



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

Mejora de la expresión de proteínas recombinantes mediante la sobreexpresión del gen *DAS1* en *Komagataella phaffii* Mut+: un enfoque metabólico para aumentar el flujo de carbono en la vía de asimilación del metanol

Tesis para optar al grado de doctor en biotecnología

Alumno: Johan Quezada Olguín

Profesor Patrocinante: Dr. Julio Berríos Araya

Valparaíso, agosto 2026

CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo: *Mejora de la expresión de proteínas recombinantes mediante la sobreexpresión del gen DAS1 en Komagataella phaffii Mut+: un enfoque metabólico para aumentar el flujo de carbono en la vía de asimilación del metanol*

Nombre del candidato: *Johan Quezada Olguín*

Carrera / Grado: *Doctorado en Biotecnología*

Campus: *Casa Central* Departamento: *Dirección de Posgrado*

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, **Julio Berríos Araya**, en mi calidad de director del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO** contiene información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por (marcar una opción):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis: *Dr. Julio Berríos Araya*

Fecha: 08 de septiembre de 2026 Firma: _____

Estudiante o Candidato(a): *Johan Quezada Olguín*

Fecha: 08 de septiembre de 2026 Firma: _____

Quisiera agradecer al Dr. Julio Berríos, por su apoyo, paciencia y guía, al igual que a la Dra. Stephanie Braun y todo el equipo de trabajo que ha sido parte de esta investigación. También agradecer a Rocío Cosmar y el equipo de trabajo del Dr. Patrick Fikers, por el desarrollo de las levaduras modificadas genéticamente que se utilizaron en esta tesis. Al Dr. Andrés Suazo, por su invaluable trabajo en el análisis de flujos metabólico que ayudó a entender los resultados más complejos.

Sin falta quisiera agradecer y dedicar este trabajo a mi familia. A mi madre, que incondicionalmente ha estado a mi lado, empujando y empujando sin descanso para verme crecer y lograr cada meta que me he propuesto en la vida. Mi hermana, que por difícil que sea el camino, nunca me dejó bajar los brazos.

no podría nombrar a cada persona que ha sido partícipe de este proceso, pero agradezco infinitamente cada palabra de aliento, cada consejo, cada sonrisa que me permitió seguir avanzando. Rhonda, Cristal, sin ustedes jamás habría terminado este trabajo, su compañía y amor le dieron sentido a cada día, cada esfuerzo, a cada traspaso de trabajo en el laboratorio, haciendo horas extras que se transformaron en momentos para recordar y reír.

Pasar por el doctorado me permitió conocer personas increíbles, que llegaron a mi vida a cambiarla por completo y poner todo de cabeza, vidas que se cruzaron con la mía y llegaron a llenarme de amor. En algunos casos dejaron de caminar a mi lado, aunque sólo espero que sigan avanzando, creciendo y amando con todas sus fuerzas.

Siento que siempre me dicen lo igual que soy a mi padre, pero en verdad lo que soy hoy en día es gracias a mi madre y a las grandes mujeres que han guiado y sido parte de mi vida. Y con ello, no puedo dejar de escribir a la mujer que más ha cambiado mi vida, mi pequeña Selene.

Hija mía, tu sabes como nadie lo difícil que ha sido este camino, nunca has soltado mi mano, y espero que todo el esfuerzo sirva para crear un mejor futuro juntos. Prometo que esta será la última tesis, pero recuerda, cada esfuerzo y cada dificultad nos llevan a crecer, aprender y transformar nuestra realidad. Nunca dejes de aprender y cuestionar el mundo, sin importar lo difícil que parezca, tu puedes. TE AMO.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	7
2.	INTRODUCCIÓN	8
2.2	<i>Metabolismo de metanol</i>	9
2.3	<i>Desafíos asociados al metabolismo de metanol.</i>	10
2.5	<i>Ingeniería genética</i>	13
2.6	<i>Sobreexpresión de DAS1 en K. phaffii Mut⁺</i>	14
2.7	<i>Planteamiento del problema</i>	15
3.	HIPÓTESIS	16
4.	OBJETIVOS	16
4.1	<i>Objetivo General</i>	16
4.2	<i>Objetivos específicos</i>	16
5.	METODOLOGÍA	17
5.1	<i>Métodos analíticos</i>	17
5.1.1	<i>Biomasa</i>	17
5.1.2	<i>Metanol</i>	17
5.1.3	<i>Medición de ácidos orgánicos</i>	17
5.1.4	<i>Análisis de actividad lipasa</i>	17
5.2	<i>Medios de cultivo e inóculos para cultivo</i>	18
5.3	<i>Cepas de Komagataella phaffii</i>	18
5.4	<i>Cultivos en matraz</i>	19
5.5	<i>Análisis transcriptómico</i>	20
5.6	<i>Gradiente de concentración de metanol inicial</i>	20
5.7	<i>Cultivo en reactor por lote</i>	21
5.8	<i>Análisis de flujo metabólico</i>	22
5.9	<i>Cultivo en reactor por lote alimentado</i>	22
5.10	<i>Estimación de parámetros cinéticos</i>	23
5.11	<i>Análisis estadístico</i>	26
6.	RESULTADOS	27
6.1.	<i>Efecto de la Concentración de Metanol en la Cinética de Crecimiento</i>	27
7.2	<i>Evaluación de la Productividad de Lipasa</i>	28
7.3	<i>Validación de Perfiles Cinéticos en Matraz</i>	29
6.4.	<i>Análisis Transcripcional</i>	31
6.5.	<i>Respuesta a Estrés Celular</i>	34

6.6.	<i>Análisis de Flujo Metabólico</i>	34
7.	DISCUSIÓN.....	38
7.1.	<i>Justificación de la estrategia de ingeniería metabólica: El rol de DAS1</i>	38
7.2.	<i>Evaluación de la fuerza del promotor en DAS1 sobre el desempeño cinético y productivo..</i>	38
7.3.	<i>Tolerancia a la inhibición por metanol: Análisis de la constante K_i</i>	39
7.4.	<i>Comparación de productividades y consumo de metanol</i>	40
7.5.	<i>Análisis transcripcional y correlación de expresión cruzada</i>	42
7.6.	<i>Análisis fisiológico de la cepa +DAS1 en cultivo controlado por lote</i>	43
7.6.1.	<i>Sobreexpresión de DAS1 y su efecto sobre el flujo de carbono en la oxidación de metanol.</i>	45
7.7.	<i>Estrategias de adaptación celular: Respuesta al estrés redox</i>	46
7.8.	<i>Optimización de la vía de secreción: El impacto de Pdi en la eficiencia de CalB</i>	46
7.9.	<i>El fenotipo de producción desacoplada en cultivos de alta densidad</i>	48
7.9.1.	<i>Disminución del consumo de oxígeno en cultivo de alta densidad de células</i>	49
7.10.	<i>Contraste con la ingeniería metabólica clásica de la vía del metanol</i>	50
7.11.	<i>Limitaciones del estudio y proyecciones futuras: Hacia la optimización del bioproceso</i>	50
8.	CONCLUSIONES	51
9.	Bibliografía	53
Anexo 1		64
Anexo 2: Productividad		65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta metabólica de utilización de metanol en <i>K. phaffii</i>	10
Figura 2: Tasa específica de crecimiento frente a la concentraciones crecientes de metanol inicial	28
Figura 3: Productividad de CalB a concentraciones crecientes de metanol inicial	29
Figura 4: Cinética de crecimiento y consumo de sustrato durante cultivo en matraz.	30
Figura 5: Parámetros cinéticos durante cultivo en matraz.....	30
Figura 6: Productividad de CalB durante cultivo en matraz.....	31
Figura 7: Expresión relativa de genes regulados por metanol 12 horas de cultivo en matraz.	32
Figura 8: Parámetros cinéticos y productivos obtenidos durante cultivo por lote en reactor.	33
Figura 9: Expresión relativa de genes asociados al metabolismo del metanol y estrés celular.	34
Figura 10: Flujo de carbono a través de la ruta de oxidación de metanol análisis de balance de flujo metabólico.	35
Figura 11: Parámetros cinéticos y productivos obtenidos durante el cultivo en lote alimentado.	36
Figura 12: Análisis de componentes extracelulares durante cultivo por lote en reactor.....	47
Figura 13: Perfil de proteínas en sobrenadante durante cultivo por lote	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características principales de las cepas de estudio en esta investigación.....	19
Tabla 2: Listado de partidores utilizados para análisis de expresión transcripcional por qPCR.	21
Tabla 3: Constantes cinéticas de <i>K. phaffii</i> con sobreexpresión de <i>Das1</i> bajo el control de diferentes promotores, determinados mediante modelo de Monod con inhibición por sustrato.	27
Tabla 4: Parámetros cinéticos globales en cultivo por lote en reactor, con metanol como única fuente de carbono y energía.	32
Tabla 5: Parámetros cinéticos utilizados en balance de flux de carbono, a partir de cultivo en reactor por lote con metanol como única fuente de carbono y energía entre 8 y 12 horas de cultivo.	35
Tabla 6: Parámetros cinéticos en reactor en cultivo por lote alimentado, determinados en las últimas 10 horas de alimentación a flujo constante de metanol.	37
Tabla 7: Parámetros cinéticos reportados en <i>Komagataella phaffii</i> cultivada en metanol.	39

1. RESUMEN

La levadura *Komagataella phaffii* (anteriormente *Pichia pastoris*) se ha consolidado como una plataforma biotecnológica esencial para la producción de proteínas recombinantes, gracias a su capacidad para alcanzar altas densidades celulares y utilizar metanol como inductor fuerte y fuente de carbono. Sin embargo, el metabolismo oxidativo del metanol presenta desafíos significativos, tales como una alta demanda de oxígeno, generación de calor y la acumulación de metabolitos tóxicos como el formaldehído, factores que limitan la eficiencia del bioproceso a escala industrial.

En este contexto, la presente investigación abordó estos desafíos mediante una estrategia de ingeniería metabólica centrada en la sobreexpresión del gen *DAS1* (dihidroxiacetona sintasa 1), con el objetivo de redirigir el flujo de carbono desde formaldehído hacia la vía asimilativa, esperando mejorar así la productividad y la robustez celular. Para evaluar esta hipótesis, se construyeron cepas Mut⁺ productoras de lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), modificadas con una copia adicional de *DAS1* bajo la regulación de promotores de distinta fuerza: P_{AOX1} (alcohol oxidasa 1, inducible), P_{GAP} (gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa, constitutivo fuerte) y P_{MDH3} (malato deshidrogenasa 3, constitutivo débil).

La caracterización cinética inicial permitió determinar que la regulación constitutiva fuerte bajo el promotor P_{GAP} (cepa denominada +DAS1) presentó las mejores propiedades, destacando una constante de inhibición (K_i) significativamente mayor al control y una ventaja productiva en etapas tempranas de cultivo. Durante los cultivos controlados en biorreactor por lote, la cepa +DAS1 demostró un incremento del 30% en la productividad volumétrica de proteína recombinante. A nivel fisiológico, este aumento se correlacionó con una inesperada sobreexpresión transcripcional colateral de los genes *AOX1* y *CalB*, junto con la activación de marcadores de estrés oxidativo del peroxisoma (*PMP20*, *CAT1*) y de plegamiento en el retículo endoplasmático (*PDI*).

Contrario a la hipótesis inicial de un aumento en la asimilación de metanol, el análisis de flujo metabólico reveló que la mejora productiva se ve limitada durante la gestión intracelular del carbono, generando el desvío hacia subproductos y limitando el aumento de la síntesis de biomasa y producto recombinante. Finalmente, en condiciones de alta densidad de células en cultivo por lote alimentado, la cepa +DAS1 exhibió un fenotipo de "producción desacoplada" de alto interés industrial. La levadura fue capaz de mantener la productividad específica de CalB a pesar de operar a una tasa de crecimiento casi nula y con un consumo reducido de oxígeno y metanol respecto de la cepa control. Estos hallazgos validan la sobreexpresión constitutiva de *DAS1* como una estrategia efectiva para aumentar la productividad volumétrica de proteína recombinante, desacoplando la formación de producto del crecimiento celular, optimizando el rendimiento energético y reduciendo los requerimientos de oxígeno durante el proceso.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Komagataella phaffii* en la producción de proteína recombinante

Las levaduras metilotróficas, comúnmente conocidas como *Pichia pastoris* fueron reagrupadas en 1995 dentro del género *Komagataella*, siendo *Komagataella phaffii* la especie principal utilizada en biotecnología [1]. Si bien existen 6 especies dentro del género, tanto *K. pastoris* como *K. phaffii* han sido utilizadas históricamente para la producción de proteínas recombinantes, aunque análisis de secuencias multigénicas han determinado que la mayoría de las cepas biotecnológicas corresponden a *K. phaffii* [1,2].

Komagataella phaffii es actualmente uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más usado, tanto a escala de laboratorio como industrial [3,4] en conjunto con *Escherichia coli* y las células de ovario de hámster chino (CHO). Aunque *K. phaffii* secreta proteínas recombinantes de manera menos eficiente que las células CHO, permite rendimientos espacio-temporales más altos para proteínas menos complejas, lo que la posiciona como una fábrica celular versátil [5].

En el campo de la farmacéutica, es posible encontrar proteínas como la insulina, el antígeno de superficie de hepatitis B, albúmina de suero humano y el factor de crecimiento epidermal, entre otros [6]. Mientras que, en el campo de la biotecnología industrial, se utiliza *K. phaffii* para la producción de enzimas de valor comercial y tecnológico como fitasas, lipasas, mananasas, xilanasas, entre otras [7], expandiéndose hacia enzimas críticas para la industria alimentaria y de piensos, tales como amilasas y glucoamilasas termoestables [8]. La demanda global de estas enzimas ha experimentado un crecimiento sostenido en los últimos 20 años, con una tasa de crecimiento anual compuesta proyectada del 5.0% para el período 2022-2028, lo que subraya la necesidad crítica de desarrollar cepas productoras más eficientes y robustas para satisfacer este mercado [8].

Entre las ventajas que presenta *K. phaffii* frente a otros sistemas de producción de proteínas recombinantes, se encuentra su condición de Crabtree negativo, lo que le permite realizar cultivos en condiciones aeróbicas para llegar a altas densidades celulares sin acumular cantidades importantes de etanol a diferencia de otras levaduras [9]. Además, es posible utilizar un medio de cultivo simple y económico, expresar altos niveles de proteína recombinante tanto de forma intracelular como extracelular, realizar modificaciones metabólicas en las vías de glicosilación para simular un sistema organismos eucariotas mayores [10] y posee el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) otorgado por la Administración de alimentos y medicamentos de E.E.U.U. (FDA) [11,12].

Como levadura metilotrófica, es capaz de oxidar metanol para la producción de energía y asimilarlo como única fuente de carbono para el crecimiento celular y la formación de productos [13]. Entre varios factores, la presencia del promotor alcohol oxidasa 1 (P_{AOX1}), genera interés debido a sus características de promotor fuerte y altamente

regulado por la presencia de metanol [14–16]. Sin embargo, el crecimiento en metanol presenta desafíos tecnológicos para la producción industrial, dado que presenta una alta demanda de oxígeno, alta producción de calor y la acumulación de compuestos tóxicos durante la fase de inducción con metanol [17,18].

2.2 Metabolismo de metanol

Todas las levaduras metilotróficas utilizan una vía común de oxidación de metanol (Mut), la cual consiste en un set de enzimas que se expresan tanto a nivel de peroxisoma como en el citoplasma [19]. Al utilizar esta levadura como sistema de expresión de proteínas recombinantes, el metanol tiene un doble propósito, como fuente de carbono a través de la vía Mut y como inductor de la expresión de las proteínas recombinante a través de la regulación de P_{AOX1} .

El metanol es oxidado en el primer paso por la enzima alcohol-oxidasa, esta enzima es producida por dos genes, *AOX1* y *AOX2*, los cuales poseen un 92% de homología en su secuencia nucleotídica y un 97% en su secuencia de aminoácidos [20]. Sin embargo, sus regiones promotoras son diferentes, donde el P_{AOX1} produce aproximadamente el 90% de la alcohol-oxidasa durante la inducción de metanol, por lo que es el promotor inducible más usado en los constructos de expresión de proteína recombinante [21,22]. La regulación de este promotor es compleja y altamente controlada por una cascada de factores de transcripción; se ha identificado que activadores como Mit1, Mxr1 y Prm1 responden a la presencia de metanol activando la expresión, mientras que represores como Nrg1, Mig1 y Mig2 inhiben el promotor en presencia de fuentes de carbono preferidas como glucosa o glicerol [23].

Debido a lo antes expuesto, es que *K. phaffii* puede ser clasificada en tres fenotipos según su capacidad de metabolizar metanol, donde la cepa silvestre es capaz de metabolizar metanol eficientemente Mut^+ , con ambos genes *AOX1* y *AOX2* activos. Mut^S , presenta una utilización lenta de metanol ya que posee una capacidad limitada para metabolizar metanol debido a la delección del gen *AOX1* [24] o la mutante Mut^- , incapaz de metabolizar metanol debido a la delección de ambos genes *AOX1* y *AOX2* [25,26]. Recientemente se ha demostrado que cepas Mut^- pueden utilizar metanol mediante la actividad de la alcohol deshidrogenasa nativa Adh2, ampliando el entendimiento de este metabolismo [27].

En la Figura 1 se resume la ruta metabólica de oxidación de metanol, donde en la primera reacción se forman formaldehído (HCHO) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este punto la ruta metabólica se divide entre la vía asimilativa y la disimilativa. En la vía disimilativa, el formaldehído sale del peroxisoma y se une espontáneamente al glutatión (GSH) para formar S-(hidroximetil)glutatión, este es transformado a formato y luego a dióxido de carbono (CO_2), lo que genera dos moles de NADH por cada mol de metanol. Por otra parte, la vía asimilativa comienza con la reacción de la enzima dihidroxiacetona sintasa (Das1/2), transformando el formaldehído en xilulosa-5-fosfato (Xu5P), lo que convierte 3 moles de formaldehído en un mol de gliceraldehido-3-fosfato (GAP),

además, Xu5P es regenerado mediante una ruta cíclica (Ciclo Xu5P), el cual considera reacciones de la vía de las pentosas [28].

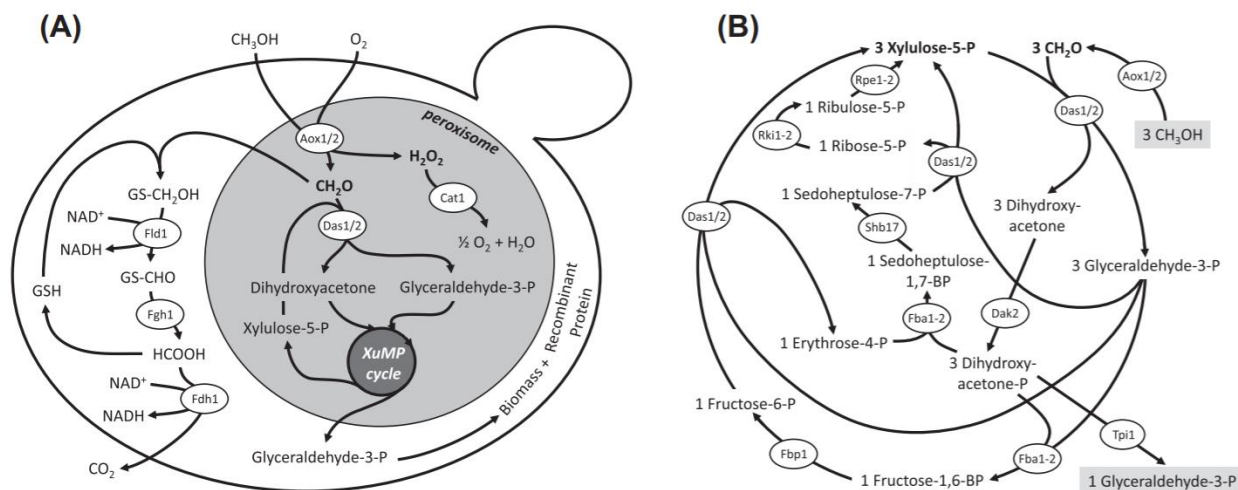


Figura 1: Ruta metabólica de utilización de metanol en *K. phaffii*: (A) Resumen de las rutas de asimilación y disimilación de metanol. (B) Ciclo de la xilulosa monofosfato (XuMP) de la asimilación de metanol. Metabolitos entrando y saliendo del peroxisoma son marcados en los cuadros grises. **GSH:** glutatión reducido; **GS-CH₂OH:** S-(hidroximetil)glutatión; **GS-CHO:** S-formil glutatión; **Cat1:** catalasa; **Fld1:** folmaldehído deshidrogenada; **Fgh1:** S-formil glutatión hidrolasa; **Fdh1:** formato deshidrogenasa; **Aox1/2:** Alcohol oxidasa 1 y 2; **Das1/2:** dihidroxiacetona sintasa 1 y 2; **Dak2:** dihidroxiacetona kinasa; **Tpi1:** triosafosfato isomerasa; **Fba1/2:** fructosa 1,6-bifosfato aldolasa; **Fbp1:** fructosa 1,6-bifosfatasa; **Shb17:** sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa; **Rki1/2:** ribosa 5-fosfato ketol-isomerasa; **Rpe1/2:** D-ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa [29,30].

Si bien, clásicamente se ha postulado que el ciclo Xu5P ocurre en el citoplasma, donde el transporte de Xu5P desde el citoplasma al peroxisoma requeriría de transporte activo [31] Rußmayer y colaboradores en 2015 describen que todo el ciclo se localiza dentro del peroxisoma, utilizando un grupo de enzimas especializadas codificadas por duplicado en el genoma y reguladas por metanol [32].

2.3 Desafíos asociados al metabolismo de metanol.

2.3.1 Baja tasa de crecimiento

K. phaffii alcanza una tasa específica de crecimiento máxima (μ_{MAX}) de entre 0,28 y 0,32 h^{-1} en glucosa, sin embargo, esta reprime fuertemente la expresión de P_{AOX1} , por lo que este azúcar no es utilizado en procesos de expresión de proteína recombinante bajo el control de este promotor [33]. Al utilizar metanol como única fuente de carbono, la tasa de crecimiento aparente (experimental) se encuentra en rangos de 0,08 - 0,11 h^{-1} en una cinética de Monod, mientras que la tasa específica de crecimiento máxima teórica se sitúa en 0,14 h^{-1} [33,34]. Sin embargo, no es posible alcanzar esa tasa de crecimiento debido a los efectos inhibitorios asociados al metabolismo de metanol [34].

1.1.1. Consumo de oxígeno y producción de calor

La actividad metabólica asociada al crecimiento celular y su mantenimiento genera energía en forma de calor, entendiendo el proceso como una reacción exérgica [35,36]. La cantidad de calor que es generado durante el proceso es variable según parámetros como el tipo de células, la fuente de carbono, el aceptor de electrones (Ej. Oxígeno), tasa de crecimiento, concentración de biomasa, entre otros. El metabolismo de metanol se vuelve tan ineficiente como su primer paso de oxidación por acción de la alcohol oxidasa, la cual requiere una transferencia directa de electrones desde el metanol hacia el oxígeno, lo que demanda altas cantidades de oxígeno y genera calor excesivo [14]. Este problema se vuelve muy relevante durante cultivos a mayor escala, donde la transferencia de calor puede ser un factor limitante del bioproceso [37].

2.3.2 Acumulación de metabolitos tóxicos

Como se ha mencionado anteriormente, el metabolismo de metanol produce dos productos desde su primera reacción, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y formaldehído (HCHO). Wakayama y colaboradores en 2016, han demostrado que las limitaciones en el crecimiento durante la inducción con metanol no se relacionan directamente con la concentración de éste, sino más bien con la acumulación de formaldehído durante su oxidación [38].

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno (ej. H_2O_2) generan daño oxidativo en biomoléculas esenciales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, además, su acumulación se asocia directamente con la muerte celular programada o apoptosis y la senescencia celular en levaduras [39]. Durante el metabolismo de metanol, los lípidos de la membrana del peroxisoma reaccionan con radicales hidroxilo derivados de peróxido de hidrógeno, estas moléculas tóxicas son eliminadas por la acción de dos enzimas centrales en la respuesta antioxidante en el peroxisoma, Pmp20 (glutatión peroxidasa) y catalasa [40,41]. Estudios transcripcionales han demostrado que, durante la fase de inducción con metanol, en cultivos de lote alimentado, aumenta de forma considerable la expresión de genes asociados a respuesta frente a estrés oxidativo, principalmente *PMP20* [42]. Este sistema se encuentra regulado por el factor transcripcional Yap1 de *K. phaffii* (KpYap1), y le permite a la célula responder específicamente frente a la acumulación de especies reactivas de oxígeno y formaldehído [43,44].

Por otra parte, durante la sobreexpresión de proteínas recombinantes se produce estrés oxidativo que no deriva directamente desde el metabolismo de metanol. En este contexto, existe el aumento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno, principalmente H_2O_2 , como derivado de la formación enzimática de enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico [45]. Además, la acumulación de proteínas en el retículo endoplásmico durante la fase de inducción suele generar mal plegamiento de éstas, lo que activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), y por consecuencia un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la proteólisis inducida [46,47]. Adicionalmente, la sobreexpresión de genes recombinantes puede saturar la maquinaria secretora innata de la célula, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (ER). Este fenómeno desencadena la respuesta UPR, mediante una cascada de señalización destinada

a restaurar la homeostasis con la activación del factor de transcripción Hac1, el cual regula positivamente la expresión de chaperonas como Kar2 y Pdi1 [48]. Sin embargo, si el estrés se prolonga debido a una alta carga metabólica, el sistema puede derivar en la degradación de proteínas vía ERAD (degradación asociada al retículo endoplásmico), disminuyendo significativamente la productividad. De hecho, se ha observado que la degradación del intracelular producto total en ciertos casos puede ser hasta el 60%, lo que subraya la importancia de equilibrar la tasa de síntesis proteica con la capacidad de plegamiento y secreción [48].

Considerando lo expuesto, se evidencia el profundo impacto metabólico que conlleva la sobreexpresión de proteínas recombinantes bajo inducción con metanol en *K. phaffii*, respecto del estrés oxidativo asociado al bioproceso. A nivel fisiológico, la principal herramienta para contrarrestar los efectos negativos de esto es el sistema redox de glutatión, el cual juega un papel crucial durante el crecimiento en metanol [43,44].

2.4 Estrategias de optimización de productividad

Las estrategias de optimización se pueden agrupar en la modificación de parámetros de cultivo y la tecnología asociada al bioproceso [49], o herramientas de ingeniería genética que permitan modular los efectos negativos en la levadura durante la sobreexpresión de proteína recombinante [50].

2.4.1 Condiciones de cultivo

Una de las estrategias más utilizadas para el mejoramiento del proceso, es la mezcla de metanol con una segunda fuente de carbono. Con glicerol o glucosa, *K. phaffii* presenta velocidades de crecimiento entre 1,5 y 8 veces más rápida que con metanol, tomando en consideración que la glucosa o el glicerol generan represión sobre P_{AOX1} , estos son utilizados secuencialmente [51]. Al utilizar glicerol o sorbitol como fuente de carbono en conjunto a metanol, es posible disminuir las tasas de consumo de metanol, lo que genera aumentos en la productividad volumétrica debido al aumento en la velocidad de crecimiento y la disminución en la generación de calor y demanda de oxígeno [51–53]. También se ha demostrado la relevancia de la estrategia de alimentación de metanol durante cultivos co-alimentados con sorbitol [54].

Otro parámetro para considerar es la tasa específica de crecimiento, donde se observa una tendencia donde a menor tasa específica de crecimiento en metanol, se genera mejor productividad de proteína recombinante [49]. Esta situación se atribuye a que la maquinaria celular se concentra en la producción de proteína recombinante por sobre el crecimiento celular, disminuyendo los requerimientos energéticos de mantención y aumentando la viabilidad celular [55].

Por otra parte, el oxígeno disponible se posiciona como un recurso clave a la hora de optimizar el proceso de producción. Dado que puede utilizarse como reactivo limitante durante la fase de inducción, se ha mostrado que, a menor tasa de transferencia de oxígeno, aumenta la productividad volumétrica durante el cultivo [56,57]. Bajo

determinadas condiciones, una limitación moderada de oxígeno podría contribuir al equilibrio de la ruta MUT al ajustar la velocidad de oxidación del metanol a la capacidad celular de asimilar o detoxificar el formaldehído. Este ajuste podría mejorar el desempeño productivo al reducir el estrés metabólico, siempre que la disponibilidad de oxígeno continúe siendo suficiente para satisfacer las demandas respiratorias y energéticas [58–61].

2.5 Ingeniería genética

La co-sobreexpresión de proteínas que colaboren en el proceso de producción de proteína recombinante es una estrategia ampliamente utilizada en los diferentes sistemas de expresión. Algunos ejemplos en *K. phaffii* intentan remediar los efectos negativos de la sobreexpresión de proteínas, es el caso de la co-sobreexpresión del factor transcripcional Yap1, el cual favorece la regulación del estrés oxidativo generado por el proceso, y aumenta considerablemente la productividad mediante la modulación en la expresión de más de 150 genes, generando el aumento al doble de la producción de tripsina recombinante [62,63].

Otros ejemplos de este tipo de modificaciones han logrado obtener aumentos entre 1,07 y 3,8 veces [64], entre ellos se encuentra la sobreexpresión de la proteína disulfuro isomerasa (Pdi), encargada de la formación de enlaces disulfuro en el retículo endoplasmático [65,66]. Adicionalmente, la co-expresión de chaperonas como Kar2 ha demostrado mejorar la secreción de fragmentos de anticuerpos de cadena única, sugiriendo que la optimización del plegamiento es clave para proteínas complejas [67]. Estrategias combinacionales que incluyen optimización de codones, dosis génica y co-expresión de chaperonas han probado ser efectivas para aumentar la producción de enzimas como la lisozima humana [68].

Además de la maquinaria de plegamiento, la ingeniería metabólica enfocada en el suministro de energía y cofactores ha cobrado relevancia, dado que la producción y secreción de proteínas genera una alta carga metabólica y desbalance redox. Por ejemplo, la sobreexpresión de genes que codifican enzimas generadoras de NADPH, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*ZWF1*) y la 6-gluconolactonasa (*SOL3*), ha demostrado mejorar la productividad de proteínas recombinantes al aliviar el desbalance redox intracelular [64]. Asimismo, el desarrollo de nuevas herramientas genéticas, como el sistema CRISPR/Cas9, ha facilitado la edición precisa del genoma en *K. phaffii*, permitiendo la integración multigénica y la regulación fina de la expresión mediante la modificación de promotores y terminadores, lo cual es fundamental para redirigir los flujos metabólicos de manera eficiente [23].

Por otra parte, GoldenPiCS, se presenta como una herramienta útil siendo un sistema modular de clonación derivado del sistema Golden Gate, pero enfocado en levaduras. Puede utilizarse para la ingeniería de cepas de *K. phaffii*, con el fin de lograr la expresión de vías y la producción de proteínas u otras aplicaciones que requieren la integración de diversos productos de ADN. Permite el ensamblaje de hasta ocho unidades de expresión en un plásmido, con la capacidad de utilizar diferentes promotores y terminadores caracterizados para cada unidad de expresión [69].

Interesantemente, se ha reportado que la expresión heteróloga de NADH oxidasa en *K. phaffii* productora de CalB aumentó la disponibilidad de NAD⁺, el consumo de metanol y la producción de la proteína recombinante. Esta modificación también incrementó los transcritos de *DAS1* y *FLD1*, así como la actividad de formaldehído deshidrogenasa. Los autores propusieron que la disponibilidad NAD⁺ limitaba la actividad de Fld1 y, por tanto, el flujo de la vía disimilativa del metanol.[70] Posteriormente, la co-expresión de adenilato quinasa permitió recuperar la carga energética reducida por la NADH oxidasa y elevó aún más la actividad de CalB recombinante. Estos resultados sugieren que la capacidad para metabolizar formaldehído puede restringir directamente el metabolismo de metanol [70].

2.6 Sobreexpresión de *DAS1* en *K. phaffii* Mut⁺

Considerando lo anteriormente expuesto, llevar el flujo de carbono del metabolismo de metanol hacia la vía asimilativa de metanol, sugiere ser una interesante alternativa para disminuir la acumulación de formaldehído y aumentar la productividad de proteína recombinante. Con este objetivo, en nuestro grupo de investigación, se ha generado una cepa mutante capaz de sobreexpresar la enzima Das1 en *K. phaffii* Mut⁺, la cual ha presentado resultados preliminares bastante prometedores. Entre estos avances, enmarcados en el proyecto FONDECYT 1191196, es posible mencionar que esta cepa es hasta 3 veces más tolerante al formaldehído y presenta un μ MAX un 30% mayor respecto de la cepa control [59]. Estos resultados sugieren el aumento en la eficiencia del consumo de metanol, y es con esta base que se busca desarrollar una estrategia de producción de proteína recombinante basada en esta nueva mutante metabólica.

La sobreexpresión de *DAS1* en *K. phaffii* ha sido reportada anteriormente [71]. En el estudio de Krainer y colaboradores de 2012, utilizando cepas con el fenotipo Mut^S, la sobreexpresión de *DAS1* resultó en un aumento de hasta 3 veces en el rendimiento de conversión de metanol a producto como la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) [64,71]. Sin embargo, en ese caso se observó una disminución de la productividad volumétrica respecto del control. Como se menciona anteriormente, las cepas Mut^S poseen una capacidad limitada de metabolizar metanol, dada por su deficiencia de *AOX1*, por lo que el aumento de *DAS1* podría no tener los efectos positivos esperados, ya que se encuentra limitado por este paso previo de la ruta metabólica. A pesar de esto, es importante destacar que la manipulación de la vía Mut ha mostrado resultados prometedores en la mejora del rendimiento de conversión sustrato-producto (*Yp/s*).

Esto sugiere que la redistribución del flujo metabólico hacia la asimilación, mediante la acción de la dihidroxiacetona sintasa, no solo provee el carbono necesario para la biomasa y el mantenimiento energético, sino que también podría mitigar la toxicidad por formaldehído al canalizarlo eficientemente hacia la formación de dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato [64].

Durante el desarrollo de la presente investigación, se pretende avanzar en el entendimiento de los efectos de la sobreexpresión de *DAS1* sobre el metabolismo de metanol, el equilibrio redox y la expresión de proteína recombinante en *Komagataella phaffii*.

2.7 Planteamiento del problema

La utilización de metanol como inductor de expresión y fuente de carbono, requiere un cuidadoso control, dado que su metabolización genera efectos inhibitorios en el crecimiento celular y la productividad del proceso. Durante la oxidación del metanol se generan especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, moléculas peroxidadas y formaldehído como intermediarios, las cuales deben ser removidas para evitar daños al sistema y pérdida de productividad.

Por ello, uno de los principales desafíos para la producción eficiente de proteínas reside en la limitación en la fase de inducción con metanol, donde el formaldehído no es asimilado de forma óptima por las células, generando por una parte daño por la acumulación de metabolitos tóxicos y reducción de la viabilidad; por el otro, una pérdida de carbono que podría utilizarse para generar energía y biomasa.

Para abordar este cuello de botella se utiliza una cepa mutante de *Komagataella phaffii* Mut⁺, la cual sobreexpresa el gen de la proteína Das1, se espera que esta estrategia desplace el equilibrio de la reacción de oxidación de formaldehído hacia la vía de asimilación de este metabolito. De esta forma, se busca evitar la acumulación de formaldehído y aumentar la tolerancia de la levadura a altas concentraciones de éste durante la fase de inducción con metanol. Considerando el aumento en la disponibilidad de energía generada por la asimilación de metanol hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la disminución en la acumulación de formaldehído, es aceptable considerar que este sistema aumente su eficiencia de expresión y secreción de proteínas recombinantes.

Sin embargo, se desconocen los efectos que puede generar la sobreexpresión de *DAS1* y el consecuente desplazamiento del flujo de carbono hacia la vía asimilativa de metanol, sobre los parámetros cinéticos y productivos de *Komagataella phaffii*. Si bien se espera un efecto positivo respecto de la disminución del formaldehído acumulado, es posible que el aumento en el consumo de metanol genere otros inconvenientes, como la acumulación de especies reactivas de oxígeno o el aumento en la demanda de oxígeno, lo cual afectaría directamente la productividad del sistema.

A partir de lo anteriormente expuesto, es que durante el desarrollo de este trabajo se pretende evaluar los efectos de la sobreexpresión de *DAS1* sobre el metabolismo de metanol y su interacción con los parámetros de cultivo, con el fin de desarrollar un proceso basado en esta cepa mutante que minimice la acumulación de especies reactivas de oxígeno y favorezca el aumento en la productividad volumétrica de proteína recombinante.

3. HIPÓTESIS

“La sobreexpresión de *DASI* en *Komagataella phaffii* Mut⁺ mejora significativamente la productividad de proteínas recombinantes, impulsada por un mayor flujo de carbono a través de la vía de asimilación de metanol, y se asocia con una perturbación de la homeostasis redox celular”.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de *DASI* en *Komagataella phaffii* Mut⁺ sobre la productividad de la proteína recombinante, el flujo de carbono a través de la vía de asimilación del metanol y los cambios asociados en la homeostasis redox celular.

4.2 Objetivos específicos

- 1-. Determinar la mejor estrategia de sobreexpresión de *DASI* en *K. phaffii* Mut⁺, bajo la regulación de diferentes promotores, que permita mejorar la productividad volumétrica de CalB.
- 2-. Evaluar el impacto de la sobreexpresión de *DASI* en el flujo metabólico de carbono dentro de la ruta de oxidación de metanol, su efecto en la productividad de proteína recombinante y la homeostasis redox durante cultivo por lote en reactor.
- 3-. Evaluar el impacto de la sobreexpresión de *DASI* en los parámetros cinéticos y productivos de *K. phaffii* Mut⁺, durante condiciones productivas de alta densidad de células en cultivo por lote alimentado.

5. METODOLOGÍA

5.1 Métodos analíticos

5.1.1 Biomasa

La biomasa se cuantificó mediante el método de peso seco de acuerdo con el protocolo descrito previamente [72]. Para ello, se cultivaron 50 mL de *K. phaffii* en medio YPD por 12h a 30°C con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, se recolectó por triplicado en tubos cónicos de 15 mL por centrifugación a 2500xG por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces con 10 mL de NaCl 150mM. Luego del último lavado, el pellet fue re suspendido en un volumen de 5 mL de la solución NaCl 150mM y trasladado a un crisol previamente secado durante 12 horas a 105°C y pesado hasta alcanzar un peso constante. La masa celular se obtuvo por diferencia y la concentración de biomasa se determinó dividiendo la masa celular en gramos por el volumen inicial de caldo de cultivo utilizado en litros.

El resto de cultivo se sometió a diluciones seriadas entre 1 y 200, posteriormente se midió la densidad óptica (D.O) de cada dilución a 600 nm. La concentración de biomasa de cada dilución ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), se estimó en función de la biomasa inicial de la muestra, para luego graficar D.O. v/s concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). A partir de la zona lineal de esta gráfica, se obtuvo la ecuación de conversión de D.O. a concentración de células.

5.1.2 Metanol

La concentración de metanol en medio de cultivo se determinó mediante cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés). Se usó un equipo Perkin-Elmer Clarus 500 con inyección manual y detector FID. Adicionalmente se utilizó una columna Supelco Equity-1 con un volumen de inyección de 0,1 μL usando isopropanol 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como estándar interno. Se diluyó 1:1 con el sobrenadante de cada muestra recolectada.

5.1.3 Medición de ácidos orgánicos

La concentración y perfil de ácido orgánicos en la fase líquida se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC; LC-2030C, Shimadzu). El HPLC estaba equipado con una columna MetaCarb 67H (300 mm x 6,5 mm, Agilent Technologies) con detector UV a una longitud de onda de 214 nm. La columna se operó a 55 °C y se utilizó H_2SO_4 0,01 N como eluyente a un caudal de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.1.4 Análisis de actividad lipasa

La actividad lipasa en sobrenadante, se analizó a partir del protocolo de Cabrera et al. en 2010 modificado. Para ello se mezclaron de 15 μL de sobrenadante (sustrato) con 0,4 mM de p-nitrofenol butirato (pNPB, stock 60 mM disuelto en acetonitrilo), y buffer fosfato de sodio 50 mM ajustado a pH 7, en un volumen final de 200 μL . La generación de producto (pNP) fue medida en un lector de placa de 96 pocillos Multiskan Sky 1530-800532C, Thermofisher a 398 nm, cada 30 segundos, durante 5 minutos.

5.2 Medios de cultivo e inóculos para cultivo

Las cepas fueron mantenidas en medio YPD (Extracto de levaduras 10 g·L⁻¹, peptona 20 g·L⁻¹ y dextrosa 10 g·L⁻¹) en caldo o medio sólido (agar-agar 15 g·L⁻¹), en caso de requerir selección, se adicionó zeocinaTM (Invitrogen) a una concentración final de 100 µg·mL⁻¹ como marcador de selección (YPD+Zeo).

El banco celular de cada cepa se realizó mediante el cultivo de una colonia aislada, inoculada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio YPD+Zeo. Se incubó durante 12 horas a 30 °C con agitación constante de 200 rpm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 2500 xG durante 5 minutos y re suspendidas en 10 mL de medio YPD con glicerol al 40% v/v, llevando a viales con tapa rosca, con 1 mL de suspensión y guardados a -80 °C hasta su uso.

Para cada ensayo realizado, se utilizó el medio mínimo descrito previamente por Krainer et. al en 2012. Este medio se denomina YNBm y está compuesto por buffer fosfato de potasio 100mM ajustado a pH 6, sulfato de amonio 10 g·L⁻¹, yeast nitrogen base sin aminoácidos (YNB BD DifcoTM Ref. 291940) 3,4 g·L⁻¹, biotina (Sigma-AldrichTM B4639) 0,4 mg·L⁻¹ y metanol a la concentración correspondiente a cada ensayo, previamente filtrado con filtro de 22 µm de PTFE.

5.3 Cepas de *Komagataella phaffii*

Con objeto de evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *DASI* como gen auxiliar durante la producción de proteína recombinante, se desarrollaron las nuevas cepas de *K. phaffii* sobreexpresoras de *DASI* a partir de una cepa *GS115* productora de Lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) con péptido señal de exportación αMF [73] con reversión de auxotrofia como marcador de selección [74]. Tanto la cepa parental productora de CalB (codificada como RIY308) como las nuevas cepas fueron desarrolladas en colaboración con el equipo de investigación del Dr. Patrick Fickers en Gembloux Agro BioTech, Universidad de Liège (*TERRA Teaching and Research Centre*).

Para la inserción del gen *DASI* de manera estable en el genoma, se utilizó como base el vector pIB4_BB3aZ incluido en el kit GoldenPiCS (Addgene N°1000000133) [75]. Los vectores correspondientes fueron diseñados y ensamblados por metodología HiFi assembly [76], en los que se generaron tres versiones de la unidad transcripcional para *DASI* recombinante. Uno bajo el control transcripcional del promotor con alta actividad transcripcional (fuerte) e inducible por metanol de alcohol oxidasa 1 (*P_{AOX1}*), otro constructo con *DASI* bajo el control transcripcional del promotor constitutivo fuerte de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*P_{GAP}*) y por último un constructo con *DASI* bajo el control del promotor de la enzima malato deshidrogenasa peroxisomal (*P_{MDH3}*), el cual presenta baja actividad transcripcional en cultivo con metanol, pero alta actividad con otras fuentes de carbono [75], detallado en la tabla 1.

Cada constructo generado, fue linealizado para su inserción por recombinación homóloga en el terminador de alcohol oxidasa 1 (*AOXTT*) ubicado en el locus PP7435_Chr4-0130, donde se seleccionó un clon de cada constructo con sólo una inserción en el genoma (evaluado por cuantificación relativa mediante qPCR).

La cepa utilizada como control en este estudio, deriva de la progenitora de las cepas en estudio (RIY308). Esta fue transformada con el vector pIB4_BB3aZ vacío, es decir, que no presenta el gen de interés (*DASI*), conteniendo la resistencia a Zeocina, presentando una única inserción en el genoma, al igual que las cepas en estudio.

Tabla 1: Características principales de las cepas de estudio en esta investigación

Nomenclatura	Sigla	Genotipo	Tamaño (a)	Marcador de selección
P_{AOX1}-<i>DASI</i>	(A)	pIB4(P _{AOX1} -CalB) His ⁺ / BB3aZ.14(P _{AOX1} - <i>DASI</i>)-Zeo ⁺	3295pb	YPD Zeo 100 µg·mL ⁻¹
P_{GAP}-<i>DASI</i>	(B)	pIB4(P _{AOX1} -CalB) His ⁺ / BB3aZ.14(P _{GAP} - <i>DASI</i>)-Zeo ⁺	2849pb	YPD Zeo 100 µg·mL ⁻¹
P_{MDH3}-<i>DASI</i>	(C)	pIB4(P _{AOX1} -CalB) His ⁺ / BB3aZ.14(pMDH3- <i>DASI</i>)-Zeo ⁺	3347pb	YPD Zeo 100 µg·mL ⁻¹
Control	(D)	pIB4(P _{AOX1} -CalB) His ⁺ / BB3aZ.14(vacio)-Zeo ⁺	n.a.	YPD Zeo 100 µg·mL ⁻¹
Parental	RIY308	pIB4(P _{AOX1} -CalB) His ⁺	n.a.	Medio sin histidina
(a) Tamaño correspondiente a la unidad transcripcional del gen <i>DASI</i> recombinante.				

5.4 Cultivos en matraz

Para el cultivo en matraz de cada cepa, se realizó un pre-cultivo con 200 µL desde un vial a -80 °C, en matraz de 500 mL con un 10% del volumen final en YNBM con 5 g·L⁻¹ de metanol, incubado a 30 °C y con agitación de 200 rpm durante 20 a 28 horas.

Desde este pre-cultivo, se tomó el volumen correspondiente para inocular matraces de 250 mL a una concentración de células de 0,1 g·L⁻¹ (DWC), se centrifugó a 1000 xG durante 5 minutos, re suspendiendo el pellet en medio fresco e inoculando cada cepa en triplicado biológico, éstos se cultivaron en las mismas condiciones que el pre-cultivo, durante 20 horas. Para evaluar el crecimiento celular, se tomaron muestras cada 4 horas y se midió su absorbancia a 600 nm en una lector de placas de 96 pocillos, mientras que la concentración de metanol se evaluó en sobrenadante mediante cromatografía de gases.

A las 12 horas de cultivo, se tomó muestra para evaluación de la expresión transcripcional de genes (pellet celular en RNA later a -20 °C). Además, para la evaluación de actividad lipasa en sobrenadante, se tomaron muestras a las 12 y 20 horas de cultivo.

5.5 Análisis transcriptómico

Las muestras obtenidas desde el cultivo fueron tratadas con el kit de extracción de RNA YeaStar (Zymo Research). El RNA purificado se disolvió en agua ultrapura y se cuantificó por absorbancia a 260 nm, y su pureza se evaluó por la razón de su absorbancia a 260/280 nm. Para el análisis por qPCR se realizó la síntesis de cDNA con 1 µg de RNA con cada muestra, utilizando el kit AffinityScript qPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Finalmente, la reacción de qPCR se realizó en duplicado analítico, utilizando 1 µL de cDNA y cada partidor a 0,2 µM por reacción de 25 µL mediante el kit Brilliant II SybrGreen (Agilent).

La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación y extensión a 60 °C durante 60 s, en un equipo *AriaMx Real-time PCR System* (Agilent). La expresión relativa se calculó con el método $-2^{\Delta\Delta C_t}$ [77], utilizando como referencia los valores medidos del ciclo de cuantificación (Cq) del gen de la β -actina expresado constitutivamente [78], y la relación con la cepa control para determinar la expresión relativa (veces de cambio). Se utilizaron los partidores detallados en la Tabla 2.

5.6 Gradiente de concentración de metanol inicial

Para este ensayo, se preparó un pre-cultivo de la misma forma que para el cultivo en matraz como ya se mencionó anteriormente. Se evaluaron 8 concentraciones diferentes de metanol inicial (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 g·L⁻¹), en medio YNBM descrito previamente. Cada concentración se evaluó en triplicado biológico, en cultivos de 5 mL en una placa de pocillo profundo de 24 pocillos, y se incubó a 30 °C con una agitación de 1000 rpm en triplicado. Se tomaron muestras de 100 µL cada 4 horas para evaluación de biomasa, y finalizado el ensayo a las 20 horas se guardó sobrenadante para evaluación de actividad lipasa.

Tabla 2: Listado de partidores utilizados para análisis de expresión transcripcional por qPCR.

Clasificación	Gen	Partidor	Secuencia 5' - 3'	Ref.
Gen de Referencia	Actina	Ppact-F	AGA TGG CTC CGA GAA GTT CA	[79]
		Ppact-R	GTT GCT CAG AGG GCT TCA AC	
Heterólogos	CalB	CalB-F	TCT CTG CTC CTT CTG TGT GG	
		CalB-R	GTC GAA CAG AGG TCC ACA GA	
Estrés de Retículo	HAC1	HAC1-F	CAA GAA TCA GCC AAA GCC	[80]
		HAC1-R	TGC GAG TGG ATG TAG ATG C	
	KAR2	KAR2-F	CCT ACT TCA ACG ACG CTC AA	
		KAR2-R	CCA CCC TCA ATA GAA AGC AGA	
	PDI	PDI-F	GAG CAA CAA GAA GTT TGG AGT TCC	
		PDI-R	CCT CAT AAG CAG GAG CCA TTC	
	ERO1	ERO1-F	CGT TAG CAA ACC CTC AAA TCC	
		ERO1-R	GCA GAA TCC CTC ATC ACC ATT	
Vía de oxidación del Metanol	AOX1	AOX-F	GTG CCC AAC TTG AAC TGA GG	[81]
		AOX-R	AGA TCG TCA AAT GGG GTG GT	
	DAS1	DAS-F	GAC TCC TGG ACA CCC TGA AA	
		DAS-R	CCT CTT GCA AAC AAG CAT CA	
Estrés Oxidativo	YAP1	Yap1-F	AGG AAC CCT GGC GTG ATA GA	Primer-Blast
		Yap1-R	AGT GAC AAG AGA CGC AAG GG	
	Pmp20	Pmp20-F	CTC CAG GTG CTT TCA CGA GT	
		Pmp20-R	AGA TCG AGG GTC AGT CCC AA	
	Cta1	Cta1-F	TTC GAC AAC GCT AAT CAC GCT AAC	
		Cta1-R	TCA CCT CAA ACT CAC CGA AAG CT	
				[82]

5.7 Cultivo en reactor por lote

El pre-cultivo se realizó de igual manera que en cultivos anteriores, en matraz de 1 L con 100 mL de medio, el cual se recolectó para inocular el reactor a una concentración de células de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aproximadamente. El cultivo en reactor se realizó en un reactor (Applikon, EZ-Control, Netherlands) de 2 L, en un volumen de trabajo de 1,5 L, con medio YNBm descrito anteriormente, con metanol inicial a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las condiciones de cultivo fueron a 30°C con agitación a 700 rpm, con control de pH a 5.05 regulado por NaOH [2N] y 1 volumen de aire por volumen de líquido por minuto (VVM) de inyección de aire. Los cultivos se monitorizaron durante 20 horas, tomando muestras cada 4 h para determinar la concentración celular, la concentración de metanol y la actividad de *CalB*. Durante todo el proceso, se registró la tensión de oxígeno disuelto (TOD) mediante un sensor óptico (Applikon, Lumisens, Netherlands).

5.8 Análisis de flujo metabólico

Los flujos metabólicos para cada cepa se calcularon mediante un modelo estequiométrico para *K. phaffii* descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación [59,81]. El modelo original se redujo a 40 reacciones que incluyen las principales vías de metabolismo del metanol, glucólisis y gluconeogénesis, ciclo de ácidos tricarboxílicos, vía de las pentosas fosfato y biosíntesis de biomasa, a lo que se sumó la síntesis de lactato y síntesis de CalB, considerando su fórmula molecular (Anexo, tabla A1).

La información metabólica para la red de reacción se obtuvo de modelos previos de flujo metabólico [54,83] y se agrupó cuando fue posible para reducir el tamaño de la matriz estequiométrica. La reacción para la formación de biomasa consideró la contribución de la composición macromolecular (proteínas, lípidos, polisacáridos, ADN y ARN) y se equilibró para obtener la fórmula empírica de biomasa ($\text{CH}_{1.89}\text{N}_{0.137}\text{O}_{0.785}$), tal como se obtuvo de la composición elemental de *K. phaffii* [84,85].

El modelo fue implementado en Python 3 mediante el paquete COBRApy [86], minimizando el flujo de ATP para mantenimiento (Reacción 39, tabla A1 anexo) bajo el supuesto de que, para una tasa de crecimiento específica dada y una condición de crecimiento celular de sustrato ilimitado, las células sintetizan nuevas células con el menor consumo de energía [87].

Todos los flux se expresaron en $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para cada parámetro de entrada calculado entre las 8 y 12 horas, en cultivo por lote en reactor con metanol como única fuente de carbono y energía. Los parámetros de entrada fueron fijados como límite inferior y superior, siendo tasa específica de crecimiento (h^{-1}), tasa específica de consumo de metanol, productividad específica de CalB, productividad específica de ácido orgánico (lactato), mientras que la tasa específica de consumo de oxígeno fue fijada como límite superior. El modelo implementado permitió estimar el flux de productividad de CO_2 , asociado principalmente a la vía disimilativa de metanol.

5.9 Cultivo en reactor por lote alimentado

El cultivo del inóculo se llevó a cabo en matraz de un litro con 100 mL de medio YNBG ($\text{ynb } 3,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sulfato de amonio $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, biotina $0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, buffer fosfato de potasio 100 mM y glicerol $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), inoculados directamente desde vial (-80) y cultivados a 30°C y agitación de 200 rpm durante 20 a 24 horas.

Este cultivo se llevó a cabo en reactor Applikon de 3 litros con un volumen inicial de 1,35 litros de medio YNBG con $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicerol, a 30°C , 1 VVM de inyección de aire y 1000 rpm de agitación. Manteniendo el cultivo a pH 5,05, mediante la adición de hidróxido de amonio al 30%. Este ensayo en particular se realizó en una réplica biológica única.

El reactor fue inoculado con $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasa inicial, para dar comienzo a la fase de lote. Luego de 12 horas de cultivo con glicerol como única fuente de carbono se adicionó un pulso de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de metanol (concentración en

reactor), con objeto de acondicionar las células a la fase de inducción. Una vez consumido completamente el glicerol presente en el cultivo, señalado por el aumento abrupto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), se comenzó la fase de alimentación a las 25 horas de iniciado el cultivo, alimentado a un flujo constante de 0,0075 L·h⁻¹ con YNB a 3,4 g·L⁻¹ y metanol 200 g·L⁻¹ hasta completar un volumen final de 1,5 litros, luego de 20 horas de alimentación. Estas condiciones de alimentación se basaron en lo descrito por Ebbecke y colaboradores en 2025 [88], generando una adaptación empírica de parámetros como la inducción inicial y la concentración de metanol en la alimentación.

5.10 Estimación de parámetros cinéticos

La tasa específica de crecimiento (μ) se estimó desde la pendiente de la región lineal ($R^2 > 0,99$) de la gráfica semilogarítmica de la concentración celular (x) y el tiempo (t), de acuerdo con la ecuación (1).

$$\text{Ec. (1)} \quad \ln(x) - \ln(x_0) = \mu_{max} \cdot t$$

Donde x_0 es la concentración inicial de células en el cultivo. El rendimiento de sustrato en biomasa (Y_{XS}), se estimó a partir de la pendiente de la región lineal de la concentración de metanol (S) y la concentración celular (x), según la ecuación (2).

$$\text{Ec. (2)} \quad Y_{\frac{x}{S}} = \frac{\Delta x}{-\Delta S}$$

Considerando Y_{XS} y μ en la etapa del cultivo en que son constantes, se estimó la tasa específica de consumo de sustrato a partir de la expresión definida en la ecuación 3.

$$\text{Ec. (3)} \quad q_S = \frac{\mu}{Y_{\frac{x}{S}}} \left[\frac{g_{Met}}{g_{Cel} \cdot h} \right]$$

El efecto de la concentración inicial de metanol sobre la tasa específica de crecimiento se estimó mediante el cálculo de la constante de inhibición (K_i). Para esto, se utilizó la ecuación de Monod asumiendo modelo de inhibición por sustrato según la ecuación 4, donde K_s corresponde a la constante de saturación de sustrato.

$$\text{Ec. (4)} \quad \mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Para la estimación de las constantes cinéticas asociadas a inhibición por sustrato (K_s , K_i y $\mu_{\max}$), se utilizó el método de minimización del error cuadrático medio (MSE, por sus siglas en inglés) entre los datos predichos y experimentales ($R^2 > 0,99$), de acuerdo con la ecuación 5.

$$\text{Ec. (5)} \quad \text{MIN: } MSE = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\hat{\mu}_j - \mu_j)^2$$

Donde $\hat{\mu}_j$ representa la estimación experimental de los valores de μ . Esta optimización se llevó a cabo utilizando la herramienta SOLVER en Microsoft Excel®.

Para el cálculo de parámetros cinéticos asociados al oxígeno, se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$), mediante la metodología de gaseo (ecuación 6) y degaseo (ecuación 7) descrito previamente [89]. Calculado de forma independiente para cada condición de operación del cultivo en reactor, en función del medio de cultivo (YNBM o YNBG), la agitación (rpm) y la inyección de aire por volumen de medio (VVM).

$$\text{Ec. (6)} \quad \ln\left(\frac{C_{L0}}{C_L}\right) = K_L a \cdot t$$

$$\text{Ec. (7)} \quad \ln\left(1 - \frac{C_L}{C^*}\right) = K_L a \cdot t$$

Donde C_L corresponde a la concentración de oxígeno en el medio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), C_{L0} es la concentración inicial de oxígeno en el medio y C^* es la solubilidad de oxígeno a la temperatura de trabajo (fijado a $7,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a 30°C [90]).

A partir de lo anterior, se determinó la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), según detalla la ecuación 8:

$$\text{Ec. (8)} \quad VTO = K_L a (C^* - C_L)$$

Considerando que el cambio de la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo es resultado de la diferencia entre la velocidad de transferencia de oxígeno y la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), es posible determinar VCO según plantea la ecuaciones 9 y 10.

$$\text{Ec. (9)} \quad \frac{-dC_L}{dt} = VTO - VCO$$

$$\text{Ec. (10)} \quad VCO = VTO - \left(\frac{C_L - C_{L0}}{t - t_0} \right)$$

Cuando se ha determinado la velocidad de consumo de oxígeno, es posible determinar la tasa específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}), mediante el cociente con la biomasa, según detalla la ecuación 11.

$$\text{Ec. (11)} \quad q_{O_2} = \frac{VTO}{X} \left[\frac{\text{mmol}_{O_2}}{g_{Cel} \cdot h} \right]$$

Respecto a la determinación de actividad enzimática en sobrenadante, evaluada mediante aparición de producto en el tiempo, se determinó la unidad internacionales (UI) por unidad de volumen, a partir de la ecuación 12, considerando una UI como la cantidad de enzima necesaria para la conversión de 1 mmol de sustrato en 1 minuto.

$$\text{Ec. (12)} \quad \frac{UI}{L} = \frac{mM}{min} = \left(\frac{P_m - P_b}{f_c} \right) \left(\frac{V_T}{V_m} \right)$$

Donde P_m corresponde a la pendiente de la aparición de producto con muestra (Absorbancia $398 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$), P_b corresponde a la pendiente de la reacción blanco, f_c es el factor de conversión obtenido a partir de la pendiente de la curva de calibrado de producto en absorbancia ($\text{Abs}_{398\text{nm}} \cdot \text{mM}^{-1}$), V_T corresponde al volumen total de reacción (L) y V_m el volumen de muestra utilizada en reacción (L).

Para el cálculo de parámetros en cultivo por lote alimentado, se requiere considerar el cambio de volumen durante la etapa de alimentación. Para esto, se considera la expresión en la ecuación 13.

$$\text{Ec. (13)} \quad XV = X_0 V_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$$

Al operar y despejar la expresión en la ecuación 13, es posible obtener el valor de μ_{max} durante el periodo de alimentación, considerando X_0 y V_0 como la concentración de biomasa y el volumen al inicio de la etapa de alimentación, la expresión utilizada se presenta en la ecuación 14.

$$\text{Ec. (14)} \quad \mu_{max} = \frac{\ln\left(\frac{XV}{X_0 V_0}\right)}{t - t_0}$$

Respecto de la determinación de parámetros asociados al consumo de metanol durante la fase de alimentación constante, se determinó el rendimiento de biomasa en sustrato a partir de la expresión presentada en la ecuación 15.

$$\text{Ec. (15)} \quad V \left[S + \frac{X}{Y_{\frac{X}{S}}} \right] = F \cdot S_F \cdot t + S_0 V_0 + \left[\frac{X_0 V_0}{Y_{\frac{X}{S}}} \right]$$

Donde F corresponde al flujo de alimentación ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$), S corresponde a la concentración de sustrato en el cultivo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), S_F corresponde a la concentración de sustrato en la flujo de entrada de alimentación ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Con esto, finalmente se estimó la productividad específica de generación de producto (q_P), donde la variación de concentración de producto respecto del cambio del volumen en el tiempo se asocia directamente con el cambio de la biomasa y volumen durante la fase de alimentación, según se expresa en la ecuación 16 y 17.

$$\text{Ec. (16)} \quad \frac{dPV}{dt} = q_P XV$$

$$\text{Ec. (17)} \quad q_P = \frac{\left[\frac{(PV - P_0 V_0)}{t - t_0} \right]}{XV}$$

Donde, P_0 corresponde a la concentración de producto al momento de iniciar la fase de alimentación, y la expresión de $t - t_0$ representa el tiempo transcurrido de la alimentación.

5.11 Análisis estadístico

Salvo que se indique lo contrario, los parámetros cinéticos se calcularon a partir de mediciones obtenidas en experimentos independientes. Cuando corresponde, los valores se expresan como el promedio $\pm$ la desviación estándar de los datos.

La significancia estadística de los datos se evaluó en el software Graphpad Prism[®] 6 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.), mediante test ANOVA de dos vías, cuando se evalúa más de dos condiciones experimentales (como cepas de estudio) y un test T múltiple no pareado (método Holm-Sidak) en caso de comparar sólo dos condiciones experimentales. Se consideró la diferencia significativa de los promedios, con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$) en adelante, donde $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ y $P < 0,0001$ se rotula en cada gráfica como (*), (**), (***) y (****) respectivamente.

6. RESULTADOS

El presente capítulo expone los hallazgos experimentales obtenidos con el fin de validar la hipótesis en que se plantea el rol de la sobreexpresión del gen *DAS1* de *Komagataella phaffii* (Mut⁺), como factor determinante en la mejora de la productividad de proteínas recombinantes mediante un incremento en el flujo de carbono sobre la ruta asimilativa de metanol y sus consecuencias en la homeostasis celular.

En primer lugar, se describen y comparan las estrategias de construcción de cepas para determinar la regulación transcripcional más eficiente para la sobreexpresión de Das1. A continuación, se analiza el impacto fisiológico de dicha modificación genética durante el cultivo controlado en reactor por lote, evaluando específicamente las alteraciones en el flujo metabólico de la vía de metanol y marcadores del estado redox intracelular. Finalmente, se presentan los parámetros cinéticos y productivos alcanzados bajo condiciones dinámicas de cultivo en lote alimentado, determinando así la viabilidad del sistema en un entorno de alta densidad de células.

6.1. Efecto de la Concentración de Metanol en la Cinética de Crecimiento

La exposición de las cepas de *Komagataella phaffii* a diferentes concentraciones iniciales de metanol reveló que la tasa de crecimiento es dependiente de la concentración del sustrato, observándose una disminución generalizada de la velocidad específica de crecimiento a medida que aumentó la concentración inicial de metanol (Figura 2). Los datos experimentales de las cuatro cepas se ajustaron satisfactoriamente con un elevado coeficiente R^2 a un modelo cinético de Monod con inhibición por sustrato.

A pesar del ajuste general al modelo, se evidenció una sensibilidad diferencial entre la cepa control y las variantes mutantes (Tabla 3). Aunque la variación de la velocidad máxima de crecimiento μ_{max} entre las cepas no superó el 10%, el parámetro de la constante de inhibición (K_i) mostró diferencias considerables. La cepa A (P_{AOX1} -*DAS1*) exhibió una K_i de 52 g·L⁻¹ casi el doble que la cepa control (27.6 g·L⁻¹) indicando una mayor tolerancia a concentraciones inhibitorias de metanol. En contraste, la cepa C (P_{MDH3} -*DAS1*) presentó el valor más bajo de K_i , denotando una alta sensibilidad al sustrato. Por su parte, la cepa B (P_{GAP} -*DAS1*) destacó por presentar el mayor valor de la constante de afinidad (K_s coincidiendo con la cepa que mostró la mayor μ_{max} estimada).

Tabla 3: Constantes cinéticas de *K. phaffii* con sobreexpresión de *Das1* bajo el control de diferentes promotores, determinados mediante modelo de Monod con inhibición por sustrato.

	μ_{max} [h ⁻¹]	K_s [g · L ⁻¹]	K_i [g · L ⁻¹]	R^2
P_{AOX}-<i>DAS1</i> (A)	0,185	0,120	52,89	0,999
P_{GAP}-<i>DAS1</i> (B)	0,213	0,391	45,50	0,998
P_{MDH3}-<i>DAS1</i> (C)	0,179	0,229	17,57	0,997
Control (D)	0,201	0,215	27,64	0,991

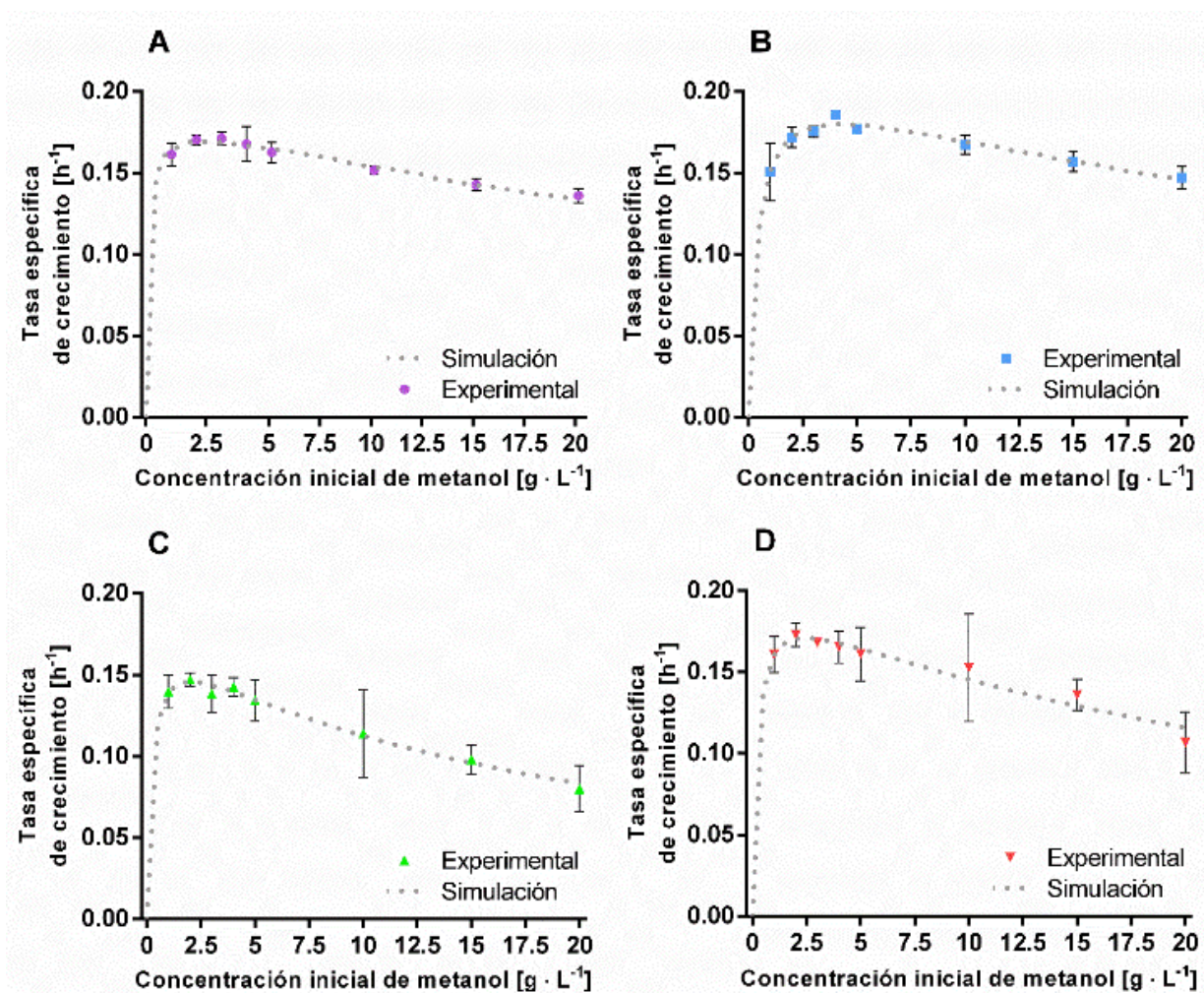


Figura 2: Tasa específica de crecimiento frente a la concentraciones crecientes de metanol inicial. Los datos experimentales se muestran en el símbolo de color correspondiente a cada cepa (A) P_{AOX1} , (B) P_{GAP} , (C) P_{MDH3} y (D) control. La simulación del modelo de Monod con inhibición se muestra como una línea punteada en gris en cada gráfica.

7.2 Evaluación de la Productividad de Lipasa

En cuanto a la producción de proteína recombinante (Figura 2), la productividad volumétrica siguió una tendencia gaussiana con un óptimo entre 4 y 5 g·L⁻¹ de metanol inicial. En este rango, únicamente la cepa B superó la productividad volumétrica del control, específicamente a 4 g·L⁻¹. Sin embargo, en términos de productividad específica, la cepa C mostró valores considerablemente superiores en todas las condiciones, alcanzando 43 UI·g_{cel}⁻¹·h⁻¹. La cepa B logró equiparar y superar este valor solo a la concentración de 4 g·L⁻¹ obteniendo una productividad volumétrica de 40 UI·g_{cel}⁻¹·h⁻¹.

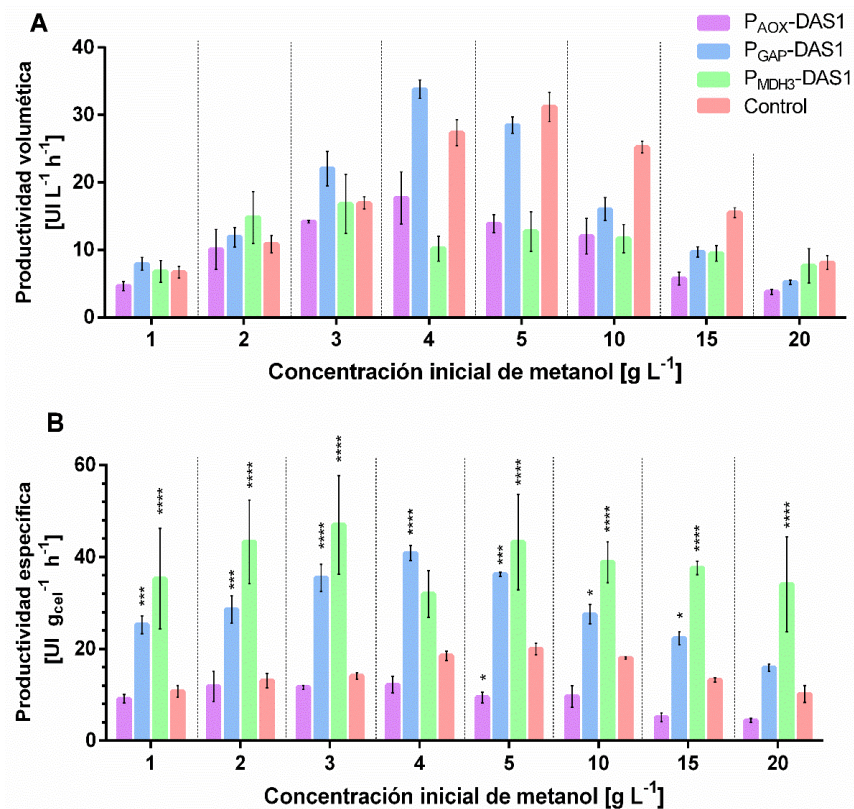


Figura 3: Productividad de CalB a concentraciones crecientes de metanol inicial. Productividad volumétrica (A) y específica (B) de cepas de *K. phaffii* sobreexpresoras de *DAS1*.

7.3 Validación de Perfiles Cinéticos en Matraz

Para superar las limitaciones de transferencia de oxígeno de las placas de pocillo profundo, se evaluó el desempeño cinético en matraz a 5 g L⁻¹ de metanol (Figura 3). Los perfiles de crecimiento (Figura 4A) mostraron que la cepa B alcanzó la fase estacionaria y la mayor concentración de biomasa de manera más temprana (16 horas) en comparación con el resto de las cepas (20 horas).

El consumo de metanol (Figura 4B) reveló diferencias significativas: a las 12 horas, los cultivos de la cepa A presentaron las concentraciones residuales más bajas, mientras que la cepa control y la cepa C mostraron un retraso en el consumo. Al finalizar el cultivo luego de 20 horas, todas las cepas excepto la C habían agotado el sustrato.

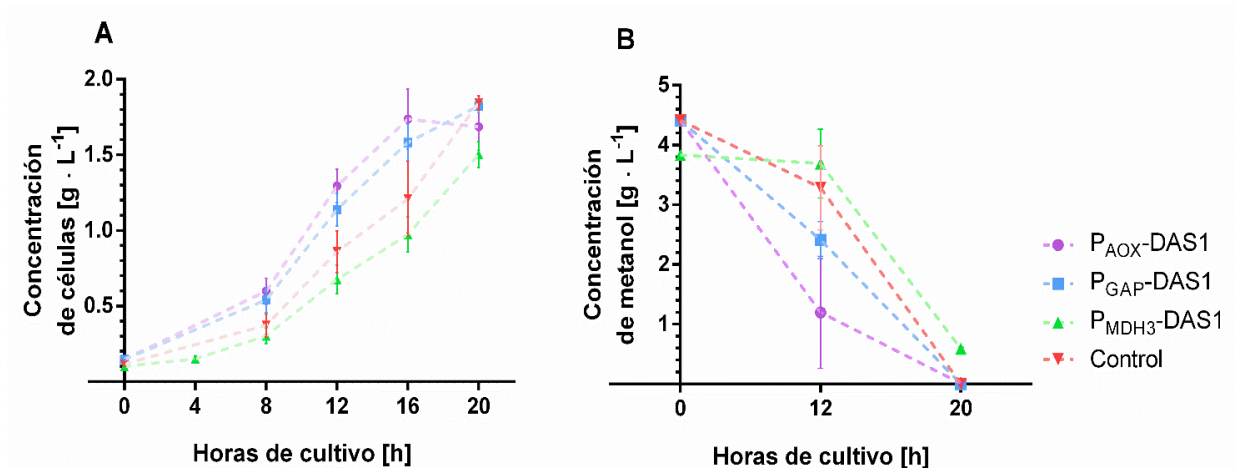


Figura 4: Cinética de crecimiento y consumo de sustrato durante cultivo en matraz. (A) Cambio de la concentración de células (peso seco estimado) en el tiempo. (B) Cambio en la concentración de metanol en sobrenadante en el tiempo.

Cinéticamente (Figura 5), las cepas sobreexpresoras de *DAS1* presentaron tasas específicas de crecimiento entre 0,17 y 0,19 h⁻¹, superiores al promedio del control (0,162 h⁻¹). Asimismo, la velocidad específica de consumo de metanol mostró una tendencia al alza correlacionada con la fuerza del promotor utilizado: P_{AOX1} > P_{GAPDH} > P_{MDH3}.

Respecto al rendimiento biomasa/sustrato (Figura 5B), solo la cepa C mostró un aumento considerable, aunque paradójicamente fue la única que no consumió la totalidad del sustrato.

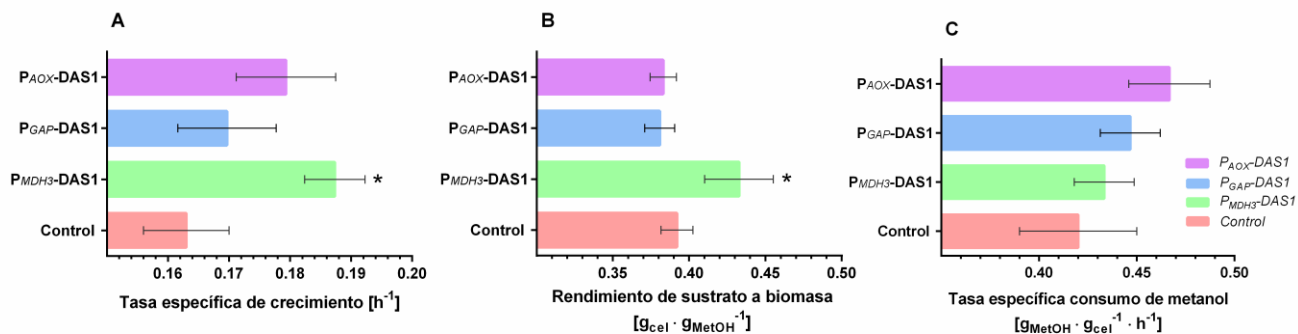


Figura 5: Parámetros cinéticos durante cultivo en matraz. (A) Productividad volumétrica, (B) Productividad específica de cepas de *K. phaffii* sobreexpresoras de *DAS1* y CalB.

En términos de productividad temporal (Figura 6), la cepa B demostró una ventaja cinética significativa a las 12 horas de cultivo, comenzando la producción de CalB a mayor velocidad en etapas tempranas, aunque al final del cultivo (20 horas) la cepa control logró igualar su productividad volumétrica.

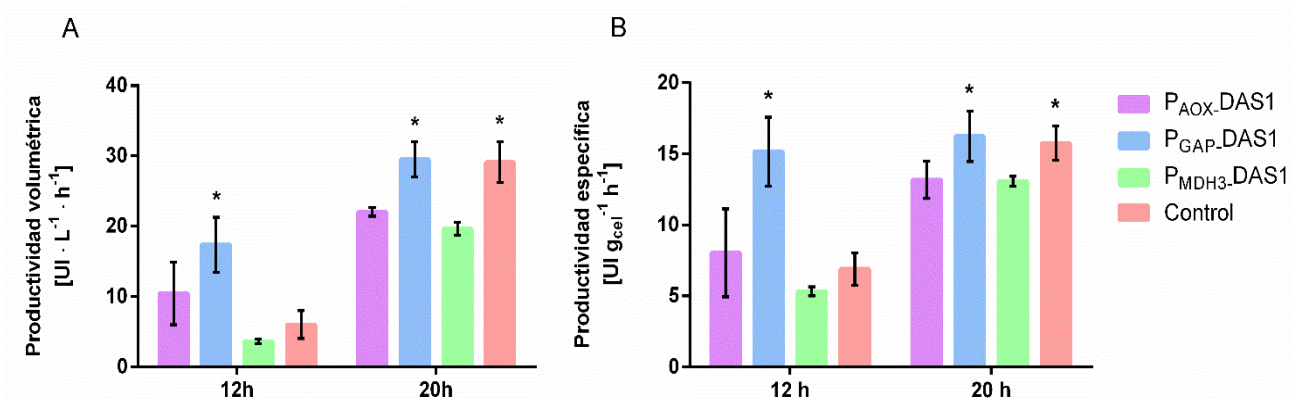


Figura 6: Productividad de CalB durante cultivo en matraz. (A) Productividad volumétrica de cepas sobreexpresoras de *DAS1* y control, (B) Productividad específica de cepas sobreexpresoras de *DAS1* y control.

6.4. Análisis Transcripcional

El análisis de expresión génica mediante qPCR a las 12 horas (Figura 7) reveló perfiles transcripcionales inesperados. Las cepas modificadas mostraron una sobreexpresión significativa no solo del gen *DAS1* (como era esperado), sino también de *AOX1* y *CalB*, a pesar de que la unidad transcripcional de *CalB* y el gen *AOX1* nativo no fueron modificados. Este hallazgo sugiere una posible regulación cruzada, dado que ambos genes están bajo el control del promotor P_{AOX1}.

Considerando el cumplimiento del primer objetivo específico, y ponderando los parámetros de $\mu_{\max}$, K_i , tolerancia al metanol y la productividad temprana de CalB, se determinó que la cepa B presentaba las mejores proyecciones biotecnológicas. En consecuencia, esta variante fue seleccionada para las etapas posteriores y se denominará en adelante como cepa +*DAS1*.

Durante el cultivo en biorreactor (Figura 8), la cepa +*DAS1* y el control mostraron perfiles similares de crecimiento y agotamiento de metanol, alcanzando ambas una biomasa final de aproximadamente 2 g·L⁻¹ tras 16 horas. Sin embargo, la cepa +*DAS1* presentó un aumento leve en la biomasa final y una mejora sustancial del 30% en la productividad volumétrica a las 20 horas (Figura 8C). Consistentemente con los ensayos en matraz, la ventaja en productividad específica de +*DAS1* se manifestó principalmente en la etapa temprana (8-12 horas).

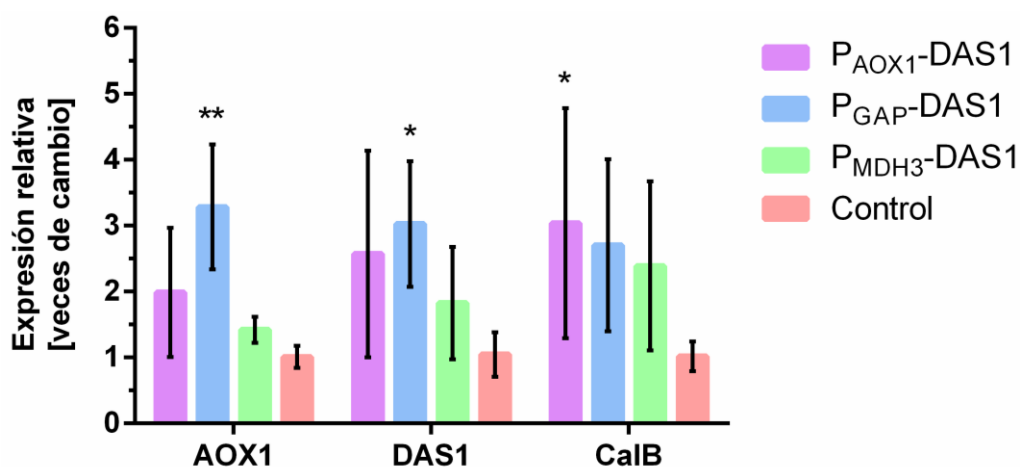


Figura 7: Expresión relativa de genes regulados por metanol 12 horas de cultivo en matraz. Cepas sobreexpresoras de *DAS1* bajo el control de los promotores P_{AOX} (morado), P_{GAP} (azul) y P_{MDH3} (verde), y de control sin sobreexpresión de *DAS1* (rojo).

El análisis de los parámetros cinéticos en reactor (Tabla 4) indicó que, si bien la productividad específica global no presentó diferencias estadísticamente significativas, +*DAS1* mostró valores nominales mayores, acompañados de menores tasas específicas de consumo de oxígeno y metanol. Los perfiles de consumo de oxígeno (Figura 8 E y F) confirmaron que la mayor demanda metabólica ocurrió entre las 12 y 14 horas para ambas cepas.

Tabla 4: Parámetros cinéticos globales en cultivo por lote en reactor, con metanol como única fuente de carbono y energía.

	<i>+DAS1</i>	Control	Sig.
μ [h ⁻¹]	0,175 ± 0,018	0,187 ± 0,018	ns
$Y_{X/S}$ [g _{cel} · g _{MetOH} ⁻¹]	0,389 ± 0,042	0,374 ± 0,047	ns
CalB [UI · L ⁻¹]	755 ± 59	577 ± 60	*
Q_{CalB} [UI · L ⁻¹ · h ⁻¹]	38 ± 3	29 ± 3	*
q_{CalB} [UI · g _{cel} ⁻¹ · h ⁻¹]	41 ± 7	36 ± 1	ns
q_{MetOH} [mmol · g _{cel} ⁻¹ · h ⁻¹]	2,15 ± 0,63	2,28 ± 0,33	ns
q_{O2} [mmol · g _{cel} ⁻¹ · h ⁻¹]	7,22 ± 1,79	8,89 ± 1,5	ns

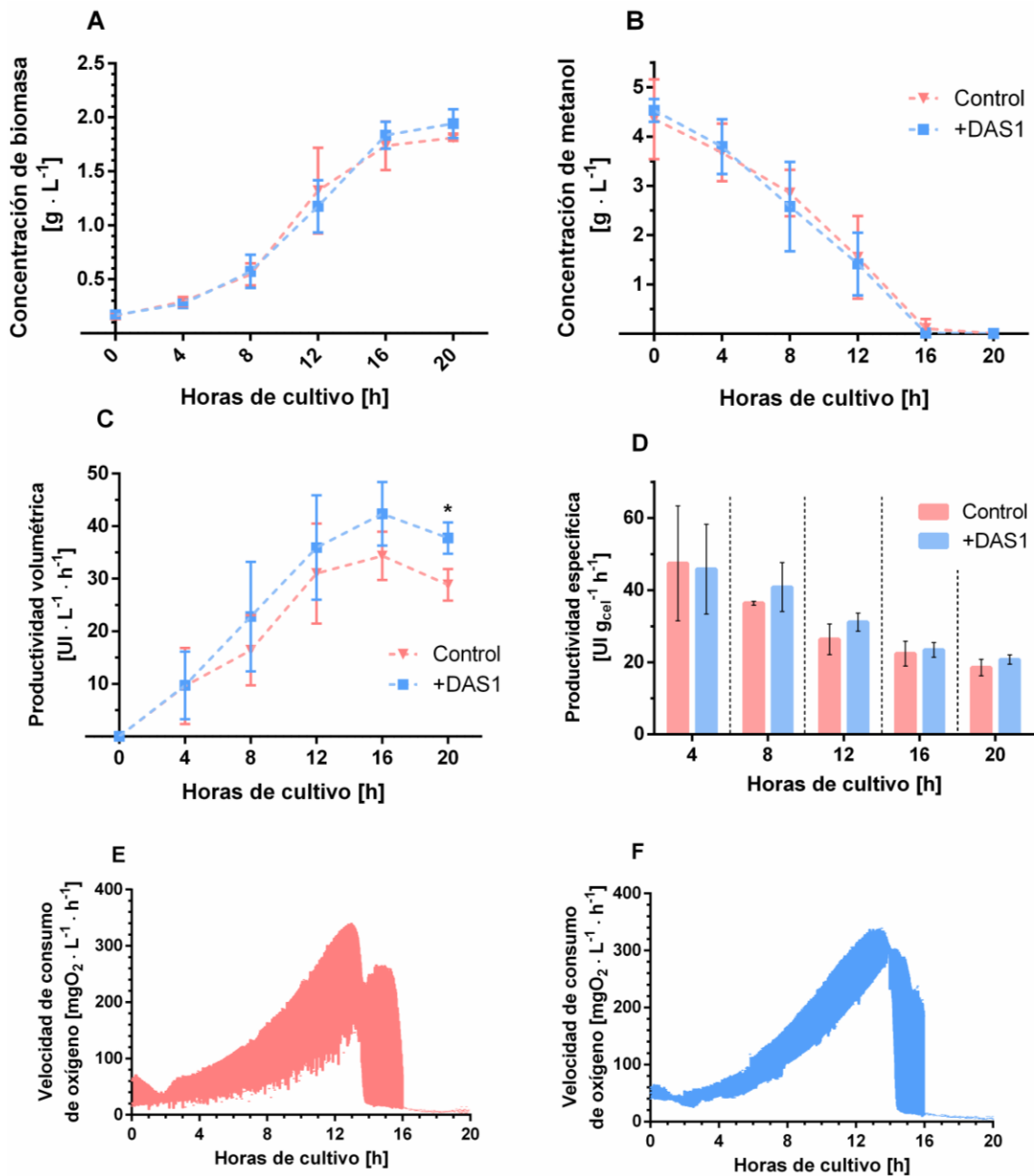


Figura 8: Parámetros cinéticos y productivos obtenidos durante cultivo por lote en reactor. Variación de concentración celular (A), concentración de metanol (B) en cultivos de reactores por lote con cepas control y +*DASI*. Productividad volumétrica de cepas Control y +*DASI* (A). Productividad específica de cepas Control y +*DASI* (B) vs. tiempo, en cultivo de reactores por lote. Velocidad de consumo de oxígeno de cepa control (A) y cepa +*DASI* (B) en cultivo de reactores por lote.

6.5. Respuesta a Estrés Celular

El análisis de marcadores genéticos a las 8 horas (Figura 9) corroboró la alta expresión de *AOX1*, *DAS1* y *CalB* en *+DAS1* (4-5 veces superior al control). Respecto al estrés celular, no se detectaron diferencias significativas en marcadores generales de estrés de retículo (UPR), salvo un aumento en la Proteína Disulfuro Isomerasa (*PDI*). Por el contrario, los marcadores de estrés oxidativo se mostraron significativamente activados en *+DAS1*, con la excepción del factor transcripcional *YAP1*.

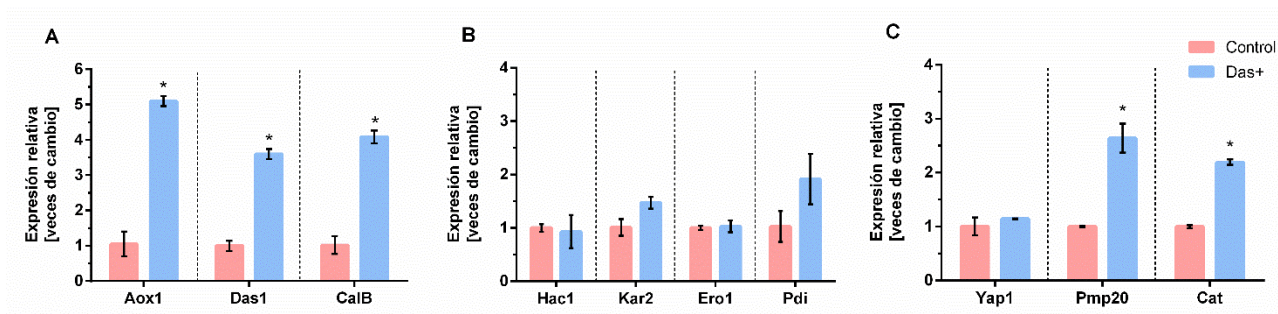


Figura 9: Expresión relativa de genes asociados al metabolismo del metanol y estrés celular. Expresión de los genes inducidos por metanol (A). Niveles de transcripción de *Hac1*, *Kar2*, *Ero1* y *Pdi1*, relacionados con la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (UPR) (B). Genes asociados al estrés oxidativo, *Yap1*, *Pmp20* y *Cat* (C). Evaluados mediante qPCR.

6.6. Análisis de Flujo Metabólico

Para dilucidar los mecanismos subyacentes, se estimó la distribución del flujo de carbono mediante un modelo estequiométrico durante la fase de crecimiento exponencial (8-12 horas) (Figura 10, Tabla 5). Los flujos de entrada de tasa específica de consumo de metanol fueron de 2,482 y 1,869 $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para el control y *+DAS1*, respectivamente.

En este análisis, se observó un aumento en la proporción de carbono dirigido hacia la vía asimilativa en la cepa *+DAS1* (78,2%) respecto al control (58,5%), lo que indica una redistribución significativa de los flujos de la bifurcación asimilativa/disimilativa. En ambas cepas, la fracción del carbono que se canalizó hacia la producción de *CalB* fue muy similar (27,5% en *+DAS1* vs 28% en control), una situación similar se observó respecto de la biomasa (10,7% *+DAS1* vs 8,1% en control). Por otra parte, se identificó que la cepa *+DAS1* destina casi el doble del carbono consumido a la productividad de ácidos orgánicos, en este caso identificado como lactato.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de *DAS1* y el aumento de la asimilación de metanol, no deriva directamente en una mayor disponibilidad de carbono y energía, que pueda traducirse en el aumento considerable del crecimiento o la productividad. Si bien se observa la formación de un nuevo cuello de botella que limita el uso del carbono asimilado, es relevante notar la diferencia en el potencial tóxico del formaldehído y otros metabolitos que se puedan acumular, en este caso ácidos orgánicos como lactato [43,59,60].

Tabla 5: Parámetros cinéticos utilizados en balance de flux de carbono, a partir de cultivo en reactor por lote con metanol como única fuente de carbono y energía entre 8 y 12 horas de cultivo.

	<i>+DAS1</i>	Control
μ [h^{-1}]	$0,198 \pm 0,042$	$0,216 \pm 0,032$
$Y_{X/S}$ [$\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{MetOH}}^{-1}$]	$0,415 \pm 0,071$	$0,346 \pm 0,071$
q_{MetOH} [$\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	$1,869 \pm 0,312$	$2,482 \pm 0,404$
q_{O_2} [$\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	$7,540 \pm 1,333$	$8,052 \pm 3,374$
q_{prot} [$\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	$0,00032 \pm 0,00007$	$0,00058 \pm 0,00017$
q_{AO} [$\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	$0,249 \pm 0,069$	$0,181 \pm 0,098$

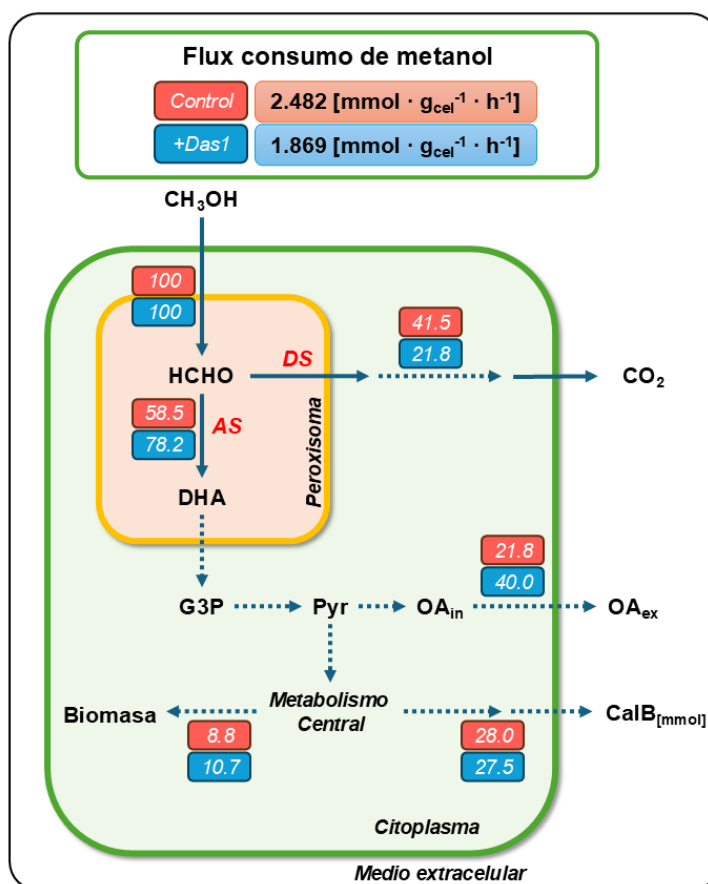


Figura 10: Flujo de carbono a través de la ruta de oxidación de metanol análisis de balance de flujo metabólico. En el cuadro superior se detalla el flujo de consumo de metanol presentado por cada cepa [$\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]. La proporción y distribución del carbono captado por la cepa control se detalla en los cuadros rojos y +DAS1 en los cuadros azules. AS indica la vía asimilativa de metanol y DS indica la vía disimilativa. OA representa el flujo de formación y secreción del ácido orgánico detectado por HPLC.

Para evaluar la calidad productiva de *+DAS1* en condiciones de alta demanda metabólica, se realizaron cultivos en modo lote alimentado (Figura 11). El protocolo incluyó una etapa de crecimiento inicial con glicerol (0-12 horas), un pulso de adaptación con metanol (5 g·L⁻¹) a las 12 horas, y el inicio de la alimentación constante con metanol a partir de las 25 horas (zona destacada en amarillo).

El comportamiento de ambas cepas fue idéntico en la etapa de glicerol, con diferencias notables solo durante las últimas 10 horas de la fase de alimentación con metanol. El consumo de metanol fue equivalente antes de la alimentación, donde la concentración disminuyó gradualmente de 5 a 3,2 g·L⁻¹. Sin embargo, tras 12 horas de alimentación constante, la cepa *+DAS1* mostró una mayor concentración de metanol residual en el medio en comparación con el control, condición que se mantuvo hasta el final.

Al analizar la tendencia del crecimiento celular (Figura 11A y 11B), la cepa control logró una mayor acumulación de biomasa al final del cultivo, en coherencia con su mayor consumo de metanol. Respecto a la producción de lipasa (Figura 11A y 11C), las diferencias volumétricas fueron bajas, aunque *+DAS1* mantuvo una mayor producción al finalizar la etapa de alimentación. En línea con su menor actividad metabólica general, la cepa *+DAS1* presentó una menor velocidad de consumo de oxígeno (VCO) durante ambas etapas del cultivo (Figura 11D).

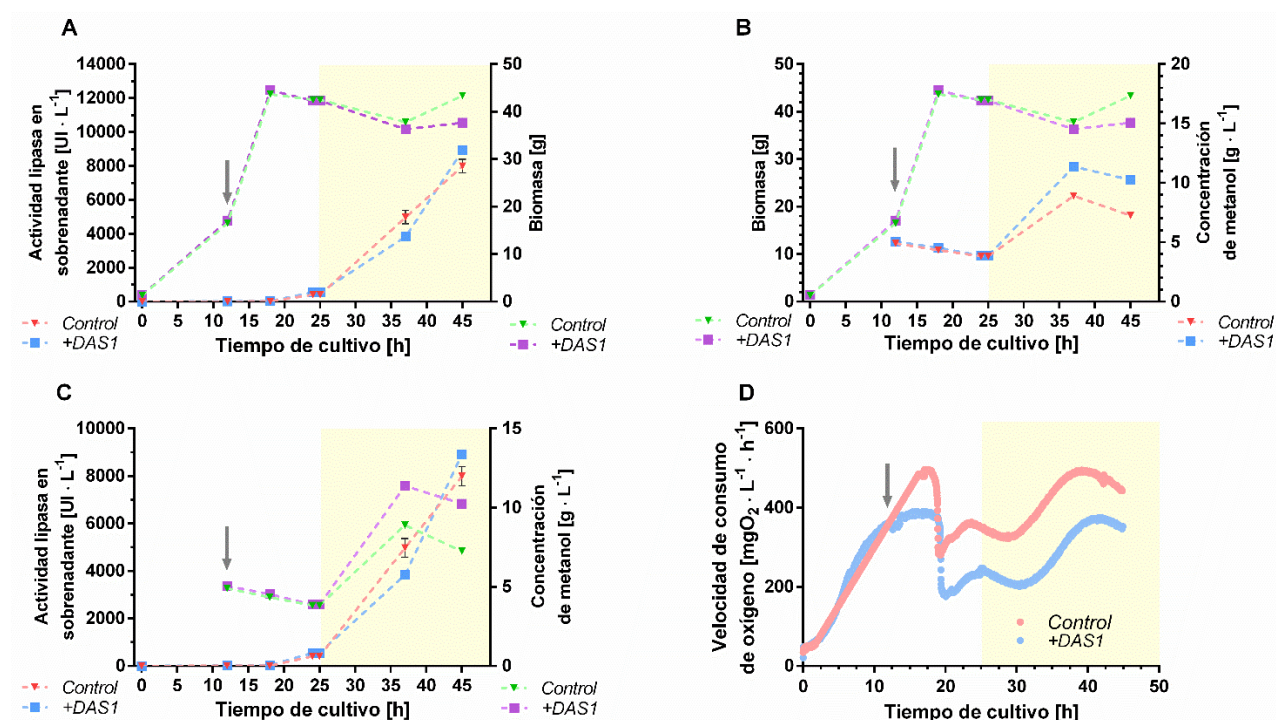


Figura 11: Parámetros cinéticos y productivos obtenidos durante el cultivo en lote alimentado. (A) Producción de biomasa y concentración de metanol en el tiempo. (B) Actividad lipasa en sobrenadante y concentración de metanol en el tiempo. (C) Velocidad de consumo de oxígeno en el tiempo (D). La flecha gris indica el pulso de metanol a 5 g·L⁻¹ durante el crecimiento en glicerol y la zona amarilla indica el periodo de alimentación constante con metanol 200 g·L⁻¹. Cepa Control en triángulos invertidos, cepa *+DAS1* en cuadrados. Las barras de error corresponden a desviación estándar de las réplicas analíticas.

Los parámetros fisiológicos detallados en la Tabla 6 durante la fase de alimentación resaltan la divergencia: +*DAS1* presentó una tasa específica de crecimiento casi nula (tres veces menor al control), un bajo rendimiento de metanol a biomasa (cuatro veces menor al control), y un menor consumo de oxígeno (0,8 veces menor al control).

La productividad específica de CalB sobre biomasa se mantuvo mayor en +*DAS1*, siguiendo tendencias previas. No obstante, al analizar la productividad específica de CalB en función del metanol consumido el panorama se invirtió, mostrando +*DAS1* un valor 40% menor al control, reflejo de su bajo consumo total de metanol.

Tabla 6: Parámetros cinéticos en reactor en cultivo por lote alimentado, determinados en las últimas 10 horas de alimentación a flujo constante de metanol.

	μ [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [g _{cel} ·g _{Met} ⁻¹]	q_{Met} [g _{Met} ·g _{Cel} ⁻¹ ·h ⁻¹]	q_{O_2} [mmol·g _{Cel} ⁻¹ ·h ⁻¹]	q_{CalB} [UI·g _{cel} ⁻¹ ·h ⁻¹]	q_{CalB} [UI·g _{Met} ⁻¹ ·h ⁻¹]
Control	0,017	0,403	0,012	0,521	13,167	161
+Das1	0,005	0,104	0,020	0,402	16,781	96

En resumen, los resultados expuestos demuestran que la sobreexpresión de *DAS1* bajo el promotor P_{GAPDH} genera un fenotipo de "producción desacoplada". La cepa +*DAS1* es capaz de sostener o aumentar la producción volumétrica de proteína recombinante (CalB) a pesar de suprimir significativamente el crecimiento celular (tasa de crecimiento casi nula) y reducir el consumo específico de metanol y oxígeno. Esta característica es relevante, ya que +*DAS1* es capaz de producir tanto o más CalB que el control mientras minimiza la acumulación de biomasa y la demanda de oxígeno. El perfil de alta productividad específica de producto por unidad de biomasa en condiciones de baja demanda energética (demostrada por la baja q_{O_2} y $Y_{X/S}$) confiere a esta cepa modificada metabólicamente características altamente ventajosas para optimizar procesos industriales, donde la reducción de costos operativos y la eficiencia del rendimiento producto/biomasa son objetivos primordiales.

7. DISCUSIÓN

El presente capítulo se presenta un análisis crítico de los resultados experimentales descritos anteriormente, con el fin de revisar la hipótesis planteada en torno a la manipulación genética de *DASI* en *Komagataella phaffii* Mut⁺, como un punto de inflexión para potenciar la productividad de proteína recombinante y sus consecuentes repercusiones en la homeostasis celular.

En primera instancia, se discute la relevancia de la fuerza del promotor y la estrategia de sobreexpresión en la modulación de los parámetros cinéticos y productivos de *K. phaffii* Mut⁺. Posteriormente, se examinan los mecanismos metabólicos observados durante el cultivo controlado en reactor de la cepa P_{GAP}-*DASI*, dado que presentó los resultados con mejores proyecciones de entre las cepas modificadas. Evaluando así, si el aumento en la expresión de *DASI* conlleva un aumento significativo en la capacidad de asimilación de metanol. Finalmente, se analizan las implicaciones de estos fenómenos sobre los parámetros cinéticos y el rendimiento global en cultivos de alta densidad de células (lote alimentado), contrastando los resultados obtenidos con la literatura vigente para determinar la viabilidad y robustez industrial de la cepa desarrollada.

7.1. Justificación de la estrategia de ingeniería metabólica: El rol de DAS1

En *Komagataella phaffii*, el gen *DASI* codifica para la dihidroxiacetona sintasa 1, enzima clave que cataliza el primer paso en la vía de asimilación del formaldehído, desviando el carbono hacia la síntesis de biomasa y energía (gliceraldehído-3-fosfato). La sobreexpresión de esta enzima en *K. phaffii* fue implementada con objeto de redirigir el flujo de carbono y mitigar la toxicidad generada por la eventual acumulación de formaldehído, un metabolito que compromete el crecimiento celular y su productividad [13,59].

Anteriormente ya se ha estudiado el efecto de la sobreexpresión de *DASI* en cepas productivas de *K. phaffii*, donde se reportó un aumento en la productividad específica de sustrato (metanol) en proteína recombinante. Sin embargo, derivó en una disminución de la productividad volumétrica [71]. Es por esto que al considerar los efectos que puede tener la sobreexpresión de *DASI* en el metabolismo de *K. phaffii*, en cultivos con metanol, se evaluaron tres estrategias diferentes respecto de los niveles transcripcionales y las condiciones de expresión heteróloga de *DASI* [16,91].

7.2. Evaluación de la fuerza del promotor en DAS1 sobre el desempeño cinético y productivo

En primera instancia, como se muestra en la Figura 2, se analizó el efecto que tenían las diferentes concentraciones de metanol inicial en el medio de cultivo sobre la tasa específica de crecimiento. Con respecto a este parámetro, el análisis de las tres cepas muestra un resultado diferencial al determinar los parámetros cinéticos presentados. En la Tabla 3 vemos que la tasa específica de crecimiento varió entre 0.17 y 0.21 donde la cepa que presentó una menor

μ_{max} fue aquella que sobreexpresaba Das1 bajo el control de P_{MDH3} . No se esperaba este resultado considerando que disminuye la velocidad específica de crecimiento respecto a la cepa control que no sobreexpresa *DASI* [92]

Por otra parte, la cepa que presentó la μ_{max} simulada más alta, fue aquella que sobreexpresa Das1 bajo el control P_{GAP} , un promotor de expresión constitutiva y de alta actividad transcripcional. En este sentido, llama la atención que el resultado sea mejor a los presentados por la cepa que sobreexpresa *DASI* bajo el control del P_{AOX1} , promotor que normalmente se utiliza para sobreexpresar tanto genes recombinantes como genes auxiliares [16,91].

Sin embargo, existen reportes anteriores que hablan respecto de efectos diferenciales que tiene la inserción de diferentes unidades transcripcionales bajo el control del P_{AOX1} [16,48]. Otros estudios reportan un cambio en los resultados obtenidos, dependiendo de las características del promotor seleccionado durante la estrategia de expresión de un gen auxiliar [93,94]. Es por esto que se decidió evaluar la sobreexpresión de *DASI* bajo regiones promotoras de características diferentes.

Al comparar los datos de los parámetros cinéticos obtenidos en este ensayo, destacan las altas μ_{max} obtenidas en todas las cepas estudiadas (entre 0,179 a 0,213 h⁻¹) respecto de lo reportado anteriormente, como se ve en la Tabla 7. Si bien cada estudio utilizó cepas distintas, cepas productoras y diferentes modelos para estimar los parámetros, destaca la coincidencia en las constantes de afinidad por sustrato K_s , las cuales se han reportado entre 0.1, 0.35 y 1.5 g·L⁻¹ [13].

Tabla 7: Parámetros cinéticos reportados en *Komagataella phaffii* cultivada en metanol.

Modelo	μ_{max} [h ⁻¹]	K_s [g·L ⁻¹]	K_i [g·L ⁻¹]	Sistema de Cultivo	Ref.
Andrews	0,146	1,5	8,86	Lote Alimentado	[95]
Monod	0,14	0,1	-	Lote alimentado	[96]
Monod	0,084	0,22	-	Continuo	[97]
Andrews	0,088	0,344	14,86	Lote	[53]
Andrews	0,087	0,35	7,08	Continuo	[98]

En este sentido era de esperar que las cepas mutantes con sobreexpresión de *DASI*, pudiesen presentar constantes de afinidad menores relacionadas a los posibles efectos que esta mutación pudiese generar en el metabolismo de metanol [59,99].

7.3. Tolerancia a la inhibición por metanol: Análisis de la constante K_i

Finalmente, el parámetro más relevante para determinar la cepa que presenta un mejor rendimiento respecto del metabolismo de metanol es la constante de inhibición K_i , donde una constante de inhibición mayor es indicativa de

tolerancia a altas concentraciones de metanol en el medio. En este sentido, todas las cepas estudiadas presentaron niveles de K_i mayores a los reportados en otros estudios [13,91]. Sin embargo, considerando que son cepas productoras de proteínas recombinantes, es necesario considerar los cambios en el metabolismo que puede generar la carga de la producción de proteína en cada caso particular, además de la cepa utilizada en cada estudio y el background genético que ésta pudiese tener [48,82].

Respecto de los valores de K_i las cepas que sobre expresan la enzima *DASI* con promotores fuertes ya sea, P_{AOX1} o P_{GAP} , presentaron las mayores constantes de inhibición [16,91]. Esto indica que resisten altas concentraciones de metanol sin variar demasiado los parámetros cinéticos de crecimiento [13]. Si bien, la constante de inhibición (K_i) de la cepa $P_{AOX-DASI}$ llega a ser el doble que la cepa control [71]. El coeficiente R^2 obtenido entre los datos experimentales y las simulaciones asociadas al modelo de Monod permiten confiar en los parámetros calculados [13,92].

7.4. Comparación de productividades y consumo de metanol

Los resultados presentados en la Figura 3, referente a la productividad de lipasa en sobrenadante, fueron bastante categóricos. Al analizar la productividad volumétrica destaca la cepa que sobreexpresa *DASI* bajo el control del P_{GAP} superando a las otras cepas en casi todas las concentraciones de metanol inicial. Sin embargo, la cepa control mostró mejor desempeño frente a altas concentraciones de metanol inicial entre 10 y 20 g·L⁻¹ [71].

Es importante considerar que la productividad volumétrica depende, entre otras cosas, de la biomasa alcanzada durante las horas de cultivo [13]. Esto se debe a que la tasa específica de crecimiento disminuye cuando la concentración de metanol es alta, logrando alcanzar una menor biomasa en el mismo tiempo de cultivo [91]. Por ende, a altas concentraciones de metanol, un mejor parámetro para comparar el desempeño productivo de cada cepa es la productividad específica (Figura 3B) [48], donde la cepas mutantes con sobreexpresión del gen auxiliar *DASI*, muestran un desempeño mejor en todas las condiciones evaluadas, con excepción de la cepa que sobreexpresa *DASI* bajo el control del P_{AOX1} , la cual presentó productividades específicas iguales o menores a la cepa control en todas las condiciones evaluadas [91].

Este fue un resultado inesperado, considerando que presenta un alto K_i y una μ_{max} simulada cercana a la de las otras cepas [71]. Esto podría estar asociado a la K_s que presenta esta cepa, y como se muestra en la Figura 4B su rápido consumo de metanol puede repercutir en la productividad, dado que el metanol es fuente de carbono, pero también inductor de la expresión de *CalB* [16].

Cuando se llevaron las cepas a cultivo en matraz, a condiciones de cultivo estándar para su evaluación. Los resultados coinciden bastante con los observados en placa de pocillo profundo. El crecimiento de células se observa similar entre las cepas evaluadas (Figura 4). Las diferencias se vuelven evidentes en el consumo de metanol, dónde,

cómo se mencionó anteriormente, la cepa (A) consume más rápido el metanol. A las 12 horas de cultivo la concentración de metanol en él en sobrenadante llega a niveles cercanos a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que la cepa control en las mismas condiciones se encontraba con metanol promedio de $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Si bien, se observan diferentes perfiles de consumo de metanol, es destacable que todas las cepas presentan tasas específicas de consumo de metanol mayores a las del control (Figura 5). Un resultado esperado, considerando que *DASI* participa directamente en la ruta de consumo de metanol.

En este sentido, al analizar el rendimiento de sustrato a biomasa del cultivo en matraz, vemos que solo en la cepa (C) presenta un aumento significativo mientras que (A) y (B) presentan los mismos resultados que el control. Pero si la tasa específica de consumo de metanol es mayor, se espera que la diferencia de carbono consumido derive en proteína recombinante (producto). Sin embargo, al contrastar luego los resultados presentados en la Figura 6, vemos que solo la cepa (B) presentó productividades mayores al control, aunque sólo en etapas tempranas de cultivo (12h). También resalta que la tasa específica de crecimiento mostrada por las cepas en estudio no alcanzó la μ_{max} calculada mediante el modelo de Monod en el ensayo de gradiente inicial donde tanto la cepa (A) y (B) muestran tasas específicas de crecimiento similares a la del control, a diferencia de la cepa (C) que logra alcanzar la μ_{max} estimada previamente [92]

Con los resultados obtenidos hasta este punto, queda en evidencia que la estrategia utilizada en la expresión de un gen auxiliar, específicamente, el promotor que regula su expresión puede generar cambios importantes en el desempeño de una cepa productora de *K. phaffii* [13,16].

La mayor productividad observada en la cepa que expresa *DASI* bajo regulación constitutiva de P_{GAP} podría explicarse por una compleja interacción entre la regulación transcripcional, la disponibilidad enzimática anticipada y el equilibrio metabólico. Esta interpretación sugiere que la expresión de *DASI* modifica indirectamente el flujo de metanol, la concentración de intermediarios y el estado fisiológico celular, sin activar de forma directa la red de promotores inducibles. Cuando *DASI* se co-expresa bajo el mismo promotor inducible que la proteína recombinante, su inducción ocurre de manera simultánea a la de *CalB*, *AOXI* y otros genes de la ruta MUT. Esta sobredemanda podría generar una competencia adicional por factores reguladores limitantes como Mxr1 y Mit1, cuya disponibilidad también depende del estado fisiológico y la velocidad de crecimiento [100]. De hecho, en cepas con múltiples casetes inducibles, el aumento de la dosis génica provoca una atenuación de los genes asociados al metabolismo del metanol, la biogénesis peroxisomal y la secreción proteica [101], un desbalance que solo logra mitigarse parcialmente al sobreexpresar dichos activadores transcripcionales [102].

Por el contrario, la expresión de *DASI* mediante un promotor constitutivo evita esta limitación regulatoria al no añadir una copia adicional que compita por los mismos factores de transcripción. Además, permite acumular la enzima de forma anticipada, de modo que, al iniciar la inducción y la consecuente generación de formaldehído, la

célula ya dispone de una mayor capacidad para derivarlo hacia la vía asimilativa. Este efecto preventivo reduce el desfase temporal entre la producción del intermediario tóxico y su consumo, lo cual favorece directamente el crecimiento, el consumo de metanol y la productividad [103].

Sin embargo, la sola abundancia de Das1 no garantiza un incremento irrestricto del flujo asimilativo, dado que esta ruta compartimentalizada genera una alta demanda de cofactores, aminoácidos y capacidad biosintética [104]. Incrementar la actividad de Das1 desplaza la limitación metabólica hacia etapas posteriores, particularmente hacia la regeneración peroxisomal de xilulosa-5-fosfato (Xu5P), un proceso que depende de enzimas complementarias como Fbp1p, Fba2p y Tal2p [105]. La secreción extracelular de ácidos orgánicos constituye una evidencia fisiológica de este desbalance: al no poder regenerar suficiente Xu5P, oxidar completamente los intermediarios o incorporarlos a la biomasa, la célula desvía el excedente de carbono hacia el metabolismo central. Lejos de contradecir el mejor desempeño de la estrategia constitutiva, esta acumulación indica que se logró optimizar la primera etapa de la ruta, revelando así el siguiente cuello de botella del bioproceso.

Finalmente, el éxito de esta configuración depende de mantener una estrecha coordinación con la vía disimilativa, la cual es crucial para la eliminación de formaldehído y la generación de poder reductor. La alteración de esta rama modifica profundamente procesos centrales como la fosforilación oxidativa, la glucólisis, el ciclo TCA y las respuestas de estrés celular [[60]], y su disrupción aumenta tanto la sensibilidad al formaldehído como las necesidades energéticas de mantenimiento [59]. En consecuencia, el estado redox y energético influye directamente en el rendimiento global; ajustes favorables en el cociente NADH/NAD⁺ y en la carga energética han demostrado potenciar el consumo de metanol y la producción recombinante [70,106]. En conjunto, la superioridad de la expresión constitutiva de *DAS1* se fundamenta en la preparación metabólica previa y la descongestión de la maquinaria regulatoria, confirmando que la enzima ejerce una modulación puramente indirecta sobre la red transcripcional, limitada en última instancia por la regeneración de co-sustratos y el balance energético.

7.5. Análisis transcripcional y correlación de expresión cruzada

Cuando miramos la expresión transcripcional de los principales genes objeto de estudio (Figura 7), nos encontramos con resultados inesperados, dado que, respecto a la expresión transcripcional de *CalB*, cuya unidad transcripcional (gen) es igual en todas las cepas, incluida el control, se observa que las cepas que sobreexpresan *DAS1* presentan tendencias con un aumento en la actividad transcripcional de *CalB* y *AOX1*, principalmente cepa (A) y (B), las cuales mostraron los q_{met} más altas (Figura 5). En este punto es importante recordar que *CalB* se encuentra bajo la regulación del P_{AOX1} .

Los resultados de análisis transcripcional mostraron una alta dispersión, lo que no permitió establecer diferencias estadísticamente significativas. Esta dispersión impide la asociación de los resultados transcripcionales con la

concentración de metanol en el medio a las 12 horas de cultivo, la que igualmente presenta alta dispersión, tanto entre cepas estudiadas como réplicas biológicas de cada una (N=3).

En este punto se tomó la decisión de continuar las evaluaciones únicamente con la cepa (B), ya que mostró los mejores perfiles de productividad en ambos estudios realizados hasta ese momento (cultivo en placa de pocillo profundo con gradiente de metanol y cultivo en matraz). Desde este punto en adelante, la cepa que sobreexpresa *DAS1* bajo el control de *GAP*, es nombrada como +**DAS1**.

7.6. Análisis fisiológico de la cepa +**DAS1** en cultivo controlado por lote

Considerando que el cultivo en pequeña escala presenta limitaciones técnicas en la determinación de parámetros metabólicos, como la transferencia y consumo de oxígeno, y con objeto de dar cumplimiento al objetivo específico N°2 se llevó la cepa +*DAS1*, además de la cepa control, a cultivo en reactor con metanol como única fuente de carbono.

La concentración de metanol donde se obtuvo el mejor rendimiento fue de $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Al analizar los resultados presentados en la Figura 8, es posible observar que tanto el crecimiento celular (Figura 8A) como el consumo de metanol (Figura 8B) presentan perfiles casi idénticos entre ambas cepas. Sin embargo, al analizar la productividad volumétrica luego de 20 horas de cultivo (Figura 8C), destaca la mayor productividad alcanzada con +**DAS1**, lo que se tradujo en un aumento del 30%.

En cuanto a la productividad específica (Figura 8D) presentada por ambas cepas, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Los perfiles de velocidad de transferencia y consumo de oxígeno (Figura 8E y 8F) ambas cepas presentaron perfiles similares a pesar de la mayor dispersión de datos que presentó la cepa control (Figura 8E) considerando las 4 réplicas biológicas analizadas.

Al mirar en detalle los parámetros cinéticos del cultivo por lote en reactor (Tabla 4), no existen diferencias estadísticamente significativas en los parámetros específicos de consumo y producción (q_s , q_{O_2} y q_p), aunque los valores de la tasa específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) son considerablemente altos al compararlas con parámetros obtenidos en cultivos con glucosa o glicerol como fuente de carbono, el cual se ha descrito alrededor de $3\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ [13,107]. Considerando que el metabolismo de metanol requiere oxígeno en el primer paso de la ruta de oxidación, además del oxígeno utilizado por el metabolismo central durante la fosforilación oxidativa, estos valores de q_{O_2} se encuentran dentro de lo esperado durante el cultivo con metanol como única fuente de carbono [13,107].

Se analizó la actividad transcripcional de marcadores genéticos asociados a estrés de retículo (Figura 9B), de estrés oxidativo (Figura 9C) y los genes de interés antes evaluados (Figura 9A). Tanto la expresión de *DAS1* como la de

AOXI y *CalB* resultaron muy elevadas en la cepa +*DASI*, resultado que coincide con lo obtenido en el análisis transcripcional durante el cultivo en matraz.

Como se mencionó anteriormente, la modificación realizada a las cepas incluye la inserción del gen de *CalB* bajo el control del P_{AOXI} (estimado previamente en al menos 4 inserciones [81]), y la inserción de una copia extra de *DASI* bajo la regulación de diferentes promotores. Estas modificaciones no deberían generar cambios en la regulación de otros genes asociados al metabolismo de metanol como *AOXI*. Sin embargo, los resultados muestran claramente que las cepas sobreexpresoras de *DASI* presentan cambios en la regulación transcripcional de *AOXI* y *CalB*, en este punto, esta sobreexpresión transcripcional no esperada de *CalB*, podría estar explicando el aumento de la productividad de la cepa modificada, y no directamente la inserción de una segunda copia del gen *DASI*.

No se encontraron reportes específicos que describan este fenómeno en particular. Sin embargo, algunos autores mencionan que la integración de secuencias recombinantes en locus comúnmente utilizados en este modelo, como *AOXI*, *GAP*, así como *HIS4* pueden generar perturbaciones en el metabolismo celular [23,108–110], por lo que se han abocado a la tarea de encontrar nuevos sitios de integración que generen un menor impacto en el metabolismo y homeostasis celular [110].

Considerando el punto anterior, se buscó encontrar antecedentes que pudiesen dar explicación al fenómeno observado. En este sentido, se ha reportado que un número elevado en las de copias de unidades transcripcionales reguladas por el P_{AOXI} , deriva en la atenuación de los niveles de expresión de este [111]. A lo largo de los últimos años, ha quedado en evidencia la compleja red de regulación de P_{AOXI} y la vía de señalización asociada a metanol en general [112]. Trabajos recientes, han ido extendiendo el conocimiento sobre la compleja red regulatoria asociada al metabolismo del metanol y específicamente P_{AOXI} , extendiendo las posibles rutas regulatorias a la vía de MAPK [113], cuya activación se ha asociado a cambios transcriptómicos globales, como respuesta adaptativa que busca favorecer la supervivencia celular [114].

La relevancia en la regulación de P_{AOXI} ha llevado al amplio desarrollo de estrategias que modifican directa o indirectamente su regulación [112]. Estos esfuerzos se han basado principalmente en la modificación de la expresión de activadores como PRM1, MIT1 y MXR1, o el bloqueo de represores como NRG1 [16,115,116], generando la activación de P_{AOXI} , en condiciones normalmente son represoras durante cultivos con glicerol [16,23,94,117]. Si bien no hay datos experimentales que puedan asociar alguna de las vías descritas a los cambios regulatorios de P_{AOXI} , se hace relevante considerar la amplitud de posibilidades que pueden estar involucradas en este cambio respecto de la levadura progenitora.

En *K. phaffii*, la inducción del promotor no depende exclusivamente del metanol, sino también de sus productos de oxidación (formaldehído y formiato). Estos metabolitos ejercen una retroalimentación positiva sobre el promotor [22,103], logrando inducir la expresión génica y la producción de proteína recombinante incluso en ausencia de

metanol [118]. En este sentido, la actividad promotora responde directamente a la concentración y velocidad de recambio de estos intermediarios intracelulares.

Bajo esta perspectiva, la sobreexpresión de *DAS1* habría canalizado el formaldehído hacia el ciclo de XuMP, mitigando su toxicidad y optimizando la distribución de carbono hacia la generación de biomasa y proteína recombinante. Esta disminución del estrés metabólico y la consiguiente mejora del balance redox podrían explicar la mayor activación de la red de genes MUT. Si bien Wang et al. [106] reportaron beneficios similares al modificar conjuntamente *AOXI* y *DAS1*, la presencia de alteraciones adicionales en su diseño impide atribuir dicho efecto exclusivamente a *DAS1*.

Es importante destacar que la relación entre el flujo metabólico y la inducción no es lineal. Un consumo acelerado de carbono puede agotar los metabolitos inductores y reducir la actividad del promotor, tal como se ha observado al sobreexpresar *SORI* [119]. De forma análoga, la sobreexpresión de *DAS1* reconfigura el delicado equilibrio entre la inducción, asimilación, disimilación y toxicidad de la ruta MUT.

7.6.1. Sobreexpresión de DAS1 y su efecto sobre el flujo de carbono en la oxidación de metanol.

El incremento del flujo asimilativo de metanol, desde aproximadamente un 60 % hasta un 80 % (Figura 10), en la cepa sobreexpresora de *DAS1* evidencia una captura más eficiente de formaldehído, aunque esto no se tradujo necesariamente en una conversión más efectiva hacia biomasa o proteína recombinante (CalB). La elevada actividad metabólica de *Das1* impulsaría la formación de intermediarios derivados de la dihidroxiacetona y el gliceraldehído-3-fosfato a una tasa superior a la capacidad de procesamiento del metabolismo central, desencadenando un desequilibrio entre la entrada de carbono, la regeneración del co-sustrato xilulosa-5-fosfato (Xu5P), la homeostasis redox y la demanda biosintética de la célula [71,106].

En este contexto, la duplicación en el flujo de exportación de ácidos orgánicos (del 20 % al 40 %) resulta plenamente consistente con un fenómeno de desbordamiento metabólico (overflow metabolism). Bajo este esquema, el lactato (u otros ácidos orgánicos) actúa como un aceptor alternativo de carbono y equivalentes reductores cuando el flujo metabólico supera la capacidad de incorporación al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la síntesis de biomasa o la formación de producto. Si bien este desvío metabólico podría contribuir a mitigar transitoriamente la acumulación de formaldehído intracelular [59], conlleva una pérdida neta de carbono y representa un costo bioenergético adicional asociado a la acidificación, la acumulación intracelular de aniones o los mecanismos de exportación dependientes de energía [120,121].

En consecuencia, el aumento en la tasa de asimilación primaria observado en la cepa +*DAS1* se ve neutralizado por una mayor secreción de subproductos fermentativos, lo que podría explicar el por qué las fracciones finales de carbono dirigidas hacia la biomasa y CalB se mantienen en niveles equivalentes a los de la cepa control.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la sobreexpresión de *DASI* desplazó exitosamente el cuello de botella metabólico desde la etapa inicial de captura y fijación del formaldehído hacia etapas posteriores vinculadas al procesamiento de los intermediarios asimilativos, la regeneración del co-sustrato, el balance redox o la capacidad respiratoria celular.

7.7. Estrategias de adaptación celular: Respuesta al estrés redox

El análisis de los marcadores de estrés durante las etapas tempranas del cultivo en biorreactor proporcionó información importante sobre la respuesta celular a la sobreexpresión de *DASI* y la inducción con metanol. Resulta interesante notar que se observó la activación de peroxidasas específicas como *PMP20* (peroxidasa de membrana del peroxisoma) y *CAT1* (catalasa1).

Estas enzimas están directamente destinadas al control de la acumulación de H_2O_2 durante la oxidación de metanol [44]. Por el contrario, el factor de transcripción Yap1, descrito como un activador de la respuesta general de estrés oxidativo [43], no presentó cambios significativos respecto al control (Figura 9). Lo anterior sugiere que, si bien existe una respuesta específica a una posible alza de especies reactivas de oxígeno (ROS, por la sigla en inglés) en el peroxisoma, la carga metabólica oxidativa no superó los niveles mínimos para activar una respuesta de estrés oxidativo sistémico o general.

Es importante mencionar, que los genes marcadores utilizados son de utilidad para conocer la condición redox de la célula, son insuficientes para consolidar información detallada de la homeostasis redox de la célula. Para esto, sería necesario medir directamente la acumulación de ROS intracelular o la proporción de glutatión oxidado y reducido, para lo cual se han descrito técnicas directas utilizadas en *K. phaffii* [62,122,123].

7.8. Optimización de la vía de secreción: El impacto de Pdi en la eficiencia de CalB

Por otra parte, los marcadores de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por las siglas en inglés) [80] no mostraron cambios significativos, con la notable excepción de un alza en los niveles de expresión de Pdi (Proteína Disulfuro Isomerasa). Esta proteína, encargada de facilitar la formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas en el Retículo Endoplasmático (RE), ha mostrado una relación directa con los niveles de estrés oxidativo durante la producción de proteínas recombinantes [124]. Este factor es relevante al considerar la estructura de la lipasa CalB, la cual requiere la formación de tres puentes disulfuro y presenta una zona de glicosilación [125].

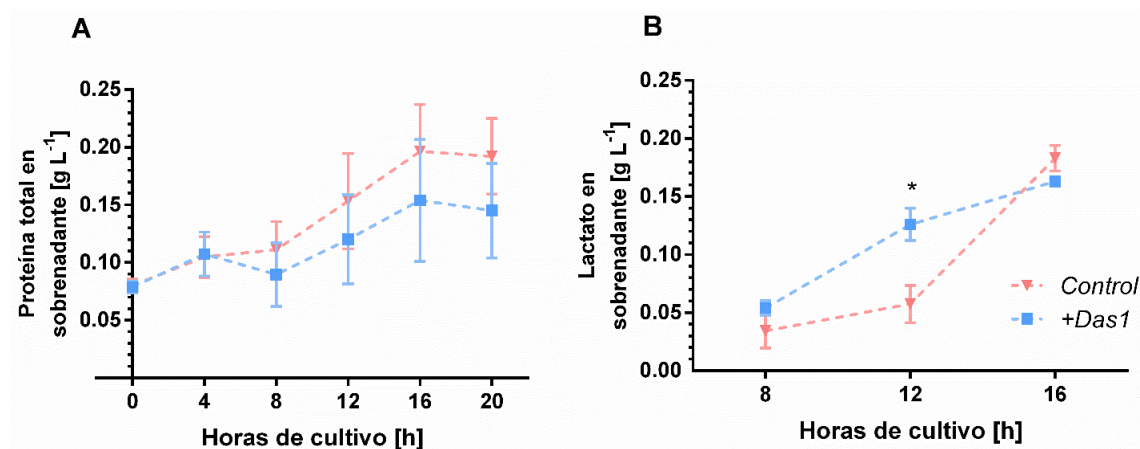


Figura 12: Análisis de componentes extracelulares durante cultivo por lote en reactor. Se presenta la cuantificación de proteínas totales (A) presentes en el sobrenadante a lo largo del cultivo (BCA Pierce, Thermo Fisher), y la concentración de ácidos orgánicos (lactato) evaluado (B).

Este fenómeno de mayor expresión de Pdi en +DAS1 podría explicar una aparente contradicción observada durante el análisis de productividades en el cultivo en reactor: a pesar de registrar una mayor actividad lipasa en el sobrenadante de +DAS1, la concentración de proteínas totales fue consistentemente menor al control (Figura 12). Dado que el análisis mediante SDS-PAGE (Figura 13) solo detectó una banda coincidente con el tamaño de CalB (33 kDa) [126], esta discrepancia sugiere una mayor eficiencia en la secreción y/o plegamiento de la proteína activa por parte de la cepa +DAS1, en lugar de una mayor cantidad de proteína total.

La afirmación anterior puede verse respaldada por el aumento de *PDI* desde etapas tempranas, un fenómeno generado como respuesta a la demanda de recursos derivada de la expresión de CalB y el desequilibrio en la homeostasis redox señalada por los marcadores de estrés oxidativo. Siendo coincidente con lo reportado por otros grupos de investigación en los que la sobreexpresión de genes asociados al RE o a UPR llevan a mejoras considerables en la productividad de proteínas recombinantes en *K. phaffii* [48,80,127].

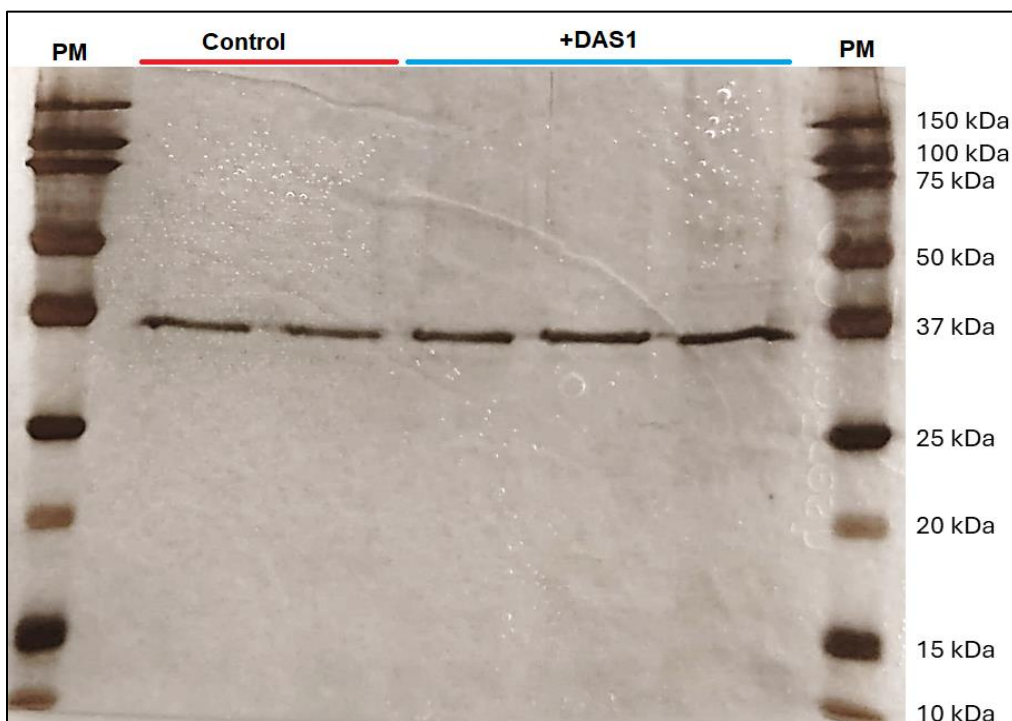


Figura 13: Perfil de proteínas en sobrenadante durante cultivo por lote. Se muestra la electroforesis denaturante de proteínas (SDS-PAGE 12%) de muestras colectadas al final del cultivo en reactor (20 h), cada carril muestra una réplica biológica del cultivo de la cepa según corresponda. (PM) Kaleidoscope BioRad.

7.9. El fenotipo de producción desacoplada en cultivos de alta densidad

Al llevar la producción a un sistema más exigente, como lo es el cultivo por lote alimentado con metanol y alta densidad celular [88], la cepa *K. phaffii* +DAS1 exhibió un fenotipo desacoplado de la productividad de CalB respecto al metabolismo de oxígeno y metanol. En estas condiciones, la levadura +DAS1 presentó una productividad volumétrica levemente superior al control, a pesar de registrar consumos específicos de oxígeno (q_{O_2}) y metanol (q_S) menores (Tabla 7).

Destaca la disminución en la biomasa absoluta (XV) luego de iniciar la fase de alimentación, fenómeno puede estar relacionado con la exigencia que implica este proceso de adaptación. Respecto de esto, se ha reportado la activación de las vías de autofagia y peroxifagia (degradación del peroxisoma) durante cultivos intensivos o procesos exigentes de producción [128]. Este escenario de alta exigencia, sumado a la concentración de metanol que se mantuvo por encima de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ durante la fase de alimentación, buscaba amplificar las diferencias metabólicas que no fueron tan evidentes en el cultivo por lote.

Originalmente, se esperaba que la expresión constitutiva de *DASI* disminuyera el proceso de adaptación a la fase de metanol. Sin embargo, los resultados indican que las diferencias se intensifican al final de la fase de alimentación

por metanol. Esto sugiere que el efecto de la sobreexpresión de *DAS1* no es un mecanismo de adaptación temprana, sino un mecanismo de optimización de flujo bajo alta carga tóxica y limitación de crecimiento. La exposición a una concentración más alta de metanol podría estar haciendo efectivo el desplazamiento del flujo de carbono hacia la ruta asimilativa (como mecanismo de desintoxicación), dado el aumento de las probabilidades de acumulación de formaldehído intracelular. El desempeño de +DAS1 en estas condiciones exigentes lo convierte en un interesante objeto de estudio industrial, ya que combina baja demanda de oxígeno con tolerancia a la acumulación de metanol en el medio.

7.9.1. Disminución del consumo de oxígeno en cultivo de alta densidad de células

Al analizar el rendimiento de producción de CalB en función de la tasa de consumo específico de oxígeno. La cepa +DAS1 presentó 3,62 [UI·mmolO₂⁻¹·h⁻¹], mientras que la cepa control presentó 2,77 [UI·mmolO₂⁻¹·h⁻¹], con esto es posible determinar que la cepa que sobreexpresa DAS1 fue un 31% superior al control, aun cuando el crecimiento se estancó durante las últimas 10 h de alimentación. Este resultado sugiere una redistribución favorable de los recursos celulares desde la formación de biomasa hacia la producción recombinante.

La mayor captura asimilativa de formaldehído podría disminuir su acumulación y el estrés oxidativo asociado al metabolismo del metanol, preservando la capacidad biosintética y secretora [106]. Esta interpretación concuerda con la relación entre tolerancia al estrés oxidativo, menores niveles de ROS y mayor expresión de proteínas heterólogas descrita en *K. phaffii* [129], así como con el elevado coste respiratorio y oxidativo que acompaña la inducción con metanol [42]. Industrialmente, el incremento del 31% en la producción de CalB por unidad de oxígeno representa una ventaja relevante para cultivos de alta densidad, en los que la transferencia de oxígeno suele limitar el escalamiento, pues permitiría mantener la producción con menores requerimientos relativos de aireación, agitación o enriquecimiento con oxígeno.

Esta mejora adquiere especial relevancia industrial porque los cultivos de alta densidad de *K. phaffii* inducidos con metanol presentan una elevada demanda de transferencia de oxígeno, que puede requerir altos niveles de agitación, aireación, presión o enriquecimiento con oxígeno [130–132]. Al aumentar la escala, las limitaciones de mezcla y transferencia de masa generan gradientes locales de oxígeno y metanol que pueden reducir el rendimiento y perjudicar la secreción de proteína recombinante [133,134]. Asimismo, el metabolismo aerobio intensivo incrementa la generación de calor y, por tanto, las necesidades de refrigeración del reactor [135,136]. En este contexto, el aumento del 31 % en la producción de CalB por unidad de oxígeno observado con la sobreexpresión de DAS1 podría reducir los requerimientos relativos de aireación, potencia de agitación, enriquecimiento con oxígeno y remoción de calor, facilitando el escalamiento y disminuyendo los costes operacionales del proceso.

7.10. Contraste con la ingeniería metabólica clásica de la vía del metanol

El desempeño de la cepa +DAS1, resultante de la sobreexpresión de *DASI*, contrasta con otras estrategias de ingeniería metabólica dirigidas a la vía disimilativa del metanol. Por ejemplo, la enzima formaldehído deshidrogenasa (*FDHI*) ha sido blanco de numerosos estudios, donde su sobreexpresión ha mostrado aumentos en la productividad volumétrica en cepas productoras de proteínas recombinantes (fenotipo Mut^S) [71]. Por otra parte, la delección de *FDHI* ha resultado en cambios fisiológicos relevantes en *Komagataella phaffii*, como una considerable disminución en la capacidad de crecimiento con metanol [59,71,118,119,137]. Entre estos resultados, resalta que la modificación de las enzimas involucradas en el manejo del formaldehído (FDH en la disimilación, o DAS1 en la asimilación) tiene efectos distintos en el balance metabólico.

7.11. Limitaciones del estudio y proyecciones futuras: Hacia la optimización del bioproceso

A pesar de los sólidos resultados que cumplen con los objetivos de la tesis, hace falta una mayor recopilación de datos para comprender completamente el fenotipo desacoplado en el cultivo de alta densidad. Se necesita un análisis transcriptómico de marcadores de estrés o un análisis de balance de flujos durante la etapa final del cultivo en lote alimentado que permita entender con mayor detalle lo que ocurre dentro de la célula. Este análisis podría establecer si el aumento en la eficiencia se debe a una represión metabólica del crecimiento o a una amplificación del flujo asimilativo en condiciones de alta toxicidad, lo que permitiría realizar ajustes en el proceso que optimicen aún más las ventajas de la cepa +DAS1.

8. CONCLUSIONES

Considerando los resultados planteados durante el desarrollo de este trabajo, es posible concluir la manipulación de la vía asimilativa del metanol, mediante la sobreexpresión de el gen *DAS1* en *Komagataella phaffii* Mut⁺, constituye una estrategia efectiva para mejorar la productividad de proteínas recombinantes, validando parcialmente la hipótesis planteada, pero refinando el mecanismo biológico propuesto.

Si bien se postuló inicialmente que la mejora provendría de un aumento en el flujo asimilativo total, los análisis de balance de flujos demostraron que la ventaja en la asimilación de carbono de la cepa modificada se ve limitada por la acumulación de ácido orgánico exportado al medio extracelular. Por lo que se genera una redistribución del carbono intracelular. La sobreexpresión constitutiva de *DAS1* bajo el promotor P_{GAP} minimizó el desbordamiento de carbono hacia rutas no deseadas, canalizando los recursos hacia la síntesis de proteína recombinante y biomasa, incluso bajo condiciones de estrés oxidativo y perturbación de la homeostasis redox evidenciada por la activación de genes marcadores específicos *PMP20* y *CAT1*.

Aunque la hipótesis inicial apostaba por un efecto metabólico directo de la enzima Das1 (desvío de flujo de carbono), los resultados que demuestran el aumento en la transcripción de CalB (un efecto indirecto de la manipulación genética), podría ser un factor determinante asociado a la mayor productividad observada, y no permite determinar a qué fenómeno estaría asociado el aumento de la productividad volumétrica. Dilucidar si es un efecto directo o sistémico queda como un pendiente para futuras evaluaciones.

Dentro de los resultados más relevantes, se encuentra la identificación de un fenotipo de "producción desacoplada" en la cepa +DAS1 durante cultivos de alta densidad. A diferencia de las estrategias clásicas que asocian la productividad al crecimiento celular, esta variante genética demostró capacidad para sostener niveles de productividad específica de lipasa similares o incluso mayores al control, manteniendo una tasa de crecimiento cercana a cero, y en particular, con una demanda específica de oxígeno y metanol inferior. Este comportamiento desafía los paradigmas convencionales de producción en sistemas metilotróficos y posiciona a la cepa +DAS1 como una candidata de interés para aplicaciones industriales, donde la reducción de la demanda de oxígeno y la generación de calor son factores críticos para la viabilidad económica y operativa del proceso.

Es importante reconocer, las limitaciones del alcance que presentan los resultados obtenidos a partir de los cultivos de alta densidad de células por lote alimentado, debido a la falta de réplicas biológicas. Sin embargo, probablemente debido a la reproducibilidad del trabajo con *K. phaffii*, es posible encontrar investigaciones con ensayos en réplica biológica única, como el publicado por Çelik y colaboradores en 2010 [54].

No obstante, la investigación abre nuevas interrogantes que requieren evaluación futura para consolidar una eventual transferencia tecnológica de estos resultados. Queda pendiente dilucidar, mediante análisis transcriptómicos globales, los mecanismos regulatorios que permiten el desacoplamiento entre crecimiento y producción en la fase de lote alimentado, así como confirmar si la sobreexpresión colateral de *AOX1* y el gen reportero es un efecto directo de la inserción o una respuesta sistémica a la alteración del flujo de metanol. Asimismo, será necesario profundizar en el análisis de la calidad del producto final para asegurar que el estrés redox y la mayor demanda sobre la maquinaria de plegamiento, sugerida por el alza de *PDI*, no comprometan las características postraduccionales de proteínas más complejas.

En definitiva, este estudio aporta evidencia sólida de que la ingeniería de la vía asimilativa del formaldehído, específicamente a través de la regulación constitutiva de *DASI*, ofrece una alternativa superior a la manipulación tradicional de la vía disimilativa. Esta estrategia no solo incrementa la productividad volumétrica, sino que confiere al sistema una eficiencia energética y una robustez fisiológica que son claves para el desarrollo de la próxima generación de bioprocesos basados en *Komagataella phaffii*.

9. Bibliografía

1. Kurtzman, C.P. Biotechnological Strains of *Komagataella (pichia) pastoris* Are *Komagataella phaffii* as Determined from Multigene Sequence Analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1435–1435, doi:10.1007/S10295-009-0638-4.
2. Heisteringer, L.; Gasser, B.; Mattanovich, D. Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: A Methanol Devouring Biotech Yeast Formerly Known as *Pichia Pastoris* microbe profile. *Microbiology (N. Y.)*. **2020**, *166*, 614–616, doi:10.1099/mic.0.000958.
3. Zhu, T.; Sun, H.; Wang, M.; Li, Y. *Pichia pastoris* as a Versatile Cell Factory for the Production of Industrial Enzymes and Chemicals: Current Status and Future Perspectives. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*, 1–13, doi:10.1002/biot.201800694.
4. Ahmad, M.; Hirz, M.; Pichler, H.; Schwab, H. Protein Expression in *Pichia pastoris*: Recent Achievements and Perspectives for Heterologous Protein Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5301–5317, doi:10.1007/s00253-014-5732-5.
5. Maccani, A.; Landes, N.; Stadlmayr, G.; Maresch, D.; Leitner, C.; Maurer, M.; Gasser, B.; Ernst, W.; Kunert, R.; Mattanovich, D. *Pichia pastoris* Secretes Recombinant Proteins Less Efficiently than Chinese Hamster Ovary Cells but Allows Higher Space-Time Yields for Less Complex Proteins. *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 526–537, doi:10.1002/BIOT.201300305.
6. Weinacker, D.; Rabert, C.; Zepeda, A.B.; Figueroa, C.A.; Pessoa, A.; Fariás, J.G. Applications of Recombinant *Pichia pastoris* in the Healthcare Industry. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *44*, 1043–1048, doi:10.1590/S1517-83822013000400004.
7. Spohner, S.C.; Müller, H.; Quitmann, H.; Czermak, P. Expression of Enzymes for the Usage in Food and Feed Industry with *Pichia Pastoris*. *J. Biotechnol.* **2015**, *202*, 118–134, doi:10.1016/J.JBIOTEC.2015.01.027.
8. Khlebodarova, T.M.; Bogacheva, N. V.; Zadorozhny, A. V.; Bryanskaya, A. V.; Vasilieva, A.R.; Chesnokov, D.O.; Pavlova, E.I.; Peltek, S.E. *Komagataella phaffii* as a Platform for Heterologous Expression of Enzymes Used for Industry. *Microorganisms* **2024**, *12*, doi:10.3390/MICROORGANISMS12020346.
9. Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 45–66, doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
10. Laukens, B.; De Wachter, C.; Callewaert, N. Engineering the *Pichia pastoris* N-Glycosylation Pathway Using the GlycoSwitch Technology. *Methods in Molecular Biology* **2015**, *1321*, 103–122, doi:10.1007/978-1-4939-2760-9_8.
11. Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. Heterologous Protein Production Using the *Pichia pastoris* Expression System. *Yeast* **2005**, *22*, 249–270, doi:10.1002/yea.1208.
12. Juturu, V.; Wu, J.C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 7–21, doi:10.1002/cbic.201700460.
13. Peña, D.A.; Gasser, B.; Zanghellini, J.; Steiger, M.G.; Mattanovich, D. Metabolic Engineering of *Pichia pastoris*. *Metab. Eng.* **2018**, *50*, 2–15.

14. Baratti, J.; Couderc, R. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase+. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2279–2289, doi:10.1080/00021369.1980.10864320.
15. Cregg, J.M.; Barringer, K.J.; Hessler, A.Y.; Madden, K.R. *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 3376–3385, doi:10.1128/MCB.5.12.3376-3385.1985.
16. Vogl, T.; Glieder, A. Regulation of *Pichia pastoris* Promoters and Its Consequences for Protein Production. *N. Biotechnol.* **2013**, *30*, 385–404, doi:10.1016/j.nbt.2012.11.010.
17. Mattanovich, D.; Jungo, C.; Wenger, J.; Dabros, M.; Maurer, M. Yeast Suspension Culture. *Wiley Blackwell* **2014**, 9783527335473, 94–129, doi:10.1002/9783527683321.
18. Ata, Ö.; Ergün, B.G.; Fickers, P.; Heistering, L.; Mattanovich, D.; Rebner, C.; Gasser, B. What Makes *Komagataella phaffii* non-conventional? *FEMS Yeast Res.* **2021**, *21*, doi:10.1093/FEMSYR/FOAB059.
19. Yurimoto, H.; Oku, M.; Sakai, Y. Yeast Methylophily: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis. *Int. J. Microbiol.* **2011**, *2011*, doi:10.1155/2011/101298.
20. Koutz, P.; Davis, G.R.; Stillman, C.; Barringer, K.; Cregg, J.; Thill, G. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. *Yeast* **1989**, *5*, 167–177, doi:10.1002/YEA.320050306.
21. Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)*. **1993**, *11*, 905–910, doi:10.1038/NBT0893-905.
22. Singh, A.; Narang, A. The Mut⁺ Strain of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Expresses PAOX1 5 and 10 Times Faster than Mut⁻ and Mut⁻-Strains: Evidence That Formaldehyde or/and Formate Are True Inducers of AOX. *bioRxiv* **2019**, 1–34, doi:10.1101/573519.
23. Wu, X.; Cai, P.; Yao, L.; Zhou, Y.J. Genetic Tools for Metabolic Engineering of *Pichia pastoris*. *Engineering microbiology* **2023**, *3*, doi:10.1016/J.ENGMIC.2023.100094.
24. Wollborn, D.; Munkler, L.P.; Horstmann, R.; Germer, A.; Blank, L.M.; Büchs, J. Predicting High Recombinant Protein Producer Strains of *Pichia pastoris* MutS Using the Oxygen Transfer Rate as an Indicator of Metabolic Burden. *Scientific Reports* **2022**, *12*, 11225–, doi:10.1038/s41598-022-15086-w.
25. Chiruvolu, V.; Cregg, J.M.; Meagher, M.M. Recombinant Protein Production in an Alcohol Oxidase-Defective Strain of *Pichia pastoris* in Fedbatch Fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 277–283, doi:10.1016/S0141-0229(97)00042-2.
26. Kupcsulik, B.; Engineering, B.S.-P.P.C. Effect Of Methanol Concentration On The Recombinant *Pichia pastoris* MutS Fermentation. *Chemical Engineering*, **2004**, *48*, 73–87.
27. Zavec, D.; Troyer, C.; Maresch, D.; Altmann, F.; Hann, S.; Gasser, B.; Mattanovich, D. Beyond Alcohol Oxidase: The Methylophilyic Yeast *Komagataella phaffii* Utilizes Methanol Also with Its Native Alcohol Dehydrogenase Adh2. *FEMS Yeast Res.* **2021**, *21*, doi:10.1093/FEMSYR/FOAB009.
28. Mattanovich, D.; Sauer, M.; Gasser, B. Industrial Microorganisms: *Pichia pastoris*. *Industrial Biotechnology* **2016**, 687–714, doi:10.1002/9783527807796.ch19.
29. Zahrl, R.J.; Mattanovich, D.; Gasser, B. The Impact of ERAD on Recombinant Protein Secretion in *Pichia pastoris* (Syn *Komagataella* Spp.). *Microbiology (United Kingdom)* **2018**, *164*, 453–463, doi:10.1099/mic.0.000630.

30. Zahrl, R.J.; Peña, D.A.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Systems Biotechnology for Protein Production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* **2017**, *17*, 1–15, doi:10.1093/femsyr/fox068.
31. van der Klei, I.J.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Veenhuis, M. The Significance of Peroxisomes in Methanol Metabolism in Methylotrophic Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, *1763*, 1453–1462, doi:10.1016/J.BBAMCR.2006.07.016.
32. Rußmayer, H.; Buchetics, M.; Gruber, C.; Valli, M.; Grillitsch, K.; Modarres, G.; Guerrasio, R.; Klavins, K.; Neubauer, S.; Drexler, H.; et al. Systems-Level Organization of Yeast Methylotrophic Lifestyle. *BMC Biol.* **2015**, *13*, doi:10.1186/s12915-015-0186-5.
33. Cos, O.; Serrano, A.; Montesinos, J.L.; Ferrer, P.; Cregg, J.M.; Valero, F. Combined Effect of the Methanol Utilization (Mut) Phenotype and Gene Dosage on Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris* Fed-Batch Cultures. *J. Biotechnol.* **2005**, *117*, 321–335, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.12.010.
34. Zhang, W.; Inan, M.; Meagher, M.M. Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2000**, *5*, 275–287, doi:10.1007/BF02942184.
35. Brettel, R.; Lamprecht, I.; Schaarschmidt, B. Microcalorimetric Investigations of the Metabolism of Yeasts VII. Flow-Calorimetry of Aerobic Batch Cultures. *Radiat. Environ. Biophys.* **1980**, *18*, 301–309, doi:10.1007/BF01324273/METRICS.
36. Schuler, M.M.; Sivaprakasam, S.; Freeland, B.; Hama, A.; Hughes, K.M.; Marison, I.W. Investigation of the Potential of Biocalorimetry as a Process Analytical Technology (PAT) Tool for Monitoring and Control of Crabtree-Negative Yeast Cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 575–584, doi:10.1007/S00253-011-3507-9.
37. Khlebodarova, T.M.; Bogacheva, N. V.; Zadorozhny, A. V.; Bryanskaya, A. V.; Vasilieva, A.R.; Chesnokov, D.O.; Pavlova, E.I.; Peltek, S.E. *Komagataella phaffii* as a Platform for Heterologous Expression of Enzymes Used for Industry. *Microorganisms* **2024**, *12*, doi:10.3390/MICROORGANISMS12020346.
38. Wakayama, K.; Yamaguchi, S.; Takeuchi, A.; Mizumura, T.; Ozawa, S.; Tomizuka, N.; Hayakawa, T.; Nakagawa, T. Regulation of Intracellular Formaldehyde Toxicity during Methanol Metabolism of the Methylotrophic Yeast *Pichia methanolica*. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *122*, 545–549, doi:10.1016/j.jbiosc.2016.03.022.
39. Farrugia, G.; Balzan, R. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Front. Oncol.* **2012**, *2 JUN*, 1–21, doi:10.3389/fonc.2012.00064.
40. Bener Aksam, E.; Jungwirth, H.; Kohlwein, S.D.; Ring, J.; Madeo, F.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. Absence of the Peroxiredoxin Pmp20 Causes Peroxisomal Protein Leakage and Necrotic Cell Death. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1115–1124, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.07.010.
41. Horiguchi, H.; Yurimoto, H.; Kato, N.; Sakai, Y. Antioxidant System within Yeast Peroxisome. Biochemical and Physiological Characterization of CbPmp20 in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 14279–14288, doi:10.1074/jbc.M011661200.
42. Vanz, A.L.; Lünsdorf, H.; Adnan, A.; Nimtz, M.; Gurramkonda, C.; Khanna, N.; Rinas, U. Physiological Response of *Pichia pastoris* GS115 to Methanol-Induced High-Level Production of the Hepatitis B Surface Antigen: Catabolic Adaptation, Stress Responses, and Autophagic Processes. *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 1–11, doi:10.1186/1475-2859-11-103.

43. Yano, T.; Takigami, E.; Yurimoto, H.; Sakai, Y. Yap1-Regulated Glutathione Redox System Curtails Accumulation of Formaldehyde and Reactive Oxygen Species in Methanol Metabolism of *Pichia pastoris*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 540–549, doi:10.1128/EC.00007-09.
44. Yano, T.; Yurimoto, H.; Sakai, Y. Activation of the Oxidative Stress Regulator PpYap1 through Conserved Cysteine Residues during Methanol Metabolism in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 1404–1411, doi:10.1271/bbb.90109.
45. Gross, E.; Sevier, C.S.; Heldman, N.; Vitu, E.; Bentzur, M.; Kaiser, C.A.; Thorpe, C.; Fass, D. Generating Disulfides Enzymatically: Reaction Products and Electron Acceptors of the Endoplasmic Reticulum Thiol Oxidase Ero1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 299–304, doi:10.1073/PNAS.0506448103.
46. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2277–2293, doi:10.1089/ars.2007.1782.
47. Mattanovich, D.; Gasser, B.; Hohenblum, H.; Sauer, M. Stress in Recombinant Protein Producing Yeasts. *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 121–135, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.04.035.
48. Raschmanová, H.; Weninger, A.; Knejzlik, Z.; Melzoch, K.; Kovar, K. Engineering of the Unfolded Protein Response Pathway in *Pichia pastoris*: Enhancing Production of Secreted Recombinant Proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 4397–4414, doi:10.1007/s00253-021-11336-5.
49. Looser, V.; Bruhlmann, B.; Bumbak, F.; Stenger, C.; Costa, M.; Camattari, A.; Fotiadis, D.; Kovar, K. Cultivation Strategies to Enhance Productivity of *Pichia pastoris*: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *33*, 1177–1193, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.008.
50. Yang, Z.; Zhang, Z. Engineering Strategies for Enhanced Production of Protein and Bio-Products in *Pichia pastoris*: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 182–195, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.002.
51. Jungo, C.; Schenk, J.; Pasquier, M.; Marison, I.W.; von Stockar, U. A Quantitative Analysis of the Benefits of Mixed Feeds of Sorbitol and Methanol for the Production of Recombinant Avidin with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, 57–66, doi:10.1016/J.JBIOTEC.2007.05.019.
52. Berrios, J.; Flores, M.O.; Díaz-Barrera, A.; Altamirano, C.; Martínez, I.; Cabrera, Z. A Comparative Study of Glycerol and Sorbitol as Co-Substrates in Methanol-Induced Cultures of *Pichia pastoris*: Temperature Effect and Scale-up Simulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44*, 407–411, doi:10.1007/s10295-016-1895-7.
53. Canales, C.; Altamirano, C.; Berrios, J. The Growth of *Pichia pastoris* Mut⁺ on Methanol–Glycerol Mixtures Fits to Interactive Dual-Limited Kinetics: Model Development and Application to Optimised Fed-Batch Operation for Heterologous Protein Production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 1827–1838, doi:10.1007/s00449-018-2005-1.
54. Çelik, E.; Çalik, P.; Oliver, S.G. Metabolic Flux Analysis for Recombinant Protein Production by *Pichia pastoris* Using Dual Carbon Sources: Effects of Methanol Feeding Rate. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 317–329, doi:10.1002/bit.22543.
55. Rebnegger, C.; Vos, T.; Graf, A.B.; Valli, M.; Pronk, J.T.; Daran-Lapujade, P.; Mattanovich, D. *Pichia pastoris* Exhibits High Viability and a Low Maintenance Energy Requirement at Near-Zero Specific Growth Rates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4570–4583, doi:10.1128/AEM.00638-16.

56. Baumann, K.; Carnicer, M.; Dragosits, M.; Graf, A.B.; Stadlmann, J.; Jouhten, P.; Maaheimo, H.; Gasser, B.; Albiol, J.; Mattanovich, D.; et al. A Multi-Level Study of Recombinant *Pichia pastoris* in Different Oxygen Conditions. *BMC Syst. Biol.* **2010**, *4*, 141, doi:10.1186/1752-0509-4-141.
57. Baumann, K.; Maurer, M.; Dragosits, M.; Cos, O.; Ferrer, P.; Mattanovich, D. Hypoxic Fed-Batch Cultivation of *Pichia pastoris* Increases Specific and Volumetric Productivity of Recombinant Proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 177–183, doi:10.1002/BIT.21763.
58. Tomàs-Gamisans, M.; Ferrer, P.; Albiol, J. Fine-Tuning the *P. pastoris* IMT1026 Genome-Scale Metabolic Model for Improved Prediction of Growth on Methanol or Glycerol as Sole Carbon Sources. *Microb. Biotechnol.* **2018**, *11*, 224–237, doi:10.1111/1751-7915.12871.
59. Berrios, J.; Theron, C.W.; Steels, S.; Ponce, B.; Velastegui, E.; Bustos, C.; Altamirano, C.; Fickers, P. Role of Dissimilative Pathway of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): Formaldehyde Toxicity and Energy Metabolism. *Microorganisms* **2022**, *10*, doi:10.3390/MICROORGANISMS10071466.
60. Yu, Y.-F.; Yang, J.; Zhao, F.; Lin, Y.; Han, S. Comparative Transcriptome and Metabolome Analyses Reveal the Methanol Dissimilation Pathway of *Pichia pastoris*. **2021**, doi:10.21203/RS.3.RS-871571/V1.
61. Niu, H.; Jost, L.; Pirlot, N.; Sassi, H.; Daukandt, M.; Rodriguez, C.; Fickers, P. A Quantitative Study of Methanol/Sorbitol Co-Feeding Process of a *Pichia pastoris* Mut+/PAOX1-LacZ Strain. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 33, doi:10.1186/1475-2859-12-33.
62. Delic, M.; Graf, A.B.; Koellensperger, G.; Haberhauer-Troyer, C.; Hann, S.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Overexpression of the Transcription Factor Yap1 Modifies Intracellular Redox Conditions and Enhances Recombinant Protein Secretion. *Microbial Cell* **2014**, *1*, 376–386, doi:10.15698/mic2014.11.173.
63. Delic, M.; Göngrich, R.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Engineering of Protein Folding and Secretion - Strategies to Overcome Bottlenecks for Efficient Production of Recombinant Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 414–437, doi:10.1089/ARS.2014.5844/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG.
64. Bustos, C.; Quezada, J.; Veas, R.; Altamirano, C.; Braun-Galleani, S.; Fickers, P.; Berrios, J. Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. *Metabolites* **2022**, *12*, doi:10.3390/METABO12040346.
65. Tsygankov, M.A.; Padkina, M. V. Influence of PDI Gene Overexpression on the Production of Heterologous Proteins in Yeast *Pichia pastoris*. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* **2018**, *8*, 197–205, doi:10.1134/S2079059718020120.
66. Inan, M.; Aryasomayajula, D.; Sinha, J.; Meagher, M.M. Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 771–778, doi:10.1002/bit.20762.
67. Damasceno, L.M.; Anderson, K.A.; Ritter, G.; Cregg, J.M.; Old, L.J.; Batt, C.A. Cooverexpression of Chaperones for Enhanced Secretion of a Single-Chain Antibody Fragment in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 381–389, doi:10.1007/s00253-006-0652-7.
68. He, H.; Wu, S.; Mei, M.; Ning, J.; Li, C.; Ma, L.; Zhang, G.; Yi, L. A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–12, doi:10.3389/fbioe.2020.00118.

69. Prielhofer, R.; Barrero, J.J.; Steuer, S.; Gassler, T.; Zahrl, R.; Baumann, K.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B.; Marx, H. GoldenPiCS: A Golden Gate-Derived Modular Cloning System for Applied Synthetic Biology in the Yeast *Pichia pastoris*. *BMC Syst. Biol.* **2017**, *11*, 123, doi:10.1186/s12918-017-0492-3.
70. Jayachandran, C.; Athiyaman, B.P.; Sankaranarayanan, M. Cofactor Engineering Improved CALB Production in *Pichia pastoris* through Heterologous Expression of NADH Oxidase and Adenylate Kinase. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0181370.
71. Krainer, F.W.; Dietzsch, C.; Hajek, T.; Herwig, C.; Spadiut, O.; Glieder, A. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris* Strains with an Engineered Methanol Utilization Pathway. *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 22, doi:10.1186/1475-2859-11-22.
72. Canales, C.; Altamirano, C.; Berrios, J. Effect of Dilution Rate and Methanol-Glycerol Mixed Feeding on Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase Production with *Pichia pastoris* Mut⁺ Phenotype in Continuous Culture. *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 707–714, doi:10.1002/BTPR.2069.
73. Merkaš, M.; Grujicic, N.; Geier, M.; Glieder, A.; Emmerstorfer-Augustin, A. The MF α Signal Sequence in Yeast-Based Protein Secretion: Challenges and Innovations'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2025**, *109*, 138, doi:10.1007/S00253-025-13532-Z.
74. Wang, W.; Han, M.; Zhu, G.; Liu, X.; Zhao, T.; Ma, X.; Gong, X.; Xu, C. Recycling Selectable Markers via Cre/LoxP System for Constructing *Komagataella phaffii* Strains Co-Expressing Multiple Proteins. *Biotechnol. Lett.* **2024**, doi:10.1007/S10529-024-03466-3.
75. Prielhofer, R.; Barrero, J.J.; Steuer, S.; Gassler, T.; Zahrl, R.; Baumann, K.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B.; Marx, H. GoldenPiCS: A Golden Gate-Derived Modular Cloning System for Applied Synthetic Biology in the Yeast *Pichia pastoris*. *BMC Systems Biology* **2017**, *11*, 123-, doi:10.1186/S12918-017-0492-3.
76. Toleco, M.R.; van der Giezen, M. A Simple and Universal Quasi-Modular Cloning System Using NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit. *Biotechniques* **2025**, *77*, 257–262, doi:10.1080/07366205.2025.2542012.
77. Pfaffl, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45–e45, doi:10.1093/NAR/29.9.E45.
78. Theron, C.W.; Berrios, J.; Delvigne, F.; Fickers, P. Integrating Metabolic Modeling and Population Heterogeneity Analysis into Optimizing Recombinant Protein Production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 63–80.
79. Theron, C.W.; Vandermies, M.; Telek, S.; Steels, S.; Fickers, P. Comprehensive Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* for Production of Candida Antarctica Lipase B. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–9, doi:10.1038/s41598-020-58683-3.
80. Huang, J.; Wang, Q.; Bu, W.; Chen, L.; Yang, Z.; Zheng, W.; Li, Y.; Li, J. Different Construction Strategies Affected on the Physiology of *Pichia pastoris* Strains Highly Expressed Lipase by Transcriptional Analysis of Key Genes. *Bioengineered* **2019**, *10*, 150–161, doi:10.1080/21655979.2019.1614422.
81. Velastegui, E.; Theron, C.; Berrios, J.; Fickers, P. Downregulation by Organic Nitrogen of AOX1 Promoter Used for Controlled Expression of Foreign Genes in the Yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **2019**, *36*, 297–304, doi:10.1002/yea.3381.

82. Lin, N.X.; He, R.Z.; Xu, Y.; Yu, X.W. Augmented Peroxisomal ROS Buffering Capacity Renders Oxidative and Thermal Stress Cross-Tolerance in Yeast. *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20*, 1–14, doi:10.1186/S12934-021-01623-1/FIGURES/6.
83. Torres, P.; Saa, P.A.; Albiol, J.; Ferrer, P.; Agosin, E. Contextualized Genome-Scale Model Unveils High-Order Metabolic Effects of the Specific Growth Rate and Oxygenation Level in Recombinant *Pichia pastoris*. *Metab. Eng. Commun.* **2019**, *9*, doi:10.1016/j.mec.2019.e00103.
84. Jordà, J.; De Jesus, S.S.; Peltier, S.; Ferrer, P.; Albiol, J. Metabolic Flux Analysis of Recombinant *Pichia pastoris* Growing on Different Glycerol/Methanol Mixtures by Iterative Fitting of NMR-Derived ¹³C- Labelling Data from Proteinogenic Amino Acids. *N. Biotechnol.* **2014**, *31*, 120–132, doi:10.1016/j.nbt.2013.06.007.
85. Zepeda, A.B.; Figueroa, C.A.; Abdalla, D.S.P.; Maranhão, A.Q.; Ulloa, P.H.; Pessoa, A.; Farias, J.G. HSF-1, HIF-1 and HSP90 Expression on Recombinant *Pichia pastoris* under Fed-Batch Fermentation. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 485–490, doi:10.1590/S1517-83822014000200015.
86. Ebrahim, A.; Lerman, J.A.; Palsson, B.O.; Hyduke, D.R. COBRApy: CONstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Systems Biology* **2013**, *7*, 74–, doi:10.1186/1752-0509-7-74.
87. García Sánchez, C.E.; Torres Sáez, R.G. Comparison and Analysis of Objective Functions in Flux Balance Analysis. *Biotechnol. Prog.* **2014**, *30*, 985–991, doi:10.1002/BTPR.1949.
88. Ebbecke, J.P.; Schlauch, D.; Güler, C.; Pirmahboub, H.; Kara, S.; Pepelanova, I. Methanol Feeding Strategies for High-Yield Production of a Collagen-Based Protein in *Komagataella phaffii*. **2025**, doi:10.21203/RS.3.RS-6985224/V1.
89. Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. Bioreactor Scale-up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 153–176, doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2008.10.006.
90. Xing, W.; Yin, M.; Lv, Q.; Hu, Y.; Liu, C.; Zhang, J. Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity. *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts* **2014**, 1–31, doi:10.1016/B978-0-444-63278-4.00001-X.
91. Garrigós-Martínez, J.; Vuoristo, K.; Nieto-Taype, M.A.; Tähtiharju, J.; Uusitalo, J.; Tukiainen, P.; Schmid, C.; Tolstorukov, I.; Madden, K.; Penttilä, M.; et al. Bioprocess Performance Analysis of Novel Methanol-Independent Promoters for Recombinant Protein Production with *Pichia Pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20*, 1–12, doi:10.1186/S12934-021-01564-9/FIGURES/6.
92. Geier, M.; Brandner, C.; Strohmeier, G.A.; Hall, M.; Hartner, F.S.; Glieder, A. Engineering *Pichia pastoris* for Improved NADH Regeneration: A Novel Chassis Strain for Whole-Cell Catalysis. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2015**, *11*, 1741–1748, doi:10.3762/BJOC.11.190.
93. Chen, S.; Zhang, M.; Wu, X.; Bai, F.; Gao, L.; Shen, Y.; Dou, S.; Cai, P.; Zhou, Y.J. Promoter Engineering for Enhanced 3-Hydroxypropionic Acid Production in *Pichia pastoris*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2025**, *10*, 916–924, doi:10.1016/J.SYNBIO.2025.04.013.
94. Vogl, T. Engineering of Promoters for Gene Expression in *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology* **2022**, *2513*, 153–177, doi:10.1007/978-1-0716-2399-2_10.

95. Zhang, W.; Bevins, M.; Plantz, B.; Smith, L.; Meaghuer, M. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein, the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A - PubMed. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *70*, 1–8.
96. Jahic, M.; Rotticci-Mulder, J.; Martinelle, M.; Hult, K.; Enfors, S.O. Modeling of Growth and Energy Metabolism of *Pichia pastoris* Producing a Fusion Protein. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2002**, *24*, 385–393, doi:10.1007/S00449-001-0274-5/METRICS.
97. Curvers, S.; Linnemann, J.; KLauser, T.; Wandrey, C.; Takors, R. Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris* in Continuous Fermentation – Kinetic Analysis of Growth and Product Formation - Curvers - 2001 - Chemie Ingenieur Technik - Wiley Online Library. *Chemie Ingenieur Technik* **2001**, *12*, 1615–1621.
98. Zhou, X.S.; Zhang, Y.X. Decrease of Proteolytic Degradation of Recombinant Hirudin Produced by *Pichia pastoris* by Controlling the Specific Growth Rate. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1449–1453, doi:10.1023/A:1019831406141/METRICS.
99. Liu, T.; Liu, B.; Zhou, H.; Zhang, J. Knockout of the DAS Gene Increases S -Adenosylmethionine Production in *Komagataella phaffii*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2021**, *35*, 29–36, doi:10.1080/13102818.2020.1837012.
100. Garrigós-Martínez, J.; Nieto-Taype, M.A.; Gasset-Franch, A.; Montesinos-Seguí, J.L.; Garcia-Ortega, X.; Valero, F. Specific Growth Rate Governs AOX1 Gene Expression, Affecting the Production Kinetics of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) PAOX1-Driven Recombinant Producer Strains with Different Target Gene Dosage. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, doi:10.1186/S12934-019-1240-8.
101. Cámara, E.; Landes, N.; Albiol, J.; Gasser, B.; Mattanovich, D.; Ferrer, P. Increased Dosage of AOX1 Promoter-Regulated Expression Cassettes Leads to Transcription Attenuation of the Methanol Metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–16, doi:10.1038/srep44302.
102. Cámara, E.; Monforte, S.; Albiol, J.; Ferrer, P. Deregulation of Methanol Metabolism Reverts Transcriptional Limitations of Recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella Spp*) with Multiple Expression Cassettes under Control of the AOX1 Promoter. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 1710–1720, doi:10.1002/bit.26947.
103. Singh, A.; Narang, A. PAOX1 Expression in Mixed-Substrate Continuous Cultures of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Is Completely Determined by Methanol Consumption Regardless of the Secondary Carbon Source. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1123703, doi:10.3389/FBIOE.2023.1123703/TEXT.
104. Rußmayer, H.; Buchetics, M.; Gruber, C.; Valli, M.; Grillitsch, K.; Modarres, G.; Guerrasio, R.; Klavins, K.; Neubauer, S.; Drexler, H.; et al. Systems-Level Organization of Yeast Methylophilic Lifestyle. *BMC Biol.* **2015**, *13*, 80, doi:10.1186/S12915-015-0186-5.
105. Fukuoka, H.; Kawase, T.; Oku, M.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Hayakawa, T.; Nakagawa, T. Peroxisomal Fba2p and Tal2p Complementally Function in the Rearrangement Pathway for Xylulose 5-Phosphate in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *128*, 33–38, doi:10.1016/j.jbiosc.2019.01.008.
106. Wang, Y.; Li, R.; Zhao, F.; Wang, S.; Zhang, Y.; Fan, D.; Han, S. Metabolic Engineering of *Komagataella phaffii* for the Efficient Utilization of Methanol. *Microb. Cell Fact.* **2024**, *23*, 1–12, doi:10.1186/S12934-024-02475-1/FIGURES/7.

107. Mitic, B.M.; Troyer, C.; Lutz, L.; Baumschabl, M.; Hann, S.; Mattanovich, D. The Oxygen-Tolerant Reductive Glycine Pathway Assimilates Methanol, Formate and CO₂ in the Yeast *Komagataella phaffii*. *Nature Communications* **2023**, *14*, 1–13, doi:10.1038/s41467-023-43610-7.
108. Liu, Q.; Shi, X.; Song, L.; Liu, H.; Zhou, X.; Wang, Q.; Zhang, Y.; Cai, M. CRISPR-Cas9-Mediated Genomic Multiloci Integration in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, doi:10.1186/s12934-019-1194-x.
109. Gao, J.; Xu, J.; Zuo, Y.; Ye, C.; Jiang, L.; Feng, L.; Huang, L.; Xu, Z.; Lian, J. Synthetic Biology Toolkit for Marker-Less Integration of Multigene Pathways into *Pichia pastoris* via CRISPR/Cas9. *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 623–633, doi:10.1021/acssynbio.1c00307.
110. Cai, P.; Duan, X.; Wu, X.; Gao, L.; Ye, M.; Zhou, Y.J. Recombination Machinery Engineering Facilitates Metabolic Engineering of the Industrial Yeast *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 7791–7805, doi:10.1093/nar/gkab535.
111. Cámara, E.; Landes, N.; Albiol, J.; Gasser, B.; Mattanovich, D.; Ferrer, P. Increased Dosage of AOX1 Promoter-Regulated Expression Cassettes Leads to Transcription Attenuation of the Methanol Metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–16, doi:10.1038/srep44302.
112. Kalender, Ö.; Çalık, P. Transcriptional Regulatory Proteins in Central Carbon Metabolism of *Pichia pastoris* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 7273–7311, doi:10.1007/s00253-020-10680-2.
113. Zhang, C.; Ma, Y.; Miao, H.; Tang, X.; Xu, B.; Wu, Q.; Mu, Y.; Huang, Z. Transcriptomic Analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 During Heterologous Protein Production Using a High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation Strategy. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 517786, doi:10.3389/FMICB.2020.00463/BIBTEX.
114. Sanz, A.B.; García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Nombela, C.; Arroyo, J. Cooperation between SAGA and SWI/SNF Complexes Is Required for Efficient Transcriptional Responses Regulated by the Yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7159–7172, doi:10.1093/NAR/GKW324.
115. Zhan, C.; Yang, Y.; Zhang, Z.; Li, X.; Liu, X.; Bai, Z. Transcription Factor Mxr1 Promotes the Expression of Aox1 by Repressing Glycerol Transporter 1 in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* **2017**, *17*, doi:10.1093/FEMSYR/FOX015.
116. Chang, C.-H.; Hsiung, H.-A.; Hong, K.-L.; Huang, C.-T. Enhancing the Efficiency of the *Pichia pastoris* AOX1 Promoter via the Synthetic Positive Feedback Circuit of Transcription Factor Mxr1. *BMC Biotechnol.* **2018**, *18*, 81, doi:10.1186/s12896-018-0492-4.
117. Arjmand, S. Promoters in *Pichia pastoris*: A Toolbox for Fine-Tuned Gene Expression. *Methods in Molecular Biology* **2024**, *2844*, 159–178, doi:10.1007/978-1-0716-4063-0_11.
118. Bustos, C.; Berrios, J.; Fickers, P. Formate from THF-C1 Metabolism Induces the AOX1 Promoter in Formate Dehydrogenase-Deficient *Komagataella phaffii*. *Microb. Biotechnol.* **2024**, *17*, e70022, doi:10.1111/1751-7915.70022.
119. Bustos, C.; Cozmar, R.; Berrios, J.; Fickers, | Patrick Sorbitol Uptake and Oxygen Transfer Shape AOX1 Promoter Induction in Formate Dehydrogenase-Deficient *Komagataella phaffii*. *Microb. Biotechnol.* **2025**, *18*, e70263, doi:10.1111/1751-7915.70263.

120. Abbott, D.A.; Van Den Brink, J.; Minneboo, I.M.K.; Pronk, J.T.; Van Maris, A.J.A. Anaerobic Homolactate Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Results in Depletion of ATP and Impaired Metabolic Activity. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 349–357, doi:10.1111/J.1567-1364.2009.00506.X.
121. Peetermans, A.; Foulquié-Moreno, M.R.; Thevelein, J.M. Mechanisms Underlying Lactic Acid Tolerance and Its Influence on Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell* **2021**, *8*, 111–130, doi:10.15698/MIC2021.06.751.
122. Haberhauer-Troyer, C.; Delic, M.; Gasser, B.; Mattanovich, D.; Hann, S.; Koellensperger, G. Accurate Quantification of the Redox-Sensitive GSH/GSSG Ratios in the Yeast *Pichia pastoris* by HILIC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2031–2039, doi:10.1007/s00216-012-6620-4.
123. Delic, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Monitoring Intracellular Redox Conditions in the Endoplasmic Reticulum of Living Yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *306*, 61–66, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01935.x.
124. Liu, C.; Gong, J.S.; Su, C.; Li, H.; Li, H.; Rao, Z.M.; Xu, Z.H.; Shi, J.S. Pathway Engineering Facilitates Efficient Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 5893–5912, doi:10.1007/S00253-022-12139-Y.
125. Uppenberg, J.; Ohmer, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G.J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838–16851, doi:10.1021/BI00051A035.
126. Höck, H.; Engel, S.; Weingarten, S.; Keul, H.; Schwaneberg, U.; Möller, M.; Bocola, M. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. *Polymers* **2018**, *Vol. 10*, Page 524 **2018**, *10*, 524, doi:10.3390/POLYM10050524.
127. Yu, S.; Miao, L.; Huang, H.; Li, Y.; Zhu, T. High-Level Production of Glucose Oxidase in *Pichia pastoris*: Effects of Hac1p Overexpression on Cell Physiology and Enzyme Expression. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *141*, 109671, doi:10.1016/j.enzmtec.2020.109671.
128. Ohsawa, S.; Oku, M.; Yurimoto, H.; Sakai, Y. Regulation of Peroxisome Homeostasis by Post-Translational Modification in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii*. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 887806, doi:10.3389/fcell.2022.887806.
129. Lin, N.X.; He, R.Z.; Xu, Y.; Yu, X.W. Oxidative Stress Tolerance Contributes to Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14*, 1–13, doi:10.1186/S13068-021-02013-W/TABLES/2.
130. Jenzsch, M.; Lange, M.; Bär, J.; Rahfeld, J.U.; Lübbert, A. Bioreactor Retrofitting to Avoid Aeration with Oxygen in *Pichia pastoris* Cultivation Processes for Recombinant Protein Production. *Chemical Engineering Research and Design* **2004**, *82*, 1144–1152, doi:10.1205/CERD.82.9.1144.44166.
131. Muñoz, M.A.M.; Jáuregui Rincón, J.; Carreón, L.S.; Chávez Vela, N.A. Dextranase Production by Recombinant *Pichia pastoris* under Operational Volumetric Mass Transfer Coefficient (K_{La}) and Volumetric Gassed Power Input (P_g/V) Attainable at Commercial Large Scale. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2019**, *49*, 606–615, doi:10.1080/10826068.2019.1591992.

132. Liu, W.C.; Gong, T.; Wang, Q.H.; Liang, X.; Chen, J.J.; Zhu, P. 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.* **2016**, *6*, 1–12, doi:10.1038/srep18439.
133. Tervasmäki, P.; Latva-Kokko, M.; Taskila, S.; Tanskanen, J. Effect of Oxygen Transfer on Yeast Growth — Growth Kinetic and Reactor Model to Estimate Scale-up Effects in Bioreactors. *Food and Bioprocess Processing* **2018**, *111*, 129–140, doi:10.1016/J.FBP.2018.08.004.
134. Velastegui, E.; Quezada, J.; Altamirano, C.; Berrios, J.; Fickers, P. Co-Feeding Strategy Alleviates Hypoxic Stress in Large-Scale Bioreactor for Optimal Production of Secretory Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **2023**, *373*, 20–23, doi:10.1016/J.JBIOTEC.2023.06.006.
135. Katla, S.; Pavan, S.S.; Mohan, N.; Sivaprakasam, S. Biocalorimetric Monitoring of Glycoengineered P. *Pastoris* Cultivation for the Production of Recombinant HuIFN α 2b: A Quantitative Study Based on Mixed Feeding Strategies. *Biotechnol. Prog.* **2020**, *36*, e2971, doi:10.1002/BTPR.2971.
136. Anasontzis, G.E.; Penã, M.S.; Spadiut, O.; Brumer, H.; Olsson, L. Effects of Temperature and Glycerol and Methanol-Feeding Profiles on the Production of Recombinant Galactose Oxidase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **2014**, *30*, 728–735, doi:10.1002/BTPR.1878.
137. Àvila-Cabré, S.; Albiol, J.; Ferrer, P. Metabolic Engineering of *Komagataella phaffii* for Enhanced 3-Hydroxypropionic Acid (3-HP) Production from Methanol. *Journal of Biological Engineering* **2025**, *19*, 19-, doi:10.1186/S13036-025-00488-X.

Anexo 1

Tabla A1: Reacciones estequiométricas consideradas para modelo de análisis de flux metabólico de carbono [59].

Número	Reacción estequiométrica	Relevancia metabólica
1	MetOH + 0.5 O ₂ → FAH	Oxidación de metanol
2	FAH → 2 NADH + CO ₂	Vía disimilativa
3	FAH + ATP → 0.33333 G3P	Vía asimilativa
4	G3P ↔ PEP + ATP + NADH	Glucólisis/Gluconeogénesis
5	PEP → Pyr + ATP	
6	F6P ↔ G6P	
7	2 G3P ↔ F6P	Vía Pentosa Fosfato
8	G6P → CO ₂ + R5P + 2 NADPH	
9	2 R5P ↔ F6P + E4P	
10	E4P + R5P ↔ F6P + G3P	Vía anaplerótica
11	Pyr + ATP + CO ₂ ↔ OA	
12	Pyr → AcCoA + CO ₂ + NADH	Piruvato deshidrogenasa
13	AcCoA + OA → aKG + CO ₂ + NADH	Ciclo TCA
14	aKG → CO ₂ + SucCoA + NADH	
15	SucCoA ↔ Mal + ATP + FADH ₂	
16	Mal ↔ OA + NADH	Metabolismo de aminoácidos
17	Glu + NH ₃ + ATP → Gln	
18	aKG + NADPH + NH ₃ → Glu	
19	Glu + ATP + 2 NADPH → Pro	
20	AcCoA + 2 ATP + 2 Glu + NADPH → Arg + Mal + aKG	
21	AcCoA + ATP + 2 Glu + NADPH → aKG + CO ₂ + Lys	
22	Glu + OA ↔ aKG + Asp	
23	Asp + 2 ATP + NH ₃ → Asn	
24	Asp + 2 ATP + 2 NADPH → Thr	
25	Asp + ATP + 2 NADPH + SucCoA + Cys → FADH ₂ + Mal + NH ₃ + Pyr + Met	
26	Thr + NADPH + Glu + Pyr → Ile + CO ₂ + NH ₃ + aKG	
27	2 Pyr + NADPH + Glu → Val + aKG + CO ₂	
28	AcCoA + Glu + 2 Pyr + NADPH → Leu + aKG + 2 CO ₂	
29	Ser ↔ Gly	
30	PEP + Glu → NADH + Ser + aKG	
31	Ser + AcCoA + 2 ATP + 2 NADPH → Cys	
32	Glu + Pyr ↔ aKG + Ala	
33	E4P + 2 PEP + Ser + ATP + R5P + NADPH → Trp + CO ₂ + G3P + Glu + Pyr	
34	2 PEP + ATP + E4P + Glu + NADPH → aKG + Tyr + CO ₂	
35	ATP + E4P + Glu + 2 PEP + NADPH → aKG + CO ₂ + Phe	
36	Glu + R5P → His + aKG	
37	NADH + 0.5 O ₂ → 2.5 ATP	Energía
38	FADH ₂ + O ₂ → 1.5 ATP	
39	ATP + H ₂ O → ADP + Pi	Biomass synthesis
40	0.013 Ala + 0.003 Arg + 0.005 Asn + 0.023 Asp + 0.444 ATP + 0.006 Cys + 0.045 Gln + 0.007 Glu + 0.012 Gly + 0.001 His + 0.006 Ile + 0.006 Leu + 0.006 Lys + 0.006 Met + 0.003 Phe + 0.005 Pro + 0.007 Ser + 0.007 Thr + 0.000 Trp + 0.004 Tyr + 0.006 Val + 0.1476 ATP + 0.042 AcCoA + 0.0185 CO ₂ + 0.002392 G3P + 0.043754 G6P + 0.0241 NH ₃ + 0.0078 O ₂ + 0.0127 R5P + 0.0006 NADH + 0.0828 NADPH → Biomass	
41 (*)	5 Met + 11 Lys + 36 Leu + 32 Ser + 30 Thr + 28 Gly + 27 Val + 40 Ala + 7 Cys + 31 Pro + 9 Arg + 14 Asp + 10 Phe + 18 Gln + 11 Ile + 14 Asn + 5 Trp + 9 Tyr + 4 Glu + 1 His + 1368 ATP → CALBe + 1368 ADP + 1368 Pi + 1027 H ₂ O	Síntesis de CalB
42 (*)	Pyr + NADH + H → Lact + NAD	Producción de lactato

(*) Reacciones incorporadas al modelo previamente descrito.

Anexo 2: Productividad

Publicaciones generadas durante el desarrollo del programa de doctorado:

- Velastegui, E., **Quezada, J.**, Ponce, B., Adrián, C., Offei, B., Wolfe, K. H., ... Braun-Galleani, S. (2025). Enhanced bioprocess performance and β -glucosidase productivity of a novel *Komagataella phaffii* strain generated by intraspecific crossing. *Fermentation*. <https://doi.org/10.3390/fermentation11110634>
- Velastegui, E., **Quezada, J.**, Altamirano, C., Berrios, J., & Fickers, P. (2023). Co-feeding strategy alleviates hypoxic stress in large-scale bioreactor for optimal production of secretory recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.06.006>
- Velastegui, E., **Quezada, J.**, Guerrero, K., Altamirano, C., Martinez, J. A., Berrios, J., & Fickers, P. (2023). Is heterogeneity in large-scale bioreactors a real problem in recombinant protein synthesis by *Pichia pastoris*? *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12434-2>
- Bustos, C., **Quezada, J.**, Veas, R., Altamirano, C., Braun-Galleani, S., Fickers, P., & Berrios, J. (2022). Advances in cell engineering of the *Komagataella phaffii* platform for recombinant protein production. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo12040346>

Participación en congresos:

- IX SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE TECNOLOGÍA DE CULTIVOS CELULARES (IX SLATCC)
Santa Fe, Argentina / 27 al 29 de octubre de 2022.
Formato Póster - Modification of the assimilative metabolism of *Pichia pastoris* for the improvement of tolerance to methanol and the productivity of recombinant protein.
- 37th International Specialised Symposium on Yeasts (ISSY 37)
Adelaida, Australia / 27 de noviembre al 1 de diciembre de 2023.
Formato Presentación oral - Overexpression of Dihydroxyacetone Synthase 1 in Mut+ *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Improves the Tolerance to Methanol and Formaldehyde Pulses
- Congreso Chileno de Microbiología (SOMICH XLVII)
Viña del Mar, Chile / 24 al 27 de noviembre de 2025.
Formato Presentación oral - Overexpression of Dihydroxyacetone Synthase 1 in Mut+ *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Improves the Tolerance to Methanol and the Productivity of Recombinant Proteins