Number," *Annu. Rev. M.*, vol. 3, no. XI, pp. 371–394, 1949.
- [39] F. Widdel, "Theory and Measurement of Bacterial Growth," pp. 1–11, 2010.
- [40] "The Difference Between Batch, Fed-batch and Continuous Processes - EN Blog." <https://www.infors-ht.com/en/blog/the-difference-between-batch-fed-batch-and-continuous-processes/> (accessed Jun. 05, 2021).
- [41] M. A. Nieto-Taype, X. Garcia-Ortega, J. Albiol, J. L. Montesinos-Seguí, and F. Valero, "Continuous Cultivation as a Tool Toward the Rational Bioprocess Development With *Pichia Pastoris* Cell Factory," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–21, Jun. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00632.
- [42] "17.11 Chemostats and turbidostats." http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch17_11.htm (accessed Jun. 10, 2021).

- [43] C. Jungo, J. Urfer, A. Zocchi, I. Marison, and U. von Stockar, "Optimisation of culture conditions with respect to biotin requirement for the production of recombinant avidin in *Pichia pastoris*," *J. Biotechnol.*, vol. 127, no. 4, pp. 703–15, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.08.001.
- [44] H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai, "Yeast Methylophony: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis," *Int. J. Microbiol.*, vol. 2011, pp. 1–8, 2011, doi: 10.1155/2011/101298.
- [45] Bio-Rad Laboratories, "Bio-Rad protein assay (Bradford)," *Bio-rad*, pp. 1–24, 2010.
- [46] L. Integrat and I. I. Protocol, "Anàlisi del procés d'expressió i purificació de la proteïna 4F2 mitjançant electroforesi de SDS-," pp. 2014–2015, 2015.
- [47] G. Potvin, A. Ahmad, and Z. Zhang, "Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review," *Biochem. Eng. J.*, vol. 64, pp. 91–105, May 2012, doi: 10.1016/j.bej.2010.07.017.

9 Annex A: Metodologia

9.1 Lots medi batch

9.1.1 Lot cultiu 1

Batch size:	1,50 kg	
Fermentation	1	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	750 g +/-	18,8 g	750 g
dissolve	citric acid	2,7 g +/-	0,1 g	2.7 g
dissolve	Glycerol	59,9 g +/-	1,50 g	69.6g
dissolve	(NH4)2HPO4	18,90 g +/-	0,47 g	18.68 g
dissolve	MgSO4 * 7 H2O	0,75 g +/-	0,02 g	0.75 g
dissolve	KCl	1,35 g +/-	0,03 g	1.32 g
dissolve	CaCl2 * 2 H2O	0,03 g +/-	0,00 g	0.03 g
dissolve	Trace Salts	6,90 ml +/-	0,17 ml	6.9 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	3,00 ml +/-	0,08 ml	3 ml
fill up	RO - water	ad 1400,00 g		

Figura 47: Components del medi batch pel cultiu 1.

9.1.2 Lot cultiu 2

Batch size:	2,00 kg	
Fermentation	2	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	1000 g +/-	25,0 g	1000 g
dissolve	citric acid	3,7 g +/-	0,1 g	3.69 g
dissolve	Glycerol	79,8 g +/-	2,00 g	78.9 g
dissolve	(NH4)2HPO4	25,20 g +/-	0,63 g	25.11 g
dissolve	MgSO4 * 7 H2O	1,00 g +/-	0,03 g	0.98 g
dissolve	KCl	1,80 g +/-	0,05 g	1.78 g
dissolve	CaCl2 * 2 H2O	0,04 g +/-	0,00 g	0.04 g
dissolve	Trace Salts	9,20 ml +/-	0,23 ml	9.2 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	4,00 ml +/-	0,10 ml	4 ml
fill up	RO - water	ad 1900,00 g		

Figura 48: Components del medi batch pel cultiu 2.

9.1.3 Lot cultiu 3

Batch size:	2,00 kg	
Fermentation	3	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	1000 g	+/- 25,0 g	1000 g
dissolve	citric acid	3,7 g	+/- 0,1 g	3.71 g
dissolve	Glycerol	79,8 g	+/- 2,00 g	79.67 g
dissolve	(NH ₄) ₂ HPO ₄	25,20 g	+/- 0,63 g	25.41 g
dissolve	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,00 g	+/- 0,03 g	1.01 g
dissolve	KCl	1,80 g	+/- 0,05 g	1.72 g
dissolve	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,04 g	+/- 0,00 g	0.04 g
dissolve	Trace Salts	9,20 ml	+/- 0,23 ml	9.2 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	4,00 ml	+/- 0,10 ml	4 ml
fill up	RO - water	ad 1900,00 g		

Figura 49: Components del medi batch pel cultiu 3.

9.1.4 Lot cultiu 4

Batch size:	1,50 kg	
Fermentation	4	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	750 g	+/- 18,8 g	750 g
dissolve	citric acid	2,7 g	+/- 0,1 g	2.70 g
dissolve	Glycerol	59,9 g	+/- 1,50 g	60.5 g
dissolve	(NH ₄) ₂ HPO ₄	18,90 g	+/- 0,47 g	18.92 g
dissolve	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,75 g	+/- 0,02 g	0.75 g
dissolve	KCl	1,35 g	+/- 0,03 g	1.36 g
dissolve	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,03 g	+/- 0,00 g	0.03 g
dissolve	Trace Salts	6,90 ml	+/- 0,17 ml	6.9 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	3,00 ml	+/- 0,08 ml	3 ml
fill up	RO - water	ad 1400,00 g		

Figura 50: Components del medi batch pel cultiu 4.

9.1.5 Lot cultiu 5

Batch size:	1,50 kg	
Fermentation	5	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	750 g +/-	18,8 g	750 g
dissolve	citric acid	2,7 g +/-	0,1 g	2.71 g
dissolve	Glycerol	59,9 g +/-	1,50 g	60 g
dissolve	(NH ₄) ₂ HPO ₄	18,90 g +/-	0,47 g	19.1 g
dissolve	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,75 g +/-	0,02 g	0.76 g
dissolve	KCl	1,35 g +/-	0,03 g	1.38 g
dissolve	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,03 g +/-	0,00 g	0.03 g
dissolve	Trace Salts	6,90 ml +/-	0,17 ml	6.9 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	3,00 ml +/-	0,08 ml	3 ml
fill up	RO - water	ad 1400,00 g		

Figura 51: Components del medi batch pel cultiu 5.

9.1.6 Lot cultiu 6

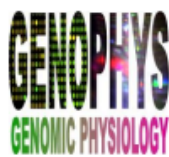
Batch size:	1,00 kg	
Fermentation	6	

Action:	Substance:	calc. weigh in:	+/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	500 g +/-	12,5 g	500 g
dissolve	citric acid	1,8 g +/-	0,0 g	1.8 g
dissolve	Glycerol	39,9 g +/-	1,00 g	39.9 g
dissolve	(NH ₄) ₂ HPO ₄	12,60 g +/-	0,32 g	12.59 g
dissolve	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,50 g +/-	0,01 g	0.50 g
dissolve	KCl	0,90 g +/-	0,02 g	0.91 g
dissolve	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,02 g +/-	0,00 g	0.02 g
dissolve	Trace Salts	4,60 ml +/-	0,12 ml	4.6 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l)	2,00 ml +/-	0,05 ml	2 ml
fill up	RO - water	ad 900,00 g		

Figura 52: Components del medi batch pel cultiu 6.

9.2 Lots medi continu

9.2.1 Lot cultiu 6

	Batch size:	11,00 kg	Expiration date:
	Int. Lot number:	1	storage:
	Creation date:		storage conditions:
	goal biomass :	25	Yx/s = 0,5

Action:	Substance:	calc. weigh in: +/-2,5%	actual weigh in:
first weight in	RO - water	5500 g +/- 137,5 g	5500 g
dissolve	citric acid	10,1 g +/- 0,3 g	10.12 g
dissolve	Glucose [c]	550,0 g +/- 13,75 g	551.23 g
dissolve	(NH ₄) ₂ HPO ₄ [d]	47,85 g +/- 1,20 g	47.89 g
dissolve	MgSO ₄ * 7 H ₂ O [e]	7,15 g +/- 0,18 g	7.16 g
dissolve	KCl [f]	18,70 g +/- 0,47 g	18.63 g
dissolve	CaCl ₂ * 2 H ₂ O [g]	0,11 g +/- 0,00 g	0.11 g
dissolve	Trace salt solution [h]	17,60 g +/- 0,44 g	17.6 ml
dissolve	Biotin (0,2g/l) [i]	11,00 ml +/- 0,28 ml	11 ml
set pH to 6.0	25% HCl		
fill up	RO - water	ad 11000,0 g	-

Figura 53: Components del medi continu pel cultiu 6.

9.3 Protocol electroforesi Gels SDS-PAGE

Aquest protocol va ser extret del protocol de l'assignatura Laboratori Integrat II del Grau en Biotecnologia de la UVic-UCC:

Per a córrer un minigel cal una intensitat de corrent de 35 mA. Si correm 2 gels caldrà fixar la intensitat a 70 mA. També és possible connectar a una única font dues cubetes d'electroforesi amb 2 gels cadascuna; en aquest cas caldria fixar el corrent a 140 mA.

1. Engegueu la font d'electroforesi i establiu les condicions del camp elèctric:
 - **Voltatge** al màxim (300 V)
 - **Intensitat**: 35 mA per gel.
2. **Connecteu els cables** de la cubeta a la font (**COMPTE**: que coincideixin els colors, vermell amb vermell i negre amb negre)
3. **Inicieu l'electroforesi**. Si funciona correctament s'haurien d'observar unes bombolletes pujant a sobre de l'elèctrode que es veu al mig de la cubeta (càtode). El corrent hauria de ser constant i el voltatge pot variar una mica. Si el voltatge puja massa, pot ser senyal de que falta tampó a la cambra superior. Si el voltatge és molt baix, pot ser senyal de que les cambres contacten pel tampó de dalt, no pels gels.
4. Durant l'electroforesi, convé **anar observant tant la font d'alimentació com la cubeta**. A la cubeta, sempre hi ha d'haver un nivell suficient de tampó a la cambra superior (de vegades té pèrdues i cal afegir-ne més). Si cal, es pot aturar l'electroforesi per posar més tampó.
Com que hem utilitzat marcadors de pes molecular pre-tenyits es podrà observar que avancen molt de pressa en el gel concentrador (en 10-15 min arriben al límit entre el gel concentrador i el gel separador); allà queden apilats i aturats.
Després, al córrer més lentament en el gel separador, es van separant cada vegada més. A les altres mostres, el color que veiem només correspon al colorant (el blau de bromofenol corre més que les proteïnes ja que té un pes molecular baix: PM = 670). En el gel concentrador, corre com una banda ampla però en arribar al gel separador, es transforma en una banda molt fina que ens pot il·lustrar com es concentren les proteïnes. Això es dona perquè queden frenades degut a que la malla per la que han de passar canvia augmentant de densitat (del 4% PA a un percentatge superior).
5. **Aturarem l'electroforesi** quan el blau de bromofenol arribi a aprox. 5 mm de la part inferior del gel, és a dir, de la part inferior del vidre.

9.4 Protocol Tinció Gels SDS-PAGE

Aquest protocol va ser extret del protocol de l'assignatura Laboratori Integrat II del Grau en Biotecnologia de la UVic-UCC:

La coloració amb coomassie es fa sobre els GELS de PA per obtenir una tinció blava de totes les proteïnes presents al gel.

1. Prepareu 25 mL de la solució de tinció en una placa de Petri **tapada**.
2. **Poseu el gel a la placa**, procurant que quedi ben submergit i poseu-lo sobre l'agitador orbital
3. Tapeu la placa i deixeu que el gel es tenyeixi durant **15 minuts**.
4. **Retorneu la solució de tinció a la seva ampolla** amb precaució (utilitzeu una pipeta de plàstic). El gel quedarà completament i uniformement blau.
5. **Primera destinció**: poseu a la placa de Petri uns 60 mL de la solució de destinció, i deixeu-la a T^a ambient al menys 20 min en l'agitador orbital.
6. **Recupereu la solució de destinció** en un vas de precipitats i filtreu-la amb carbó actiu.
7. **Segona destinció**: poseu uns 60 mL de solució de destinció nova i deixeu destenyir fins que el fons sigui totalment transparent. Descarteu la solució a l'ampolla corresponent.
8. Finalment es prendrà una imatge del gel.

10 Annex B: Resultats

10.1 Cinètica de creixement de la soca #16

Taula 8: Absorbàncies (OD_{600}) de cada volum inoculat respecte al temps de cultiu.

<i>Temps de cultiu (h)</i>	<i>OD_{600} 25 μL</i>	<i>OD_{600} 50 μL</i>	<i>OD_{600}100 μL</i>	<i>OD_{600} 250 μL</i>
0	0.03	0.06	0.12	0.29
20.15	4.15	7.74	9.63	24.88
21.15	6.57	11.82	11.87	28.65
22.15	8.61	13.03	15.92	31.07
23.15	10.84	14.72	19.12	31.82
24.15	13.79	16.32	22.45	33.05

10.2 Cinètica de creixement de la soca #13

Taula 9: Absorbàncies (OD_{600}) del volum inoculat respecte al temps de cultiu.

<i>Temps de cultiu (h)</i>	<i>OD_{600} 25 μL</i>
20	2.50
21	3.31
22	4.82
23	6.02
24	8.91
25	10.72

10.3 Taules anàlisi Off-line cultiu 1

Taula 10: Absorbàncies (OD₆₀₀) del cultiu 1.

TEMPS (H)	OD ₆₀₀
0	1,21
1,5	1,73
2,5	2,12
17,5	26,87
18,5	36,57
19,5	42,96
20,5	52,47
21,5	56,47
41,5	150,87

Taula 11: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 1.

ASSAIG ENZIMÀTIC				
TEMPS DE CULTIU (H)	19.5	20.5	21.5	41.5
	Pendent	Pendent	Pendent	Pendent
CULTIU 1: GLICEROL	0.06	0.07	0.09	0.27

Taula 12: Assaig proteïna total del cultiu 1.

	17.5 H	20.5 H	21.5 H	41.5 H
A (abs)	0,44	0,51	0,54	0,78
B (abs)	0,44	0,51	0,53	0,82
C (abs)	0,41	0,48	0,51	0,76
PROMIG	0,43	0,50	0,53	0,79
CONCENT [g/L]	0,09	0,18	0,21	0,51

10.4 Taules anàlisi Off-line cultiu 2

Taula 13: Absorbàncies (OD₆₀₀) cultiu 2.

TEMPS (H)	OD ₆₀₀
0	0,57
1	0,75
18	15,95
19	19,32
20	22,50
21	27,40
22	31,87
23	39,07
23,5	37,73
43,25	159,67

Taula 14: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 2.

ASSAIG ENZIMÀTIC				
TEMPS DE CULTIU (H)	19	21	23	43.25
	Pendent	Pendent	Pendent	Pendent
CULTIU 2: GLUCOSA	0.027	0.045	0.064	0.1

Taula 15: Assaig proteïna total del cultiu 2.

	18 H	19 H	20 H	21 H	22 H	23 H	23,5 H	43,25 H
A (abs)	0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,51	0,51	0,52
B (abs)	0,41	0,42	0,45	0,46	0,49	0,51	0,52	0,52
C (abs)	0,39	0,42	0,72	0,45	0,47	0,50	0,50	0,52
PROMIG	0,41	0,42	0,45	0,45	0,48	0,50	0,51	0,52
CONCENT [g/L]	0,06	0,07	0,10	0,11	0,13	0,16	0,16	0,17

10.5 Taules anàlisi Off-line cultiu 3

Taula 16: Absorbàncies (OD_{600}) cultiu 3.

TEMPS (H)	OD_{600}
0	0,95
1,5	0,83
2,25	0,89
3,25	2,68
19	24,13
20	30,63
21	40,37
22	48,50
23	53,17
23,25	54,97
43	98,13
44	123,53
45	102,60

Taula 17: Valors de les pendents de l'assaig enzimàtic del cultiu 3.

ASSAIG ENZIMÀTIC					
TEMPS DE CULTIU (H)	19	21	23	43	45
	Pendent	Pendent	Pendent	Pendent	Pendent
CULTIU 3: GLUCOSA	0.02	0.026	0.043	0.12	0.14

Taula 18: Assaig proteïna total del cultiu 3.

	19 H	21 H	23 H	43 H	45 H
A (abs)	0,38	0,40	0,46	0,67	0,69
B (abs)	0,38	0,41	0,44	0,70	0,71
C (abs)	0,35	0,37	0,41	0,63	0,68
PROMIG	0,37	0,39	0,44	0,67	0,69
CONCENT [g/L]	0,03	0,06	0,12	0,42	0,45

10.6 Taules anàlisi Off-line cultiu 4

Taula 19: Absorbàncies (OD₆₀₀) cultiu 4.

TEMPS (H)	OD ₆₀₀
0	0,80
20,8	16,40
21,75	17,53
22,75	18,97
23,75	21,52
24,75	21,97
25	23,70
46	67,53
47	71,73
48	64,93
49	83,20

Taula 20: Assaig proteïna total del cultiu 4.

	23.75 H	25 H	46 H	47 H	48 H	49 H
C (abs)	0,31	0,32	0,35	0,37	0,36	0,35
D (abs)	0,31	0,32	0,35	0,35	0,35	0,34
E (abs)	0,29		0,34	0,34	0,34	0,33
PROMIG	0,30	0,32	0,35	0,35	0,35	0,34
CONCENT	0,01	0,02	0,05	0,05	0,05	0,04

10.7 Taula assaig de proteïna total cultiu 5

Taula 21: Absorbàncies cultiu 5.

TEMPS (H)	OD ₆₀₀
0	0,85
20,8	47,17
21,75	56,17
23	60,90
45	66,73

Taula 22: Assaig proteïna total del cultiu 5.

	20.8 H	21.75 H	23 H	45 H
A (abs)	0,29	0,32	0,34	0,34
B (abs)	0,33	0,34	0,36	0,35
C (abs)	0,32	0,33	0,35	0,35
Promig	0,31	0,33	0,35	0,34
Proteïna [g/L]	0,009	0,023	0,039	0,035

10.8 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 4

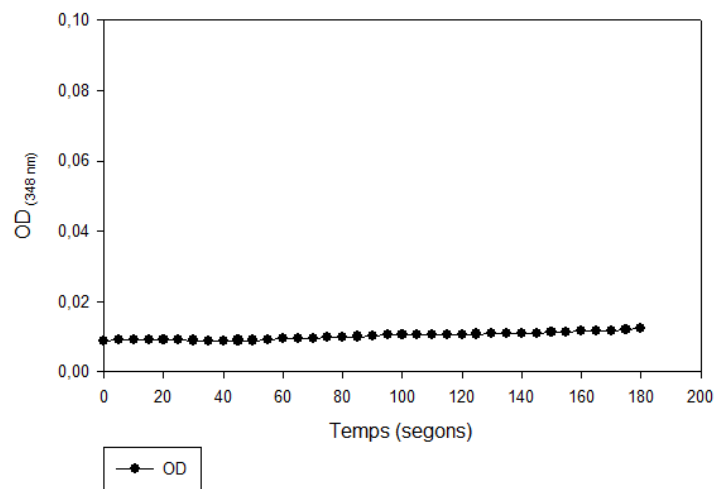


Figura 54: Gràfica assaig enzimàtic cultiu 4.

10.9 Gràfica assaig enzimàtic cultiu 5

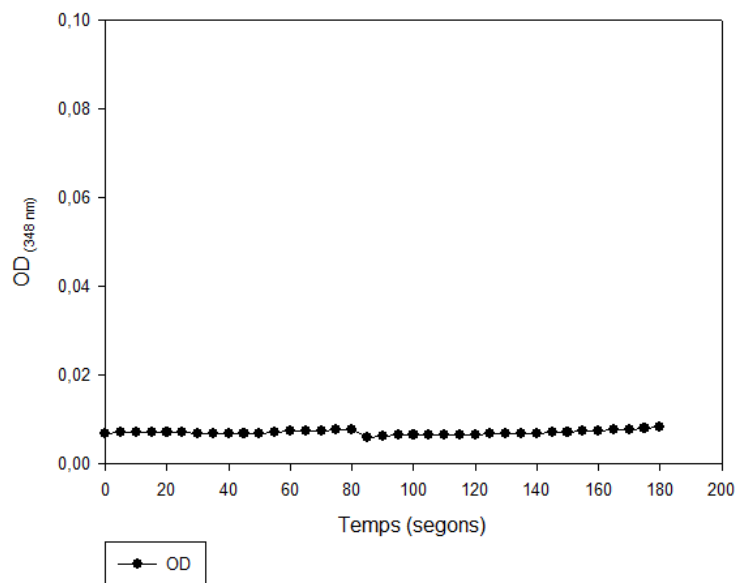


Figura 55: Gràfica assaig enzimàtic cultiu 5.

10.10 μ abans del canvi metabòlic del cultiu 3

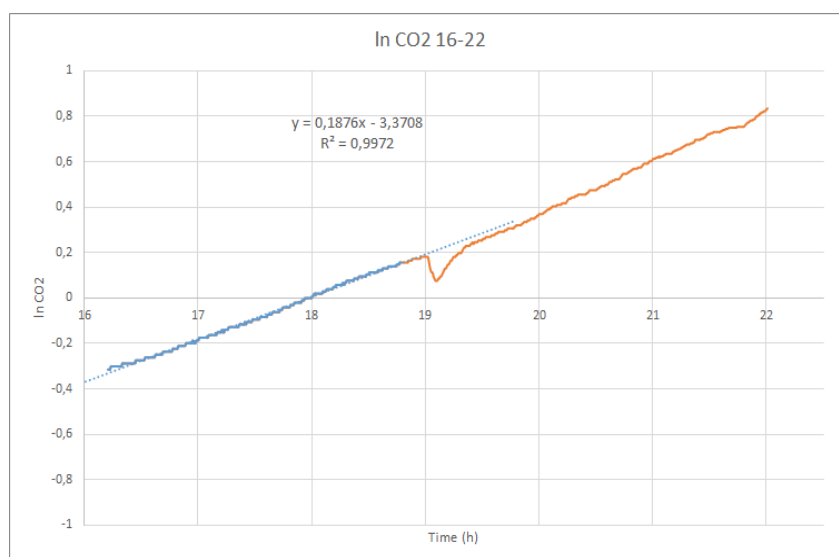


Figura 56: Taxa específica de creixement abans del canvi metabòlic causat per l'efecte Crabtree.

10.11 Taules paràmetres Off-line cultiu en continu

Taula 23: Temps respecte l'absorbància a 600 nm.

TEMPS (H)	OD ₆₀₀
0	0,97
26	44,73
47,75	38,3
50	34,5
53,5	31,9
116,5	74,37

Taula 24: Activitat enzimàtica del cultiu en continu.

TEMPS (H)	PENDENT
0	0,000
26	0,056
47,75	0,043
50	0,038
53,5	0,036
116,5	0,066

10.12 Gràfiques assaig cabal del sistema d'addició en llaç tancat

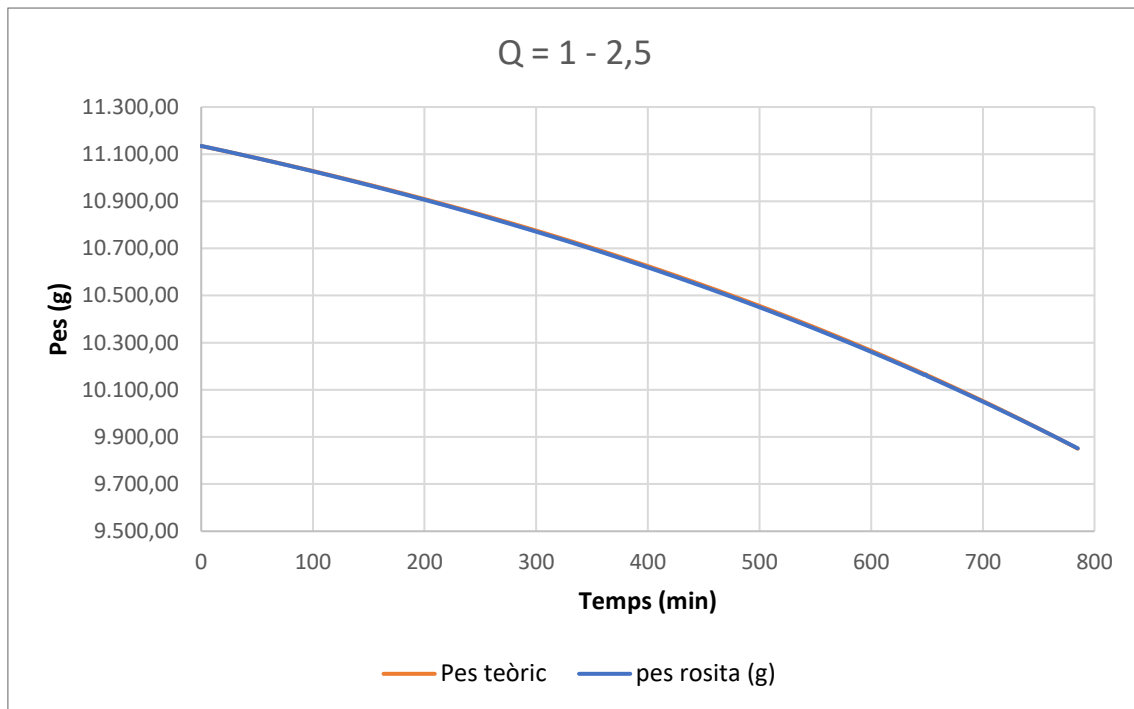


Figura 57: Assaig del cabal amb perfil exponencial fase 1-2.5 g/min.

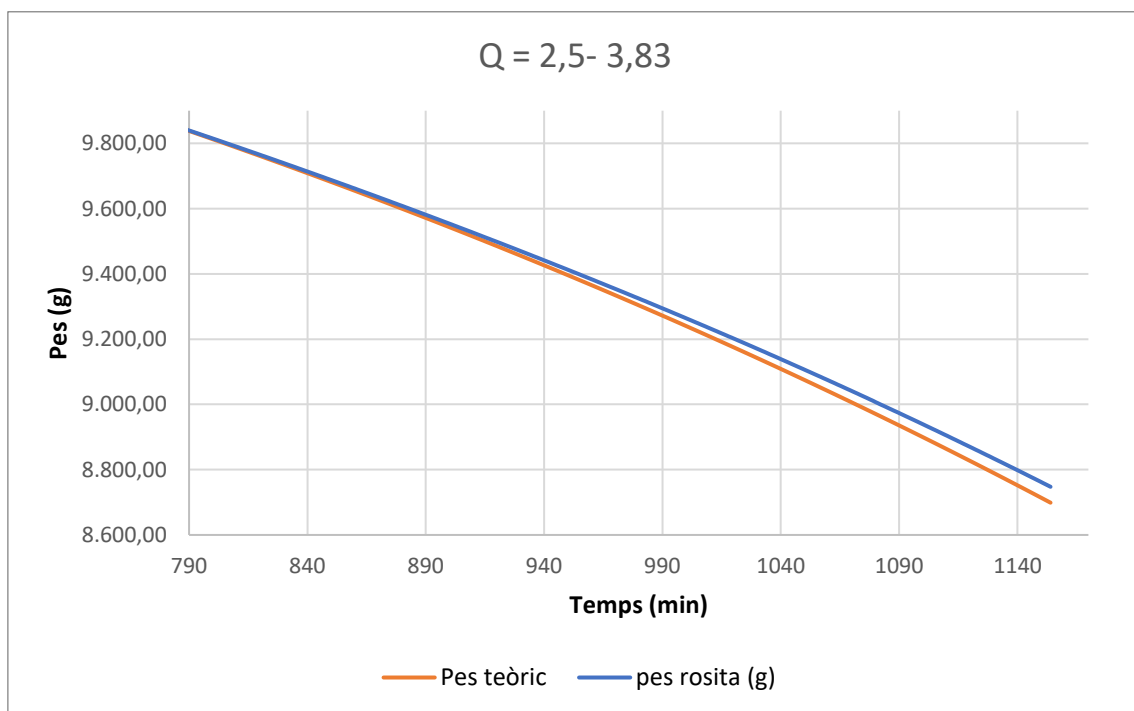


Figura 58: Assaig del cabal amb perfil exponencial fase 2.5-3.83 g/min

Taula 25: Diferència de pes d'inici fins al punt mig.

PUNT MIG Q = 1 - 2,5 G/MIN

	Final	Afegit
Pes teòric (g)	9.850,51	1.283,99
Pes real (g)	9.851,70	1.282,80
Diferència		1,19
Error		0,09%

Taula 26: Diferència de pes del punt mig fins al final.

PUNT MIG Q = 2,5 - 3,84 G/MIN

	Final	Afegit
Pes teòric (g)	9.848,02	1.149,22
Pes real (g)	9.849,30	1.101,80
Diferència		47,42
Error		4,30%

10.13 Gràfica profile amb diferents cabals

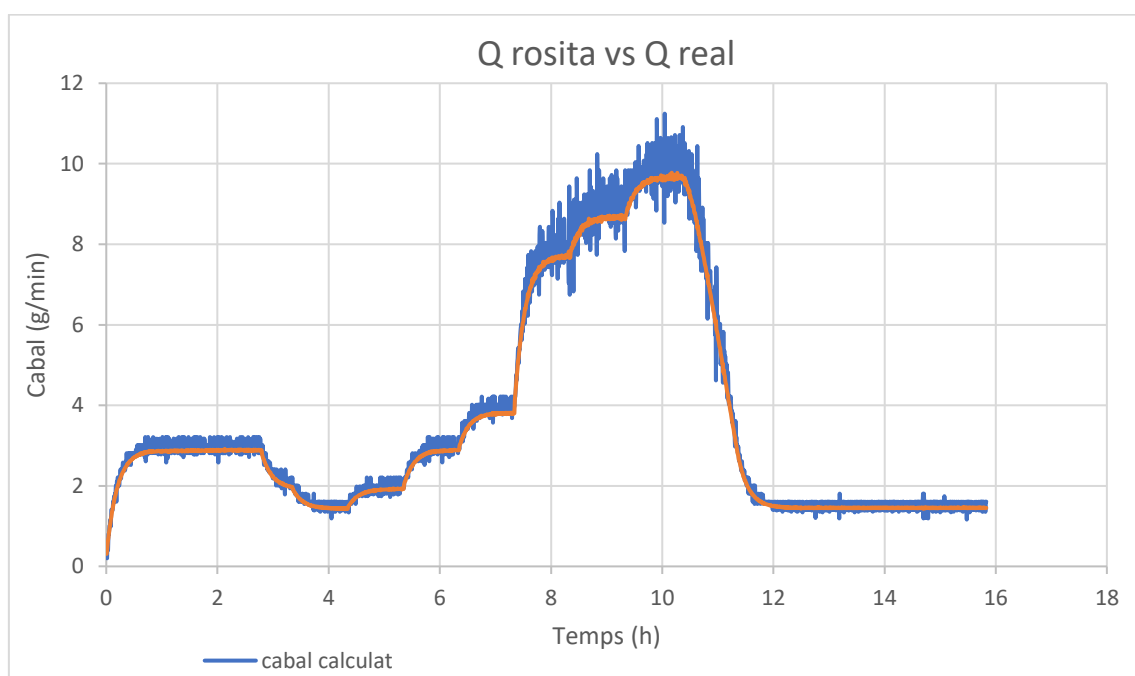


Figura 59: Assaig del cabal constant amb profile pre-programat.