

Department of Industrial Engineering

*Ph.D. Course in Chemical Engineering
(XII Cycle-New Series)*

High Cell Density Cultivation to Produce Heterologous Proteins by *S. cerevisiae* Strains: a Holistic Approach to Investigate and Optimize the System

Abstract

Carmin Landi

Il lavoro di ricerca di questa tesi di dottorato è focalizzato sullo studio e la realizzazione di sistemi ad elevata densità cellulare (HCDC) con ceppi auxotrofi del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, quest'ultimo utilizzato come ospite per la produzione di proteine eterologhe (HEPs).

Considerando la complessità dei sistemi HCDC e che la loro performance dipende da interazioni forti tra determinati biologici ed ambientali, lo studio di tali sistemi è stato effettuato mediante un approccio olistico ovvero considerando il sistema colturale nel suo complesso ed il suo comportamento esplicabile sulla base di interconnessioni intime delle sue parti. Sotto questa visione, il lavoro ha come obiettivo, non solo il migliorare la performance delle HCDC ma anche elucidare la fisiologia espressa dal lievito quando prolifera in questo tipo di sistemi.

Lo studio delle HCDC è stato condotto in un reattore fed-batch aerato nel quale è realizzato l'accumulo della biomassa nel tempo sino al raggiungimento di HCDC. Ciò è possibile grazie al prolungamento dei tempi di lavoro e al controllo dei sottoprodotti, o repressione dei cataboliti, effettuata attraverso il controllo del substrato alimentato.

Inizialmente, l'attività sperimentale si è rivolta nel trovare un ospite per l'espressione delle proteine eterologhe.

A tal riguardo è stata realizzata un'investigazione sistematica considerando sei ceppi del lievito *S. cerevisiae* appartenenti alla famiglia CEN.PK, caratterizzati da numero e tipo differente di auxotrofia. Tale studio preliminare ha dato risultati chiari sul potenziale ospite da poter essere impiegato per la produzione delle proteine ricombinate. Infatti il ceppo selezionato, CEN.PK113-5D, produce un quantitativo di biomassa approssimativamente tre volte maggiore rispetto agli altri ceppi testati, molto simile a quello ottenuto con il lievito industriale che non reca auxotrofie.

Sulla base di questi risultati sono state ottimizzate le condizioni operative del bioprocesso. In particolare l'ospite selezionato è stato testato a diverse condizioni operative per trovare quale valore di velocità di crescita specifica assicura valori elevati di produttività volumetrica e resa in biomassa contemporaneamente.

Successivamente, CEN.PK113-5D è stato prima trasformato per l'espressione di interleuchina-1 β , usata come proteina modello, e successivamente per due proteine di forte interesse dell'industria agro-alimentare: la Lipasi A da *Bacillus subtilis* ed una endoglucanasi da *Paenibacillus barcinonensis*.

I test nel reattore fed-batch sono stati combinati con studi fisiologici per appurare la presenza di stress ossidativo (analizzando le specie reattive dell'ossigeno ROS e la catalasi), la vitalità cellulare e la presenza di sottoprodotti nel mezzo colturale durante le corse fermentative.

Il risultato di questo lavoro è stato implementato esprimendo in CEN.PK113-5D tre proteine umane: l'emoglobina, la mioglobina e la neuroglobina. In tal modo, gli effetti sulla crescita del lievito della produzione di un ampio range di proteine ricombinate di diversa origine è stato investigato. È interessante notare, l'effetto positivo sulla crescita realizzato con l'espressione di mioglobina e neuroglobina umana, e la loro possibile interazione con il trasporto dell'ossigeno nella cellula del lievito; ciò potrebbe avere interessanti ricadute nel campo applicativo.

Durante il lavoro, particolare interesse è stato riservato allo studio riguardante i limiti riscontrati durante la coltivazione dei microrganismi ad elevate densità cellulari. Infatti le corse fermentative in fed-batch, dei ceppi di *S. cerevisiae*, sono state caratterizzate dall'aver un decadimento peculiare del tasso specifico di crescita accompagnato da fluttuazioni del metabolismo, con un limite di densità cellulare difficile da superare, che per CEN.PK113-5D è di circa 100 g l⁻¹.

Successivamente è stato evidenziato che i fenomeni di decadimento della crescita erano correlati all'accumulo nel mezzo di coltura di composti inibenti non ancora identificati.

L'approccio sperimentale di questa tesi è stato implementato con lo sviluppo di un modello matematico innovativo basato su principi della System Dynamic. Tale modello è stato capace di rappresentare le dinamiche di crescita dei ceppi di *S. cerevisiae* in reattori batch e fed-batch. Tale modello è stato sviluppato attraverso la rappresentazione esplicita delle due principali vie cataboliche del lievito, la respirazione e la fermentazione. Il piruvato è stato identificato come metabolita chiave del metabolismo degli zuccheri nel lievito. Inoltre nella fase di modellazione sono stati considerati composti che esercitano un'azione negativa sulla crescita.

I risultati della modellazione mostrano come per ottenere una buona capacità descrittiva del modello è essenziale considerare l'azione del *negative-feedback* esercitata dai composti tossici

(English version)

The research of this PhD thesis has been focused on the study and realization of high cell density cultivation (HCDC) systems with auxotrophic strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, these latter to be used as hosts for heterologous proteins (HEPs) production.

Considering the complexity of the HCDC systems and that their performance depends on the strong interactions between biological and environmental determinants, the study of such systems was carried out by means an holistic approach or by considering the cultivation system as a whole and its behavior explicable on the basis of the intimate interconnection of its parts. In this light, the work has been aimed not only at improving the HCDC performance but also elucidating the physiology expressed by yeast when it proliferates in this type of system.

The HCDC study has been carried out in an aerated fed-batch reactor which allows the proliferating biomass to be accumulated so as to achieve high cell density (HCDC). This is possible due to the extension of working time and the control of by-products, or catabolite repression effects through controlled conditions for the substrate supply.

Initially, the experimental activity has been directed to find out the host for heterologous proteins expression. For this purpose a systematic investigation has been made considering six strains belonging to the CEN.PK family of the yeast *S. cerevisiae*, characterized by different types and number of auxotrophies. This preliminary investigation gave a clear result on the best candidate to be used as host for recombinant protein production. Indeed, the selected strain, CEN.PK113-5D, produced an amount of biomass which was, approximately, three-fold higher than the other strains tested, and similar to that obtained with *S. cerevisiae* industrial strains which did not carry any auxotrophy.

Based on this result, the operative conditions of the bioprocess were optimized. Particularly the selected host has been tested in different operative conditions to find those values of specific growth rate ensured high volumetric productivity and biomass yield.

Therefore, CEN.PK113-5D was transformed for the production of interleukin-1 β , used as a model protein and subsequently, for two proteins of great interest for the agri-food field: Lipase A from *Bacillus subtilis* and an endoglucanase from *Paenibacillus barcinonensis*.

Fed-batch tests were combined with physiological studies to asses Reactive Oxygen Species, catalase, cell viability and presence of by-product into the culture medium during fed-batch runs.

The results of this work were implemented by expressing in CEN.PK 113-5D three human proteins: hemoglobin, myoglobin and neuroglobin. In this way, the effects of the production of a wide range of recombinant proteins of different origin, on the yeast growth, has been investigated. It is worth noticing here the special interest, from an applied point of view, of the positive effect obtained with the expression of human myoglobin and neuroglobin on the growth characteristics of the recombinant yeast strains and its possible relationship with a better oxygen transfer. This part of the work has been performed at the Chalmers University in Goteborg (Sweden).

During the work, particular interest was reserved to the study concerning the limits encountered in the cultivation of microorganisms at high cell densities. Indeed, fermentation runs of the *S. cerevisiae* strains investigated in fed-batch, were characterized by a peculiar decay in the specific growth rate and metabolic fluctuation with a limit of cell density hardly to be overcome, that for CEN.PK 113-5D was about 100 g l⁻¹. Further, it has been highlighted that growth decay phenomena were related to the accumulation in the medium of not yet identified, inhibitory compounds.

The experimental approach of this thesis work has been implemented with the development of an innovative mathematical model built up on the System Dynamic principles. This model was capable to represent the growth dynamics of *S. cerevisiae* strains in batch and fed-batch reactors. The model has been developed through the explicit representation of the two main pathways of the glucose catabolism in yeast, respiration and fermentation. Pyruvate was identified as the key intermediate of sugar metabolism in yeast. Moreover, other components exerting negative feedback effect on cell proliferation were modeled.

Model results highlighted that in order to obtain a good fitting between the simulation curves and the experimental data, it was essential to consider a negative feedback effector represented by the secretion of

inhibitory compounds along the fermentation runs and as such capable to describe entirely the yeast growth in the fed-batch reactor.