



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE *ESCHERICHIA COLI* PARA LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES

Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología
Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico

ANA LUZ QUIROGA CAMPANO

PROFESOR GUÍA:
María Elena Lienqueo Contreras

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
Oriana Salazar Aguirre
Ziomara Gerdtzen Hakim

Santiago de Chile
Abril, 2010

Resumen

El Presente Trabajo de Título se enmarca dentro del proyecto de investigación Fondecyt N°1080143 denominado “Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”, cuyo objetivo es determinar, cuantitativa y cualitativamente, el efecto de la fusión de polipéptidos hidrofóbicos en diferentes etapas del proceso de producción de proteínas recombinantes. Una de las etapas del proyecto, consiste en la optimización de las condiciones y el modo de operación del cultivo de *Escherichia coli*, que maximicen la productividad de cutinasas recombinantes.

El microorganismo hospedero corresponde a *Escherichia coli* BL21 (DE3), cepa en la que se ha introducido el vector de expresión pET11a, el cual, bajo inducción, permite la producción de la proteína recombinante cutinasa a la que se han adicionado los aminoácidos triptófano(W), prolina(P) y tirosina(Y). Los polipéptidos hidrofóbicos adicionados son WPWP(Cutinasa-(WP)2) e YYY(Cutinasa-(Y)3).

Las condiciones de cultivo en estudio, variables de entrada, corresponden a: temperatura de crecimiento y temperatura de inducción (25/18°C y 37/25°C), densidad celular en el punto de inducción (0,8 y 1,5 U Abs_{600nm}), concentración de inductor (0,1 y 0,5 mM IPTG); concentración de extracto de levadura (5 y 20 g/L), concentración de triptona (10 y 15 g/L) y concentración de glicerol (0 y 0,3 % v/v), en el medio de cultivo. Para realizar el estudio, se desarrolló un diseño experimental factorial fraccionario (2^{6-2}_{IV}) que permite obtener información contundente respecto de los efectos principales de los factores (condiciones de cultivo) y sus interacciones (interacciones entre 2 factores) en cultivos batch en matraces.

Se llevó a cabo la totalidad de experimentos establecidos en la malla de tratamientos, para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3. Mediante un análisis estadístico de los resultados obtenidos se determinó la significancia de los factores y sus interacciones sobre la productividad y rendimiento (test ANOVA 95% nivel de significancia), se elaboró un modelo matemático lineal para estas variables en función de los factores e interacciones significativas y se determinaron las condiciones óptimas que maximizan la productividad y rendimiento para cada variante en particular, utilizando el modelo anteriormente nombrado.

Los resultados obtenidos permitieron optimizar la producción de Cutinasa-(WP)2, sin inconvenientes, alcanzando una producción total de 28.870 [U Cutinasa-(WP)2/L] lo que equivale a 5,3 veces lo producido bajo las condiciones del caso base. El rendimiento optimizado fue 6,5 veces el rendimiento del caso base. Las condiciones óptimas de cultivo son: temperatura de crecimiento y temperatura de inducción, 37°C/25°C (Alto); densidad celular en el punto de inducción, 1,5 U Abs_{600nm}(Alto); concentración de inductor, 0,1 mM IPTG (Bajo); concentración de extracto de levadura, 20 g/L (Alto); Concentración de triptona, 10 g/L (Bajo) y concentración de glicerol nula. El comportamiento errático de la variante Cutinasa-(Y)3 generó dificultades para modelar, predecir y optimizar la productividad y rendimiento de los cultivos. Se propone que las problemáticas de esta variante provienen de la cepa electrocompetente transformada productora de Cutinasa-(Y)3.

La comparación de los modos de operación en el fermentador Biostat B entregaron como resultado que el modo batch, para la variante Cutinasa-(WP)2, presentó mayor productividad específica total y rendimiento equivalentes a 2,5 y 1,4 veces la producción de fermentador operando en modo fed-batch con alimentación constante de nutrientes. En el caso de la variante Cutinasa-(Y)3, el modo de fermentación batch también fue el más favorable.

Se concluye que todos los factores analizados tienen efectos significativos sobre la productividad y/o rendimiento de cutinasa recombinante en cultivos de *E. coli* BL21(DE3). Los factores e interacciones que poseen un efecto positivo y significativo sobre la productividad y/o rendimiento de ambas variantes corresponden a: densidad celular y sus interacciones con los factores temperatura de crecimiento e inducción y concentración de extracto de levadura. Los factores e interacciones que presentan efectos negativos y significativos sobre la productividad y/o rendimiento de ambas variantes son la concentración de inductor, concentración de triptona y la interacción concentración de glicerol-concentración extracto de levadura.

A mi Familia por todo su amor y comprensión.

Índice del Contenido

	Páginas
1	Introducción y Objetivos 1
1.1	Introducción 1
1.1.1	Descripción del Proyecto y Justificación 2
1.1.2	Microorganismo: Escherichia coli BL21(DE3)..... 3
1.1.3	Vector de Expresión: PET11a 3
1.1.4	Proteína Recombinante: Cutinasa 6
1.1.5	Optimización de la Producción 7
1.1.5.1	Temperatura de crecimiento e inducción 7
1.1.5.2	Densidad celular en el punto de inducción 9
1.1.5.3	Concentración del inductor IPTG 11
1.1.5.4	Composición del medio de cultivo 14
1.1.6	Modos de Fermentación 15
1.1.6.1	Cultivos batch 15
1.1.6.2	Cultivos fed-batch 15
1.1.6.3	Cultivos continuos 16
1.2	Objetivos 17
1.2.1	Objetivo General 17
1.2.2	Objetivos Específicos 17
2	Materiales y Métodos 18
2.1	Materiales 19
2.1.1	Cepa Bacteriana y Variantes 19
2.1.2	Reactivos 19
2.1.3	Software de Análisis Estadístico 20
2.2	Métodos 21
2.2.1	Optimización de Condiciones de Cultivo y Diseño Experimental. 21
2.2.1.1	Identificación de variables de entrada, parámetros, factores de ruido y variables de respuesta 21
2.2.1.2	Elaboración del diseño experimental factorial 2^{6-2}_{IV} 23
2.2.2	Caso Base 24
2.2.3	Fermentaciones 25
2.2.3.1	Protocolo de fermentación en matraces 25
2.2.3.2	Protocolo de extracción de proteínas periplasmáticas 26
2.2.4	Modos de Operación 27
2.2.4.1	Fermentación en fermentador BIOSTAT B 28
2.2.4.2	Protocolo de fermentaciones 29
2.2.5	Medición del Crecimiento Celular 30
2.2.6	Ensayo de Actividad Cutinasa 31
2.2.7	Determinación de Proteínas Totales 32
2.2.8	Electroforesis de Proteínas 32
3	Resultados y Discusión 34
3.1	Crecimiento Celular 35
3.2	Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Cutinasas Recombinantes 36
3.2.1	Dificultades 36
3.2.2	Producción Total y Periplasmática 37
3.2.2.1	Producción de la variante Cutinasa-(WP)2 37
3.2.2.2	Producción de la variante Cutinasa-(Y)3 40
3.2.3	Análisis de la Distribución Subcelular de Cutinasa 42
3.2.3.1	Efecto de los factores en la distribución subcelular de cutinasa 43
3.2.3.2	Análisis de la varianza para determinación de efectos significativos. 44

3.2.3.3	Análisis de efectos significativos en la distribución subcelular de cutinasa.....	45
3.2.4	Productividad de la Variante Cutinasa-(WP)2	46
3.2.4.1	Análisis estadístico de la Productividad para la variante Cutinasa-(WP)2.	48
3.2.4.1.1	Efectos de los factores sobre la productividad.....	48
3.2.4.1.2	Determinación efectos significativos sobre la Productividad.....	49
3.2.4.1.3	Análisis de efectos significativos sobre la Productividad de la variante Cutinasa-(WP)2.....	50
3.2.4.1.4	Modelos lineales para Productividad	52
3.2.4.1.5	Condiciones para optimizar la Productividad	54
3.2.5	Rendimiento de la Variante Cutinasa-(WP)2	55
3.2.5.1	Análisis estadístico del Rendimiento para la variante Cutinasa-(WP)2	56
3.2.5.1.1	Efectos de los factores sobre el Rendimiento	56
3.2.5.1.2	Determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento	57
3.2.5.1.3	Análisis de efectos de factores e interacciones significativos	58
3.2.5.1.4	Modelos lineales para el Rendimiento	60
3.2.5.1.5	Condiciones para optimizar el Rendimiento.	61
3.2.6	Productividad de la Variante Cutinasa-(Y)3	62
3.2.6.1	Análisis estadístico de la Productividad para la variante Cutinasa-(Y)3.....	64
3.2.6.1.1	Efectos de los factores sobre la Productividad.....	64
3.2.6.1.2	Determinación de los efectos significativos sobre la Productividad	64
3.2.6.1.3	Análisis de efectos de factores e interacciones significativos sobre la Productividad de la Variante Cutinasa-(Y)3	65
3.2.6.1.4	Modelos lineales para la Productividad	66
3.2.6.1.5	Condiciones para optimizar la Productividad	68
3.2.7	Rendimiento de la Variante Cutinasa-(Y)3.....	69
3.2.7.1	Análisis estadístico del Rendimiento de la variante Cutinasa-(Y)3	70
3.2.7.1.1	Efectos de los factores sobre el Rendimiento	70
3.2.7.1.2	Determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento	71
3.2.7.1.3	Análisis de efectos de factores e interacciones significativos	72
3.2.7.1.4	Modelos lineales para el Rendimiento.	74
3.2.7.1.5	Condiciones para optimizar el Rendimiento	75
3.3	Optimización del Modo de Operación.....	76
3.3.1	Resultados Obtenidos de Fermentaciones Batch y Fed-bach de las Variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3	77
3.4	Análisis de la Variante Cutinasa-(Y)3	80
3.4.1	Problemáticas Presentadas por la Variante Cutinasa-(Y)3	80
3.4.2	Transformación de cepa proveniente de stock original para producción de Cutinasa-(Y)3. ..	83
3.5	Recomendaciones.....	85
4	Conclusiones	86
5	Bibliografía	89
6	Anexos	94
6.1	Anexo A: Soluciones stock y medios de cultivo	95
6.2	Anexo B: Curvas de calibración para ensayo de proteínas totales.	96
6.3	Anexo C: Geles SDS PAGE.	98
6.3.1	Tratamientos mayor productividad. Cutinasa-(WP)2	98
6.3.2	Tratamientos menor productividad. Cutinasa-(WP)2.....	99
6.3.3	Tratamientos mayor productividad. Cutinasa-(Y)3.....	100
6.3.4	Tratamientos menor productividad. Cutinasa-(Y)3	101
6.4	Anexo D: Memoria de cálculo.....	102
6.5	Anexo E: Resultados detallados de cada experimento.	104
6.6	Anexo F: Composición de triptona y extracto de levadura.	113

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Para la producción de una proteína recombinante es necesario caracterizar la proteína de interés y, posteriormente, seleccionar un sistema de expresión (Guerrero-Olazarán-Olazarán y *col.*, 2004). En el caso de los sistemas de expresión, los conocimientos asociados, han alcanzado niveles insospechados y continúan avanzando. Todos los sistemas poseen ventajas y desventajas; y ninguno es óptimo para la producción de todas las proteínas recombinantes (Asenjo y Merchuck, 1994). Para la selección de un sistema de expresión adecuado, se debe tener en consideración el origen biológico, estructura y funcionalidad de la proteína de interés. El origen biológico es importante, ya que, generalmente, un sistema de expresión eucariótico es más eficiente para sintetizar una proteína de origen eucarionte que un sistema de expresión procariótico. En cuanto a la estructura y funcionalidad se debe analizar la secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización de la transcripción; la secuencia aminoacídica para evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico y tipo de modificaciones transcripcionales presentes; la estabilidad al pH, temperatura y proteólisis; la posible toxicidad sobre el hospedero, el destino (extracelular o intracelular) y el grado de pureza deseado (Guerrero-Olazarán y *col.*, 2004).

El sistema de expresión tiene fuerte incidencia en las condiciones de cultivo que optimizan la expresión de la proteína recombinante, puesto que distintos hospederos y vectores de expresión presentan distintos niveles de producción de una misma proteína recombinante bajo condiciones de cultivo idénticas (Martínez-Luaces y *col.*, 2006).

En cuanto a las condiciones de cultivo, los factores que han sido optimizados con mayor frecuencia son la temperatura de crecimiento y temperatura de inducción; y la concentración de inductor (Salazar, 2001; Martínez-Luaces y *col.*, 2006; Gordon y *col.*, 2008; Lee y Keasling, 2008; Pinsach y *col.*, 2008). La composición del medio de cultivo también es un factor de gran interés, ya que los componentes del medio pueden afectar la producción basal de proteína recombinante, generar alta producción bajo condiciones no-inducidas o provocar liberación de la proteína al medio extracelular (Grossman y *col.*, 1998; Salazar y *col.*, 2001; Jevsėvar y *col.*, 2007).

El modo de operación del bioreactor mediante el cual se desarrolla el cultivo bacteriano tiene importancia relevante en la optimización de proceso productivo. Entre los modos de operación más importantes se encuentran el cultivo batch, cultivo fed-batch y cultivo continuo (Asenjo y Merchuk, 1994; Jonasson y *col.*, 2002). La selección de la estrategia de alimentación de nutrientes es crítica porque afecta los flujos de las vías metabólicas y, consecuentemente, afecta la concentración celular máxima factible, la productividad de la proteína recombinante y la formación de subproductos (Choi y *col.*, 2006).

El presente tema de memoria se orienta a estudiar las condiciones de operación bajo las cuales se optimiza la producción de cutinasa recombinantes en cultivos de *Escherichia coli*.

1.1.1 Descripción del Proyecto y Justificación

El Presente Trabajo de Título se enmarca dentro del proyecto de investigación Fondecyt N°1080143 denominado “Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”, cuyo objetivo es determinar, cuantitativa y cualitativamente, el efecto de la fusión de polipéptidos hidrofóbicos en diferentes etapas del proceso de producción de proteínas recombinantes.

Una de las etapas del proyecto consiste en la optimización de condiciones de cultivo y modo de operación de la fermentación de *Escherichia coli*, de manera que se maximice el proceso global de producción, recuperación y purificación de proteínas recombinantes.

La cutinasa ha sido presentada como una enzima versátil, con numerosas propiedades notables para su aplicación en productos y procesos industriales. La cutinasa in vitro, presenta actividad hidrolítica para una amplia variedad de ésteres, desde ésteres sintéticos solubles (p -nitrofenilesteres) hasta triglicéridos insolubles de cadena larga. Por otra parte, la cutinasa puede ser considerada como un vínculo entre esterasas y las lipasas, ya que hidrolizan eficientemente ésteres solubles y triglicéridos emulsionados. Además, la cutinasa ha sido aplicada como una enzima lipolítica en la composición de detergentes para el lavado de ropa o vajilla para la eliminación de grasa. Uno de los beneficios de la cutinasa, cuando se compara con una lipasa comercial (Lipolase™), en la eliminación de triglicéridos en un proceso de lavado, es la capacidad de hidrolizar las grasas en ausencia de calcio (Carvalho y col., 1999).

Debido a la importancia de las potenciales aplicaciones de la cutinasa es necesario optimizar su producción de modo que sea posible llevar a cabo su caracterización, determinar su termo estabilidad como función de las condiciones ambientales tales como el pH, modular su estabilidad y estructura en presencia de detergentes y proponer mutaciones que mejoren su actividad (Petersen y col., 1998; Sehgal y col., 2007).

1.1.2 Microorganismo: *Escherichia coli* BL21(DE3)

La elección de las células hospederas para la producción de proteínas recombinantes depende principalmente de las propiedades y el uso final de la proteína expresada. Si la proteína consiste en múltiples subunidades o requiere sustanciales modificaciones post-traduccionales, el hospedero suele ser de origen eucariótico. La bacteria *Escherichia coli*, sin embargo, es exitosamente utilizada en la producción de proteínas relativamente complejas (Jonasson y col., 2002).

Escherichia coli es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes (Jonasson y col., 2002; Choi y col., 2006). Los parámetros importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* incluyen eficiencia transcripcional y traduccional, estabilidad del vector de expresión y de los mRNA transcritos, estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Jonasson y col., 2002).

La cepa BL21(DE3) es deficiente en proteasa *lon* y carece de la proteasa de membrana externa *ompT*, esta proteasa puede degradar proteínas durante la purificación. Además, presenta altos niveles de expresión y la expresión de la proteína recombinante es fácilmente inducida (lactosa o IPTG). La desventaja se asocia a la expresión basal de T7 RNA polimerasa. La T7 RNA Polimerasa es altamente selectiva y activa, cuando se induce fuertemente casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la proteína recombinante, los productos pueden corresponder hasta en un 50% a la proteína recombinante de interés (Novagen, 2006).

1.1.3 Vector de Expresión: PET11a

Un vector de expresión para *E. coli* debe contener, además del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos (u otro marcador de selección), un promotor y un terminador transcripcional. El origen de replicación determina el número de copias del vector, el cual influencia la estabilidad del plasmidio, es decir, la conservación del plasmidio dentro de las células durante la división celular. Un efecto positivo en el alto número de copias es la alta estabilidad de los plasmidios cuando ocurre un particionamiento aleatorio en la división celular. Por otro lado, un alto número de plasmidios generalmente disminuye la velocidad de crecimiento (Jonasson y col., 2002).

La elección del vector puede incrementar la solubilidad y/o plegamiento de 3 formas: fusión a un polipéptido soluble, fusión a una enzima que catalice la formación de puentes disulfuro y fusión a una secuencia señal para

transporte al espacio periplasmático. La exportación de proteínas al periplasma permite que la proteína posea un buen plegamiento y además favorece la formación de puentes disulfuro debido a la presencia de enzimas que catalizan su formación. En consecuencia se obtiene proteínas solubles y activas (Novagen, 2006; Larsen y col., 2008).

La regulación de expresión se encuentra ligada a la fuerza del promotor. Un sistema promotor regulable proporciona la habilidad de activar la expresión del gen foráneo variando un factor ambiental, como la concentración de un componente particular en el medio de cultivo. El promotor *lac*, proveniente del operón lactosa de *E. coli*, es uno de los promotores más comúnmente utilizados para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias y ha sido extensamente caracterizado a nivel molecular (Donovan y col., 1998).

El vector a utilizar en el presente Trabajo de Título corresponde al vector de expresión PET11a. El funcionamiento del vector se encuentra estrechamente ligado las características del hospedero elegido (*Ver Ilustración 1*) y posee como marcador de selección un gen que confiere resistencia a ampicilina. Además, incluye una señal PhoA que dirige la proteína al espacio periplasmático de la célula (Lauwereys y col., 1990). La producción en periplasma tiene variadas ventajas. Primero, el producto secretado puede ser idéntico al producto nativo, ya que la secuencia señal es cortada por peptidasas. Segundo, la actividad proteasa es considerada mucho más baja en el espacio periplasmático que en el citoplasma. Tercero, la purificación de la proteína recombinante es simplificada, puesto que el periplasma contiene menor cantidad de proteínas endógenas. Cuarto, la correcta formación de los puentes disulfuro puede ser facilitada porque el espacio periplasmático entrega el ambiente oxidativo necesario (Choi y col., 2006).

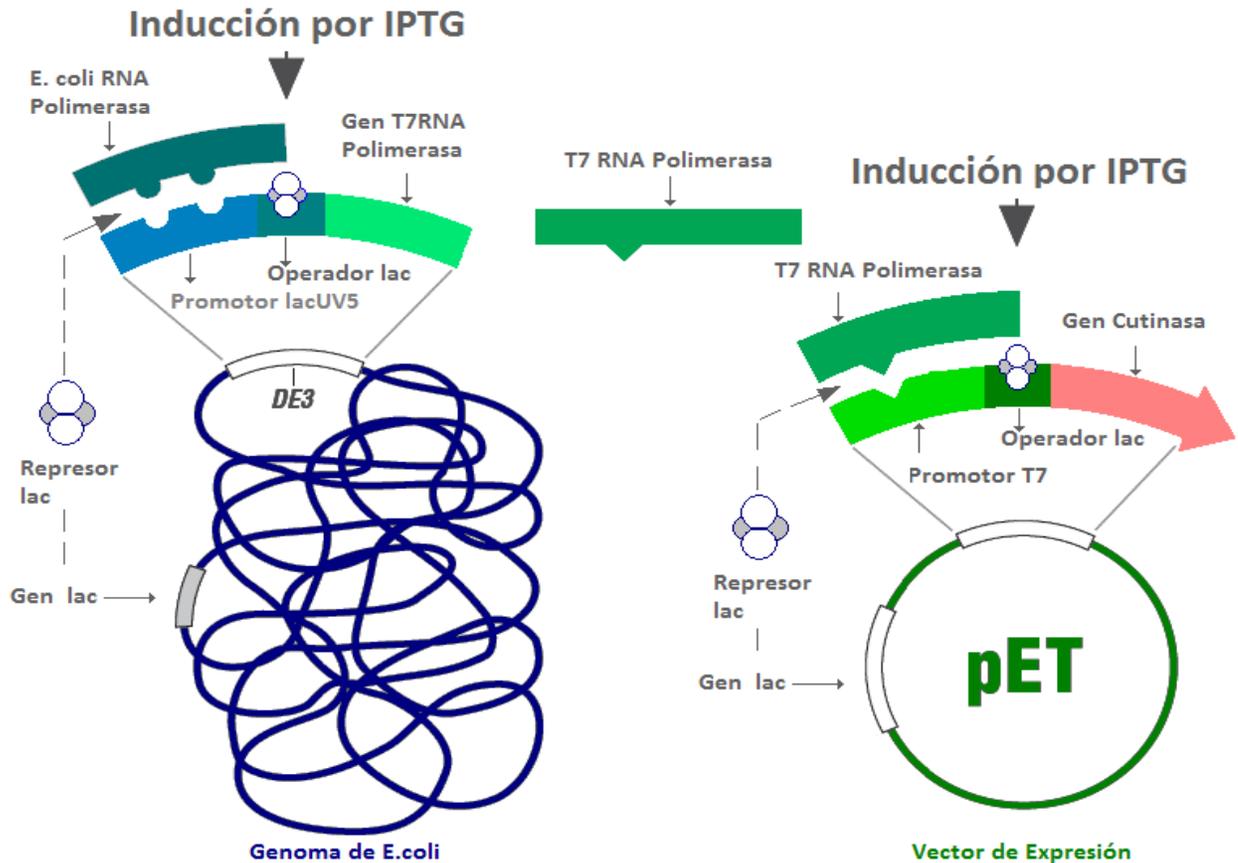


Ilustración 1: Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedero *E. coli* BL21(DE3) y como vector de expresión el vector PET11a. A la izquierda de la imagen es posible apreciar la inducción por IPTG de la transcripción de T7 RNA polimerasa, la cual, una vez expresada transcribe el gen de la proteína recombinante de interés, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG.

La *Ilustración 1*, muestra los elementos disponibles para el control de los niveles de T7 RNA polimerasa y la posterior transcripción del gen insertado en el vector pET. En lisógenos λ DE3, la T7 RNA polimerasa se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*, el cual permite un grado de transcripción en el estado no inducido y en la ausencia de control adicional, es recomendado para la expresión de variados genes cuyos productos tienen efectos inocuos en el crecimiento de las células hospederas (Novagen, 2006).

1.1.4 Proteína Recombinante: Cutinasa

La Cutinasa, proveniente de *Fusarium solani pisi*, es una lipasa que cataliza la hidrólisis natural de cutina. La cutina es un entramado de ácidos grasos que ejerce una función protectora sobre las hojas y tallos de plantas (García, 2005). Esta enzima lipasa/esterasa también presenta actividad hidrolítica en una amplia variedad de ésteres, desde p-nitrofenil hasta largas cadenas de triglicéridos insolubles (Neves-Petersen y col., 2001). La importancia de este tipo de enzimas radica en su utilidad en la industria de detergentes, puesto que presenta una apreciable flexibilidad en su sitio activo, lo cual se encuentra relacionado con una posible adaptación a distintos sustratos (Longui y col., 1997). La estructura tridimensional de la cutinasa de *Fusarium solani pisi* clonada y expresada en *Escherichia coli* fue resuelta a una resolución de 1,6 Å (Martínez y col., 1992) y posteriormente fue extendida a 1,0 Å (Longhi y col., 1997, Jelsch y col., 1998).

La Cutinasa de *Fusarium solani pisi* es una proteína de 197 residuos, 22 kDa y tiene un tamaño de 45x30x30 Å³ (Carvalho y col., 1998). La actividad máxima de cutinasa nativa se obtiene a pH 8,5 y temperatura entre 20 y 25°C. El punto isoeléctrico de la cutinasa es 7,8. La ubicación del sitio activo es alrededor de la Serina-120, Histidina-188 y Asparragina-175 (Petersen y col., 2001, Sehgal y col., 2007).

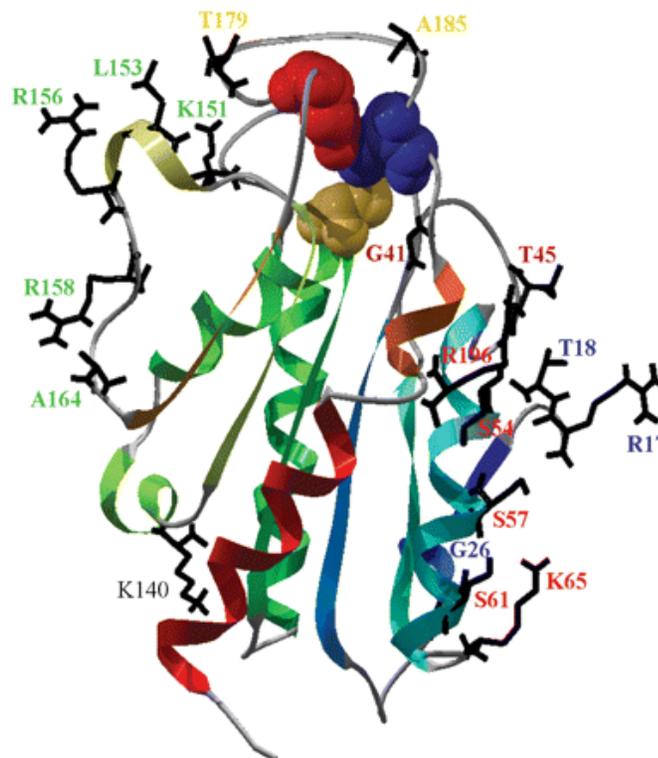


Ilustración 2: "Estructura tridimensional de cutinasa de *Fusarium solani pisi*"

1.1.5 Optimización de la Producción

La optimización de la producción de proteínas recombinantes puede realizarse a nivel del microorganismo productor, del vector de expresión o de las condiciones de cultivo. En el presente Trabajo de Título se estudiarán variadas condiciones de cultivo para la producción de cutinasas recombinantes tales como, temperatura de crecimiento y temperatura de inducción, densidad celular en el punto de inducción, concentración de inductor y composición del medio de cultivo. A continuación se analizan cada uno de ellos.

1.1.5.1 Temperatura de crecimiento e inducción

La temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es 37°C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas (Donovan y col., 1998). El uso de temperaturas inferiores a la de crecimiento óptimo, en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas foráneas y, como consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (Donovan y col., 1998).

Reducir la temperatura permite disminuir la sobreproducción de proteínas y así disminuir la sobrecarga en la maquinaria transcripcional (Gordon y col., 2008). Se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37°C induce a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas y la ubicación en los compartimentos deseados (Chen y col., 2003; Novagen, 2006). Sin embargo, un decrecimiento pronunciado de la temperatura genera múltiples cambios celulares en respuesta, lo cual se conoce como “*cold-shock adaptation*” que provoca ineficiencias en el plegamiento de las proteínas (Gordon y col., 2008).

En variados estudios, la temperatura de crecimiento y la de inducción son los factores de mayor significancia estadística en la producción de proteínas recombinantes. Esto se debe a que la temperatura es un factor importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de transcripción y de traducción de proteínas (Salazar y col., 2001; Martínez-Luaces y col., 2006). El efecto de la temperatura sobre las variables de salida del proceso de producción de proteínas recombinantes (productividad y rendimiento), ha generado gran interés para la optimización de la expresión del producto. Por ello se han desarrollado variados estudios en los cuales se utilizan distintas temperaturas de crecimiento e inducción para la producción de múltiples proteínas recombinantes (Ver *Tabla 1*)

Tabla 1: Rangos de temperatura de crecimiento e inducción utilizados en variadas publicaciones.

Temperatura Crecimiento/Inducción °C	Hospedero	Vector	Producto	Fuente
25/25	Escherichia coli BL21(DE3)	pFCEX1	Cutinasa Recombinante	Neves Petersen y col., 2001
30/30	Escherichia coli BLR(DE3)	pPro29b pET29b	Coclorina N-metiltransferasa(CMT) Norclaurina sintetasa (NCS)	Lee y Keasling, 2008
28/28 32,5/32,5* 37/37	Escherichia coli BL21-SI	pPTM13	Interferon β	Maldonado y col., 2006
37/37 37/30 37/25*	Escherichia coli BL21 (DE3)	pET20b(+)	β -1,3-Glucanasa	Salazar y col., 2001
37/25 37/37*	Escherichia coli TG2-XL-JM109 DH1-RB791	-	Estreptolisina-O	Martinez Luaces y col., 2006
18/18 30/30* 37/37 37/30 37/18	Escherichia coli Rosetta(DE3) BL21 (DE3)	pEG1020 pEG1022	Proteínas de membrana de L. pneumophila	Gordon y col., 2008
37/27 37/37*	Escherichia coli BL21 (DE3)pLysS	pETMCSI	Pro-resilina	Kim y col., 2007
37/37	Escherichia coli BL21 (DE3) BL21 (DE3)-RIL	pET28	Anticuerpo recombinante	Nadkarni y col., 2007
37/37	Escherichia coli BL21 (DE3)	pET	Interferon α 2a	Shin y col., 2001
37/16* 37/25 37/37	Escherichia coli Rostta-gami 2(DE3) Origami 2(DE3)	pET22b	Lipasa candida antartica CALB	Larsen y col., 2008
37/28* 37/33 37/37	Escherichia coli M15 Δ glyA	pQE α β rham	Ramnulosa 1-Fosfato Aldolasa	Pinsach y col., 2008
25/25	Escherichia coli BL21 (DE3)	pFCEX1	Cuitnasa Recombinante	Petersen y col., 1998

Nota: La **Tabla 1** presenta variados sistemas de expresión y combinaciones hospedero-vector para distintos productos. Entre las temperaturas de crecimiento se encuentran 18-25-32,5-37°C y las temperaturas de inducción 16-18-25-32,5-30-37°C. Los valores que se encuentran marcados con asterisco (*) corresponden a los que han entregado mejores resultados en la expresión del producto.

1.1.5.2 Densidad celular en el punto de inducción

Se debe inducir en un rango de densidad celular apropiado, que entregue condiciones metabólicas deseables lo cual permite alcanzar una máxima productividad.

La elevada producción basal de proteínas heterólogas, se debe a la existencia de un promotor no silente, lo cual mengua el crecimiento celular. Por lo tanto, es necesario contar con la posibilidad de reprimir el promotor durante la fase de crecimiento celular hasta alcanzar una alta densidad del microorganismo antes de iniciar la inducción (Jonasson y col., 2002). Al inducir a una alta densidad celular disminuye el efecto nocivo de la concentración de inductor sobre la densidad final alcanzada por el cultivo. Esto tiene estrecha relación con la producción específica, la cual es proporcional a la densidad celular final alcanzada en la fermentación, bajo condiciones de inducción efectiva (Babaeipour y col., 2007; Lee y Keasling, 2008).

Es recomendado alcanzar altas densidades celulares para inducir, pero no llegar a la etapa estacionaria, puesto que en esta etapa existen condiciones desfavorables, tales como: agotamiento de nutrientes, reducción drástica de la actividad metabólica y utilización de proteínas celulares no esenciales como fuente de carbono, actividad proteasa aumentada. En cambio, la inducción a una alta velocidad específica de crecimiento entrega condiciones metabólicas más favorables como el alto contenido de ribosomas, mayor disponibilidad de nutrientes y menor concentración de subproductos tóxicos. Además, al no encontrarse en una etapa de limitación de nutrientes se puede reducir la respuesta de estrés antes y después de la inducción (Babaeipour y col., 2007).

Se han desarrollado estudios que revelan una estrecha relación entre la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor en el medio de cultivo, por lo cual el análisis de este factor no debe ser aislado de otros factores que intervienen en la producción de proteínas recombinantes (Lee y Keasling, 2008). En la *Tabla 2*, es posible observar un gran número de estudios en los cuales se induce la producción de proteínas recombinantes en distintas etapas crecimiento exponencial: temprana, intermedia y avanzada. Los resultados para cada estudio son completamente diferentes, por lo cual, no es posible establecer cuál es la densidad celular indicada para inducir la producción de todas las proteínas recombinantes. Esto se debe a que cada sistema de expresión, en conjunto con la proteína recombinante que expresa, posee condiciones óptimas específicas, para la producción de la proteína de interés.

La razón por la que la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor poseen una interacción, está relacionada a la concentración de IPTG por célula en el punto de inducción, es decir, si la densidad celular en el punto de inducción es alta, pocas células serán inducidas generando un cultivo heterogéneo de células productoras y no productoras. En cambio si la densidad celular en el punto de inducción es baja, las células serán

efectivamente inducidas, pero a su vez se generará un gran estrés metabólico, menguando la densidad celular final alcanzada por el cultivo (Shitu y Woodley, 2009).

Tabla 2: Rangos de densidad celular a los cuales se aplica la inducción en variadas publicaciones.

Densidad celular en el punto de inducción	Hospedero	Vector	Producto	Fuente
0,5 D.O.600nm 1,0 D.O.600nm 3,0 D.O.600nm*	BL21(DE3)	pET11a	Interleuquina-13	Shitu y Woodley, 2009
1,5 D.O.600nm	Escherichia coli BL21(DE3)	pFCEx1	Cutinasa Recombinante	Neves Petersen y col., 2001
0,6 D.O.600nm 1,5 D.O.600nm 3,2 D.O.600nm*	Escherichia coli BLR(DE3)	pPro29b pET29b	Coclaurina N-metiltransferasa(C MT) Norclaurina sintetasa (NCS)	Lee y Keasling, 2008
0,2 D.O.620nm 0,6 D.O.620nm* 1,0 D.O.620nm	Escherichia coli BL21-SI	pPTM13	Interferon β	Maldonado y col., 2007
0,8 D.O.620nm	Escherichia coli BL21 (DE3)	pET20b(+)	β -1,3-Glucanasa	Salazar y col., 2001
0,5 D.O.600nm	Escherichia coli BL21 (DE3)	pEst100	EstA-B. subtilis LipA EstA-F. solani pisi Cutinasa EstA-S. marcesens lipasa	Becker y col., 2005
0,5 – 0,6D.O.600nm	Escherichia coli Rostta-gami 2(DE3) Origami 2(DE3)	pET22b	Lipasa candida antartica CALB	Larsen y col., 2008
1,0 D.O.600nm	Escherichia coli BL21 (DE3)pLysS	pETMCSI	Pro-resilina	Kim y col., 2006
0,5 D.O.600nm	Escherichia coli BL21 (DE3) BL21 (DE3)-RIL	pET28	Anticuerpo recombinante	Nadkarni y col., 2007
2,0 D.O.600nm	Escherichia coli Rosetta(DE3) BL21 (DE3)	pEG1020 pEG1022	Proteínas de membrana de L. pneumophila	Gordon y col., 2008
1,5 D.O.600nm	Escherichia coli BL21 (DE3)	pFCEx1	Cuitnasa Recombinante	Petersen y col., 1998

Nota: La **Tabla 2** presenta variados sistemas de expresión para distintos productos. El rango de valores de densidad óptica en el punto de inducción va desde 0,2 a 3,2; estas densidades abarcan la etapa inicial, etapa intermedia y etapa avanzada del crecimiento exponencial. Los valores que presentan un asterisco (*) corresponden a aquellos que han entregado mejores resultados en la expresión del producto.

1.1.5.3 Concentración del inductor IPTG

IPTG, *isopropil-β-D-tiogalactopiranosido*, suele utilizarse como inductor del operón *lac*, ya que es capaz de unirse al represor *lacI* e inactivarlo, pero no es sustrato para β-galactosidasa.

Para producir grandes cantidades de una proteína en *E. coli*, se procura ubicar el gen de la proteína deseada bajo el control de un promotor fuerte como el promotor T7. Sin embargo, se ha encontrado que las células fuertemente inducidas presentan un comportamiento indeseable: crecimiento lento, eventual detención del crecimiento y producción de proteínas insolubles. Esto se debe a que, en primer lugar, para una cantidad fija de proteínas totales, sobre-producir proteínas no esenciales da lugar a una reducción en la fracción de proteínas esenciales debido a una competencia por recursos. Segundo, a altos niveles de inducción de proteínas heterólogas, la bacteria degrada rRNA previamente ensamblado generando un colapso en el sistema de traducción, este fenómeno es atribuido a las proteínas de choque térmico, proteínas que poseen actividad proteolítica y se encuentran en las células ante condiciones de estrés (Kurland y Dong, 1996). En conclusión, la sobreexpresión de proteínas recombinantes provoca una rápida respuesta de estrés incrementando la actividad proteasa y la lisis celular. Además, la habilidad de transcribir de la T7 RNA polimerasa es ocho veces mayor que la de RNA polimerasa de *E. coli* (Lee y Keasling, 2008).

Los inconvenientes del uso de IPTG son: costo, toxicidad en humanos, limitando su uso para producción de proteínas terapéuticas; formación de proteínas en agregados insolubles o cuerpos de inclusión, a altas concentraciones de inductor; crecimiento retardado como consecuencia del desvío del metabolismo celular hacia procesos de producción del DNA plasmidial y expresión de la proteína recombinante. La carga metabólica termina inhibiendo el crecimiento, generando lisis celular o muerte. Por ello es necesario balancear la producción de la proteína recombinante con el crecimiento celular para maximizar los niveles de producción. Además, se debe considerar la relación biomasa-producción de proteína recombinante, bajo condiciones de inducción eficiente; es decir, se debe procurar obtener una alta densidad celular final del cultivo para obtener una mayor productividad en las fermentaciones (Lee y Keasling, 2008).

Por otro lado, una ventaja del uso de IPTG es que no puede ser metabolizado por la bacteria, lo cual permite que su concentración en el medio permanezca constante. Además, el IPTG es transportado eficientemente al interior de las bacterias en ausencia de la proteína de membrana permeasa LacY mediante un transporte por difusión.

La proteína permeasa LacY, es una proteína de membrana que transporta β-galactósidos al interior de la bacteria *E. coli*, como lactosa e IPTG. El gen que codifica esta proteína es parte del operón *lac* junto a otros 2 genes

estructurales, gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa y el gen *lacG* que codifica la enzima tiogalactósido transferasa, gen no relacionado con el metabolismo de la lactosa. La lactosa induce la expresión de las proteínas encargadas de su transporte y metabolización, puesto que una vez transportada al interior de la célula se une a la proteína represora LacI generando un cambio conformacional que disminuye la afinidad del represor por la región operadora. De esta forma, la región operadora queda libre y la RNA polimerasa puede transcribir los genes estructurales produciéndose β -galactosidasa, permeasa LacY y tiogalactósido transferasa.

Algunas cepas tienen mutaciones, ausencia del gen *lacY*. Esto permite la entrada uniforme de IPTG en la población de células, lo que produce una dependencia entre el nivel de inducción y concentración de inductor más directa, menos sensible, y un nivel homogéneo de inducción, es decir, ajustando la concentración de IPTG, la expresión puede ser regulada de bajos niveles a niveles completamente inducidos (Jensen y col.; 1993). La permeasa LacY de *E.coli* tiene un papel importante en el transporte de IPTG a través de la membrana celular. Sin embargo, debido al transporte por difusión, la contribución de permeasa LacY ha sido reportada como no significativa en variados sistemas de expresión donde la inducción puede ser totalmente eficaz sin permeasa LacY (Hansen y col., 1998). Las cepas que poseen el gen *lacY* presentan un comportamiento no lineal respecto a la expresión de las proteínas recombinantes y la concentración de IPTG en el medio de cultivo. Este fenómeno se debe a que el inductor induce la expresión de su transportador, permeasa Lac Y (Jensen y col; 1993).

Tabla 3: Concentraciones de inductor utilizadas en variadas publicaciones.

Concentración de Inductor	Hospedero	Vector	Producto	Fuente
1mM	BL21(DE3)	pET11a	Interleuquina-13	Shitu y Woodley, 2009
0,1mM	Escherichia coli BL21(DE3)	pFCEX1	Cutinasa Recombinante	Neves Petersen y col., 2001
0,005mM* 0,010mM 0,025mM 0,050mM 0,1mM 0,2mM 0,5mM	Escherichia coli BLR(DE3)	pPro29b pET29b	Coclaurina N-metiltransferasa(CMT) Norclaurina sintetasa (NCS)	Lee and Keasling, 2008
0,4mM	Escherichia coli BL21 (DE3)	pET20b(+)	β -1,3-Glucanasa	Salazar y col., 2001
0,01mM* 0,1mM	Escherichia coli TG2-XL-JM109 DH1-RB791	-	Estreptolisina-O	Martínez-Luaces y col., 2006
1mM	Escherichia coli BL21 (DE3)	pEst100	EstA-B. subtilis LipA EstA-F. solani pisi Cutinasa EstA-S. marcesens lipasa	Becker y col., 2005
1mM	Escherichia coli Rostta-gami 2(DE3) Origami 2(DE3)	pET22b	Lipasa candida antartica CALB	Larsen y col., 2008
1mM	Escherichia coli BL21 (DE3)pLysS	pETMCSI	Pro-resilina	Kim y col., 2006
0,5mM	Escherichia coli BL21 (DE3) BL21 (DE3)-RIL	pET28	Anticuerpo recombinante	Nadkarni y col., 2007
0,1mM IPTG	Rosetta(DE3) BL21 (DE3)	pEG1020 pEG1022	Proteínas de membrana de <i>L. pneumophila</i>	Gordon y col., 2008
0,1	Escherichia coli BL21 (DE3)	pFCE X1	Cuitnasa Recombinante	Petersen y col., 1998

Nota: La **Tabla 3** presenta variados sistemas de expresión para distintos productos. El rango de concentración de inductor, IPTG, va desde 0,01 a 1mM; en la mayoría de las publicaciones se utilizó la concentración recomendada por el proveedor del sistema de expresión, 1mM. Los valores que se encuentran con asterisco (*) corresponden a los que han entregado mejores resultados en la expresión del producto.

1.1.5.4 Composición del medio de cultivo

Los medios de cultivo recomendados por los proveedores de sistemas de expresión se pueden mejorar para incrementar la productividad y rendimiento del proceso productivo. Incluso, los proveedores destacan la necesidad de variar las condiciones de crecimiento e inducción, puesto que cambiar uno de estos factores puede influenciar dramáticamente los niveles de expresión y la solubilidad de la proteína de interés, mejorando su producción (Salazar y col., 2001; Novagen, 2006; Maldonado y col., 2007).

Al realizar una fermentación lo ideal es saber en forma precisa, todo lo que contiene el medio para poder realizar balances de masa apropiados. Para esto es necesario utilizar medios de cultivo de composición definida.

Existen diversas cepas de *Escherichia coli*, con necesidades de nutrientes distintas. Algunas variantes como TG1 y B54125 pueden crecer en medios completamente definidos, pero otras tienen necesidades mayores que no se conocen con precisión. Por lo anterior, se han realizado pruebas en la variante BL21(DE3) para variados medios de cultivo tales como: LB(Luria Bertani), TB(Terrific Broth), SB(Super Broth), Medio R, Medio Reinsenber, Medio Mínimo M9, Medio VBC. Los resultados han demostrado que la variante no es capaz de crecer en medios definidos, sin embargo, crece apropiadamente en medios complejos o medios definidos suplementados con extracto de levadura o triptona (Ribbeck, 2001).

En la mayoría de los estudios de producción de proteínas recombinantes, se utiliza el medio complejo LB, el cual contiene: 10 g de Triptona/L, 5 g de Extracto de levadura/L y 10 g de Cloruro de Sodio/L (Hasen y col., 1998; Neves-Petersen y col., 2001; Becker y col., 2005; Gordon y col.,2008; Larsen y col., 2008; Lee y Keasling, 2008; Shitu y Woodley, 2009). Este medio puede ser modificado aumentando o disminuyendo la concentración de sus componentes o agregando fuentes de carbono inmediatas tales como glucosa o glicerol, para aumentar la densidad celular final. Se utiliza glicerol, en lugar de glucosa, puesto que la glucosa reprime el transporte de lactosa al interior de las células, lo cual es perjudicial en los cultivos inducidos a través de este compuesto (Nadkarni y col., 2007).

Al comparar el medio de cultivo LB con medios enriquecidos como el medio TB, se ha determinado que aumenta el nivel de masa celular, pero no hay un aumento sustancial en la producción de proteínas recombinantes (Gordon y col., 2008). Además, se ha observado que aumentar la concentración de triptona o peptona, fuente de aminoácidos, puede favorecer o perjudicar la producción de la proteína recombinante de interés, por lo cual su efecto no es definido (Salazar y col., 2001; Gordon y col.,2008).

La composición del medio de cultivo en la etapa de inducción puede tener un efecto significativo en la expresión de la proteína foránea. Como se ha mencionado previamente, la sobre-expresión de proteínas genera una carga metabólica adicional generando una respuesta de estrés poco favorable para la producción de la proteína heteróloga. Proporcionando aminoácidos, a través de la adición de extracto de levadura durante la inducción, ha sido demostrado que se mejora la expresión y estabilidad de las proteínas (Donovan y *col.*, 1998).

1.1.6 Modos de Fermentación

Existen variadas estrategias para llevar a cabo una fermentación entre las cuales se encuentran los cultivos batch, fed-batch y continuos. Estas estrategias, bajo condiciones de operación similares, pueden presentar parámetros cinéticos distintos (Babeipour, 2007).

1.1.6.1 Cultivos batch

El cultivo batch es la forma más simple de producir proteínas recombinantes. En cultivos batch, todos los nutrientes requeridos para el crecimiento celular son suministrados desde el comienzo y el crecimiento es irrestringido, inicialmente. Sin embargo, el crecimiento irrestringido desencadena una serie de cambios en el medio de cultivo, como la limitación de oxígeno y cambios de pH. También, las vías metabólicas se saturan, lo cual genera una acumulación de productos inhibitorios en el medio. Para obtener una densidad celular y niveles de producción de proteínas alta, son comúnmente utilizados los sistemas fed-batch donde la fuente de carbono es adicionada en proporción a la velocidad de consumo (Jonasson y *col.*, 2002).

1.1.6.2 Cultivos fed-batch

Esta técnica se define como un cultivo batch donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, es posible controlar la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo. En el sistema fed-batch, la estrategia de alimentación es crítica porque afecta los flujos de las vías metabólicas y, como consecuencia, afecta la concentración máxima de células factible, la productividad de proteínas recombinantes y la formación de subproductos.

Existen variadas estrategias de alimentación que han sido utilizadas con el fin de obtener cultivos de *E. coli* de alta densidad en. Estrategias de alimentación simple tales como: velocidad de alimentación constante, velocidad de alimentación variable y velocidad de alimentación exponencial, han sido exitosamente aplicadas. El método de

alimentación exponencial en cultivos fed-batch es probablemente uno de los más utilizados para el crecimiento bacteriano de alta densidad, puesto que en esta metodología el proceso es fácil de implementar y manipular la velocidad específica de crecimiento.

El incremento en la productividad, a altas velocidades específicas de crecimiento, se puede deber al alto contenido de ribosomas, reducción del tiempo de duración de la fermentación, reducción en la acumulación de subproductos (acetato), incremento en la estabilidad del plásmido, disponibilidad de nutrientes (glucosa, amonio y fosfato), provisión de condiciones fisiológicas y metabólicas apropiadas durante el cultivo (Babaeipour y col., 2007).

1.1.6.3 Cultivos continuos

En el modo de operación continuo, los nutrientes son alimentados continuamente al biorreactor y fracciones del medio de cultivo son removidos a la misma velocidad, manteniendo un volumen de operación constante. Las ventajas de este modo de operación son: se puede producir grandes cantidades de producto, salida constante de producto y minimización de la represión catabólica bajo condiciones de carbono limitantes. Las desventajas tienen relación con las posibilidades de contaminación del cultivo y de pérdida de estabilidad de la cepa recombinante.

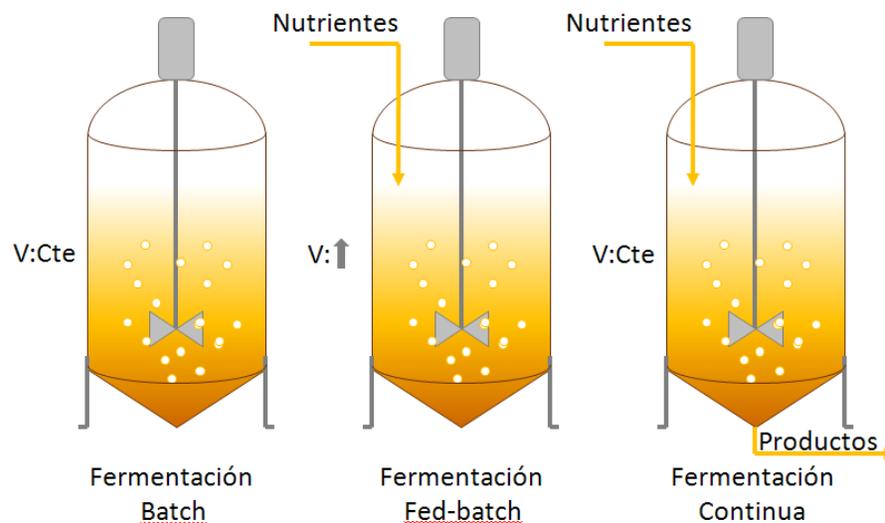


Ilustración 3: Esquema simplificado de alimentación para los modos de operación en fermentaciones.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Establecer el modo de fermentación y las condiciones de operación que optimizan la productividad y/o rendimiento de cutinasas recombinantes en cultivos de *Escherichia coli*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Establecer, mediante búsqueda bibliográfica, qué factores presentan mayor relevancia sobre la productividad y/o rendimiento de cutinasas recombinantes en cultivo de *Escherichia coli*.

Determinar valores máximos y mínimos de cada parámetro o factor elegido.

Evaluar diferentes condiciones de operación bajo un diseño experimental que permita estudiar el comportamiento de fermentaciones batch en matraces, considerando la interacción de los factores.

Estudiar modos de cultivo batch y fed-batch, y establecer cuál es el más conveniente para aumentar la productividad y/o rendimiento de cutinasas recombinantes.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Cepa Bacteriana y Variantes

La cepa a utilizar en el presente Trabajo de Título corresponde a *Escherichia coli* BL21 (DE3) genotipo *E. coli* B F– *dcm ompT hsdS(rB– mB–) gal λ*(DE3) (Novagen). Cepa para expresión, lisógena del fago λDE3, que incorpora el gen de T7-RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV*. Inducible por Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG).

Variante Cutinasa-(WP)2: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET11a portador de la secuencia de cutinasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Triptófano(W)-Prolina(P)-Triptófano(W)-Prolina(P).

Variante Cutinasa-(Y)3: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET11a portador de la secuencia de cutinasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Tirosina(Y)-Tirosina(Y)-Tirosina(Y).

2.1.2 Reactivos

Tabla 4: Proveedores y reactivos.

Proveedor	Reactivos
Novagen(WI-USA)	Vector de expresión pET11a
Novagen(WI-USA)	Cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3)
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas.
Fermentas	IPTG(Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido)
Merck	Ampicilina
Becton Dickinson	Medio Luria Bertani
Becton Dickinson	Triptona (Extracto de Caseína)
Becton Dickinson	Extracto de Levadura
Merk	Cloruro de Sodio
Winkler	Glicerol
Winkler	Tris
Merk	Sacarosa
Sigma	p-nitrofenolbutirato
Sigma –Aldrich	Tetrahidrofurano
Sigma	Azul de Commassie

Nota: La soluciones Stock se encuentran en Anexo A.

2.1.3 Software de Análisis Estadístico

El software para realizar el análisis estadístico de los datos corresponde a *Statgraphics 5.1*. El programa se utilizó para determinar la significancia de los factores estudiados en el presente Trabajo de Título y además, para desarrollar un modelo ajustado a los datos obtenidos mediante la experimentación, el cual al ser optimizado permite determinar las condiciones óptimas para las variables de salida.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Optimización de Condiciones de Cultivo y Diseño Experimental.

En el presente estudio se analizaron las siguientes condiciones de cultivo en los siguientes rangos (*Ver Tabla 5*).

Tabla 5: Factores y niveles

Factor	Niveles		Unidad
	(-)	(+)	
A: Temperatura de crecimiento y de inducción	25/18	37/25	°C
B: Densidad celular en el punto de inducción	0,8	1,5	UAbs 600nm
C: Concentración de inductor (IPTG)	0,1	0,5	Mm
D: Concentración de extracto de levadura	5	20	[g/L]
E: Concentración de triptona	10	15	[g/L]
F: Concentración de glicerol	0	0,3	%[v/v]

Para determinar cuáles son los niveles de los factores que optimizan la productividad y/o rendimiento, en la producción de cutinasa recombinante, fue necesario elaborar un diseño experimental, el cual, una vez obtenidos los resultados de la experimentación, se sometió a estudios estadísticos para dar validez a las conclusiones establecidas.

2.2.1.1 Identificación de variables de entrada, parámetros, factores de ruido y variables de respuesta

El diseño experimental factorial es una técnica que permite ejecutar todas las combinaciones de los niveles de factores. Para confeccionar el diseño es necesario establecer los factores, niveles de factores, parámetros y factores de ruido.

Factores: Variables de entrada del sistema las cuales son controladas por el experimentador. Los factores corresponden a temperatura, densidad celular en el punto de inducción, concentración de inductor, concentración de extracto de levadura, concentración de triptona y concentración de glicerol.

Nivel de factores: Estado en el cual se encuentran los factores. Los niveles de los factores son dos, alto(+) y bajo(-).

Parámetros: Variables de entrada fijas y controladas. Los parámetros para experimentos realizados en fermentador Biostat corresponden a volumen de operación, aireación (4,5 L/min), agitación (200 rpm) y pH 7. Los parámetros para experimentos realizados en matraces corresponden a la agitación (200 rpm) y volumen de operación (100 ml de medio en matraces de 500ml).

Factores de ruido: Variables de entrada no controladas. Los factores de ruido para los experimentos realizados en matraces corresponden a aireación y pH, ya que los matraces son sellados y no es posible controlar la transferencia de oxígeno al medio de cultivo.

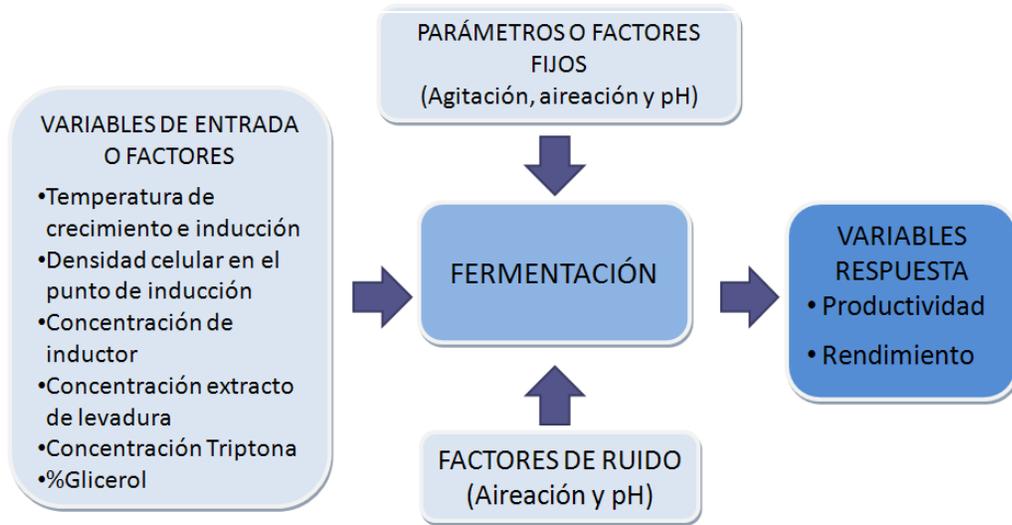


Ilustración 4: Esquema del proceso de optimización con identificación de factores, parámetros, factores de ruido y variables de respuesta.

2.2.1.2 Elaboración del diseño experimental factorial 2^{6-2}_{IV}

La optimización del cultivo de *E. coli* para la producción de cutinasas recombinantes considera 6 factores en dos niveles cada uno, por lo tanto, la malla de experimentos que contiene todas las combinaciones posee 2^6 tratamientos, es decir 64, los cuales completan una totalidad de 192 experimentos si se consideran 2 réplicas.

Dado que es necesario reducir el número de experimentos a realizar, se consideró que las interacciones de orden superior a tres factores eran despreciables. Esto permitió desarrollar un diseño factorial fraccionario que está constituido por menos corridas que el diseño factorial 2^6 . El diseño factorial fraccionario, fracción un cuarto de 2^6 , se conoce como diseño 2^{6-2}_{IV} . Este diseño se compone de 16 tratamientos y permite estimar los seis efectos principales, con cierta capacidad para examinar las interacciones entre dos factores.

Para generar el diseño experimental, primero se escriben los estados de los niveles (- ó +) de los primeros 4 factores (A, B, C y D) en un diseño 2^4 ; como diseño básico. Para determinar los estados de los niveles de los factores siguientes (E y F), se multiplican los estados de los niveles de los factores anteriormente nombrados $E=A*B*C$ y $F=B*C*D$. La malla de experimentos se muestra en la *Tabla 6*.

Tabla 6: Malla de experimentos para ambas variantes (Cutinasa -WP(2) y Cutinasa-(Y)3)

Tratamiento	Temperatura Crecimiento/Inducción (A)	Densidad celular de inducción (B)	Concentración de inductor (C)	Concentración Extracto Levadura (D)	Concentración Triptona (E)	Concentración Glicerol (F)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Nota. Codificación de niveles: Temperatura de crecimiento /inducción (A), -1, 25°C/18°C; 1, 37°C/25°C. Densidad celular en el punto de inducción (B), -1; 0,8U Abs₆₀₀; 1; 1,5 U Abs₆₀₀. Concentración de inductor (C), -1; 0,1mM de IPTG; 1; 0,5mM de IPTG. Concentración de extracto de levadura (D), -1, 5g/L; 1, 20g/L. Concentración de triptona (E), -1, 10g/L; 1, 15g/L. Concentración de glicerol (F), -1, 0% v/v; 1, 0,3% v/v.

2.2.2 Caso Base

El presente Trabajo de Título se encuentra en el marco del proyecto de investigación Fondecyt N°1080143 denominado “Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”, el cual se encuentra constituido por variadas etapas.

Las etapas previas al presente Trabajo de Título:

- Adición de cola polipeptídica hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal de Cutinasa Nativa para generar cutinasas recombinantes: Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3.
- Ligación de las secuencias Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, en vector de expresión pET11a.
- Transformación de células BL21(DE3) con el vector de expresión.

Con el fin de expresar las proteínas recombinantes, se realizaron variadas fermentaciones bajo distintas temperaturas de crecimiento (25°C y 30°C) e inducción (18°C, 25°C y 30°C) y diferentes periodos de inducción (7-15h). La condiciones elegidas como favorables corresponden a las presentadas en la *Tabla 7*.

Tabla 7: Condiciones originales del caso base caso base (Robinson, 2008).

Factores	Unidades	Unidad
Volumen de cultivo en matraz de 500ml de capacidad	100	ml
Razón de inóculo	0,05	U Abs _{600nm}
Agitación	200	rpm
pH inicial	7	U de pH
Periodo de inducción	19-20	H
Temperatura de crecimiento / inducción	25/18	°C
Densidad celular en el punto de inducción	1,5	U Abs ₆₀₀
Concentración de inductor	0,2	mM
Concentración extracto de levadura	5	g/L
Concentración triptona	10	g/L
Concentración de glicerol	0	% v/v

Nota: Las condiciones presentadas en la *Tabla 7* corresponden a las condiciones óptimas de cultivo halladas durante el desarrollo de etapas previas a la optimización de las fermentaciones. Estas condiciones fueron establecidas como caso base.

2.2.3 Fermentaciones

Las 48 fermentaciones, 16 tratamientos aplicados en triplicado, fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se analizaron las desviaciones estándar de cada tratamiento aplicado y se repitieron las experiencias que mostraban mayor variabilidad. Finalmente, se escogió el tratamiento óptimo para la productividad periplasmática para cada una de las variantes. Se llevaron a cabo cultivos batch y fed batch, en el fermentador Biostat B, para determinar cuál modo de operación de cultivo era el más adecuado.

2.2.3.1 Protocolo de fermentación en matraces

Siembra de placas

Se preparó una placa de agar con medio LB estéril y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). Se sembró la bacteria, *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el gen de cutinasa modificada en pET11a, desde el stock glicerol para obtener colonias aisladas. Se dejó crecer durante toda la noche en estufa a 37°C.

Inóculo: En un tubo de 50 ml con 10 ml de medio de cultivo LB, se agregó ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, se colocó una colonia de las células cultivadas en placas y se dejó crecer toda la noche a 37°C y a 200 rpm.

Inicio de fermentación: Se midió la densidad óptica del inóculo a 600 nm ($D.O_{600}$), utilizando medio estéril como blanco. Se determinó el volumen requerido para inocular 100 ml de medio estéril a una $D.O_{600}$ final de 0,05 U Abs_{600} . Se inocularon los matraces y se creció el cultivo, bajo condiciones de temperatura de crecimiento establecidas en el diseño experimental (25°C ó 37°C).

Inducción: Se realizó la inducción agregando IPTG estéril a una concentración de 0,1 ó 0,5 mM; cuando se alcanzó la $D.O_{600}$ establecida; 0,8 ó 1,5 U Abs_{600} . Se dejó durante 19-20 horas a temperatura de inducción (18 ó 25°C) con agitación de 200 rpm.

Finalización: Se midieron y registraron las unidades de absorbancia a 600 nm alcanzadas al finalizar el cultivo. Se dejaron los cultivos en hielo durante 10 minutos.

2.2.3.2 Protocolo de extracción de proteínas periplasmáticas

Los 100 ml de cultivo se centrifugaron a 3.400 g durante 7 min (Centrífuga IEC Modelo MP4R y Rotor 224, International Equipment Company). Se guardó el sobrenadante rotulado como EXT (Fracción extracelular).

Se resuspendió el pellet en Buffer TES frío (Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; 20% sacarosa) según los volúmenes indicados en la *Tabla 8*. A las células en suspensión, se agregó EDTA frío a una concentración final de 1 mM.

Se agitaron los pellet resuspendidos suavemente en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron por 10 min a 4 °C y 3.400 g (Centrífuga IEC Modelo MP4R y Rotor 224, International Equipment Company). Se guardó el sobrenadante, rotulado como TES (Fracción recogida del lavado de células con buffer TES).

Se resuspendió el pellet en agua fría estéril en volúmenes según los volúmenes indicados en la *Tabla 8* y se agitaron manualmente manteniéndose a baja temperatura durante 10 minutos. En este paso las proteínas periplasmáticas eran liberadas al agua.

Se centrifugó a 4 °C por 30 minutos a 3.400 g (Centrífuga IEC Modelo MP4R y Rotor 224, International Equipment Company). El sobrenadante obtenido rotulado como PERI (Fracción periplasmática) fue analizado mediante los correspondientes ensayos de actividad y cuantificación de proteínas totales.

Tabla 8: Volúmenes de TES o Agua Fría a adicionar según absorbancia de la muestra

Volumen de Cultivo[ml]	Absorbancia a 600nm	Volumen de buffer TES (o Agua) agregado a los pellets[ml]
100	3 o menor	5
100	4	6
100	5	8
100	6	10
100	7	12

Nota: Se presentan las cantidades de buffer TES y agua estéril que fueron agregadas en los tratamientos para la recuperación de la fracción de proteínas periplasmáticas a través de shock osmótico.

2.2.4 Modos de Operación

Se desarrollaron 2 modos de operación: batch y fed-batch. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo bajo las condiciones elegidas en la etapa de optimización en matraces (*Ver Tabla 9*).

Tabla 9: Condiciones de cultivo Batch y Fed-batch en fermentador Biostat B

Factores		Unidad
Volumen Batch	900	ml
Volumen Fed batch inicial-final	750-1500	ml
Volumen del fermentador	2.000	ml
Razón de inóculo	0,05	U Abs _{600nm}
Agitación	200	Rpm
Aireación (Oxígeno)	4,5	L /min
pH	7	U pH
Periodo de inducción	19-20	h
Temperatura de crecimiento / inducción	37/25	°C
Densidad celular en el punto de inducción	1,5	U Abs _{600nm}
Concentración de inductor	0,1	mM
Composición Batch		
Concentración extracto de levadura	20	g/L
Concentración triptona	10	g/L
Cloruro de sodio	10	g/L
Composición medio alimentado		
Concentración extracto de levadura	40	g/L
Concentración triptona	20	g/L
Cloruro de sodio	10	g/L

La composición del medio de cultivo alimentado contiene el doble de fuentes de energía y aminoácidos (extracto de levadura y triptona), esto se debe a que el medio es alimentado a baja velocidad (0,625 ml/min), por lo cual los nutrientes se diluyen en el medio de cultivo, aumentando la concentración de fuentes de carbono sin variar el volumen del cultivo repentinamente. La alimentación de nutrientes a partir del punto de inducción se justifica por el aumento en los requerimientos de la bacteria como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína recombinante.

2.2.4.1 Fermentación en fermentador BIOSTAT B

Equipo

Se utilizó el fermentador Braun sistema BIOSTAT[®] B (Braun Biotech Internacional). El fermentador se compone de una unidad de control y medición digital; y un vaso de dos litros instalado en un soporte metálico (*Ver Ilustración 5*).

Mediante este equipo es posible controlar temperatura, con una termocupla y una camisa de refrigeración; pH, con un electrodo y dos bombas peristálticas que se activan automáticamente para proveer de ácido o base según sea necesario; y el porcentaje de oxígeno disuelto, con un electrodo, variando la velocidad de agitación y el ingreso de aire u oxígeno (con un flujómetro).

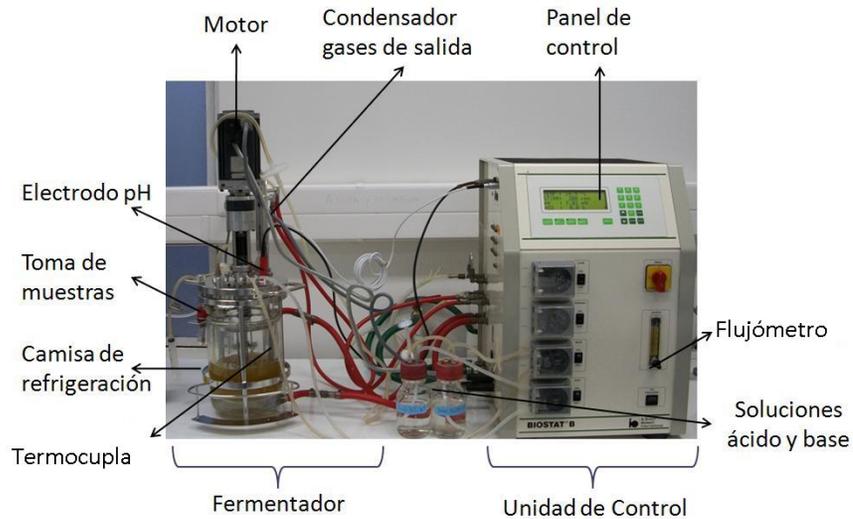


Ilustración 5: Equipo de fermentación Biostat B operando en laboratorio

2.2.4.2 Protocolo de fermentaciones

Preparación de inóculo: En un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio LB estéril y 100µg/ml de ampicilina; se agregaron 5 µl de stock glicerol de la bacteria (almacenado a -80°C). Se incubó durante la noche a 37 °C y 200 rpm de agitación, con un tapón de algodón estéril para asegurar la oxigenación y no permitir el paso de agentes contaminantes.

Preparación del equipo: La preparación de la fermentación comenzó con la esterilización del equipo y medio de cultivo. Cuando el material ya se encontraba estéril, se conectó el fermentador a la unidad de control, se fijaron las condiciones de operación tales como temperatura, pH, revoluciones por minuto de agitación y flujo de oxígeno; se agregó antiespumante (2 gotas) y ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Inoculación: Un vez alcanzadas las condiciones de operación, 37 °C, pH 7, 200 rpm de agitación, y 4,5 L/min de oxígeno; se determinó la cantidad de inóculo necesario para partir con la fermentación a una densidad óptica de 0,05 U Abs_{600nm} y esta se agregó al fermentador.

Inducción: A la densidad óptica deseada; 1,5 U Abs_{600nm}, se agregó IPTG para alcanzar una concentración de 0,1mM. Se bajó la temperatura a 25 °C, temperatura de inducción, y se mantuvo durante 19-20 horas.

Finalización: La fermentación finalizó a las 19-20 horas de realizada la inducción. Posteriormente, se colectaron las fracciones “Extracelular”, “Buffer TES” y “Periplasma” como se explica en la *Sección 2.2.3.2*.

La fermentación fed-batch se desarrolló bajo el mismo protocolo anterior, iniciando el cultivo con 750 ml de medio. Posterior a la inducción se agregaron 750 ml de medio fresco de forma constante durante 19 horas. El medio fresco contenía el doble de nutrientes que el medio del cultivo batch, es decir, 40 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de triptona.

2.2.5 Medición del Crecimiento Celular

El crecimiento celular fue monitoreado mediante mediciones constantes de absorbancia a 600nm de longitud de onda (Genesys 6, Thermo Scientific, USA.). Cada muestra fue medida en cubetas de 1,5ml y fueron diluidas con agua destilada, lo necesario para estar dentro del rango de linealidad del espectrofotómetro (hasta 0,1 U Abs₆₀₀).

Los gramos de peso seco de bacterias se determinaron mediante una curva de calibración. Para elaborar la curva de calibración se llevó a cabo un cultivo mediante la metodología de la *Sección 2.2.3.1*, sin inducción. Una vez finalizado el cultivo, al día siguiente, se midió la densidad óptica alcanzada y se prepararon variadas diluciones (D=1; 1,25; 1,67; 2; 2,5; 10); con agua destilada, en tubos de 50ml previamente secados y pesados. Se midió la densidad óptica a las muestras diluidas a 600nm. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 9.000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf AG, 5804R, Alemania), los sobrenadantes fueron descartados y los tubos con el pellet fueron secados en estufa a 105°C hasta alcanzar un peso constante, aproximadamente 15hrs. Finalmente, los tubos con pellet fueron pesados y se restó el peso del tubo obteniendo, de este modo, el peso de las células. La curva de calibración fue utilizada para determinar el rendimiento de los cultivos (Unidades de actividad cutinasa totales/mg de bacteria totales). La curva obtenida se muestra en el capítulo de Resultados.

2.2.6 Ensayo de Actividad Cutinasa

Este ensayo tiene como finalidad determinar la presencia de cutinasa en la fracción periplasmática de las células cultivadas.

El sustrato utilizado fue p-nitrofenilbutirato (p-NPB), que posee un enlace éster en su cadena, que es hidrolizado por la actividad esterasa de la cutinasa. Los productos de esta reacción corresponden a ácido butírico y p-nitrofenol (pNP), siendo este último cuantificado al medir absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo Scientific, USA.).

Para realizar el ensayo de actividad se efectuó un estudio cinético y se consideraran las variaciones de absorbancia a intervalos de 10 segundos. La metodología aplicada fue la siguiente:

Se preparó una mezcla compuesta por 5 ml de solución A (0,5 g de colato de Sodio en 100 ml de buffer Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7,0 almacenado a 4°C) con 125 µL de solución de reacción B (40 µL de p-nitrofenilbutirato en 10 ml de tetrahidrofurano, almacenado herméticamente cubierto con parafilm a -20°C).

Se midió la absorbancia agregando 980 µL de la mezcla antes mencionada en una cubeta de vidrio (Starna, UK) más 20 µL de muestra. La medición se realiza a temperatura ambiente. La muestra fue diluida en buffer Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7 en los casos donde fue requerido. El blanco correspondió a 980 µL de mezcla de reacción y 20 µL de solución de reacción A.

Para determinar las unidades de actividad se utilizó la siguiente ecuación:

$$U_{cutinasa} (U/mL) = 16.32 * (dAbs_{400}/dt) * D \quad [1]$$

Donde D es la dilución y d Abs₄₀₀/dt es la pendiente del estudio cinético. Este valor no puede ser superior a 0,6; en caso contrario se debe diluir la muestra.

2.2.7 Determinación de Proteínas Totales

La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo modificado de Bradford, para lo cual se mezclan: 1,2 ml de agua destilada, 0,5 ml de Coomassie 1 g/L preparado en HCl 2,2 % v/v y 50 µL de muestra o proteína estándar de calibración.

Se confeccionó una curva de calibración con BSA 0,5 mg/ml como solución patrón para la construcción de una curva de calibración, en concentraciones entre 0,03125 y 0,5 mg/ml. Se midió la absorbancia a 465 (U Abs₄₆₅) y 595nm (U Abs₅₉₅) y se calculó la razón $U\text{ Abs}_{465} / U\text{ Abs}_{595}$.

El valor obtenido en ausencia de BSA se restó a todas las demás razones y se graficó en función de la concentración de BSA (*Anexo B*).

Los cálculos de productividad y rendimiento basados en los datos obtenidos de la experimentación, ensayos de actividad y determinación de proteínas totales se encuentran en el *Anexo D*.

2.2.8 Electroforesis de Proteínas

La separación electroforética de proteínas en condiciones denaturantes se realizó con el fin de determinar la presencia y pureza inicial de la proteína recombinante de interés en cada una de las muestras analizadas y fracciones periplasmáticas de cada cultivo.

La electroforesis se realizó en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) y el gel se preparó según la siguiente tabla:

Tabla 10: Volúmenes de los reactivos para la preparación de gel separador.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	1,58 ml
Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %	0,95 ml
Agua destilada	1,27 ml
PSA 10%	20 µL
TEMED	2 µL

Tabla 11: Volúmenes de los reactivos para la preparación de gel concentrador.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	0,17 ml
Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %	0,25 ml
Agua destilada	0,58 ml
PSA 10%	7,5 μ L
TEMED	1,25 μ L

Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 % p/v pH 6,8), se calentaron a 100°C por 5 minutos y posteriormente se cargaron en gel de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Se utilizó tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v) y estándar de peso molecular preteñido de proteínas (Fermentas).

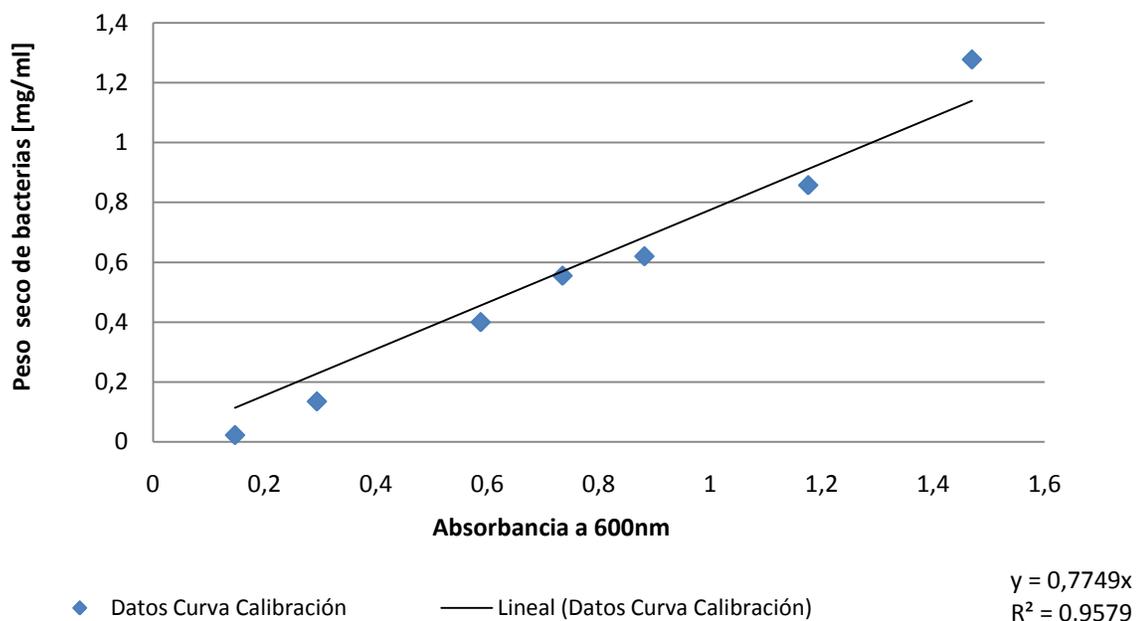
Los geles de proteínas de la fracción “Periplasma” de los tratamientos con mayor y menor productividad, para cada variante, se encuentran en el Anexo C.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CRECIMIENTO CELULAR

La curva de calibración de masa seca en función de la absorbancia de las células a 600 nm, obtenida mediante la aplicación de la metodología de la Sección 2.2.5 es la siguiente (Ver Gráfico 1).

Gráfico 1: Curva de calibración Peso seco-Absorbancia



Con esta curva se obtiene la siguiente correlación para conocer el peso seco de las células en mg/ml a partir del valor de la absorbancia a 600nm:

$$\text{Peso seco [mg/ml]} = 0,7749 * U \text{ Abs}_{600} \quad [1]$$

3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES

Se llevó a cabo la totalidad de experimentos establecidos en la malla de tratamientos (*Ver Tabla 6*), para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3 en cultivos batch. Los datos obtenidos de la experimentación fueron utilizados para calcular la productividad y el rendimiento de los cultivos. Mediante un análisis estadístico de los resultados obtenidos se determinó la significancia de los efectos de los factores e interacciones sobre las variables de salida (test ANOVA 95% nivel de significancia), se elaboró un modelo matemático lineal para la productividad y rendimiento en función de las variables de entrada y sus interacciones, y se determinaron las condiciones óptimas que maximizan la productividad y rendimiento para cada variante en particular.

Cada experimento fue realizado en triplicado. A cada réplica se aplicó el protocolo de extracción de proteínas periplasmáticas (*Sección 2.2.3.2*), extrayéndose muestras de las fracciones “Extracelular”, “Buffer TES” y “Periplasma”. Las muestras fueron analizadas midiéndose actividad cutinasa [U/ml] y proteínas totales [mg/ml]. Se calculó la producción [U], productividad [U/h] y rendimiento [U/mg Peso Seco]. Los detalles de los cálculos realizados se encuentran en *Anexo D*. Los resultados se encuentran en *Anexo E*.

3.2.1 Dificultades

La variante Cutinasa-(WP)2 presentó más estabilidad que la variante Cutinasa-(Y)3, tanto en la desviación estándar de las mediciones aplicadas a las réplicas (*Ver Anexo E*) como en las curvas de crecimiento y en la estabilidad de las variantes conservadas a 4°C en las placas de cultivo sólido.

La variante Cutinasa-Y(3) presentó crecimiento lento y baja capacidad de las bacterias para ser conservadas en medio de cultivo sólido a 4°C. Al observar estas diferencias se determinó que los cultivos sólidos no eran útiles como stock, por lo cual los inóculos fueron preparados a partir del stock glicerol conservado a -80°C (preparación de inóculo sin etapas intermedias). Sólo de este modo fue posible obtener réplicas más uniformes.

El análisis del factor *Densidad celular en el punto de inducción* presentó inconvenientes, ya que es difícil determinar con precisión en qué momento se alcanza la densidad celular deseada para inducir sin intervenir el cultivo en variadas ocasiones para realizar mediciones de absorbancia, con el objetivo de monitorear el crecimiento de las bacterias. Se realizaron cultivos a distintas temperaturas y en diferentes medios de cultivo para determinar, mediante la curva de crecimiento, el momento exacto donde debía realizarse la inducción, de este modo fue

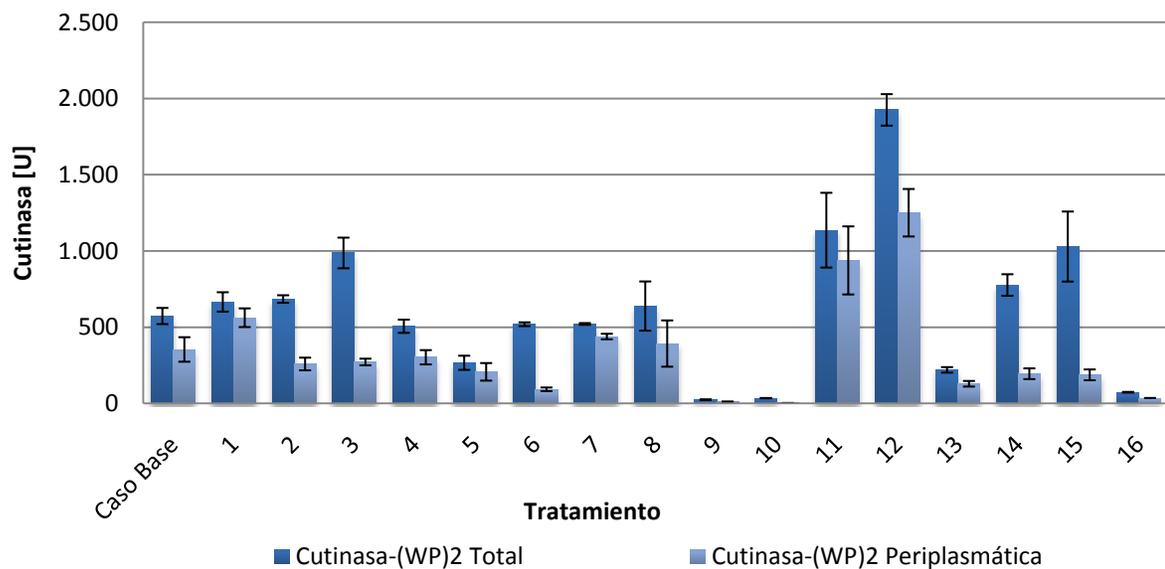
posible minimizar el error en este factor. En cuanto a la concentración de nutrientes, la *concentración de glicerol* fue la más difícil de controlar, como consecuencia de la viscosidad del compuesto.

3.2.2 Producción Total y Periplasmática

A continuación se presentan los resultados de la Producción Total y Periplasmática, en unidades de actividad cutinasa producidas por las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3. Los resultados son presentados gráficamente, identificándose los tratamientos que entregaron mejores y peores resultados. El detalle se encuentra en *Anexo E*.

3.2.2.1 Producción de la variante Cutinasa-(WP)2

Gráfico 2: Producción de cutinasa recombinante de la variante Cutinasa-(WP)2 bajo diferentes tratamientos aplicados.



Nota: Los niveles de los factores para cada tratamiento aplicado se encuentran en la *Tabla 6*.

Producción Total

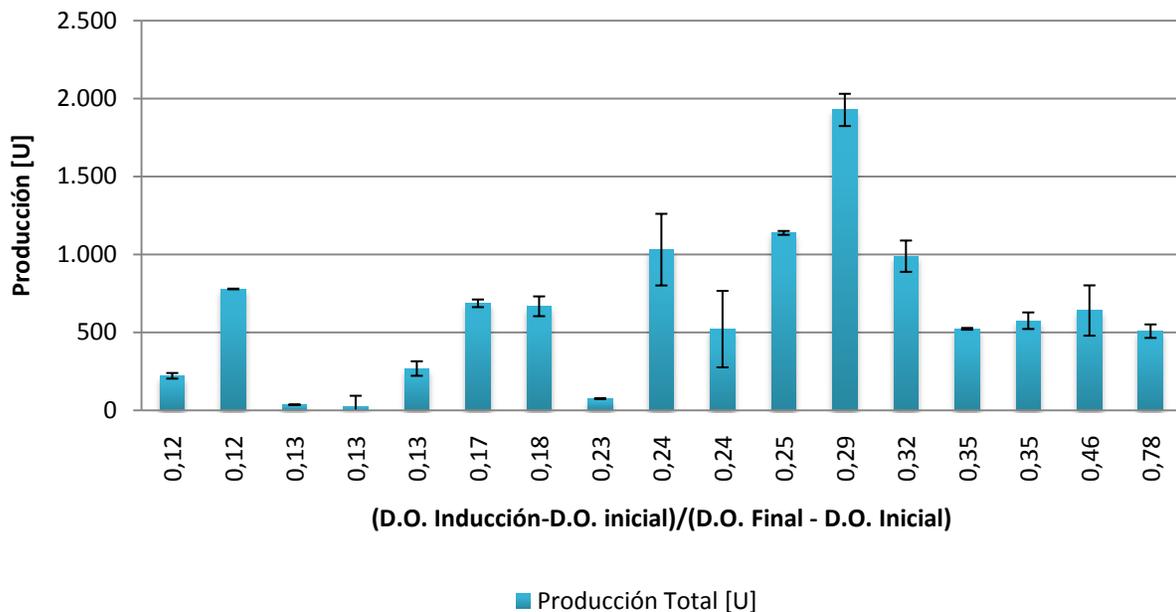
Los tratamientos que presentan mayor Producción Total corresponden a los tratamientos 12, 11 y 15; en orden de mayor a menor producción. Estos tratamientos coinciden en los niveles de 2 factores: *concentración de extracto de levadura*, 20g/L (Alto); y *densidad celular en el punto de inducción*, 1,5 U Abs_{600nm} (Alto). Ambos factores tiene un efecto positivo y significativo sobre la Producción Total. Esto se debe a que en las bacterias efectivamente inducidas, es decir, en células que no presentan represión de la inducción hay una relación directamente proporcional entre la densidad celular final alcanzada y la producción total de proteína recombinante. Por lo tanto,

se requiere una alta concentración de nutrientes con el objetivo de alcanzar una alta densidad celular (Babaeipour y col., 2007).

La etapa del crecimiento bacteriano donde se induce la producción de la proteína recombinante tiene fuerte incidencia en la densidad celular final alcanzada por el cultivo, ya que cuando se induce la producción las bacterias dirigen su metabolismo hacia la producción de la proteína foránea y menguan su crecimiento (Donovan y col., 1996; Jevševar y col., 2007). Además, el efecto nocivo de la alta concentración de inductor sobre la densidad celular final alcanzada disminuye cuando las células son inducidas a mayor densidad celular (Lee y Kealing, 2008).

En el siguiente *Gráfico 3* es posible apreciar el efecto de la densidad celular en el punto de inducción. Los tratamientos que presentan mayor Producción Total son aquellos que fueron inducidos, aproximadamente en el primer tercio del crecimiento ($(D.O. \text{ Inducción} - D.O. \text{ inicial}) / (D.O. \text{ Final} - D.O. \text{ Inicial}) \approx 0,29$). En cambio los tratamientos que presentan menor Productividad Total son aquellos en los cuales se indujo durante el primer octavo del crecimiento ($(D.O. \text{ Inducción} - D.O. \text{ inicial}) / (D.O. \text{ Final} - D.O. \text{ Inicial}) \approx 0,13$).

Gráfico 3: Producción de cutinasa según la etapa del crecimiento en la cual se induce la producción



Por lo tanto, bajo condiciones de inducción efectiva se recomienda inducir al finalizar el primer cuarto o tercio del crecimiento.

Producción Periplasmática

Los tratamientos que presentan mayor Producción Periplasmática corresponden a los tratamientos 12, 11 y 1, ordenados de mayor a menor producción. Estos tratamientos coinciden en los niveles de 2 factores: *concentración de inductor*, 0,1 mM IPTG (Bajo) y *concentración de glicerol en el medio de cultivo*, 0% v/v (Bajo). Se debe mantener un nivel bajo de inducción de la producción de la proteína recombinante, puesto que su acumulación en el periplasma genera liberación hacia el medio extracelular, la cual es inespecífica y se atribuye a simple difusión o lisis celular (Salazar y col., 2001; Nadkarni y col., 2007). Además, al inducir fuertemente la producción de la proteína recombinante, el desplazamiento del metabolismo hacia la producción de la proteína heteróloga y la carga metabólica que genera, reduce la producción de proteínas de membrana. Esta reducción en la producción de las proteínas de membrana atenúa la habilidad de las células para retener la proteína recombinante en el periplasma (Bäcklund y col., 2008).

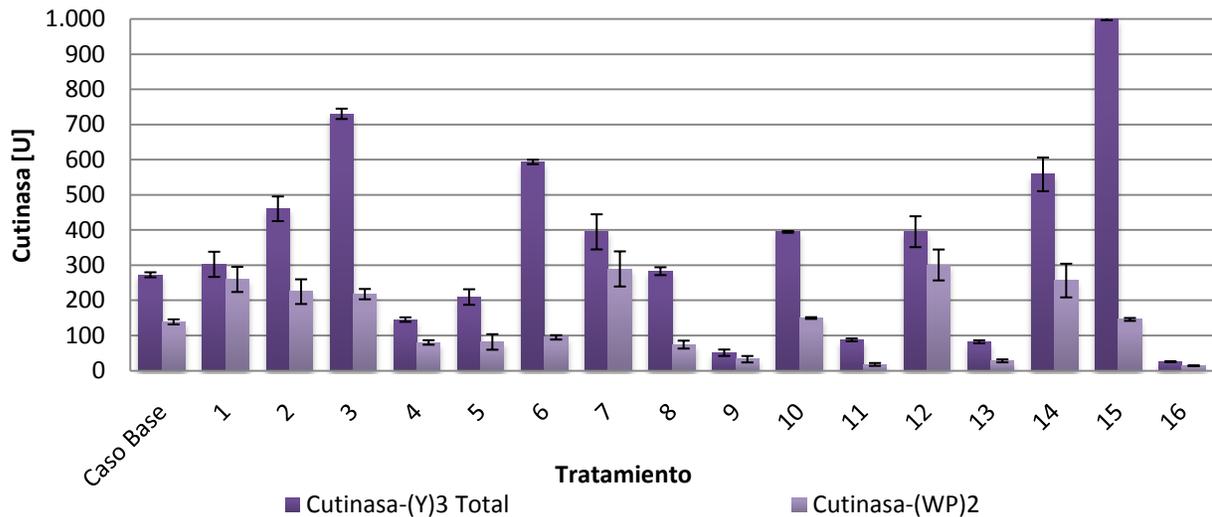
Tratamientos con menor producción

Los tratamientos que presentan menor Producción Total y Periplasmática corresponden a los tratamientos 9, 10 y 16. Estos tratamientos coinciden en 2 niveles de factores: *concentración de extracto de levadura*, 20 g/L(Alto); y *concentración de glicerol* 0,3% v/v(Alto). La concentración de extracto de levadura en un nivel alto, tiene un efecto positivo y significativo en la Producción Total. Por lo tanto, se infiere que existe una interacción negativa entre el factor concentración de extracto de levadura y glicerol, lo cual conlleva a una baja producción en los tratamientos anteriormente nombrados.

El Tratamiento 16 corresponde al experimento en el cual todos los factores se encuentran en el nivel máximo, es decir: temperatura de crecimiento e inducción óptima para crecimiento de *E. coli*; densidad celular en el punto de inducción en etapa intermedia del crecimiento exponencial, condiciones metabólicas óptimas para producción de proteínas recombinantes; y alta concentración de nutrientes. Sin embargo, a pesar de que las condiciones son las óptimas, según estudios de factores aislados, la producción y rendimiento de este tratamiento se encuentra entre las más bajas. Se postula entonces, que variados factores interactúan en los niveles altos, anulando su efecto benéfico sobre la producción.

3.2.2.2 Producción de la variante Cutinasa-(Y)3

Gráfico 4: Producción de Cutinasa en la variante Cutinasa-(Y)3 bajo diferentes tratamientos aplicados.



La variante Cutinasa-(Y)3 produce aproximadamente la mitad de las unidades de actividad que produce la variante Cutinasa-(WP)2. Esta observación condujo al estudio de la variante e identificación del origen de estas diferencias, las cuales fueron atribuidas a una mutación de la variante transformada y no a la proteína recombinante que produce (Ver Sección 3.4). En consecuencia de lo anterior los análisis de productividad y rendimiento fueron realizados para cada variante por separado.

Producción Total

El caso de la variante Cutinasa-Y(3), los tratamientos que presentan mayor Productividad Total corresponden a los tratamientos 15, 3 y 6, ordenados de mayor a menor producción (Gráfico 4). Estos tratamientos coinciden en el nivel del factor *concentración de glicerol*, 0,3% v/v (Alto). Este resultado es inverso al de la variante Cutinasa-(WP)2, en la que este factor tiene un efecto negativo sobre la Producción Total.

Producción Periplasmática

La Producción Periplasmática presenta un patrón completamente distinto a la Producción Total. Los experimentos que presentan mayor Producción Periplasmática son los tratamientos 12, 7 y 14, los cuales coinciden en 2 niveles de factores: *concentración de triptona*, 10 g/L (Bajo) y *concentración de glicerol* 0% v/v (Bajo). Al igual que en el caso de la Producción Periplasmática de la variante Cutinasa-(WP). La fuente de nutrientes y aminoácidos

(extracto de levadura o triptona) interactúan negativamente con la fuente de carbono inmediata, glicerol, sobre la Producción Periplasmática.

Tratamientos con menor Producción Total y Periplasmática

La menor Producción Total y Periplasmática es presentada por los tratamientos 16, 9 y 13, ordenados de menor a mayor producción. Estos tratamientos coinciden en la *alta concentración de extracto de levadura* acompañado de una *alta concentración de triptona o glicerol*, es decir, una alta concentración de nutrientes.

La naturaleza indefinida de la composición de los medios de cultivo no permite detallar los componentes o interacciones de componentes que provocan un efecto nocivo sobre la producción de la proteína recombinante. Sin embargo, se sabe que el extracto de levadura y la triptona poseen un 17,5% y 7,7% de carbohidratos en su composición respectivamente (*Ver Anexo F*), los cuales pueden inhibir la expresión de la proteína recombinante mediante represión catabólica. El medio de cultivo menos nutritivo, utilizado en el estudio, posee 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de triptona, por lo tanto, contiene alrededor de un 0,16% p/v de carbohidratos. El medio más nutritivo contiene 20 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de triptona posee alrededor de un 0,46% p/v de carbohidratos.

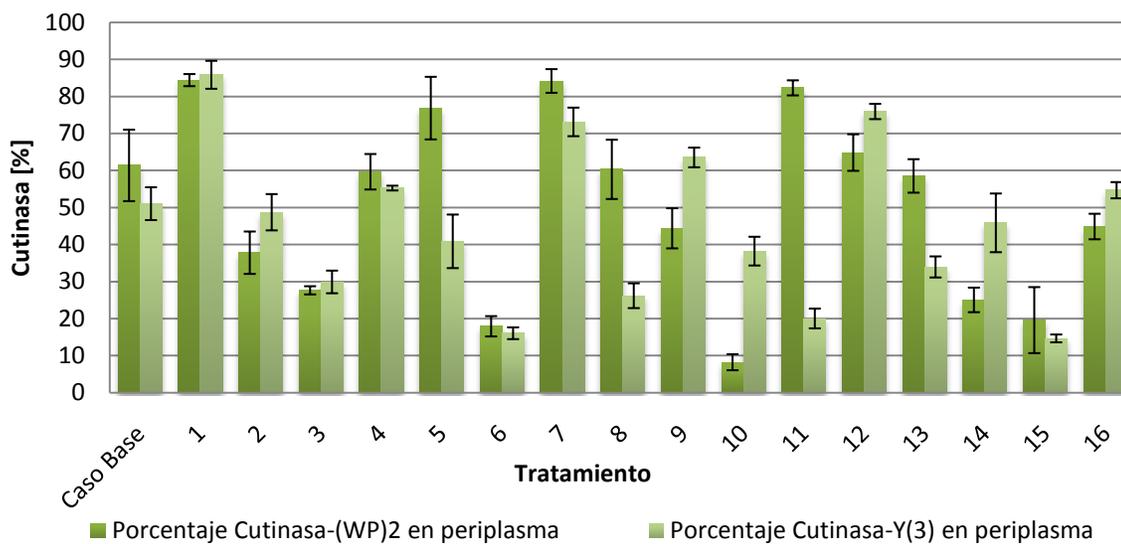
La represión catabólica se encuentra asociada al sistema fosfotransferasa (*PTS-Phosphotransferase System*). El sistema PTS, es un complejo grupo de enzimas que detecta, transporta y fosforila un alto número de fuentes de carbono en las bacterias (glucosa, manosa, fructosa y los polioles sorbitol y manitol). La fosforilación de un azúcar determinado requiere cuatro proteínas generales, la Enzima I y HPr, y un par de proteínas específicas para el compuesto denominadas como complejo Enzima II. El sistema PTS interviene en la actividad de la enzima Adenilato Ciclasa. Esta enzima cataliza la formación del cAMP, el cual se une a la proteína CAP (*Catabolite Activator Protein*). El complejo cAMP-CAP se une al DNA en una zona anterior al promotor e incrementa la afinidad entre promotor y la RNA polimerasa para que se pueda efectuar el inicio de la transcripción con eficiencia. Cuando se transportan carbohidratos por el sistema PTS, se inhibe la actividad de adenilato ciclasa y en consecuencia, se inhibe la transcripción de las proteínas heterólogas (Boer y *col.*, 1986; Donovan y *col.*, 1996; Grossman y *col.*, 1998; Postma y *col.*, 1993). Por lo tanto, al contar con la amplia concentración de nutrientes contenidos en el extracto de levadura, también se cuenta con una alta concentración de hidratos de carbono transportables por PTS, lo cual disminuye la eficiencia del inicio de la transcripción. La glucosa en concentraciones de 0,1 a 1% p/v puede inhibir la producción de proteínas recombinantes durante la fase de inducción (Donovan y *col.*, 1996).

3.2.3 Análisis de la Distribución Subcelular de Cutinasa

La distribución de cutinasa en el periplasma tiene gran importancia, puesto que se desea purificar la proteína a partir de la fracción periplasmática del cultivo. Esto debido a que esta fracción contiene menor concentración de proteínas nativas y contaminantes (Makrides, 1996).

La producción total de cutinasa presenta un patrón similar al de la producción contenida en el periplasma para ambas variantes. Sin embargo, es posible apreciar que, en variados casos, la cantidad total producida es alta y la cantidad contenida en el periplasma es considerablemente baja, tratamientos 3, 6, 14 y 15 (Ver Gráficos 2 y 4). Para analizar esta observación se calculó el porcentaje de cutinasa contenida en la Fracción Periplasmática en relación al total producido y se analizaron los factores que afectan significativamente esta variable (Ver Gráfico 5).

Gráfico 5: Porcentaje de cutinasa recombinante contenida en la fracción periplasmática para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3



En el Gráfico 5 es posible notar que la tendencia de ambas variantes es similar. Los tratamientos 1 y 7 presentan sobre un 70% de cutinasa contenida en el periplasma, para ambas variantes. Estos tratamientos coinciden en 3 niveles de factores: *temperatura de crecimiento/inducción*, 25/18°C (Baja); *concentración de extracto de levadura*, 5 g/L (Baja) y *concentración de glicerol* 0% v/v (Baja). Los niveles altos de estos tres factores son desfavorables para la retención la proteína heteróloga en el periplasma de las bacterias, lo cual será estudiado mediante el análisis estadístico de resultados.

Los tratamientos que presentan menor retención de la proteína foránea en el periplasma corresponden a los experimentos 3, 6 y 15. Estos tratamientos coinciden sólo en el nivel del factor *concentración de glicerol*, 0,3% v/v. Por lo tanto, se espera que el efecto de este factor sea negativo y significativo sobre esta variable.

3.2.3.1 Efecto de los factores en la distribución subcelular de cutinasa

Para determinar cuál es el efecto de los factores y sus interacciones sobre el porcentaje de cutinasa contenida en el periplasma se llevó a cabo el siguiente análisis estadístico.

El estudio de un efecto principal se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor. Se calcula como la diferencia entre la respuesta promedio del nivel alto y la respuesta promedio del nivel bajo del factor en estudio. Los resultados obtenidos para los efectos principales y de las interacciones para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3 se presentan en la *Tabla 12*.

Tabla 12: Efectos principales y de las interacciones de factores sobre la distribución subcelular de cutinasa

Factor	Efecto	Efecto
	Cutinasa-(WP)2	Cutinasa-(Y)3
A: Temperatura de crecimiento/inducción	-19,91	-0,13
B: Densidad celular en el punto de inducción	11,28	-2,91
C: Concentración de inductor	-2,74	-14,01
D: Concentración de extracto de levadura	-12,62	-3,64
E: Concentración de triptona	-0,44	-17,21
F: Concentración de glicerol	-24,79	-12,07
AB (CE Alias)	23,89	18,71
AC (BE Alias)	-2,85	-4,83
AD (EF Alias)	4,44	20,76
AE (BC-DF Alias)	-3,63	10,89
AF (DE Alias)	10,45	3,93
BD (CF Alias)	7,58	-1,15
BF (CD Alias)	-10,18	1,87
Error normal	-2,96	+/-2,60

Nota: Las interacciones presentan alias, es decir, los efectos de las interacciones se confunden, por ejemplo, la interacción AB, se confunde con la interacción CE.

El efecto indica que si un factor o interacción pasa del nivel bajo al nivel alto, la variación en la variable de respuesta es el valor de unidades indicado por el efecto. Por ejemplo, el efecto del factor A, temperatura de crecimiento/inducción equivale a -19,91 para la variante Cutinasa-(WP)2; esto quiere decir que, al aumentar la temperatura de 25/18°C a 37/25°C el porcentaje cutinasa contenida en el periplasma disminuye en 19,91%.

La *Tabla 12* muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones. También se muestra el error normal, el cual mide el error de muestreo. Para probar la significancia estadística de los efectos, se debe llevar a cabo el análisis de la varianza aplicando el Test de ANOVA.

3.2.3.2 Análisis de la varianza para determinación de efectos significativos.

El análisis de varianza se utiliza para comparar los valores de un conjunto de datos numéricos y determinar si son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. En este caso, los datos son los efectos de factores y de las interacciones. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza, intra y entre grupos.

Tabla 13: Tabla de ANOVA para la determinación de efectos significativos sobre el porcentaje de cutinasa contenida en el periplasma.

Factor	Cutinasa-(WP)2			Cutinasa-(Y)3		
	Suma de cuadrados	Coficiente F	P-Valor	Suma de Cuadrados	Coficiente F	P-Valor
A: Temperatura de crecimiento/inducción	4755,90	45,19	0,0000	0,19	0,00	0,9618
B: Densidad celular en el punto de inducción	1527,42	14,51	0,0006	101,76	1,26	0,2709
C: Concentración de inductor	90,39	0,86	0,3610	2357,18	29,08	0,0000
D: Concentración de extracto de levadura	1911,80	18,17	0,0002	158,81	1,96	0,1712
E: Concentración de triptona	2,32	0,02	0,8829	3555,76	43,86	0,0000
F: Concentración de glicerol	7376,76	70,10	0,0000	1747,62	21,56	0,0001
AB (CE Alias)	6853,33	65,12	0,0000	4202,83	51,84	0,0000
AC (BE Alias)	97,16	0,92	0,3438	280,38	3,46	0,0721
AD (EF Alias)	236,96	2,25	0,1433	5172,77	63,81	0,0000
AE (BC-DF Alias)	158,30	1,50	0,2290	1423,00	17,55	0,0002
AF (DE Alias)	1312,63	12,47	0,0013	185,69	2,29	0,1400
BD (CF Alias)	689,55	6,55	0,0154	16,00	0,20	0,6599
BF (CD Alias)	1245,12	11,83	0,0016	41,76	0,52	0,4782
Bloques	98,45	0,47	0,6306	17,38	0,11	0,8987

Para la variante Cutinasa-(WP)2, 8 de los efectos de los factores y de las interacciones presentan p-valores inferiores a 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero, al nivel 95% de confianza (valores en rojo). Por lo tanto, estos factores e interacciones influyen significativamente en el porcentaje de cutinasa contenido en el periplasma respecto del total de proteína recombinante producida. En cambio, para la variante Cutinasa-(Y)3,

6 de los efectos de los factores e interacciones son significativos, coincidiendo sólo en 2 factores con la variante Cutinasa-(WP)2.

3.2.3.3 Análisis de efectos significativos en la distribución subcelular de cutinasa.

Los efectos en los que las variantes, Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, coinciden son:

Concentración de glicerol (Efecto negativo): No se ha encontrado en la literatura la razón por la cual el glicerol tiene un efecto negativo en la retención de la proteína recombinante en el periplasma de las bacterias.

Temperatura de crecimiento/inducción-densidad celular en el punto de inducción (AB) o concentración de inductor-concentración de triptona (CE) (Efecto positivo): El efecto de estos alias es positivo. Para determinar cual de ellos es el que posee la significancia calculada, es necesario observar el valor de los efectos principales. Es posible notar que la *temperatura de crecimiento/inducción*, *concentración de IPTG* y *concentración de triptona* tienen efectos negativos y que solamente el efecto densidad celular en el punto de inducción es positivo para la variante Cutinasa-(WP)2, por lo tanto, la interacción positiva corresponde al de *temperatura de crecimiento/inducción - densidad celular en el punto de inducción*.

La temperatura es un factor importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de transcripción y traducción de proteínas; por lo tanto, tiene incidencia sobre la velocidad específica de crecimiento. La relación entre la velocidad específica de crecimiento y la temperatura está dada por ley de Arrhenius, y dentro del rango de temperaturas estudiadas (18-37°C), la relación entre estas variables es directamente proporcional (Ratkowsky y col., 1982; Membré y col., 2005). Un incremento en la velocidad específica de crecimiento conduce a una alta velocidad de producción pero también a un incremento en la fuga del material contenido en el periplasma. Esto se debe a la reducción de la producción de proteínas de membrana lo cual atenúa la habilidad de las células para retener la proteína recombinante (Bäcklund y col., 2008). Por lo tanto, una mayor temperatura genera una alta velocidad específica de crecimiento, lo cual otorga condiciones favorables para la inducción como el alto contenido de ribosomas (Donovan y col., 1996). Posterior a la inducción la temperatura baja 12 grados Celsius (37->25°C), lo cual permite que metabolismo de la bacteria se desacelere y la inducción no genere una sobrecarga tanto en la maquinaria transcripcional y traduccional como en la maquinaria secretora (Babaeipour y col., 2007; Donovan y col., 1996).

Por lo anterior, inducir a densidades celulares más avanzadas y disminuir la temperatura, en la inducción, tiene un efecto positivo sobre la retención de proteínas en el periplasma de las bacterias. Esto se debe a que

inducir a una mayor densidad permite que las bacterias superen la etapa de adaptación y enfrenten la inducción de la producción en condiciones más favorables.

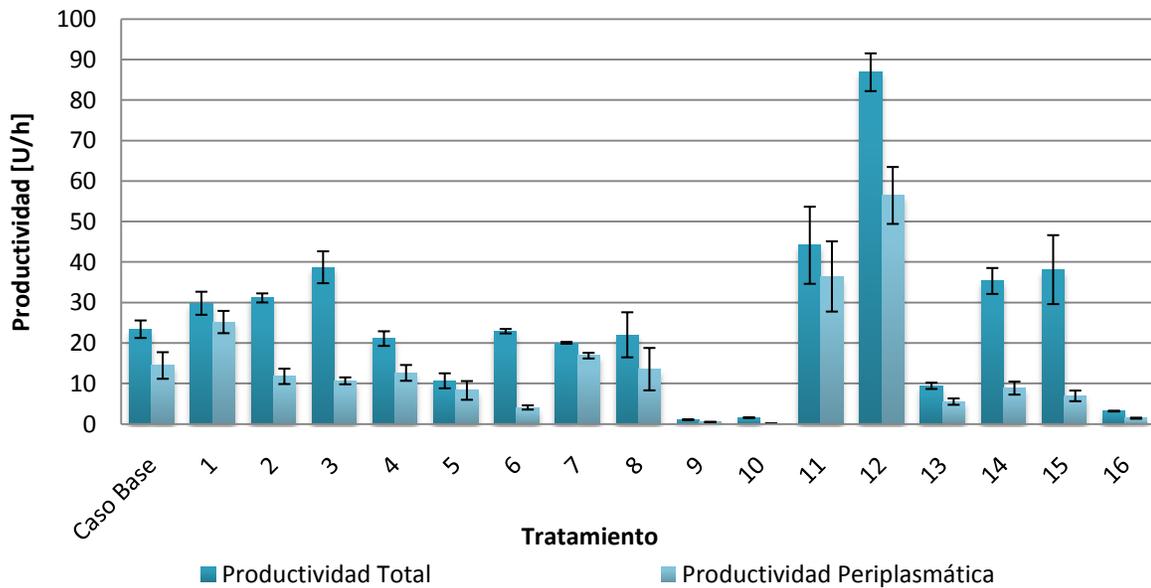
Se ha reportado que el periodo que dura la inducción de la producción de las proteínas heterólogas, dirigidas al espacio periplasmático, influye negativamente en el porcentaje acumulado en esta fracción. El efecto ha sido considerable, la literatura indica que el porcentaje de la proteína acumulado en el periplasma puede pasar de 90% a solo un 10% de 4 a 20 horas de inducción (Jeong y Lee; 1999).

3.2.4 Productividad de la Variante Cutinasa-(WP)2

La Productividad Total y Productividad Periplasmática de los cultivos fue determinada a través de la Producción Total y Producción Periplasmática dividida por el número de horas de la fermentación completa (crecimiento e inducción).

A continuación se presentan gráficamente los resultados obtenidos para la variante Cutinasa-(WP)2. El detalle se encuentra en el *Anexo D*.

Gráfico 6: Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(WP)2 bajo los tratamientos aplicados.



Al comparar la productividad [U/h] (*Gráfico 6*) con la producción [U] (*Gráfico 2*), es posible notar gran similitud en patrón de comportamiento. Esto se debe a que el 88% de las fermentaciones se desarrolló durante un periodo de 22 a 26 horas, un rango estrecho. Por esto, al dividir la producción por un valor relativamente común, horas de fermentación, se obtuvo un patrón análogo como resultado.

Tratamientos con mayor Productividad Total

Los tratamientos que sobrepasan la Productividad Total de 35 [U/h] corresponden a los tratamientos 12, 11 y 3, ordenados de mayor a menor. Estos tratamientos son candidatos a ser el óptimo según el análisis estadístico de resultados y coinciden en el nivel del factor *densidad celular en el punto de inducción*, $1,5 U Abs_{600nm}$. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis estadístico, en el que este factor presenta un efecto positivo y significativo en la Productividad Total y Periplasmática. La razón por la cual este factor es favorable se relaciona con la etapa del crecimiento en que se induce la producción, la etapa intermedia del crecimiento exponencial. En esta etapa las células se encuentran creciendo a mayor velocidad y existe un alto contenido de ribosomas, mayor acceso a nutrientes y menor concentración de subproductos tóxicos (Babaeipour y col., 2007; Shin y col., 2001)

Tratamientos con mayor Productividad Periplasmática

Los tratamientos que presentan mayor Productividad Periplasmática corresponden a los experimentos 12, 11 y 1, ordenados de mayor a menor. Estos tratamientos coinciden en los niveles de dos factores: *concentración de inductor*, 0,1 mM IPTG (Bajo) y *concentración de glicerol*, 0% v/v (Bajo). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el análisis estadístico en que estos factores presentan un efecto negativo significativo sobre la Productividad Periplasmática. La concentración de inductor tiene un efecto negativo, puesto que la producción abrupta de la proteína recombinante inducida por IPTG genera estrés en la maquinaria traduccional y secretora de las bacterias, como se mencionó anteriormente (Gordon y col., 2008).

Tratamientos que presentan menor Productividad Total y Periplasmática

Los tratamientos que presentan menor productividad son los tratamientos 9, 10 y 16. Estos tratamientos coinciden en los niveles de dos factores: *concentración de extracto de levadura*, 20 g/L (Alto), y *concentración de glicerol*, 0,3% v/v (Alto). La interacción de estos factores es negativa y significativa sobre la Productividad Periplasmática, según el análisis estadístico aplicado. La explicación de este fenómeno se basa en que la alta disponibilidad de nutrientes, concede disponibilidad de carbohidratos, ingresados a la célula mediante el sistema fosfotransferasa. Esto provoca la inactivación de la enzima adenilato ciclasa, por ende, una baja concentración de cAMP, lo que genera una inducción no efectiva.

3.2.4.1 Análisis estadístico de la Productividad para la variante Cutinasa-(WP)2.

3.2.4.1.1 Efectos de los factores sobre la productividad

Los resultados obtenidos para los efectos estimados de los factores y de las interacciones sobre la Productividad Total y Productividad Periplasmática se presentan a continuación.

Tabla 14: Efectos estimados de factores e interacciones sobre la Productividad de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor	Efectos sobre Productividad Total	Efectos sobre Productividad Periplasmática
A: Temperatura de crecimiento/inducción	4,01	-0,19
B: Densidad celular en el punto de inducción	16,53	11,33
C: Concentración de inductor	-11,58	-11,02
D: Concentración de extracto de levadura	2,91	1,65
E: Concentración de triptona	-11,80	-5,46
F: Concentración de glicerol	-17,68	-16,25
AB (CE Alias)	-5,98	3,50
AC (BE Alias)	-2,72	-2,24
AD (EF Alias)	4,53	4,56
AE (BC-DF Alias)	-15,27	-8,33
AF (DE Alias)	-13,96	-1,84
BD (CF Alias)	14,70	10,23
BF (CD Alias)	-0,31	-6,65
Error normal	+/-2,18	+/-1,11

Nota: Las interacciones presentan alias, es decir, los efectos de las interacciones se confunden, por ejemplo, la interacción AB, se confunde con la interacción CE.

Los efectos de los factores sobre la Productividad Total y Periplasmática presentan diferencias en magnitud y/o signo, puesto que una variable se encuentra asociada a la totalidad de la producción de la proteína recombinante y la otra a la producción contenida en un compartimento celular, el periplasma. Lo mismo sucede al analizar el Rendimiento de las variantes. Un ejemplo de lo anterior se observa en la *Tabla 14* donde es posible apreciar que los efectos sobre la Productividad Total y Periplasmática muestran un patrón similar, pero en el factor *temperatura de crecimiento e inducción* presentan distinto signo. Como se explicó anteriormente, la temperatura tiene una fuerte relación con la velocidad de crecimiento de las bacterias, por lo tanto, a mayor temperatura la producción es más acelerada (37°C) lo que implica alta productividad total (efecto positivo del factor). Sin embargo, la competencia por la maquinaria secretora entre la proteína recombinante y las proteínas de la pared celular genera un debilitamiento de la membrana celular externa, lo cual provoca una fuga del producto desde el periplasma hacia el espacio extracelular, es decir, el factor temperatura presenta un efecto negativo sobre la Productividad Periplasmática. Por lo tanto, las diferencias entre las variables totales y periplasmáticas se atribuyen

a las características de la membrana externa cuya integridad permite retener un mayor porcentaje de proteína recombinante en el periplasma.

3.2.4.1.2 Determinación efectos significativos sobre la Productividad

El análisis de varianza para los efectos de los factores e interacciones sobre la Productividad Total y Periplasmática se presenta a continuación.

Tabla 15: Tabla de ANOVA para la determinación de efectos significativos sobre la Productividad de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor	Productividad Total			Productividad Periplasmática		
	Suma de Cuadrados	Coficiente F	P-Valor	Suma de Cuadrados	Coficiente F	P-Valor
A: Temperatura	193,32	3,40	0,0744	0,44	0,03	0,8646
B: Densidad celular en el punto de inducción	3282,03	57,75	0,0000	1541,22	103,75	0,0000
C: Concentración de inductor	1609,27	28,31	0,0000	1456,73	98,06	0,0000
D: Concentración de extracto de levadura	101,41	1,78	0,1910	32,69	2,20	0,1478
E: Concentración de triptona	1671,23	29,40	0,0000	358,23	24,11	0,0000
F: Concentración de glicerol	3752,93	66,03	0,0000	3168,91	213,31	0,0000
AB (CE Alias)	428,47	7,54	0,0098	144,46	9,72	0,0038
AC (BE Alias)	88,70	1,56	0,2206	60,37	4,06	0,0523
AD (EF Alias)	246,48	4,34	0,0454	249,20	16,78	0,0003
AE (BC-DF Alias)	2799,75	49,26	0,0000	831,75	55,99	0,0000
AF (DE Alias)	2340,12	41,17	0,0000	40,42	2,72	0,1088
BD (CF Alias)	2592,35	45,61	0,0000	1256,96	84,61	0,0000
BF (CD Alias)	1,14	0,02	0,8881	532,20	35,82	0,0000
Bloques	5,37	0,05	0,9539	10,66	0,36	0,7013

Los p-valores indican que 9 factores e interacciones son significativos, en un 95%, tanto para la Productividad Total como para la Productividad Periplasmática, coincidiendo en la significancia y signo del efecto, en 7 de ellos. Los factores coincidentes han sido analizados respecto de su efecto favorable o desfavorable sobre la variable de salida.

3.2.4.1.3 Análisis de efectos significativos sobre la Productividad de la variante Cutinasa-(WP)2

A continuación se presenta un análisis de los efectos de factores e interacciones significativos sobre la Productividad Total y Periplasmática

Densidad celular en el punto de inducción (B) (Efecto positivo): Este factor tiene un efecto positivo para la productividad, ya que, como se comentó anteriormente, inducir a 1,5 U Abs_{600nm}, implica que los cultivos se encuentran entre la finalización del primer cuarto o tercio del crecimiento de las bacterias, que presenta condiciones metabólicas y ambientales favorables para comenzar la inducción de la producción proteína recombinante.

Concentración de inductor (C) (Efecto negativo): El efecto negativo de este factor tiene relación con la carga metabólica generada al inducir fuertemente la expresión de la proteína recombinante, puesto que para su producción no solo se desvía la maquinaria transcripcional y traduccional (degradación acelerada de mRNA y mayor producción de rRNA), si no que también la maquinaria secretora (efecto de las proteínas secretadas al periplasma), colapsando el funcionamiento celular (Donovan y col., 1996).

Concentración de triptona (E) (Efecto negativo): El efecto de este factor es negativo. Estos se atribuye a la alta concentración de aminoácidos que contiene, los cuales pueden provocar la inhibición en la biosíntesis de otros aminoácidos o metabolitos esenciales (Donovan y col., 1996).

Concentración de Glicerol (F)(Efecto negativo): El efecto negativo de la concentración de glicerol no se ha encontrado registrado en la literatura.

Concentración de extracto de levadura- Concentración de glicerol (DF)(Alias AE-BC)(Efecto negativo): Existe una interacción negativa significativa entre estos factores tanto en la producción como en la productividad total y periplasmática. Se ha descartado el efecto negativo de la interacción *Temperatura-Concentración de triptona (AE)*, puesto que en la literatura se destaca el aumento en los requerimientos nutricionales de las bacterias a mayor temperatura, por lo cual, estos factores presentan interacción positiva (Gordon y col., 2008). Lo mismo sucede en el caso de la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor, puesto que se ha reportado que el efecto nocivo de la alta concentración de inductor sobre el metabolismo de las bacterias disminuye al inducir a alta densidad celular (Lee y Keasling, 2008). Por lo tanto, estos factores presentan una interacción positiva y sólo es posible atribuir el efecto negativo a la interacción DF.

Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de extracto de levadura (BD) o Concentración de inductor - concentración de glicerol (CF) (Efecto positivo): La interacción a la cual se atribuye el efecto positivo corresponde a la interacción BD, puesto que, como se ha discutido anteriormente, la inducción debe realizarse al comienzo de la etapa intermedia de la fase exponencial. Ya que, la densidad celular máxima de inducción corresponde a 1,5 UAbs_{600nm}, es necesario alcanzar una densidad óptica final entre 4, 5 y 6 UAbs_{600nm} y esto se logra cuando el medio de cultivo contiene alta concentración de extracto de levadura (todos los tratamientos con alta concentración de extracto de levadura, 20 g/L, alcanzaron densidades ópticas superiores a 6 U Abs_{600nm}). Se descarta el efecto positivo de la interacción CF puesto que el factor glicerol presenta un alto efecto negativo.

Temperatura de crecimiento/inducción-Concentración de extracto de levadura (AD) o Concentración de triptona-Concentración de glicerol (EF) (Efecto positivo): La interacción elegida como responsable del efecto positivo sobre la productividad corresponde a la interacción AD, puesto que, a mayor temperatura, mayor es la velocidad específica de crecimiento, por ende, mejores condiciones metabólicas para la producción de proteínas foráneas. Para que estas condiciones se mantengan por un tiempo prolongado es necesario disponer de los nutrientes requeridos tanto para cubrir la demanda asociada a la producción de la proteína recombinante como para la mantención del microorganismo de modo que no se presente estrés metabólico ni un inicio temprano de la fase estacionaria. Nuevamente se descarta de interacción en la cual se presenta el glicerol ya que a este factor se atribuyen solo efectos negativos.

3.2.4.1.4 Modelos lineales para Productividad

Posterior a la identificación de los factores e interacciones que influyen significativamente sobre la productividad, es necesario determinar cuáles son las condiciones óptimas bajo las que se debe llevar a cabo el proceso. Para ello, es necesario construir un modelo matemático que permita predecir el comportamiento de las fermentaciones y, finalmente, optimizarlo.

Los modelos propuestos son lineales, ya que se cuenta sólo con 2 estados para los niveles de los factores. Los coeficientes de regresión lineal son calculados en base a los resultados obtenidos para la Productividad Total y Productividad Periplasmática. Los valores que pueden tomar los factores en la ecuación se encuentran entre -1 y +1, es decir, los valores no son los reales si no que se encuentran estandarizados. Estos modelos sólo se utilizan para maximizar las variables de respuesta.

Tabla 16: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre la Productividad Total.

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	26,01
B: Densidad óptica en el punto de inducción	8,27
C: Concentración de inductor	-5,79
E: Concentración de triptona	-5,90
F: Concentración de glicerol	-8,84
AF: Temperatura de crecimiento /inducción-Concentración de glicerol	-6,98
BD: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de extracto de levadura	7,34
CE: Concentración de inductor-Concentración de triptona	-2,99
DF: Concentración de extracto de levadura –Concentración de glicerol	-7,64

$$Productividad\ Total[U/h] =$$

$$26,01 + 8,27 * B - 5,79 * C - 5,9 * E - 8,84 * F - 6,98 * AF + 7,34 * BD - 2,99 * CE - 7,64 * DF$$

El modelo se ajusta en un 85,89% los datos experimentales con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 17: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre la Productividad Periplasmática.

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	13,71
B: Densidad celular en el punto de inducción	5,67
C: Concentración de inductor	-5,51
E: Concentración de triptona	-2,73
F: Concentración de glicerol	-8,13
AB: Temperatura-Densidad celular en el punto de inducción	1,73
AD: Temperatura-Concentración de extracto de levadura	2,28
BD: Densidad celular-Concentración levadura	5,12
CD: Concentración de inductor-Concentración de extracto de levadura	-3,33
DF: Concentración de extracto de levadura –Concentración de glicerol	-4,16

$$\begin{aligned}
 & \text{Productividad Periplasmática}[U/h] = \\
 & 13,71 + 5,67 * B - 5,51 * C - 2,73 * E - 8,13 * F + 1,73 * AB + 2,28 * AD + 5,12 * BD - 3,33 * CD - 4,16 * DF
 \end{aligned}$$

El modelo ajusta en un 92,58% los datos experimentales.

Ambos modelos ajustan en un nivel superior al 85%, por lo tanto, los modelos predicen el comportamiento de las fermentaciones con alta precisión, ya que al menos 13 de los 16 tratamientos aplicados se encuentran correctamente estimados (con porcentajes de diferencia inferior al 50%).

3.2.4.1.5 Condiciones para optimizar la Productividad

Las condiciones óptimas se determinan mediante la maximización de la variable de respuesta, Productividad Total o Productividad Periplasmática, sometiendo el modelo lineal a restricciones. Las restricciones son los rangos de las variables que en este caso son -1, inferior; y +1, superior.

Los resultados de la maximización para la Productividad Total y Periplasmática, corresponden a 73,8 [U/h] y 52,37[U/h], respectivamente. Estos valores se obtienen bajo las siguientes condiciones según los modelos lineales correspondientes (*Ver Tabla 18*).

Tabla 18: Condiciones óptimas para la Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(WP)2

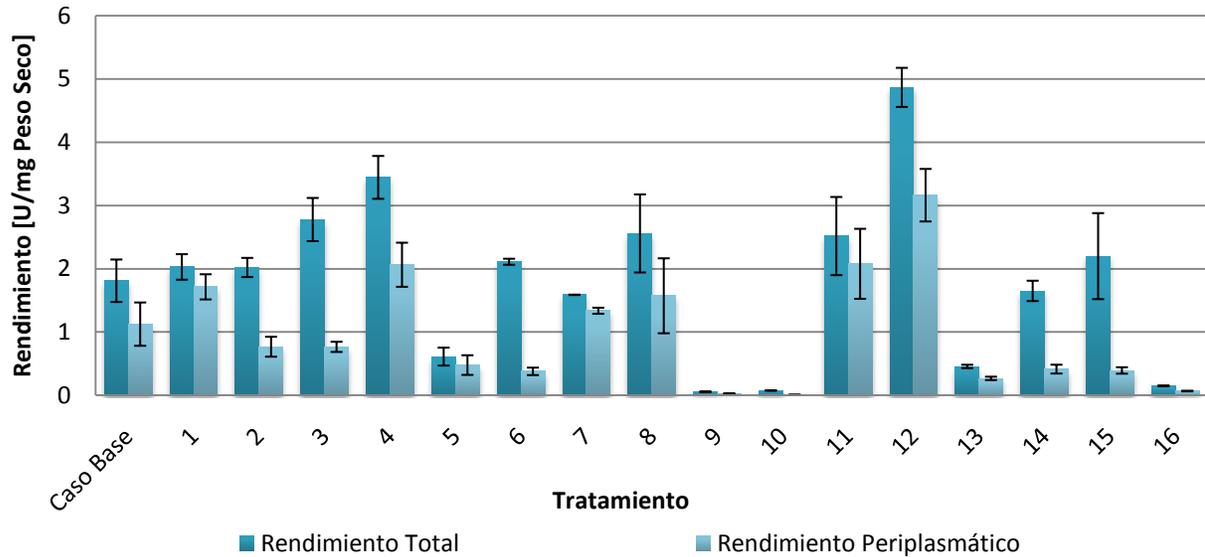
Factor	Nivel del Factor	Estado real del factor
Temperatura de crecimiento e inducción	+1	37/25°C
Densidad óptica en el punto de inducción	+1	1,5 U Abs _{600nm}
Concentración de inductor	-1	0,1mM
Concentración de extracto de levadura	+1	20g/L
E: Concentración de triptona	-1	10g/L
F: Concentración de glicerol	-1	0% v/v

Las condiciones óptimas para la Productividad Total y para Productividad Periplasmática corresponden a las del Tratamiento 12, el cual presenta, efectivamente la mayor productividad total, 86,66+/-4,66 [U/h] y periplasmática 56,45+/-7,03[U/h], ambas superiores a la predichas por el modelo.

3.2.5 Rendimiento de la Variante Cutinasa-(WP)2

A continuación se presentan los resultados sobre el rendimiento obtenidos para variante Cutinasa-(WP)2. Los resultados son presentados gráficamente, el detalle se encuentra en el Anexo E.

Gráfico 7: Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(WP)2 bajo los tratamientos aplicados



Al comparar la productividad [U/h] con el rendimiento [U/mg Peso Seco], es posible apreciar diferencias en el patrón de comportamiento. Un ejemplo de ello es el tratamiento 4 que presenta el segundo mejor rendimiento total, pero que en el caso de la productividad se encuentra en el lugar 11. Esto se debe a que en ciertos tratamientos, las células se encuentran altamente inducidas pero no presentan disponibilidad de nutrientes, por lo tanto, menguan el crecimiento celular y desplazan el metabolismo a la producción de la proteína recombinante.

Mayor Rendimiento Total y Periplasmático

Es posible notar que los tratamientos que sobrepasan el rendimiento total de total de 2,5[U/mg Peso Seco] corresponden a los tratamientos 12, 4 y 3, ordenados de mayor a menor. Estos tratamientos coinciden en nivel de los factores *densidad celular en el punto de inducción*, 1,5 U Ab_{600nm}(Alto) y *concentración de inductor*, 0,1 mM IPTG (Bajo). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis estadístico posterior, donde estos factores presentan efectos significativos positivo y negativo, respectivamente, sobre el Rendimiento Total de los cultivos. Los mismos factores son coincidentes en los tratamientos que presentan mayor Rendimiento Periplasmático (Tratamientos 12, 11 y 4).

Menor Rendimiento Total y Periplasmático

Los tratamientos que presentan menor Rendimiento Total y Periplasmático son los tratamientos 9, 10 y 16. Los mismos tratamientos presentan menor productividad.

3.2.5.1 Análisis estadístico del Rendimiento para la variante Cutinasa-(WP)2

3.2.5.1.1 Efectos de los factores sobre el Rendimiento

Los resultados obtenidos para los efectos estimados de los factores y de sus interacciones sobre la Rendimiento Total y Periplasmático se presentan a continuación.

Tabla 19: Efectos estimados de factores e interacciones sobre el Rendimiento Total y Periplasmático para la variante Cutinasa-(WP)2

Factor	Efectos Rendimiento Total	Efectos Rendimiento Periplasmático
A: Temperatura	0,58	0,17
B: Densidad celular en el punto de inducción	1,39	0,92
C: Concentración de inductor	-0,81	-0,71
D: Concentración de extracto de levadura	-0,65	-0,33
E: Concentración de triptona	-0,85	-0,43
F: Concentración de glicerol	-0,78	-0,89
AB (CE Alias)	-0,10	0,40
AC (BE Alias)	-0,17	-0,18
AD (EF Alias)	-0,20	0,05
AE (BC-DF Alias)	-0,97	-0,47
AF (DE Alias)	-0,55	0,04
BD (CF Alias)	0,49	0,32
BF (CD Alias)	0,04	-0,32
Error muestral	+/-0,15	+/-0,09

Nota: Las interacciones presentan alias, es decir, los efectos de las interacciones se confunden, por ejemplo, la interacción AB, se confunde con la interacción CE.

3.2.5.1.2 Determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento

El análisis de varianza para los efectos de los factores e interacciones sobre el Rendimiento Total y Periplasmático, variante Cutinasa-(WP)2, se presentan a continuación.

Tabla 20: Tabla de ANOVA para la determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor	Rendimiento Total			Rendimiento Periplasmático		
	Suma de cuadrados	Coefficient e F	P-Valor	Suma de cuadrados	Coefficient e F	P-Valor
A: Temperatura	4,04	15,64	0,0004	0,35	3,86	0,0582
B: Densidad celular en el punto de inducción	23,10	89,50	0,0000	10,25	112,96	0,0000
C: Concentración de inductor	7,86	30,44	0,0000	6,06	66,83	0,0000
D: Concentración de extracto de levadura	5,03	19,49	0,0001	1,33	14,62	0,0006
E: Concentración de triptona	8,60	33,33	0,0000	2,26	24,93	0,0000
F: Concentración de glicerol	7,35	28,47	0,0000	9,52	104,95	0,0000
AB (CE Alias)	0,11	0,43	0,5145	1,94	21,43	0,0001
AC (BE Alias)	0,37	1,45	0,2372	0,40	4,40	0,0438
AD (EF Alias)	0,49	1,89	0,1787	0,03	0,32	0,5757
AE (BC-DF Alias)	11,31	43,82	0,0000	2,60	28,70	0,0000
AF (DE Alias)	3,59	13,89	0,0007	0,02	0,22	0,6418
BD (CF Alias)	2,85	11,05	0,0022	1,26	13,90	0,0007
BF (CD Alias)	0,02	0,08	0,7739	1,26	13,90	0,0007
Bloques	0,03	0,07	0,9356	0,12	0,64	0,5321

Los p-valores indican que 9 factores e interacciones son significativos, en un 95%, tanto para el Rendimiento Total y como para el Rendimiento Periplasmático, pero sólo coinciden, en la significancia y signo del efecto, en 7 de ellos. Los factores coincidentes han sido analizados respecto de su efecto favorable o desfavorable sobre el Rendimiento.

3.2.5.1.3 Análisis de efectos de factores e interacciones significativos

Tabla 21: Resumen de efectos de factores e interacciones significativos sobre Productividad y Rendimiento para la variante Cutinasa-(WP)2

Factor o Interacción	Productividad Total	Productividad Periplasmática	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasmático
A: Temperatura	+	-	+	+
B: Densidad celular en el punto de inducción	+	+	+	+
C: Concentración de inductor	-	-	-	-
D: Concentración de extracto de levadura	+	+	-	-
E: Concentración de triptona	-	-	-	-
F: Concentración de glicerol	-	-	-	-
AB (CE Alias)	-	+	-	+
AC (BE Alias)	-	-	-	-
AD (EF Alias)	+	+	-	+
AE (BC-DF Alias)	-	-	-	-
AF (DE Alias)	-	-	-	+
BD (CF Alias)	+	+	+	+
BF (CD Alias)	-	-	+	-

Nota: Los signos (+) y(-) indican el signo del efecto o interacción(Filas) sobre las distintas variables de salida(Columnas). El color verde de la celda indica que el factor o interacción es positivo y significativo, mientras que el color rosado indica que el factor es negativo y significativo sobre la variable.

Condiciones favorables para Productividad y Rendimiento

- Densidad celular en el punto de inducción: En el nivel alto del punto de inducción las células se encuentran adaptadas al medio de cultivo, la velocidad de específica de crecimiento es alta, por lo tanto hay una alta disponibilidad de ribosomas lo que facilita la transcripción, puesto que esta densidad celular se alcanza durante el primer tercio del crecimiento exponencial existe disponibilidad de nutrientes y baja concentración de metabolitos tóxicos.
- Densidad celular en el punto de inducción – Concentración de extracto de levadura: Existe una interacción positiva entre estos factores debido a la necesidad de nutrientes al inducir el cultivo como consecuencia de la sobreproducción de la proteína heteróloga. Si la densidad celular en el punto de inducción es alta, entonces mayores serán los requerimientos de fuentes de carbono y aminoácidos.

Condiciones desfavorables para Productividad y Rendimiento

- Concentración de inductor: El aumento de la carga metabólica y desplazamiento del metabolismo hacia la producción de la proteína recombinante colapsa el sistema transcripcional de la célula y el transporte de proteínas de membrana.
- Concentración de triptona: El efecto desfavorable de este factor es atribuido a la alta concentración de aminoácidos que posee, lo cual mengua la biosíntesis de otros aminoácido o metabolitos esenciales.
- Concentración de glicerol: Efecto negativo no establecido.
- Concentración de extracto de levadura- Concentración de glicerol (DF) (Alias AE-BC): Se descartaron las interacciones *Temperatura –Concentración de triptona(AE) y Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de inductor(BC)* puesto que según la literatura estos factores presentan una interacción positiva. La interacción DF, en cambio, presentó un efecto negativo evidente sobre la productividad y rendimiento de la variante Cutinasa-(WP)2, tanto en el análisis preliminar como en análisis estadístico. Posiblemente la interacción entre algunos componentes del extracto de levadura, medio complejo, y el glicerol presentan una interacción nociva sobre la expresión de la proteína recombinante lo que genera una disminución en la producción.

3.2.5.1.4 Modelos lineales para el Rendimiento

Los coeficientes de regresión calculados para los factores e interacciones significativos son los siguientes:

Tabla 22: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre el Rendimiento Total de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor o Interacción	Coeficiente de regresión
Constante	1,82
A: Temperatura de crecimiento/inducción	0,29
B: Densidad óptica en el punto de inducción	0,69
C: Concentración de inductor	-0,40
D: Concentración de extracto de levadura	-0,32
E: Concentración de triptona	-0,42
F: Concentración de glicerol	-0,39
AF: Temperatura de crecimiento/inducción-Concentración glicerol	-0,27
BD: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración levadura	0,24
DF: Concentración de extracto de levadura –Concentración de glicerol	-0,49

$$Rendimiento\ Total[U/mg\ Peso\ Seco] =$$

$$1,82 + 0,29 * A + 0,69 * B - 0,40 * C - 0,32 * D - 0,42 * E - 0,39F - 0,27 * AF + 0,24 * BD - 0,49 * DF$$

El modelo ajusta en un 86,2% los datos experimentales.

Tabla 23: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre el Rendimiento Periplasmático de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor o Interacción	Coeficiente de regresión
Constante	0,97
B: Densidad celular en el punto de inducción	0,46
C: Concentración de inductor	-0,36
D: Concentración de extracto de levadura	-0,17
E: Concentración de triptona	-0,22
F: Concentración de glicerol	-0,45
AB: Temperatura-Densidad celular en el punto de inducción	0,20
BD: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de levadura	0,16
CD: Concentración de inductor-Concentración de extracto de levadura	-0,16
DF: Concentración de extracto de levadura –Concentración de glicerol	-0,23

$$Rendimiento\ Periplasmático[U/mg\ Peso\ Seco] =$$

$$0,97 + 0,46 * B - 0,36 * C - 0,17 * D - 0,22 * E - 0,45 * F + 0,20 * AB + 0,16 * BD - 0,16 * CF - 0,23DF$$

El modelo ajusta en un 88,6% los datos experimentales.

Al igual que en el caso de la productividad los ajustes de los modelos son adecuados, ya que estiman correctamente 13 de los 16 tratamiento aplicados.

3.2.5.1.5 Condiciones para optimizar el Rendimiento.

Las condiciones óptimas se determinan mediante la maximización de la variable de respuesta, Rendimiento Total o Rendimiento Periplasmático, sometiendo el modelo lineal a restricciones. Las restricciones son los rangos de las variables que en este caso corresponden a -1, inferior; y +1, superior.

La maximización de las variables de salida, Rendimiento Total y Periplasmático, corresponden a 4,70 [U/ mg Peso Seco] y 3,04 [U/ mg Peso Seco], respectivamente. Estos valores se obtuvieron bajo las siguientes condiciones, según los modelos lineales correspondientes:

Tabla 24: Condiciones óptimas para el Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(WP)2

Factor	Nivel del Factor	Estado real del factor
Temperatura de crecimiento e inducción	+1	37/25°C
Densidad óptica en el punto de inducción	+1	1,5 U Abs _{600nm}
Concentración de inductor	-1	0,1mM
Concentración de extracto de levadura	+1	20g/L
E: Concentración de triptona	-1	10g/L
F: Concentración de glicerol	-1	0% v/v

Las condiciones óptimas para la Rendimiento Total corresponden a las del Tratamiento 12, el cual presenta, efectivamente el mayor rendimiento total 4,87+/-0,31 [U/ mg Peso Seco] y periplasmático 3,17+/-0,42[U/ mg Peso Seco].

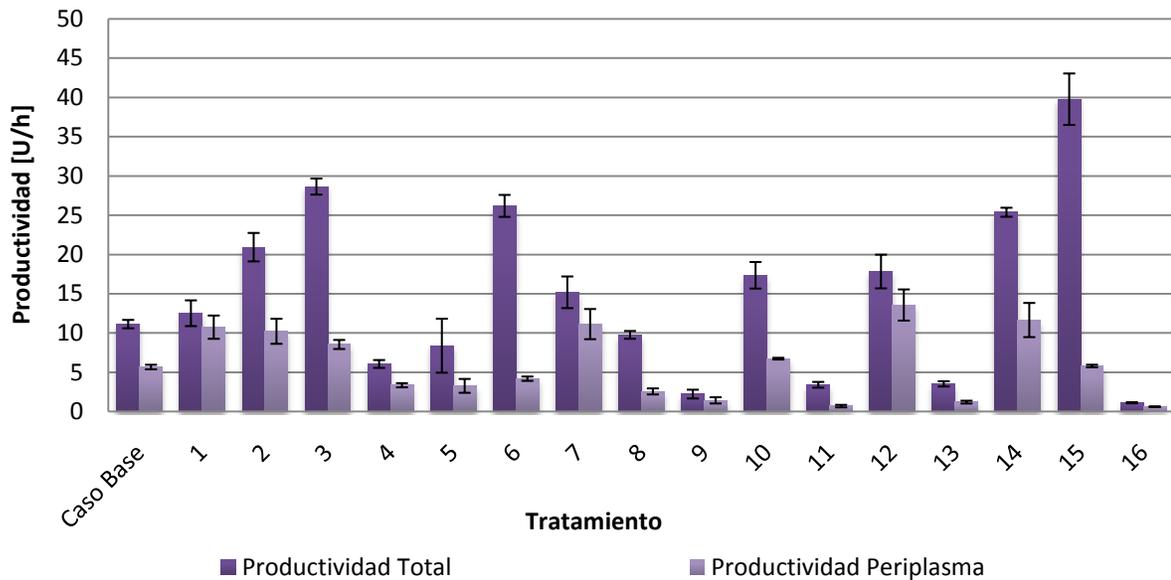
Las condiciones óptimas para la productividad y rendimiento, total y periplasmático, son las mismas, lo cual refleja la solidez de la respuesta de la variante ante variadas condiciones.

Las condiciones óptimas, son consistentes con el efecto favorable o desfavorable de los factores e interacciones, es decir, los factores que presentan efectos significativos negativos se encuentran niveles bajos y los factores que presentan efectos significativos positivos se encuentran en niveles altos.

3.2.6 Productividad de la Variante Cutinasa-(Y)3

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(Y)3. Los resultados son presentados gráficamente, el detalle se encuentra en el *Anexo E*.

Gráfico 8: Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(Y)3 bajo los tratamientos aplicados.



Tratamientos con mayor Productividad Total

Es posible notar que los tratamientos que sobrepasan la Productividad Total de 25 [U/h] corresponden a los experimentos 15, 3 y 6, ordenados de mayor a menor productividad. Estos tratamientos coinciden en el nivel del factor *concentración de glicerol*, 0,3% v/v (Alto). El nivel alto de este factor es favorable para la Productividad Total, en la variante Cutinasa-(Y)3, lo cual es completamente inverso en la variante Cutinasa-(WP)2.

Tratamientos con mayor Productividad Periplasmática

Los tratamientos que presentan mayor productividad periplasmática corresponden a los experimentos 12, 7 y 14, ordenados de mayor a menor productividad. Estos tratamientos coinciden en el nivel del factor *concentración de glicerol*, pero en un nivel nulo, 0% v/v. Esto se debe a que el glicerol, tiene un efecto nocivo sobre la retención de la proteína recombinante en el espacio periplasmático.

Tratamientos con menor Productividad Total y Periplasmática

Los tratamientos que presentan menor productividad son los experimentos 9, 11, 16 y 13. Estos tratamientos coinciden el nivel del factor concentración de extracto de levadura, 20 g/L (Alto), acompañado de una alta concentración de triptona o glicerol. Este resultado también fue obtenido para la variante Cutinasa-(WP)2. La razón fue asociada a que la alta concentración de nutrientes genera una alta concentración de carbohidratos PTS, lo cual inhibe la producción de cAMP, fundamental para la inducción efectiva de las bacterias (Grossman y *col.*, 1998).

A continuación se presenta el análisis de la Productividad Total y Periplasmática, partiendo por la determinación de los efectos estimados de factores e interacciones, seguido del análisis de significancia de los efectos, elaboración de un modelo lineal ajustado a los datos experimentales y finalmente optimización del modelo.

3.2.6.1 Análisis estadístico de la Productividad para la variante Cutinasa-(Y)3

3.2.6.1.1 Efectos de los factores sobre la Productividad

Los resultados obtenidos para los efectos estimados de los factores y de las interacciones sobre la Productividad Total y Productividad Periplasmática, para la variante Cutinasa-(Y)3, se presentan continuación.

Tabla 25: Efectos estimados de factores e interacciones sobre la Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor	Efecto Productividad Total	Efecto Productividad Periplasmática
A: Temperatura	1,37	1,26
B: Densidad celular en el punto de inducción	0,66	-0,39
C: Concentración de inductor	2,54	-1,86
D: Concentración de extracto de levadura	-2,13	-1,54
E: Concentración de triptona	-6,50	-3,50
F: Concentración de glicerol	2,65	-3,48
AB (CE Alias)	-14,44	-2,77
AC (BE Alias)	-2,47	-1,85
AD (EF Alias)	1,82	4,60
AE (BC-DF Alias)	-0,07	0,35
AF (DE Alias)	-8,45	-2,30
BD (CF Alias)	2,75	0,31
BF (CD Alias)	4,70	1,07
Error normal	+/-1,68	+/-0,4

Nota: Las interacciones presentan alias, es decir, los efectos de las interacciones se confunden, por ejemplo, la interacción AB, se confunde con la interacción CE.

La Productividad Total y Productividad Periplasmática presentan diferencias en los signos de 4 efectos, a diferencia de la variante Cutinasa-(WP)2, donde sólo diferían en el signo de un efecto.

3.2.6.1.2 Determinación de los efectos significativos sobre la Productividad

En el análisis de la varianza es posible observar que la significancia de los efectos para la Productividades Total y Periplasmática presentan mayores diferencias que las esperadas en base al estudio realizado para la Variante Cutinasa-(WP)2. En este caso es posible apreciar que los p-valores indican que sólo 4 factores e interacciones son significativos para la Productividad Total, mientras que para la Productividad Periplasmática 10 factores e interacciones son relevantes (*Ver Tabla 26*).

Tabla 26: Tabla de ANOVA para la determinación de efectos significativos sobre la Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-Y(3)

Factor	Productividad Total			Productividad Periplasmática		
	Suma de Cuadrados	Coficiente F	P-Valor	Suma de Cuadrados	Coficiente F	P-Valor
A: Temperatura	22,45	0,66	0,4221	19,00	9,74	0,0038
B: Densidad celular en el punto de inducción	5,25	0,15	0,6968	1,90	0,98	0,3307
C: Concentración de inductor	77,49	2,28	0,1406	41,37	21,20	0,0001
D: Concentración de extracto de levadura	54,51	1,61	0,2143	28,52	14,62	0,0006
E: Concentración de triptona	507,85	14,96	0,0005	147,14	75,41	0,0000
F: Concentración de glicerol	84,30	2,48	0,1249	145,46	74,55	0,0000
AB (CE Alias)	2498,55	73,60	0,0000	92,63	47,47	0,0000
AC (BE Alias)	73,48	2,16	0,1510	41,37	21,20	0,0001
AD (EF Alias)	39,66	1,17	0,2879	254,29	130,32	0,0000
AE (BC-DF Alias)	0,06	0,00	0,9680	1,43	0,73	0,3986
AF (DE Alias)	856,58	25,23	0,0000	63,30	32,44	0,0000
BD (CF Alias)	90,94	2,68	0,1115	1,17	0,60	0,4453
BF (CD Alias)	265,41	7,82	0,0087	13,74	7,04	0,0123
Bloques	8,51	0,13	0,8827	4,57	1,17	0,3227

3.2.6.1.3 Análisis de efectos de factores e interacciones significativos sobre la Productividad de la Variante Cutinasa-(Y)3

El análisis se basa en los efectos significativos coincidentes para la Productividad Total y Periplasmática.

Concentración de triptona: El efectos de este factor es negativo tanto en la Productividad Total como en la Productividad Periplasmática; esto se atribuye a la alta concentración de aminoácidos que contiene, los cuales pueden provocar la inhibición en la biosíntesis de de otros aminoácidos o metabolitos esenciales (Donovan y col., 1996).

Temperatura de crecimiento/inducción –Densidad celular en el punto de inducción (AB) o Concentración de inductor-Concentración de triptona (CE) (Efecto negativo): El efecto negativo se atribuye el efecto de la concentración de aminoácidos que, bajo condiciones altamente inducidas, genera sobreproducción de la proteína recombinante, limitando a las células de otros metabolitos, como se ha explicado anteriormente. Además, se ha reportado que reducir los niveles de peptona, otra fuente de aminoácidos, genera un aumento en la velocidad de crecimiento y dependencia de la concentración de extracto de levadura para la mantención del cultivo, fuente de

nutrientes que ha resultado ser más eficiente en variados estudios (Donovan y col.,1996; Gordon y col., 2008). Se descarta la interacción AB como causante del efecto negativo puesto que como se ha visto anteriormente estos factores, temperatura y la densidad celular en el punto de inducción, tienen efectos positivos sobre la Productividad.

Temperatura de crecimiento/inducción-Concentración de glicerol (AF) o Concentración de extracto de levadura-Concentración de triptona (DE) (Efecto negativo): La alta concentración de nutrientes, en ambas variantes, ha generado una alta densidad celular pero una baja productividad de los cultivos, sobre todo en los cuales se encuentran el extracto de levadura, triptona y glicerol en su nivel más altos (Tratamientos 10 y 16). Por lo tanto, la baja productividad se atribuye a una ineficiente inducción del cultivo y no a un efecto nocivo de los componentes del medio sobre las bacterias. Por ello se ha establecido que, para esta variante, el efecto negativo es provocado por la interacción DE.

Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de glicerol (BF) o Concentración de inductor-Concentración de extracto de levadura (CD) (Efecto positivo): En el caso de la variante Cutinasa-(Y)3, el glicerol ha tenido un efecto positivo sobre la productividad, esto se atribuye que la disponibilidad de una fuente de carbono no-PTS, no afecta los niveles de cAMP, por lo tanto, no interfiere en la inducción del cultivo. La interacción entre este factor y la densidad celular en el punto de inducción tiene un efecto positivo sobre la productividad, ya que, inducir a una densidad óptica de 1,5 UAbs_{600nm}, es decir, al finalizar el primer tercio del crecimiento en medio LB suplementado con glicerol, se dispone de las condiciones óptimas para comenzar la producción de la proteína recombinante, en el caso de esta variante. Se descarta el efecto de la interacción CD ya que la concentración de extracto de levadura presenta un efecto negativo sobre la productividad en esta variante.

3.2.6.1.4 Modelos lineales para la Productividad

A continuación se presentan los modelos lineales que permiten predecir el comportamiento de las fermentaciones con respecto a la Productividad.

Los modelos propuestos, son lineales, ya que se contó sólo con 2 estados para los niveles de los factores. Los coeficientes de regresión lineal fueron calculados en base a los resultados obtenidos para la Productividad Total y Productividad Periplasmática. Los valores que pueden tomar los factores en la ecuación se encuentran entre -1 y +1, es decir, los valores no son los reales si no que se encuentran estandarizados. Estos modelos sólo se utilizan para maximizar las variables de respuesta.

Tabla 27: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre la Productividad Total de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	14,89
E: Concentración de triptona	-3,25
BF: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de glicerol	2,35
CE: Concentración de inductor-Concentración de triptona	-7,21
DE: Concentración de extracto de levadura-Concentración de triptona	-4,22

$$Productividad\ Total[U/h] = 14,89 - 3,25 * E + 2,35 * BF - 7,21 * CE - 4,22 * DE$$

El modelo ajusta en un 70,43% los datos experimentales. Este ajuste no es recomendado para determinar las condiciones óptimas puesto que la estimación no posee un nivel de precisión adecuado. El modelo no predice correctamente comportamiento de las fermentaciones en base a las variables de entrada.

Tabla 28: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre la Productividad Periplasmática de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	5,97
A: Temperatura de crecimiento/inducción	0,63
C: Concentración de inductor	-0,93
D:Concentración de extracto de levadura	-0,77
E: Concentración de triptona	-1,75
F: Concentración de glicerol	-1,74
AC: Temperatura-Concentración de inductor	-0,93
AD: Temperatura-Concentración de extracto de levadura	2,30
BF: Densidad celular-Concentración de glicerol	0,54
CE: Concentración de inductor-Concentración de triptona	-1,39
DE: Concentración de extracto de levadura -Concentración triptona	-1,15

$$Productividad\ Periplasmática[U/h] = 5,97 + 0,63 * A - 0,93 * C - 0,77 * D - 1,75 * E - 1,74 * F - 0,93 * AC + 2,30 * AD + 0,54 * BF - 1,39 * CE - 1,15 * DE$$

El modelo ajusta en un 90,74% los datos experimentales.

3.2.6.1.5 Condiciones para optimizar la Productividad

Las condiciones óptimas se determinaron mediante la maximización de la variable de respuesta, Productividad Total o Productividad Periplasmática, sometiendo el modelo lineal a restricciones. Las restricciones son los rangos de las variables, que en este caso son -1, inferior y +1, superior.

La maximización de las variables de salida, Productividad Total y Periplasmática, corresponden a 31,93 [U/h] y 13,75 [U/h], respectivamente. Estos valores se obtienen bajo las siguientes condiciones según los modelos lineales correspondientes:

Tabla 29: Condiciones óptimas para la Productividad Total y Periplasmática de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor	Productividad Total		Productividad Periplasmática	
	Nivel del Factor	Estados real del factor	Nivel del Factor	Estados real del factor
Temperatura de crecimiento e inducción	+1	37/25°C	+1	37/25°C
Densidad óptica en el punto de inducción	-1	0,8 U Abs _{600nm}	-1	0,8 U Abs _{600nm}
Concentración de inductor	+1	0,5mM	-1	0,1mM
Concentración de extracto de levadura	+1	20g/L	+1	20g/L
E: Concentración de triptona	-1	10g/L	-1	10g/L
F: Concentración de glicerol	-1	0% v/v	-1	0% v/v

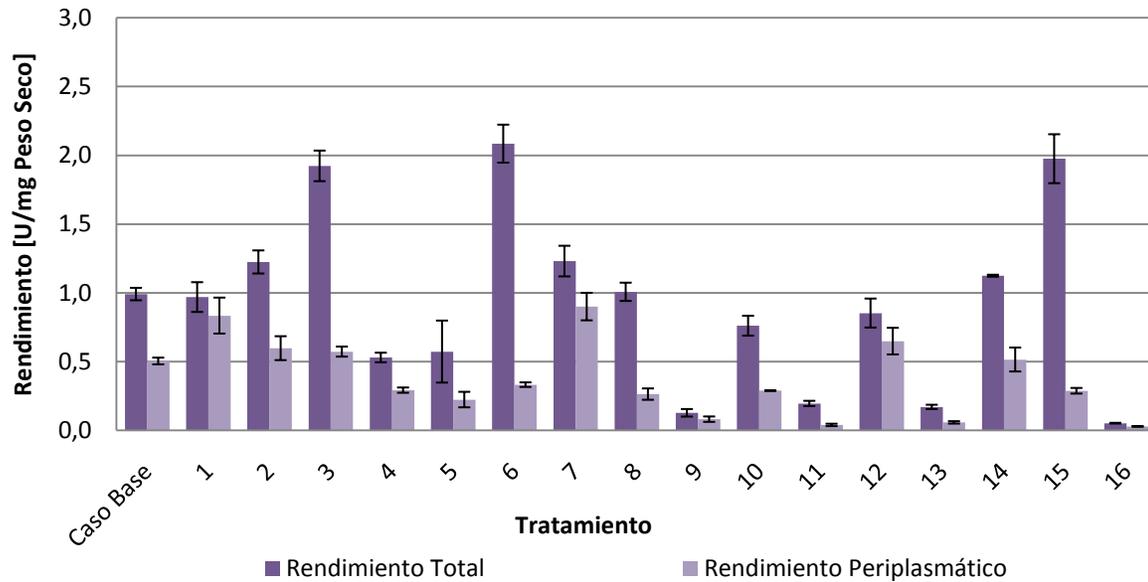
El tratamiento que maximiza la Productividad Total, según el modelo lineal, posee las mismas condiciones que el experimento 14, el cual no presentan la mayor productividad total, ya que se encuentra en el tercer lugar precedido por los tratamientos 15 y 3. Esto se debe a que el modelo ajusta los datos sólo en un 70,43% los datos experimentales.

El tratamiento que maximiza la Productividad Periplasmática de esta variante, según el modelo lineal, corresponde a un tratamiento que no se encuentra en la malla de experimentos. Pero es muy similar al experimento que presenta la mayor productividad periplasmática experimental, el tratamiento 12, que produce 13,56+/-1,98 [U/h]. Este tratamiento solo varía en la densidad celular en el punto de inducción de 0,8 a 1,5 U Abs_{600nm}.

3.2.7 Rendimiento de la Variante Cutinasa-(Y)3

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3. Los resultados son presentados gráficamente, el detalle se encuentra en el Anexo E.

Gráfico 9: Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3 bajo los tratamientos aplicados.



Los tratamientos que sobrepasan el rendimiento total de 1,7 [U/mg Peso Seco] corresponden a los tratamientos 6, 15 y 3, ordenados de mayor a menor rendimiento. Estos tratamientos coinciden en nivel del factor *concentración de glicerol*, 0,3% v/v (Alto). Este resultado es inverso al obtenido para el Rendimiento Periplasmático, donde el factor *concentración de glicerol* es desfavorable (dificultad de retención de proteínas periplasmática en presencia de glicerol).

Los tratamientos que presentan menor Rendimiento Total y Periplasmático son los tratamientos 16, 9 y 13. Estos tratamientos coinciden en la alta concentración de extracto de levadura acompañada de un alto nivel de triptona o glicerol. Efecto nocivo de la alta concentración de nutrientes para productividad y rendimiento de ambas variantes.

A continuación se presenta el análisis del Rendimiento Total y Periplasmático, partiendo por la determinación de los efectos estimados de factores e interacciones, seguido del análisis de significancia de los efectos, elaboración de un modelo lineal ajustado a los datos experimentales y finalmente optimización del modelo.

3.2.7.1 Análisis estadístico del Rendimiento de la variante Cutinasa-(Y)3

3.2.7.1.1 Efectos de los factores sobre el Rendimiento

Los resultados obtenidos para los efectos estimados de los factores y de las interacciones sobre la Rendimiento Total y Periplasmático, para la variante Cutinasa-(Y)3, se presentan a continuación.

Tabla 30: Efectos estimados de factores e interacciones sobre el Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor	Efectos	
	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasmático
A: Temperatura	0,06	-0,00
B: Densidad celular en el punto de inducción	0,09	0,01
C: Concentración de inductor	0,20	-0,09
D: Concentración de extracto de levadura	-0,53	-0,26
E: Concentración de triptona	-0,37	-0,23
F: Concentración de glicerol	0,16	-0,22
AB (CE Alias)	-0,78	-0,14
AC (BE Alias)	0,02	-0,08
AD (EF Alias)	0,02	0,25
AE (BC-DF Alias)	-0,01	0,08
AF (DE Alias)	-0,35	-0,05
BD (CF Alias)	0,13	0,00
BF (CD Alias)	0,14	0,00
Error muestral	+/-0,11	+/-0,02

Nota: Las interacciones presentan alias, es decir, los efectos de las interacciones se confunden, por ejemplo, la interacción AB, se confunde con la interacción CE.

3.2.7.1.2 Determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento

En el análisis de la varianza es posible observar que la significancia de los efectos para el Rendimiento Total y Periplasmático presentan mayores diferencias que las esperadas en base al estudio realizado para la Variante Cutinasa-(WP)2, al igual que el fenómeno ocurrido con la productividad. En este caso es posible apreciar que los p-valores indican que sólo 4 factores e interacciones son significativos para el Rendimiento Total, mientras que para el Rendimiento Periplasmático, 10 factores e interacciones son relevantes (Ver *Tabla 31*).

El análisis de varianza para los efectos de los factores e interacciones sobre El Rendimiento Total y Periplasmático, variante Cutinasa-(Y)3, se presentan a continuación.

Tabla 31: Tabla de ANOVA para la determinación de efectos significativos sobre el Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor	Rendimiento Total			Rendimiento Periplasmático		
	Suma de cuadrados	Coficiente F	P-Valor	Suma de cuadrados	Coficiente F	P-Valor
A: Temperatura	0,04	0,32	0,5759	0,00	0,02	0,8765
B: Densidad celular en el punto de inducción	0,10	0,74	0,3965	0,00	0,33	0,5698
C: Concentración de inductor	0,49	3,57	0,0680	0,10	15,06	0,0005
D: Concentración de extracto de levadura	3,45	24,78	0,0000	0,80	116,04	0,0000
E: Concentración de triptona	1,67	12,03	0,0015	0,63	91,28	0,0000
F: Concentración de glicerol	0,29	2,12	0,1552	0,57	82,84	0,0000
AB (CE Alias)	7,30	52,52	0,0000	0,23	33,99	0,0000
AC (BE Alias)	0,01	0,04	0,8477	0,07	10,59	0,0027
AD (EF Alias)	0,01	0,03	0,8538	0,79	115,29	0,0000
AE (BC-DF Alias)	0,00	0,01	0,9083	0,07	10,14	0,0032
AF (DE Alias)	1,48	10,62	0,0026	0,03	4,58	0,0400
BD (CF Alias)	0,20	1,46	0,2360	0,00	0,00	0,9587
BF (CD Alias)	0,24	1,71	0,2000	0,03	4,58	0,0400
Bloques	0,04	0,15	0,8599	0,01	0,79	0,4631

3.2.7.1.3 Análisis de efectos de factores e interacciones significativos

Tabla 32: Resumen de efectos de factores e interacciones significativos sobre Productividad y Rendimiento de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor o Interacción	Productividad Total	Productividad Periplasmática	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasmático
A: Temperatura	+	+	+	-
B: Densidad celular en el punto de inducción	+	-	+	+
C: Concentración de inductor	+	-	+	-
D: Concentración de extracto de levadura	-	-	-	-
E: Concentración de triptona	-	-	-	-
F: Concentración de glicerol	+	-	+	-
AB (CE Alias)	-	-	-	-
AC (BE Alias)	-	-	+	-
AD (EF Alias)	+	+	+	+
AE (BC-DF Alias)	-	+	-	+
AF (DE Alias)	-	-	-	-
BD (CF Alias)	+	+	+	+
BF (CD Alias)	+	+	+	+

Nota: Los signos (+) y(-) indican el signo del efecto o interacción(Filas) sobre las distintas variables de salida(Columnas). El color verde de la celda indica que el factor o interacción es positivo y significativo, mientras que el color rosado indica que el factor es negativo y significativo sobre la variable.

Las variables de salida, para la variante Cutinasa-(Y)3 coinciden en el efecto significativo y negativo de 3 factores e interacciones.

Condiciones desfavorables para Productividad y Rendimiento

- Concentración de triptona
- Concentración de inductor – Concentración de triptona
- Concentración de extracto de levadura-Concentración de triptona

Todas las interacciones desfavorables incluyen la alta concentración de triptona en el medio de cultivo. El efecto nocivo de este factor se ha asociado a la concentración de aminoácidos que contiene, la cual no es siempre

favorable (Donovan y *col.*, 1996). A pesar de que el extracto de levadura también corresponde a un medio complejo, su efecto negativo no es significativo, esto puede deberse a las diferencias en la composición respecto de la triptona, menor concentración de aminoácidos y mayor concentración de vitaminas y carbohidratos (*Ver Anexo F*)

3.2.7.1.4 Modelos lineales para el Rendimiento.

Los modelos propuestos, son lineales, ya que se cuenta sólo con 2 estados para los niveles de los factores. Los coeficientes de regresión lineal son calculados en base a los resultados obtenidos para el Rendimiento Total y Rendimiento Periplasmático. Los valores que pueden tomar los factores, en la ecuación, se encuentran entre -1 y +1, es decir, los valores no son los reales si no que se encuentran estandarizados. Estos modelos sólo se utilizan para maximizar las variables de respuesta.

Tabla 33: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre el Rendimiento Total de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	0,92
D: Concentración de extracto de levadura	-0,27
E: Concentración de triptona	-0,19
CE: Concentración de inductor- Concentración de triptona	-0,39
DE: Concentración de extracto de levadura-Concentración de triptona	-0,18

$$\text{Rendimiento Total [U/mg Peso Seco]} = 0,92 - 0,27 * D - 0,19 * E - 0,39 * CE - 0,18 * DE$$

El modelo ajusta en un 67,7% los datos experimentales. Ajuste inadecuado para realizar la optimización.

Tabla 34: Coeficientes de regresión del modelo lineal para factores e interacciones significativos sobre el Rendimiento Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor o Interacción	Coefficiente de regresión
Constante	0,37
C: Concentración de inductor	-0,05
D: Concentración de extracto de levadura	-0,13
E: Concentración de triptona	-0,11
F: Concentración de glicerol	-0,11
AC: Temperatura-Concentración de inductor	-0,04
AD: Temperatura-Concentración de extracto de levadura	0,13
BC: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de inductor	0,04
BF: Densidad celular en el punto de inducción-Concentración de glicerol	0,03
CE: Concentración de inductor-Concentración de triptona	-0,07
DE: Concentración de extracto de levadura -Concentración de triptona	-0,03

$$\text{Rendimiento Periplasmático[U/mg Peso Seco]} = 0,37 - 0,05 * C - 0,13 * D - 0,11 * E - 0,11 * F - 0,04 * AC + 0,13 * AD + 0,04 * BC + 0,03 * BF - 0,07 * CE - 0,03 * DE$$

El modelo ajusta en un 91,46% los datos experimentales.

3.2.7.1.5 Condiciones para optimizar el Rendimiento

Las condiciones óptimas se determinan mediante la maximización de la variable de respuesta, Rendimiento Total o Rendimiento Periplasmático, sometiendo el modelo lineal a restricciones. Las restricciones son los rangos de las variables que en este caso corresponden a -1, inferior; y +1, superior.

La maximización de las variables de salida, Rendimiento Total y Periplasmático, son 1,59 [U/mg Peso Seco] y 0,90 [U/mg Peso Seco], respectivamente. Estos valores se obtienen bajo las siguientes condiciones según los modelos lineales correspondientes:

Tabla 35: Condiciones óptimas para el Rendimiento Total y Periplasmático de la variante Cutinasa-(Y)3

Factor	Rendimiento Total		Rendimiento Periplasmático	
	Nivel del Factor	Estados real del factor	Nivel del Factor	Estados real del factor
Temperatura de crecimiento e inducción	+1	37/25°C	-1	25/18°C
Densidad óptica en el punto de inducción	-1	0,8 U Ab _{560nm}	+1	1,5 U Ab _{560nm}
Concentración de inductor	+1	0,5mM	+1	0,5mM
Concentración de extracto de levadura	-1	5g/L	-1	5g/L
E: Concentración de triptona	-1	10g/L	-1	10g/L
F: Concentración de glicerol	+1	0,3% v/v	-1	0% v/v

Las condiciones óptimas para la Rendimiento Total corresponden a las condiciones del Tratamiento 6, el cual presenta efectivamente el mayor rendimiento experimental 2,0 +/-0,14 [U/mg Peso Seco]. En cuanto al Rendimiento Periplasmático, las condiciones óptimas, según el modelo, corresponden a las del Tratamiento 7, el cual presenta, efectivamente, el mayor rendimiento, 0,90+/-0,10 [U/mg Peso Seco].

Es posible, al comparar las condiciones óptimas para cada variable de respuesta, notar un comportamiento errático de la variante Cutinasa-(Y)3, en relación a los resultados obtenidos para la variante Cutinasa-(WP)2, ya que cada variable de salida presenta condiciones óptimas distintas. Lo anterior genera dificultades para establecer cuáles son las condiciones óptimas de cultivo.

Puesto que para la producción industrial de proteínas recombinantes, la variable más relevante corresponde a la productividad, se seleccionan las condiciones del tratamiento 12 como las más favorables, ya que permiten obtener mayor productividad periplasmática.

3.3 OPTIMIZACIÓN DEL MODO DE OPERACIÓN

Se evaluaron 2 modos de operación: batch y fed-batch.

Para comparar los modos de operación se utilizaron las condiciones óptimas obtenidas para la Productividad Periplasmática de las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, condiciones del Tratamiento 12, el cual fue identificado como el óptimo tanto experimentalmente como mediante el análisis estadístico de datos.

Las condiciones de operación se presentan en la *Tabla 36*.

Tabla 36: Condiciones de cultivo Batch y Fed-batch en fermentador (Biostat B)

Factores		Unidad
Volumen Batch	900	ml
Volumen Fed batch inicial-final	750-1500	ml
Volumen del fermentador	2	L
Razón de inóculo	0,05	U Abs _{600nm}
Agitación	200	rpm
Aireación (Oxígeno)	4,5	L /min
pH	7	U de pH
Periodo de inducción	19-20	h
Temperatura de crecimiento / inducción	37/25	°C
Densidad celular en el punto de inducción	1,5	U Abs ₆₀₀
Concentración de inductor	0,1	mM
Composición Batch		
Concentración extracto de levadura	20	g/L
Concentración triptona	10	g/L
Cloruro de sodio	10	g/L
Composición medio alimentado		
Concentración extracto de levadura	40	g/L
Concentración triptona	20	g/L
Cloruro de sodio	10	g/L

A continuación se presentan los resultados obtenidos mediante la experimentación

3.3.1 Resultados Obtenidos de Fermentaciones Batch y Fed-batch de las Variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3

Los resultados son presentados en todas las formas llevadas a cabo:

- Matraz de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo, proveniente de la optimización en matraces.
- Fermentador Biostat B en modo de operación batch.
- Fermentador Biostat B en modo de operación fed-batch.

Los resultados obtenidos para cada variante se presentan en las *Tablas 37 y 38*.

Tabla 37: Comparación de modos de operación para la variante Cutinasa-(WP)2

	Caso Base	Optimización Matraz	Fermentador Operación Batch	Fermentador Operación Fed-batch
Volumen [ml]	100	100	900	1.500 Volumen Final
Porcentaje de cutinasa contenida en el Periplasma %	61,35	64,82	30,36	3,15
Producción de cutinasa [U/ml]	5,73	19,25	28,87	11,48
Productividad Total Específica [U/h ml]	0,23	0,87	1,25	0,50
Productividad Periplasmática Específica [U/h ml]	0,14	0,56	0,38	0,16
Rendimiento Total [U/mg Peso Seco]	1,81	4,87	5,74	2,73
Rendimiento Periplasmático [U/mg Peso Seco]	1,12	3,16	1,74	0,09

Nota: Los mejores resultados para cada variable se encuentran en rosado.

Tabla 38: Comparación de modos de operación en la variante Cutinasa-(Y)3

	Caso Base	Optimización Matraz	Fermentador Operación Batch	Fermentador Operación Fed-batch
Volumen [ml]	100	100	900	1.500
Porcentaje en Periplasma %	51,02	75,91	20,62	3,43
Producción [U/ml]	2,73	3,95	15,57	12,01
Productividad Total Específica [U/h ml]	0,11	0,18	0,72	0,51
Productividad Periplasmática Específica [U/h ml]	0,06	0,14	0,15	0,02
Rendimiento Total [U/mg Peso Seco]	0,99	0,85	3,04	2,88
Rendimiento Periplasmático [U/mg Peso Seco]	0,50	0,65	0,63	0,10

Los mejores resultados para la variable Productividad fueron obtenidos mediante el modo de operación batch en fermentador Biostat B, para ambas variantes. La Productividad Total en el modo de fermentación optimizado genera 5,3 y 6,5 veces la cantidad producida en el Caso Base para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, respectivamente.

Las condiciones entregadas por el fermentador Biostat B, tales como pH constante, aireación y agitación permiten mantener condiciones de óptimas de crecimiento: pH 7, disponibilidad de oxígeno disuelto y buena distribución de nutrientes a todas las células del cultivo; en consecuencia se genera una mayor producción y rendimiento bajo los modos de operación analizados en el fermentador. Sin embargo, el porcentaje de la proteína recombinante acumulado en el periplasma disminuye considerablemente en los modos de operación con agitación y aireación, por lo cual, la Productividad Periplasmática corresponde a 3,9 y 2,7 veces la cantidad producida en el Caso Base, para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, respectivamente. Estos valores son menores al compararlos con la Productividad Total, este resultado es esperado considerando las condiciones de aireación, agitación y amplio periodo de inducción (19-20 hrs).

El porcentaje acumulado en el periplasma disminuye, aún más, al alimentar la fermentación con medio fresco al inicio la inducción (cultivo fed-batch). Esto ocurre porque el aumento de la concentración de nutrientes, en la fase exponencial, provoca un incremento en la velocidad específica de crecimiento. Este efecto, adicionado al de la inducción, genera un incremento de la carga metabólica transcripcional y traduccional y competencia por la maquinaria secretora; por lo tanto, el metabolismo merma la producción de proteínas que constituyen la

membrana celular externa, debilitando su integridad y, a su vez, disminuyendo la capacidad de las bacterias para mantener las proteínas secretadas en el periplasma (Bäcklund *et al.*, 2008).

Al comparar la productividad y rendimiento de los cultivos batch y fed-batch, es posible notar que el cultivo fed-batch no entrega mejores resultados. Esto se atribuye a la estrategia de alimentación, puesto que no corresponde a una estrategia que permita controlar la velocidad específica de crecimiento, sino que simplemente es una alimentación constante de nutrientes a partir del punto de inducción. La productividad depende de la velocidad específica de crecimiento y se presume que esto se encuentra relacionado con el efecto de la maquinaria ribosomal en la velocidad de síntesis de proteínas. La concentración de ribosomas dentro de las células aumenta con un incremento de la velocidad específica de crecimiento, lo que permite a la células sintetizar proteínas rápidamente, de ese modo mantiene constante la concentración interna de proteínas de crecimiento y mantención (Shin *et al.*, 2001). Por ello, establecer una estrategia que mantenga una velocidad específica de crecimiento que proporcione un balance entre la producción de proteínas internas y de la proteína heteróloga es el objetivo del cultivo fed-batch, además de la alta densidad celular final alcanzada por el cultivo que tiene directa relación con los niveles de productividad (Lee y Keasling, 2008). Estos objetivos no se cumplen mediante la estrategia de alimentación aplicada. En base a lo anterior se recomienda utilizar como estrategia de alimentación la técnica pH-stat, la cual corresponde a una metodología de retroalimentación indirecta basada en el aumento del pH debido al agotamiento de las fuentes de carbono o una alimentación exponencial.

La variante Cutinasa-(Y)3 presenta menor productividad y rendimiento que la variante Cutinasa-WP(2). Esta observación y otras serán discutidas en la siguiente sección.

3.4 ANÁLISIS DE LA VARIANTE CUTINASA-(Y)3

La variante Cutinasa-(Y)3 presentó variadas complicaciones analizadas a continuación

3.4.1 Problemáticas Presentadas por la Variante Cutinasa-(Y)3

Pérdida de viabilidad de los stock en medio sólido y baja densidad celular de inóculos

Los cultivos fueron elaborados a partir de inóculos preparados en dos etapas: siembra en placas y preparación de inóculo a partir de una colonia aislada de la placa como se muestra en la *Sección 2.2.3.1*. La variante Cutinasa-(WP)2 no presentó inconvenientes, los cultivos en placas duraron hasta un mes después de cultivadas mientras que las placas que contenían la variante Cutinasa-(Y)3 presentaban colonias con poca consistencia y al preparar inóculos a partir de estas colonias se alcanzó una baja densidad celular, es decir, las células en las placas perdían rápidamente su viabilidad.

Crecimiento lento en matraces en comparación con la variante Cutinasa-(WP)2

Se realizaron cultivos de las variantes en medio LB sin inducción e iniciando la fermentación a la misma densidad celular. Durante el desarrollo de los cultivos se observó que el crecimiento de la variante Cutinasa-(Y)3 era más lento, alejándose progresivamente de la curva de crecimiento de la variante Cutinasa-(WP)2. Por esta razón fue difícil aplicar los tratamientos a ambas variantes en conjunto, ya que la variante Cutinasa-(WP)2 alcanzaba antes la densidad celular de inducción mientras que la variante Cutinasa-(Y)3 no la alcanzaba hasta horas después. Puesto que el fenómeno fue observado antes de la inducción de la producción de las proteínas recombinantes se descarta un efecto nocivo de la proteína Cutinasa-(Y)3 sobre la bacteria.

Menor productividad y rendimiento en comparación con la cepa Cutinasa-(WP)2

Es posible observar que la producción total, productividad y rendimiento son menores en la variante Cutinasa-(Y)3 al compararla con la variante Cutinasa-(WP)2, ver *Tablas 37 y 38*. En un comienzo la disminución en las Unidades de Actividad de Cutinasa producidas fue atribuida a un cambio en la actividad de la proteína producida por esta variante como consecuencia del polipéptido adicionado (Y-Y-Y). No fue posible purificar las muestras hasta un nivel donde se pudiera determinar la actividad específica de las proteínas recombinantes, ya que el proceso de purificación a través de variadas cromatografías afecta la actividad de la enzima Cutinasa-(WP)2 (resultados no presentados), por lo tanto, no sería posible llevar a cabo la comparación de la actividad específica de las proteínas recombinantes. Sólo se dispuso de los geles de SDS PAGE de la fracción periplasmática de los distintos tratamientos donde es posible notar que la diferencia en el volumen e intensidad de las bandas que identifican a Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa(Y)3 es proporcional al la diferencia de actividad presentada por las variantes como muestra la *Ilustración 6*.

Al realizar un análisis, normalizando el volumen e intensidad de las bandas a través del uso de programa ImageQuant TL, se determinó que la proteína Cutinasa-(Y)3 no presenta variaciones en la actividad en relación a la proteína recombinante Cutinasa-(WP)2. A continuación se presenta el análisis realizado.

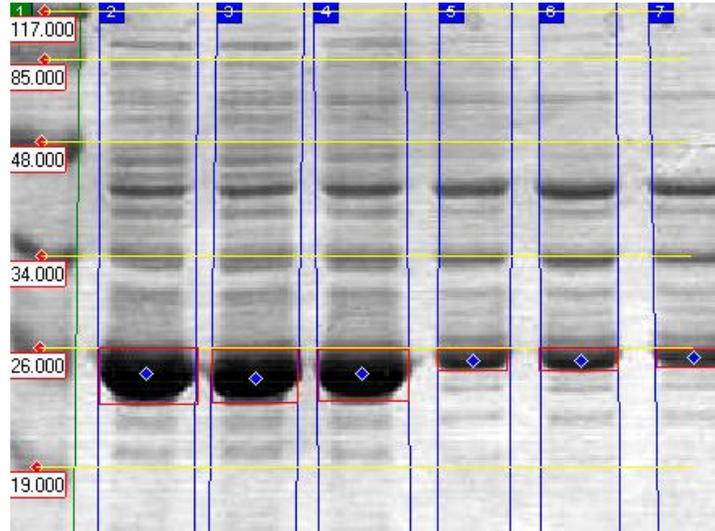


Ilustración 6: Resultados para la Productividad Periplasmática del tratamieto 12. La ilustración muestra la detección de los carriles en el gel de poliacrilamida (azul), las bandas (rojo) y los pesos moleculares del marcador de peso molecular (amarillo). Carriles 2-4 fraccion periplasmática de las réplicas de la variante Cutinasa-(WP)2. Carriles 5-7 fracción periplasmática de las réplicas de la variante Cutinasa-(Y)3.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del gel de SDS PAGE de la fracción periplasmática son los siguientes.

Tabla 39: Resultados del análisis de imagen para el gel SDS PAGE

Variantes y réplicas	Análisis de Imagen programa ImageQuant TL	Análisis Unidades Totales Resultados obtenidos
	Normalización del volumen e intensidad de bandas %	Normalización de Cutinasa periplasmática %
1 Cutinasa -(WP)2	100,00	100,00
2 Cutinasa -(WP)2	79,44	77,94
3 Cutinasa -(WP)2	84,25	92,64
Promedio	89,72	88,97
Desviación estándar	10,75	11,23
1 Cutinasa -(Y)3	26,70	21,91
2 Cutinasa -(Y)3	28,88	24,71
3 Cutinasa -(Y)3	23,52	18,38
Promedio	27,79	23,31
Desviación estándar	2,70	3,17

Nota: La normalización tanto del Volumen de Banda como de la Actividad Cutinasa se determinó considerando la primera muestra, réplica 1 de Cutinasa-(WP)2 como 100%.

Los valores presentados en la *Tabla 39* permiten determinar que no hay un efecto sobre la actividad de la proteína al comparar las variantes, ya que la relación Volumen e intensidad (WP)2/ Volumen e intensidad (Y)3 corresponde a $3,23 \pm 0,15$ y la relación Unidades de actividad (WP)2 / Unidades de actividad (Y)3 es $3,82 \pm 0,19$. Es decir, el cambio en la cantidad producida en miligramos de proteína es proporcional al cambio en las Unidades de Actividad Cutinasa medida. Por lo tanto, la disminución en la productividad y rendimiento que presenta la variante Cutinasa-(Y)3 se puede atribuir, principalmente, a una menor producción en miligramos de proteína.

Difícil determinación de condiciones óptimas de cultivo

El comportamiento de la variante Cutinasa-(WP)2 permitió elaborar modelos lineales con un porcentaje de ajuste sobre el 85% para todas las variables de salida, Productividad y Rendimiento Total y Periplasmático, por lo cual fue posible predecir el comportamiento de la variable utilizando estos modelos. Por el contrario, en el caso de la variante Cutinasa-(Y)3 la Productividad y Rendimiento total presentaron porcentajes de ajuste del modelo lineal inferiores al 70%, lo cual impidió estimar correctamente los valores de las variables de salida, es decir, no fue posible predecir el comportamiento de la variante en base al modelo, por lo tanto, tampoco fue posible establecer las condiciones óptimas a partir de este.

3.4.2 Transformación de cepa proveniente de stock original para producción de Cutinasa-(Y)3.

En base a las observaciones anteriormente mencionadas, la inestabilidad de la variante Cutinasa-(Y)3 no se atribuye a una pérdida de actividad de la proteína recombinante o un efecto nocivo de la proteína producida sobre el microorganismo productor. Por lo tanto, se propone que la problemática es originada por la cepa hospedera utilizada en la transformación, la cual puede presentar mutaciones indefinidas. Para verificar lo anterior se extrajo el plasmidio de la variante Cutinasa-(Y)3, cultivada en tubos de ensayo con medio LB y ampicilina; y se transformaron nuevas células electrocompetentes provenientes del stock original de la cepa BL21(DE3). Los resultados obtenidos se presentan en las *Tablas 40 y 41*.

Tabla 40: Resultados para nuevas transformadas Cutinasa-(Y)3 y cepas originales. Tratamiento 12.

	Producción Total			Productividad		Rendimiento	
	Actividad Total	Proteínas Totales	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Nuevas Transformadas	U	Mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mg Peso Seco]	[U Periplasma/ mg Peso Seco]
Cutinasa-(Y)3-1	1526,12	16,88	70,58	69,37	48,96	3,70	2,61
Cutinasa-(Y)3-2	1656,28	10,06	65,62	75,29	49,41	4,09	2,69
Promedio Nueva Transformada	1591,20	17,47	68,10	72,33	49,18	3,90	2,65
Desviación Estándar	92,03	0,83	3,50	4,18	0,31	0,28	0,05
Cutinasa-(WP)2	1925,76	23,82	64,82	86,88	56,45	4,87	3,16
Desviación Estándar	103,40	1,12	4,94	4,66	7,03	0,31	0,42
Cutinasa-(Y)3	395,08	16,48	75,91	17,82	13,56	0,85	0,65
Desviación Estándar	47,57	0,33	2,07	2,15	1,98	0,11	0,10

Nota: Cutinasa-(Y)3-1: Cepa transformada con el plasmidio proveniente del cultivo 1. Cutinasa -(Y)3-2: Cepa transformada con el plasmidio proveniente del cultivo 2. Cultivo 1 y 2 realizados bajo las mismas condiciones.

Tabla 41: Resultados para nuevas transformadas Cutinasa-(Y)3 y cepas originales. Tratamiento 4.

	Producción Total			Productividad		Rendimiento	
	Actividad Total	Proteínas Totales	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Nuevas Transformadas	U	Mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mg Peso Seco]	[U Periplasma/ mg Peso Seco]
Cutinasa-(Y)3-1	493,68	13,16	53,55	19,75	10,58	1,63	0,87
Cutinasa-(Y)3-2	552,02	12,36	56,17	22,08	12,40	2,01	1,13
Promedio Nueva Transformada	522,85	12,76	54,86	20,91	11,49	1,82	1,00
Desviación Estándar	41,26	50,56	1,85	1,65	1,29	0,27	0,18
Cutinasa-(WP)2	506,49	11,06	59,63	21,10	12,63	3,44	2,06
Desviación Estándar	43,31	0,50	4,79	1,80	1,95	0,34	0,35
Cutinasa-(Y)3	145,28	8,07	55,22	6,05	3,34	0,53	0,29
Desviación Estándar	11,98	0,21	0,64	0,50	0,27	0,03	0,02

Nota: Cutinasa-(Y)3-1: Cepa transformada con el plasmidio proveniente del cultivo 1. Cutinasa -(Y)3-2: Cepa transformada con el plasmidio proveniente del cultivo 2. Cultivo 1 y 2 realizados bajo las mismas condiciones.

A partir de las *Tablas 40 y 41* es posible apreciar que las nuevas transformadas muestran productividad y rendimiento más cercano a la variante Cutinasa-(WP)2 que a la variante Cutinasa-(Y)3, por lo cual se infiere que las problemáticas presentadas por la variante deben ser atribuidas a la cepa electrocompetente transformada.

Se recomienda extraer el plasmidio de la nueva variante y determinar, mediante la secuenciación nucleotídica del plasmidio, si este contiene el inserto de la secuencia para la producción de la proteína recombinante Cutinasa-(Y)3, lo cual validaría la hipótesis que justifica el comportamiento errático de la variante.

3.5 RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer un estudio aislado de los factores no asociados a la composición de medio de cultivo y determinar experimentalmente, es decir, no a partir de bibliografía como se hizo en el presente Trabajo de Título, niveles de los factores *temperatura de crecimiento y temperatura de inducción, densidad celular en el punto de inducción y concentración de inductor*; que presenten diferencias significativas en la expresión de las proteínas recombinantes al ser estudiados en forma independiente para el sistema microorganismo hospedero-vector de expresión-proteína recombinante, en particular.

Por otro lado, se sugiere seleccionar 3 niveles para cada factor en estudio de modo que sea posible obtener información más detallada respecto de las interacciones de los factores, ya que mediante el estudio con 2 niveles llevado a cabo sólo fue posible generar modelos lineales que entregan como solución a la optimización uno de los dos estados de los niveles y no puntos intermedios, como consecuencia de la información restringida que se posee, bajo número de niveles. En cambio, para un elevado número de niveles en estudio es posible establecer modelos polinomiales que permiten encontrar condiciones de cultivo óptimas entre los niveles establecidos que no se encuentran en la malla de experimentos del diseño experimental y que posiblemente entreguen mejor productividad de las proteínas recombinantes.

Considerando que continúe la investigación sobre condiciones óptimas de cultivo que optimicen la producción de cutinasa recombinantes se recomienda extraer el plasmidio de la nueva variante Cutinasa-(Y)3 y determinar, mediante la secuenciación nucleotídica del plasmidio, si este contiene el inserto de la secuencia para la producción de la proteína recombinante Cutinasa-(Y)3 para evitar las problemáticas acaecidas en el presente Trabajo de Título.

En cuanto a los modos de operación, se recomienda hacer un estudio exhaustivo que permita determinar las condiciones bajo las cuales se pueda realizar un cultivo fed-batch de alta densidad con la finalidad de obtener cultivos con mayor productividad.

4 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se logró optimizar la Productividad y Rendimiento de ambas variantes alcanzando una Producción de 28.870 [U/L] de Cutinasa-(WP)2 y 15.570 [U/L] de Cutinasa-(Y)3. La Productividad Total Específica fue 5,3 y 6,5 veces la cantidad producida en el Caso Base y 116,8 y 64,9 veces la cantidad producida por el caso menos favorable, para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, respectivamente. El Rendimiento óptimo presentó valores de 6,5 y 3,1 veces la cantidad producida en el Caso Base y 114,8 y 24,6 veces la cantidad producida por el caso menos favorable, para las variantes Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa-(Y)3, correspondientemente.

Mediante búsqueda bibliográfica fue posible establecer variados factores que afectan la productividad y/o rendimiento en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los factores y niveles, bajo y alto, seleccionados para llevar a cabo el estudio fueron: temperatura de crecimiento y temperatura de inducción, 25°C/18°C y 37°C/25°C; densidad celular en el punto de inducción, 0,8 y 1,5 U Abs_{600nm}; concentración de inductor, 0,1 y 0,5 mM IPTG; concentración de extracto de levadura, 5 y 20 g/L; concentración de triptona, 10 y 15g/L y concentración de glicerol 0 y 0,3 % v/v.

Se determinó que todos los factores analizados, temperatura de crecimiento e inducción, densidad celular en el punto de inducción y composición del medio de cultivo; tienen efectos significativos sobre la productividad y/o rendimiento de cutinasas recombinantes, Cutinasa-(WP)2 y Cutinasa(Y)3, en cultivos de *E. coli* BL21(DE3), dicha conclusión se logró en base al análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante un diseño experimental factorial fraccionario 2_{IV}^{6-2} .

A partir del estudio anteriormente mencionado es posible concluir que la densidad celular en el punto de inducción, tiene un efecto positivo y significativo sobre la productividad y rendimiento total de ambas variantes. El análisis de este factor permitió determinar que al inducir la producción de la proteína recombinante al finalizar el primer tercio del crecimiento bacteriano, la productividad total de los cultivos aumenta sustancialmente. Este factor interactúa con la concentración de extracto de levadura.

Adicionalmente se tiene que la concentración de inductor agregada al medio de cultivo tiene un efecto negativo sobre la productividad, atribuido a la carga metabólica que genera en las bacterias, la cual se encuentra fuertemente ligada al colapso de la maquinaria transcripcional, traduccional y secretora, es decir, la maquinaria asociada la síntesis de proteínas periplasmáticas y de membrana. Por la misma razón, la alta concentración de inductor es nociva para el porcentaje de proteína heteróloga retenida en el periplasma de las bacterias, ya que la integridad de la membrana externa de las células se encuentra disminuida.

También es posible indicar que la alta concentración de fuentes de carbono, aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas, tales como extracto de levadura y triptona, menguan la productividad y rendimiento de cutinasa en ambas variantes. Si se adiciona glicerol, a la alta concentración de los compuestos anteriormente nombrados, la densidad final alcanzada por el cultivo incrementa, pero la producción de la proteína recombinante baja considerablemente, por lo tanto, la alta concentración de nutrientes tiene un efecto nocivo sobre la producción de la proteína recombinante, lo cual no era un efecto esperado.

Gracias a los antecedentes anteriores la optimización de los modelos estadísticos lineales, obtenidos mediante el análisis de los resultados del diseño experimental, permitieron determinar las condiciones que optimizan la productividad y rendimiento de la proteína recombinante Cutinasa-(WP)2.

El comportamiento errático de la variante Cutinasa-Y(3), no permitió establecer las condiciones óptimas para la Productividad y Rendimiento Total de la proteína recombinante, ya que los modelos matemáticos no ajustaron apropiadamente los resultados obtenidos mediante la experimentación, perdiendo solidez en el resultado de la optimización. Se propone que las problemáticas del análisis de esta variante son producto de la procedencia de la cepa BL21(DE3) electrocompetente transformada y productora de cutinasa-(Y)3.

La comparación de los modos de operación permitió establecer que el modo de operación batch es óptimo para la producción de cutinasa recombinante al compararlo con el cultivo fed-batch con estrategia de alimentación constante, ya que presenta una mayor Productividad Total Específica y Rendimiento que la del fermentador operando en modo fed-batch.

5 BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Asenjo, Juan A. y Merchuk José C. Bioreactor System Design. 1a Edición. New York-Basel-Hong Kong. Marcel Dekker,1995. 479-509p.

Babaiepour, V., Shojaosadati, S.A., Robotjazi, S.M., Khalilzadeh, R., Maghsoudi, N. Over-production of human interferon γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. Process Biochemistry 42:112-117. 2007.

Becker, S., Theile, S., Heppler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar, H. A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. Federation of European Biochemical Societies. 579(5): 1177-1182. 2005.

Boer, M., Broekhuizen, C. O., Postma, P. W. Regulation of glycerol kinase by the enzyme III^{Gluc} of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. Journal of Bacteriology. 167(1): 393-395.1986

Carvalho, C., Aires-Barros, M. R., Cabral, J.M.S. Cutinase estructura, function and biocatalytic applications. Electronic Journal of Biotechnology. Universidad Católica de Valparaíso. 1(3). 1998.

Carvalho, C., Aires-Barros, M. R., Cabral, J.M.S. Cutinase: From molecular level to bioprocess development. Biotechnology and Bioengineering. 66:17:34. 1999.

Chen, Y., Song, J., Sui, S., Wang, D. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorS overexpressed in *Escherichia coli*. Protein expression and Purification. 32(2): 221-231. 2003.

Choi, J.H., Keum, K.C., Lee, S.Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science 61: 876-885. 2006.

Donovan, R.S., Robinson, C.W., Glick, B.R. Optimizing inducer and cultura conditions for expression of foreing proteins under control of lac promoter. Journal os Industrial Microbiology. 16:145-154. 1996.

García Román, Miguel. Hidrólisis Enzimática de Triglicéridos en Emulsiones O/W. Aplicación a Formulaciones Detergentes. Tesis Doctor en Ciencias de la Ingeniería. Granada, España. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias. 2005.

-
- Gordon, E., Horsefield, R., Swars, H., De Pont, J., Neutze, R., Snijder, A. Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 62:1-8. 2008.
- Grossman , T, Kawasaki, E.S., Punreaddy, S.R, Osburne, M.S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209:95-103. 1998.
- Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E., Galán-Wong L.J.,y Viajen-Salvadó J.M. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. En VII Simposium Internacional de Nutricion Acuícola. 16-19 de Noviembre de 2004. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Hansen, L.H., Knudsen, S., Sorensen, S.J. The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*. 36(6):341-347.1998.
- Jelsch, C., Longui, S., Cambillau, C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 31(3): 320-333. 1998.
- Jensen, P.R., Westerhoff, H.V., Michelsen, O. The use of *lac*-type promoters in control analysis. *European Journal of Biochemistry*. 211: 181-191. 1993.
- Jeong, K.J., Lee, S. Y. Secretory production of human leptin in *Escherichia coli*. Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering. 1999.
- Jevšëvar, S., Palcic, J., Jalen, S., Pavko, A., Influence of the media composition on behavior of pET expression system. *Acta Chimica Slovenica*. 54:360-365. 2007
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A., Stahl, S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35: 91-105.2002.
- Kim, M., Elvin, C., Brownlee, A., Lyons, R. High yield expression of recombinant pro-relisin: Lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification. *Protein Expression and Purification*. 52: 230-236.2007.
- Kurland, C.G., Dong, H.J. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Molecular Microbiology*. 21: 1-4. 1996.
- Larsen, M.W., Bornscheuer, U.T., Hult, K. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression Purification*. 62:90-97. 2008.

Lauwereys, M., de Geus, P., dMeutter, J., Stanssens, P., Matthyssens, G. Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. L. Alberghina, R. D. Schmid, R. Verger, New York, 1991. Vol:16 243-251p.

Lee, S.K., Keasling, J.D. Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expression and Purification*. 61:197-203. 2008.

Longui, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A., Cambillau, C. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *Journal of Molecular Biology* 268:779-799. 1997.

Maldonado, L.M., Balderas, V. E., Medina, E., Barba de la Rosa, A., Flores, J. L., Ordoñez, L.G., De León, A. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: The case of human interferon beta. *Biomolecular Engineering*. 24:217-222. 2007. Boer y col., 1986

Martínez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., Cambillau, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*. 356:615-618.1992.

Martínez-Luaces, V., Guineo-Cobs, G., Velásquez, B. Bifactorial Design Applied to Recombinant Protein Expression. *Journal of Data Science*. 4:247-255. 2006.

Nadkarni, A., Kelley, L., Momany, C. Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 52: 219-229. 2007

Neves-Petersen, M.T., Petersen, E.I., Fojan, P., Noronha, M., Madsen, R. G., Petersen S.B. Engineering the pH-optimum of a triglyceride lipase: from predictions based on electrostatic computations experimental results. *Journal of Biotechnology*.87:225-254. 2001.

Novagen. pET System Manual. 10ª Edición. U.S.-Canadá- Alemania-Reino Unido. 2006.

Novotny, M. J., Frederickson, W.L., Waygood, B. Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme III^{Glc} of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 162(2): 810-816. 1985

Petersen S. B., Jonson, P.H., Fojan, P., Petersen, E. I., Neves-Petersen, M.T., Hansen, S., Ishak, R.J., Hough, E. Protein engineering the surface of enzymes. *Journal of Biotechnology*. 66:11-26. 1998.

Pinsach, J., De Mas, C., López-Santín, J., Streidner, G., Bayer, K. Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 43: 507-512. 2008

Postma, P.W., Lengeler, J. W., Jacobson, G.R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiological Reviews*. 57(3): 543-594. 1993

Ribbeck Neale, Bárbara Johana. Estudio del cultivo en alta densidad de *Escherichia coli*: Optimización de la producción de Bgl II. Memoria de Título Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2001. 68pp.

Robinson Robinson, María del Carmen. Efecto de la Adición de Extremos Polipeptídicos Hidrofóbicos en la Expresión y Purificación por HIC de Cutinasas. Memoria de Título Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2008. 70pp.

Salazar, O., Molitor, J., Lienqueo, M.E., Asenjo, J.A. Overproduction, Purification, and Characterization of b-1,3-Glucanase Type II in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 23: 219-225. 2001

Sehgal, P., Nielsen, S.B., Pedersen, S., Wimmer, R., Otzen, D.E. Modulation of cutinase stability and structure by phospholipid detergents. *Proteins and Proteomics*. 1774(12):1544-1554. 2007.

Shin, C.S, Hong, M.S., Shin, H.C., Lee, J. High-level production of recombinant human IFN- α 2a with co-expression of tRNA^{Arg(AGG/AGA)} in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 6(4): 301-305. 2001.

Shitu, J.O., Woodley, J.M. Induction studies with *Escherichia coli* expressing recombinant interleukin-13 using multi-parameter flow cytometry. *Biotechnology Letters*. 31(4): 577-584. 2009.

Vary, P.S. y Tao, Y.P. Plasmidless Lac strain of *Bacillus megaterium* QM B1551. U.S. 9 Julio 2008. Patent 5030574.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A: SOLUCIONES STOCK Y MEDIOS DE CULTIVO

Soluciones stock

IPTG 0,5 M

Se prepararan 5ml de una solución de IPTG a una concentración de 0,5M en agua Milli-Q estéril. Se esteriliza por filtración con un tamaño de poro de 0,2 μ m (Sartorius, Hannover-Alemania) y se almacena a -20°C en volúmenes de 1ml.

Ampicilina 100mg/ml

Se prepara una solución stock de ampicilina 100mg/ml en agua Milli-Q estéril. Se esteriliza por filtración mediante un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μ m y se almacena a -20°C en volúmenes de 1ml.

Medios de cultivo

Medio de Cultivo Sólido (Placas LB con ampicilina)

Se agrega 1,5 gr de agar a 100ml de medio LB, se esteriliza en autoclave y se deja enfriar a 50°C. Se agrega ampicilina para obtener una concentración final de 100 μ g/ml (100 μ l del stock de ampicilina de 100 mg/ml) y se reparte el contenido en cuatro placas de petri estériles. Se dejan gelificar, se sellan con parafilm (Pechiney, Chicago, IL-USA).Luego se guardan a 4°C.

Medios de Cultivo Líquidos

Los medios de cultivo se preparan según la composición específica de nutrientes de cada experimento según el diseño experimental (*Ver Tabla 6*). El volumen se lleva a 1.000ml con agua Milli-Q y se esteriliza por autoclave. Previa a su utilización se le agrega ampicilina estéril a una concentración final de 100 μ g/ml.

6.2 ANEXO B: CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA ENSAYO DE PROTEÍNS TOTALES.

Gráfico 10: Curva de calibración 7 Abril 2009.

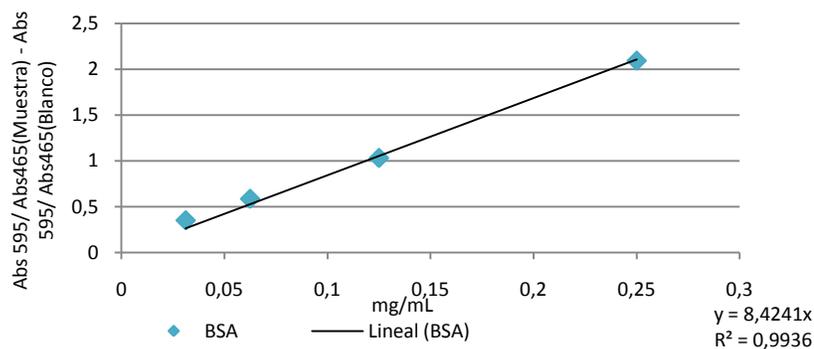


Gráfico 11: Curva de calibración 11 Mayo 2009.

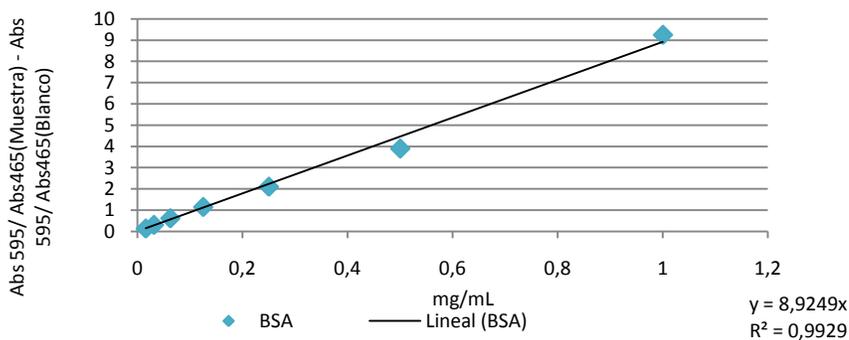


Gráfico 12: Curva de calibración 25 Agosto 2009.

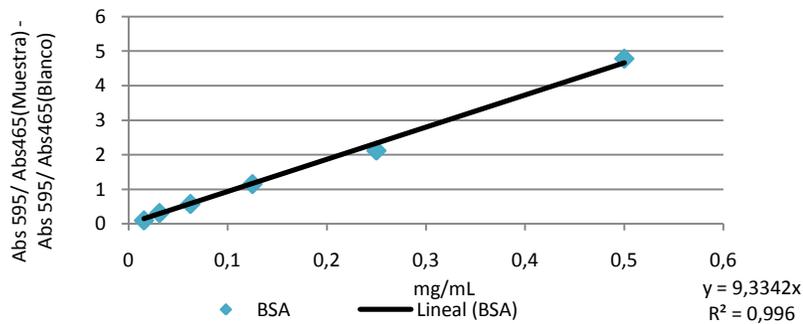
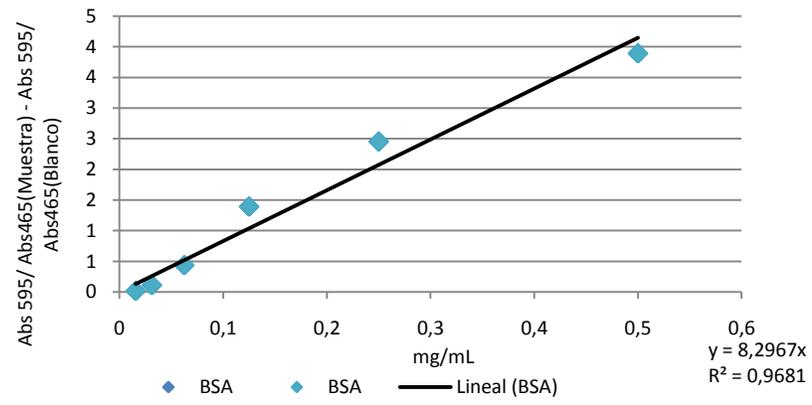


Gráfico 13: Curva de calibración Diciembre 2009.



6.3 ANEXO C: GELES SDS PAGE.

6.3.1 Tratamientos mayor productividad. Cutinasa-(WP)2

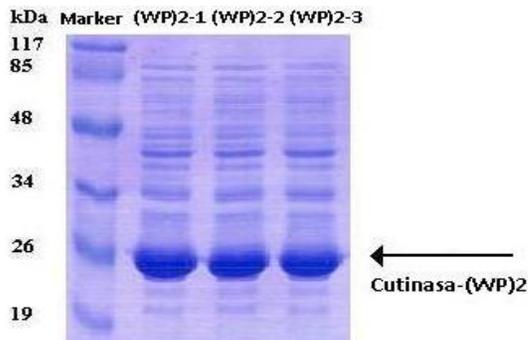


Ilustración 7: Gel poliacrilamida. Tratamiento 12. Cutinasa-(WP)2 . Marker, marcador de peso molecular. (WP)2-1, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(WP)2- réplica 1. (WP)2-2, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(WP)2- réplica 2. (WP)2-3, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(WP)2- réplica 3.

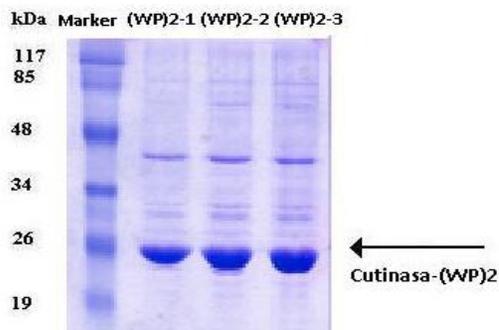


Ilustración 8: Gel poliacrilamida. Tratamiento 7. Cutinasa-(WP)2

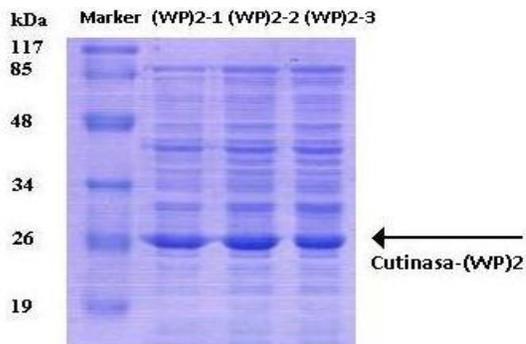


Ilustración 9: Gel poliacrilamida. Tratamiento 7. Cutinasa-(WP)2

6.3.2 Tratamientos menor productividad. Cutinasa-(WP)2

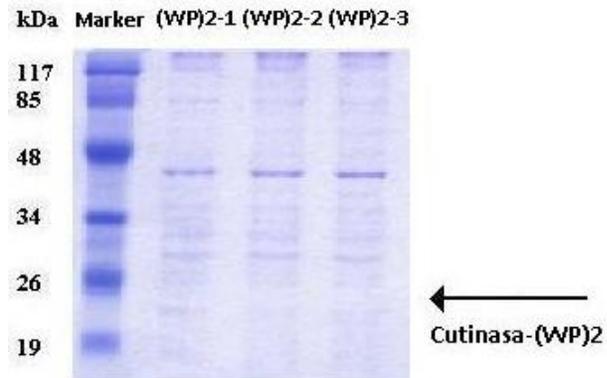


Ilustración 10: Gel poliacrilamida. Tratamiento 9. Cutinasa-(WP)2

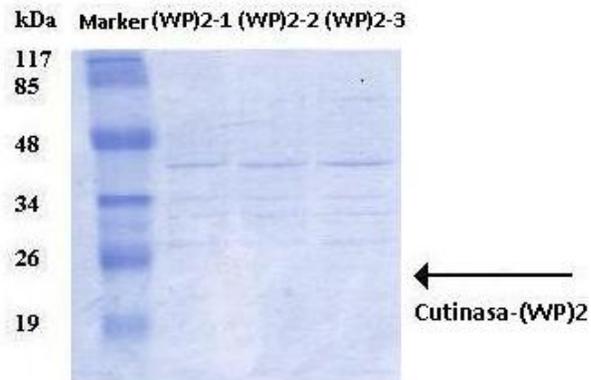


Ilustración 11: Gel poliacrilamida. Tratamiento 10. Cutinasa-(WP)2

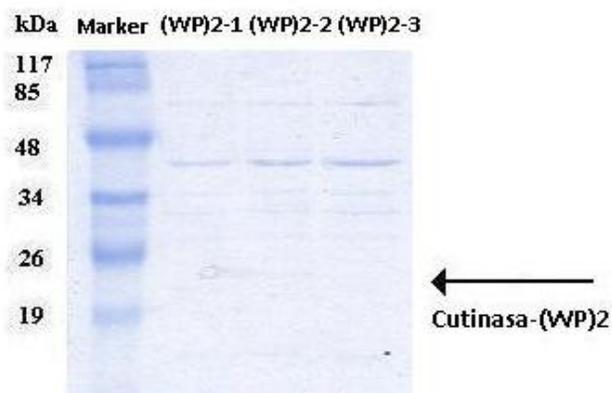


Ilustración 12: Gel poliacrilamida. Tratamiento 16. Cutinasa-(WP)2

6.3.3 Tratamientos mayor productividad. Cutinasa-(Y)3

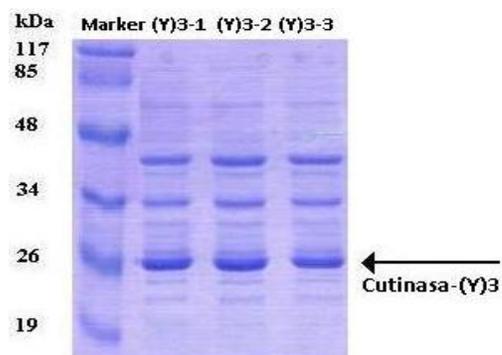


Ilustración 13: Gel poliacrilamida. Tratamiento 12. Cutinasa-(Y)3. Marker, marcador de peso molecular. (Y)3-1, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(Y)3- réplica 1. (Y)3-2, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(Y)3- réplica 2. (Y)3-3, fracción periplasmática del cultivo de las variante Cutinasa-(Y)3- réplica 3.

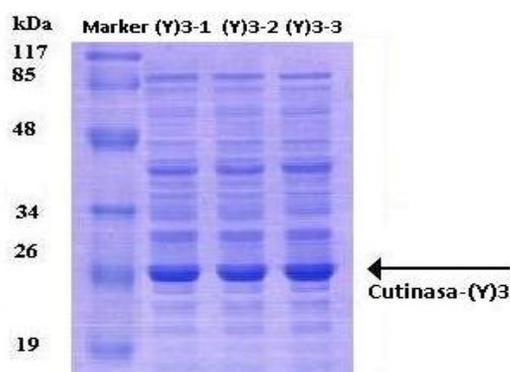


Ilustración 14: Gel poliacrilamida. Tratamiento 7. Cutinasa-(Y)3

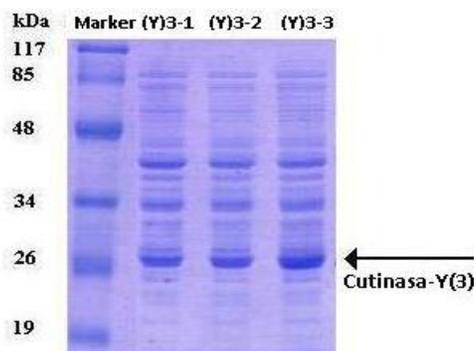


Ilustración 15: Gel poliacrilamida. Tratamiento 14. Cutinasa-(Y)3

6.3.4 Tratamientos menor productividad. Cutinasa-(Y)3

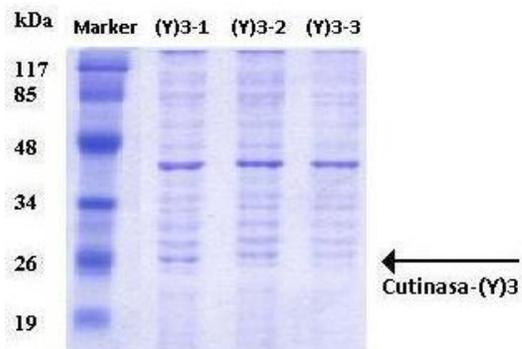


Ilustración 16: Gel poliacrilamida. Tratamiento 9. Cutinasa-(Y)3

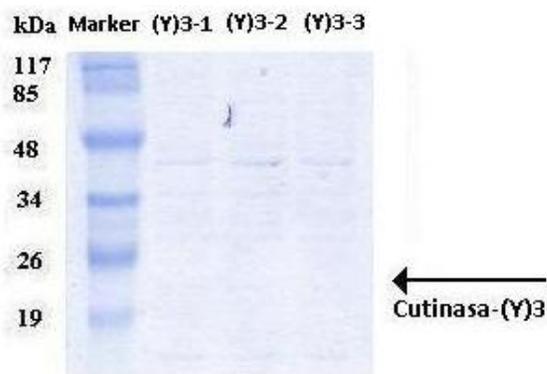


Ilustración 17: Gel poliacrilamida. Tratamiento 16. Cutinasa-(Y)3

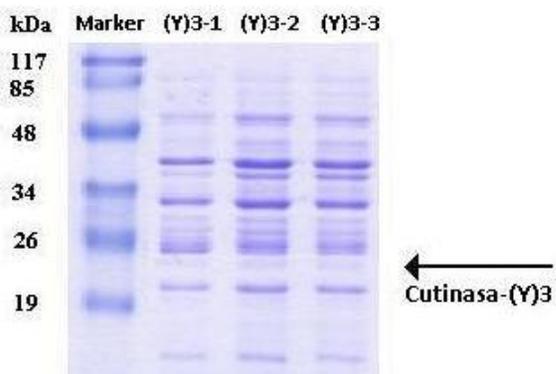


Ilustración 18: Gel poliacrilamida. Tratamiento 13. Cutinasa-(Y)3

6.4 ANEXO D: MEMORIA DE CÁLCULO

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la malla de tratamientos presentada en la *Tabla 6*, en forma aleatoria.

Los datos recopilados en cada experimento corresponden a:

- Duración de la fermentación (periodo pre y post-inducción medido en horas)
- Densidad óptica final del cultivo (U Abs₆₀₀)
- Volumen de fracciones “Extracelular”, “Lavado Buffer TES” y “Periplasma” (ml)
- Unidades de actividad contenida en cada fracción (U/ml)
- Proteínas totales contenidas en cada fracción (mg/ml)

Mediante estos datos fue posible calcular:

Unidades de actividad totales en cada fracción

$$\begin{aligned} \text{Unidades totales de actividad en cada fracción}[U] = \\ \text{Unidades de actividad en la fracción}[U/ml] * \text{Volumen de la fracción}[ml] \end{aligned}$$

Unidades totales de actividad

$$\begin{aligned} \text{Unidades totales de actividad } [U] = \\ \text{Unidades de actividad EXT}[U] + \text{Unidades de actividad TES}[U] + \text{Unidades de actividad PERI}[U] \end{aligned}$$

Proteínas totales en cada fracción

$$\begin{aligned} \text{Proteínas totales } [mg] = \\ \text{Proteínas en la fracción } [mg/ml] * \text{Volumen de la fracción}[ml] \end{aligned}$$

Proteínas Totales

$$\begin{aligned} \text{Proteínas totales [mg]} &= \\ \text{Proteínas EXT[mg]} + \text{Proteínas TES[mg]} + \text{Proteínas PERI[mg]} \end{aligned}$$

Porcentaje de unidades de actividad contenidas en el periplasma

$$\text{Porcentaje en Periplasma \%} = \frac{\text{Unidades de Actividad PERI[U]}}{\text{Unidades Totales de Actividad[U]}} * 100$$

Productividad total

$$\text{Productividad Total [U/h]} = \frac{\text{Unidades de Actividad Total}}{\text{Horas de fermentación}}$$

Productividad Periplasmática

$$\text{Productividad Total} = \frac{\text{Unidades de Actividad PERI}}{\text{Horas de fermentación}}$$

Rendimiento Total

$$\text{Rendimiento[U/mg Peso Seco]} = \frac{\text{Unidades de Actividad Totales}}{\text{mg de Peso Seco Bacterias}}$$

Rendimiento Periplasma

$$\text{Rendimiento[U/mg Peso Seco]} = \frac{\text{Unidades de Actividad PERI}}{\text{mg de Peso Seco Bacterias}}$$

6.5 ANEXO E: RESULTADOS DETALLADOS DE CADA EXPERIMENTO.

Caso Base

Caso Base Martes 14 Julio	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_ Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	Mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,52	302,21	87,92	3,85	169,73	1,52	344,35	6,33	602,00	11,69	51,49	57,20	24,57	14,06	1,99	1,14
Cutinasa-(WP)2_2	1,70	360,33	99,55	4,61	133,82	1,63	279,07	6,72	512,45	12,95	39,56	54,46	20,92	11,39	1,42	0,77
Cutinasa-(WP)2_3	1,59	301,05	69,56	3,76	97,92	1,05	439,01	6,52	606,49	11,33	53,52	72,38	24,75	17,92	2,01	1,46
Promedio (WP)2	1,60	321,20	85,68	4,07	133,82	1,40	354,14	6,52	573,65	11,99	48,19	61,35	23,41	14,45	1,81	1,12
Desviación Estándar	0,09	33,89	15,12	0,46	35,90	0,30	80,42	0,20	53,05	0,85	7,54	9,66	2,17	3,28	0,34	0,34
Cutinasa-(Y)3_1	1,55	274,31	77,93	3,76	73,44	1,22	130,56	3,77	281,93	8,76	32,20	46,31	11,51	5,33	1,03	0,48
Cutinasa-(Y)3_2	1,56	273,93	67,12	3,42	48,47	0,73	141,98	3,68	257,57	7,84	32,86	55,12	10,51	5,80	0,94	0,52
Cutinasa-(Y)3_3	1,61	277,03	69,36	3,60	65,28	0,90	143,62	4,16	278,26	8,67	32,10	51,61	11,36	5,86	1,00	0,52
Promedio (Y)3	1,57	275,09	71,47	3,59	62,40	0,95	138,72	3,87	272,58	8,42	32,39	51,02	11,13	5,66	0,99	0,50
Desviación Estándar	0,03	1,69	5,71	0,17	12,73	0,25	7,11	0,26	13,13	0,51	0,41	4,44	0,54	0,29	0,05	0,02

Tratamiento 1

Tratamiento 1 Jueves 9 Julio	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasas-(WP)2_1	0,95	328,17	59,98	4,08	46,19	0,34	633,22	4,27	739,38	8,69	85,09	85,64	33,11	28,35	2,25	1,93
Cutinasas-(WP)2_2	0,92	318,48	59,77	4,10	34,30	0,26	532,03	3,89	626,11	8,25	75,87	84,97	28,03	23,82	1,97	1,67
Cutinasas-(WP)2_3	0,79	339,41	56,92	4,17	53,53	0,39	522,24	4,31	632,69	8,87	71,33	82,54	28,33	23,38	1,86	1,54
Promedio (WP)2	0,88	328,69	58,89	4,12	44,67	0,33	562,50	4,16	666,06	8,60	77,43	84,39	29,82	25,19	2,03	1,71
Desviación Estándar	0,88	10,47	1,71	0,05	9,70	0,07	61,44	0,23	63,58	0,32	7,01	1,63	2,85	2,75	0,20	0,20
Cutinasas-(Y)3_1	0,78	278,96	22,64	5,02	15,99	0,53	218,69	5,24	257,33	10,79	23,85	84,98	10,65	9,05	0,92	0,78
Cutinasas-(Y)3_2	0,80	290,59	19,18	7,46	12,73	0,54	285,60	5,28	317,51	13,28	23,92	89,95	13,14	11,82	1,09	0,98
Cutinasas-(Y)3_3	0,78	372,34	41,21	7,00	16,81	0,45	274,18	5,47	332,19	12,92	25,71	82,54	13,75	11,35	0,89	0,74
Promedio (Y)3	0,78	313,96	27,68	6,49	15,18	0,50	259,49	5,33	302,34	12,33	24,49	85,82	12,51	10,74	0,97	0,83
Desviación Estándar	0,01	50,89	11,85	1,29	2,16	0,05	35,79	0,12	39,67	1,35	1,05	3,78	1,64	1,48	0,11	0,13

Tratamiento 2

Tratamiento 2 Martes 7 Abril	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasas-(WP)2_1	0,81	332,04	368,83	7,90	71,73	1,44	272,54	4,04	713,10	13,38	53,29	38,22	32,41	12,39	2,15	0,82
Cutinasas-(WP)2_2	0,93	359,94	340,27	8,32	114,32	1,84	212,16	2,97	666,75	13,12	50,81	31,82	30,31	9,64	1,85	0,59
Cutinasas-(WP)2_3	0,88	328,17	297,84	6,92	85,52	1,13	292,13	3,71	675,48	11,77	57,40	43,25	30,70	13,28	2,06	0,89
Promedio (WP)2	0,87	340,05	335,65	7,71	90,52	1,47	258,94	3,57	685,11	12,76	53,84	37,76	31,14	11,77	2,02	0,77
Desviación Estándar	0,06	17,33	35,72	0,72	21,73	0,35	41,68	0,55	24,63	0,87	3,33	5,73	1,12	1,89	0,15	0,16
Cutinasas-(Y)3_1	0,80	368,85	141,98	5,26	67,65	1,10	225,22	3,87	434,85	10,23	42,50	51,79	19,77	10,24	1,18	0,61
Cutinasas-(Y)3_2	1,18	383,19	158,71	5,45	88,05	1,29	259,49	4,55	506,25	11,29	44,85	51,26	23,01	11,79	1,32	0,68
Cutinasas-(Y)3_3	0,77	375,05	150,55	5,20	99,96	1,28	189,31	2,89	439,82	9,37	46,92	43,04	19,99	8,61	1,17	0,50
Promedio (Y)3	0,92	375,70	150,42	5,31	85,22	1,22	224,67	3,77	460,31	10,30	44,76	48,70	20,92	10,21	1,22	0,60
Desviación Estándar	0,23	7,19	8,36	0,13	16,34	0,10	35,09	0,83	39,86	0,96	2,21	4,90	1,81	1,60	0,08	0,09

Tratamiento 3

Tratamiento 3 Miércoles 2 Septiembre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,45	358,00	550,80	10,90	84,86	3,12	257,86	7,18	893,52	21,20	42,15	28,86	35,04	10,11	2,50	0,72
Cutinasa-(WP)2_2	1,53	346,38	718,08	11,03	78,34	3,10	297,02	7,04	1093,44	21,18	51,62	27,16	42,88	11,65	3,16	0,86
Cutinasa-(WP)2_3	1,51	364,20	642,60	12,61	71,32	3,21	261,12	7,19	975,04	23,01	42,38	26,78	38,24	10,24	2,68	0,72
Promedio (WP)2	1,49	356,20	637,16	11,52	78,17	3,14	272,00	7,14	987,33	21,80	45,38	27,60	38,72	10,67	2,78	0,76
Desviación Estándar	0,04	9,05	83,77	0,96	6,77	0,06	21,73	0,08	100,53	1,05	5,40	1,11	3,94	0,85	0,34	0,08
Cutinasa-(Y)3_1	1,47	370,01	510,00	14,10	46,19	2,11	202,37	6,05	758,55	22,26	34,08	26,68	29,75	7,94	2,05	0,55
Cutinasa-(Y)3_2	1,45	377,38	440,64	11,16	34,76	1,91	231,74	6,71	707,15	19,78	35,74	32,77	27,73	9,09	1,87	0,61
Cutinasa-(Y)3_3	1,47	393,26	473,28	12,27	33,29	2,19	218,69	6,26	725,26	20,72	35,01	30,15	28,44	8,58	1,84	0,56
Promedio (Y)3	1,46	380,22	474,64	12,51	38,08	2,07	217,60	6,34	730,32	20,92	34,94	29,87	28,64	8,53	1,92	0,57
Desviación Estándar	0,01	11,88	34,70	1,49	7,06	0,14	14,72	0,34	26,07	1,25	0,83	3,06	1,02	0,58	0,11	0,04

Tratamiento 4

Tratamiento 4 Jueves 8 Octubre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,43	147,23	161,16	5,50	55,57	1,49	317,02	4,64	533,75	11,63	45,88	59,39	22,24	13,21	3,63	2,15
Cutinasa-(WP)2_2	1,45	149,56	159,12	5,12	46,51	1,57	250,92	4,11	456,55	10,80	42,26	54,96	19,02	10,46	3,05	1,68
Cutinasa-(WP)2_3	1,44	144,91	138,72	5,35	48,96	1,36	341,50	4,04	529,18	10,75	49,23	64,53	22,05	14,23	3,65	2,36
Promedio (WP)2	1,44	147,23	153,00	5,32	50,35	1,48	303,14	4,27	506,49	11,06	45,79	59,63	21,10	12,63	3,44	2,06
Desviación Estándar	0,01	2,32	12,41	0,19	4,69	0,11	46,85	0,33	43,31	0,50	3,48	4,79	1,80	1,95	0,34	0,35
Cutinasa-(Y)3_1	1,40	280,51	61,40	4,97	10,21	0,96	86,90	2,23	158,52	8,16	19,43	54,82	6,60	3,62	0,57	0,31
Cutinasa-(Y)3_2	1,43	272,76	51,41	5,34	9,58	0,85	74,17	2,03	135,17	8,23	16,43	54,88	5,63	3,09	0,50	0,27
Cutinasa-(Y)3_3	1,43	268,89	51,20	4,78	11,40	0,94	79,56	2,12	142,16	7,84	18,14	55,97	5,92	3,32	0,53	0,30
Promedio (Y)3	1,42	274,06	54,67	5,03	10,40	0,92	80,21	2,13	145,28	8,07	18,00	55,22	6,05	3,34	0,53	0,29
Desviación Estándar	0,02	5,92	5,83	0,29	0,92	0,06	6,39	0,10	11,98	0,21	1,50	0,64	0,50	0,27	0,03	0,02

Tratamiento 5

Tratamiento 5 Martes 23 Junio	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]														
Cutinasa-(WP)2_1	0,81	442,86	31,42	3,28	17,75	0,32	269,28	2,51	318,44	6,11	52,13	84,56	12,74	10,77	0,72	0,61
Cutinasa-(WP)2_2	0,81	507,95	28,76	2,90	44,88	0,38	155,04	2,49	228,68	5,77	39,63	67,80	9,15	6,20	0,45	0,31
Cutinasa-(WP)2_3	0,71	382,41	15,10	2,48	40,39	0,37	197,88	2,78	253,37	5,62	45,05	78,10	10,13	7,92	0,66	0,52
Promedio (WP)2	0,78	444,41	25,09	2,89	34,34	0,36	207,40	2,59	266,83	5,83	45,61	76,82	10,67	8,30	0,61	0,48
Desviación Estándar	0,06	62,78	8,76	0,40	14,54	0,03	57,71	0,16	46,37	0,25	6,27	8,46	1,85	2,31	0,14	0,16
Cutinasa-(Y)3_1	0,69	366,92	170,34	3,66	20,07	0,26	104,45	2,24	294,86	6,16	47,89	35,42	11,79	4,18	0,80	0,28
Cutinasa-(Y)3_2	0,63	374,66	116,69	3,21	13,55	0,20	79,97	1,99	210,20	5,39	38,97	38,04	8,41	3,20	0,56	0,21
Cutinasa-(Y)3_3	0,62	348,32	48,35	3,06	14,36	0,21	60,38	2,05	123,09	5,32	23,13	49,06	4,92	2,42	0,35	0,17
Promedio (Y)3	0,65	363,30	111,79	3,31	15,99	0,22	81,60	2,09	209,39	5,62	36,66	40,84	8,38	3,26	0,57	0,22
Desviación Estándar	0,04	13,54	61,14	0,31	3,56	0,03	22,08	0,13	85,89	0,46	12,54	7,23	3,44	0,88	0,23	0,06

Tratamiento 6

Tratamiento 6 Jueves 27 Agosto	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]														
Cutinasa-(WP)2_1	1,02	244,09	381,48	5,55	55,94	1,33	89,84	2,48	527,26	9,35	56,37	17,04	23,26	3,96	2,16	0,37
Cutinasa-(WP)2_2	1,04	254,94	379,44	5,57	64,63	1,60	82,50	2,84	526,56	10,00	52,67	15,67	23,23	3,64	2,07	0,32
Cutinasa-(WP)2_3	1,02	240,22	340,68	5,35	58,75	1,38	105,88	3,20	505,31	9,93	50,91	20,95	22,29	4,67	2,10	0,44
Promedio (WP)2	1,03	246,42	367,20	5,49	59,77	1,43	92,74	2,84	519,71	9,76	53,31	17,89	22,93	4,09	2,11	0,38
Desviación Estándar	0,01	7,63	22,99	0,12	4,43	0,14	11,96	0,36	12,48	0,35	2,79	2,74	0,55	0,53	0,05	0,06
Cutinasa-(Y)3_1	1,03	279,35	471,24	6,73	53,73	1,77	87,64	2,76	612,61	11,26	54,38	14,31	27,02	3,87	2,19	0,31
Cutinasa-(Y)3_2	1,05	286,71	454,92	6,14	56,67	1,88	99,27	2,52	610,86	10,55	57,93	16,25	26,95	4,38	2,13	0,35
Cutinasa-(Y)3_3	1,16	288,65	403,92	6,33	55,69	2,06	97,19	2,90	556,80	11,29	49,32	17,45	24,56	4,29	1,93	0,34
Promedio (Y)3	1,08	284,90	443,36	6,40	55,37	1,91	94,70	2,73	593,42	11,03	53,88	16,00	26,18	4,18	2,08	0,33
Desviación Estándar	0,07	4,91	35,12	0,30	1,50	0,15	6,20	0,19	31,73	0,42	4,33	1,59	1,40	0,27	0,14	0,02

Tratamiento 7

Tratamiento 7 Martes 25 Agosto	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,56	332,04	60,59	5,78	30,68	0,41	435,74	7,10	527,01	13,29	39,67	82,68	20,27	16,76	1,59	1,31
Cutinasa-(WP)2_2	1,45	324,30	59,57	5,40	33,46	0,39	422,69	7,69	515,71	13,49	38,24	81,96	19,84	16,26	1,59	1,30
Cutinasa-(WP)2_3	1,36	329,72	46,92	5,52	16,65	0,30	458,59	6,75	522,16	12,58	41,51	87,83	20,08	17,64	1,58	1,39
Promedio (WP)2	1,46	328,69	55,69	5,57	26,93	0,37	439,01	7,18	521,63	13,12	39,81	84,16	20,06	16,88	1,59	1,34
Desviación Estándar	0,10	3,98	7,61	0,19	9,01	0,06	18,17	0,48	5,67	0,48	1,64	3,20	0,22	0,70	0,00	0,05
Cutinasa-(Y)3_1	1,65	308,80	65,69	4,36	28,64	0,62	246,02	4,98	340,35	9,96	34,18	72,28	13,09	9,46	1,10	0,80
Cutinasa-(Y)3_2	1,59	306,47	78,54	4,75	42,23	0,77	277,85	5,00	398,62	10,52	37,88	69,70	15,33	10,69	1,30	0,91
Cutinasa-(Y)3_3	1,59	345,22	62,83	4,78	38,19	0,56	343,94	5,30	444,96	10,64	41,81	77,30	17,11	13,23	1,29	1,00
Promedio (Y)3	1,61	320,16	69,02	4,63	36,35	0,65	289,27	5,09	394,64	10,37	37,96	73,09	15,18	11,13	1,23	0,90
Desviación Estándar	0,03	21,73	8,37	0,24	6,98	0,11	49,95	0,17	52,42	0,37	3,82	3,86	2,02	1,92	0,11	0,10

Tratamiento 8

Tratamiento 8 Martes 14 Abril	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,47	253,78	220,93	28,25	41,74	0,66	296,21	1,55	558,88	30,45	18,35	53,00	19,27	10,21	2,20	1,17
Cutinasa-(WP)2_2	1,41	242,54	168,10	24,29	50,80	0,72	314,57	1,45	533,46	26,45	20,17	58,97	18,40	10,85	2,20	1,30
Cutinasa-(WP)2_3	1,49	252,23	190,13	24,87	66,71	0,84	567,94	2,11	824,77	27,83	29,64	68,86	28,44	19,58	3,27	2,25
Promedio (WP)2	1,46	249,52	193,05	25,80	53,08	0,74	392,90	1,70	639,04	28,24	22,72	60,28	22,04	13,55	2,56	1,57
Desviación Estándar	0,04	6,09	26,54	2,14	12,64	0,10	151,86	0,36	161,35	2,03	6,06	8,01	5,56	5,24	0,62	0,59
Cutinasa-(Y)3_1	1,58	286,33	165,04	25,06	30,72	0,54	71,97	1,08	267,73	26,68	10,03	26,88	9,23	2,48	0,94	0,25
Cutinasa-(Y)3_2	1,53	278,58	181,15	22,83	39,41	0,72	64,02	0,88	284,58	24,42	11,65	22,49	9,81	2,21	1,02	0,23
Cutinasa-(Y)3_3	1,55	278,19	173,81	25,20	36,35	0,63	86,17	1,44	296,33	27,27	10,87	29,08	10,22	2,97	1,07	0,31
Promedio (Y)3	1,55	281,03	173,33	24,36	35,50	0,63	74,05	1,13	282,88	26,13	10,85	26,15	9,75	2,55	1,01	0,26
Desviación Estándar	0,03	4,59	8,07	1,33	4,41	0,09	11,22	0,28	14,38	1,50	0,81	3,35	0,50	0,39	0,07	0,04

Tratamiento 9

Tratamiento 9 Martes 16 Junio	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	1,16	450,99	9,38	6,58	3,04	0,40	12,04	2,07	24,46	9,05	2,70	49,21	1,06	0,52	0,05	0,03
Cutinasa-(WP)2_2	0,85	470,36	12,44	6,79	2,18	0,52	12,14	2,23	26,76	9,54	2,81	45,35	1,16	0,53	0,06	0,03
Cutinasa-(WP)2_3	0,62	440,14	11,83	6,72	2,08	0,36	8,71	2,36	22,62	9,45	2,40	38,50	0,98	0,38	0,05	0,02
Promedio (WP)2	0,88	453,83	11,22	6,70	2,43	0,43	10,96	2,22	24,62	9,35	2,63	44,35	1,07	0,48	0,05	0,02
Desviación Estándar	0,27	15,31	1,62	0,11	0,53	0,08	1,95	0,15	2,08	0,26	0,21	5,42	0,09	0,08	0,00	0,00
Cutinasa-(Y)3_1	0,80	404,11	14,48	9,03	7,57	0,77	39,58	3,58	61,63	13,38	4,61	64,22	2,68	1,72	0,15	0,10
Cutinasa-(Y)3_2	0,80	414,57	9,59	8,54	9,14	0,60	35,90	4,19	54,63	13,33	4,10	65,72	2,38	1,56	0,13	0,09
Cutinasa-(Y)3_3	0,80	373,50	10,40	7,35	4,08	0,52	22,24	3,37	36,72	11,23	3,27	60,56	1,60	0,97	0,10	0,06
Promedio (Y)3	0,80	397,39	11,49	8,31	6,93	0,63	32,57	3,71	50,99	12,65	3,99	63,50	2,22	1,42	0,13	0,08
Desviación Estándar	0,00	21,34	2,62	0,86	2,59	0,13	9,14	0,43	12,85	1,22	0,68	2,66	0,56	0,40	0,03	0,02

Tratamiento 10

Tratamiento 10 Miércoles 21 Octubre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasa-(WP)2_1	0,80	475,01	29,38	11,52	3,79	0,57	2,00	2,45	35,17	14,55	2,42	5,68	1,58	0,09	0,07	0,00
Cutinasa-(WP)2_2	0,80	459,90	27,54	10,24	2,84	0,58	3,22	2,36	33,60	13,17	2,55	9,59	1,51	0,14	0,07	0,01
Cutinasa-(WP)2_3	0,83	469,59	29,17	12,10	3,06	0,55	3,28	2,73	35,52	15,37	2,31	9,25	1,60	0,15	0,08	0,01
Promedio (WP)2	0,81	468,17	28,70	11,28	3,23	0,57	2,84	2,51	34,76	14,37	2,43	8,18	1,56	0,13	0,07	0,01
Desviación Estándar	0,02	7,65	1,01	0,95	0,50	0,02	0,72	0,19	1,02	1,11	0,12	2,16	0,05	0,03	0,00	0,00
Cutinasa-(Y)3_1	0,71	512,98	167,69	13,65	35,09	2,79	148,92	6,27	351,70	22,71	15,49	42,34	15,46	6,69	0,69	0,29
Cutinasa-(Y)3_2	0,77	528,87	210,12	12,87	43,25	2,35	152,39	6,23	405,76	21,45	18,91	37,56	17,84	6,85	0,77	0,29
Cutinasa-(Y)3_3	0,77	513,76	234,60	13,67	43,86	2,44	147,70	6,25	426,16	22,36	19,06	34,66	18,73	6,64	0,83	0,29
Promedio (Y)3	0,75	518,54	204,14	13,40	40,73	2,53	149,67	6,25	394,54	22,18	17,82	38,19	17,34	6,73	0,76	0,29
Desviación Estándar	0,03	8,96	33,85	0,46	4,90	0,23	2,43	0,02	38,48	0,65	2,02	3,88	1,69	0,11	0,07	0,00

Tratamiento 11

Tratamiento 11 14 Octubre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante Réplica	Abs 600	[mg]														
Cutinasa-(WP)2_1	1,58	440,14	113,83	10,55	102,20	1,99	940,44	7,64	1156,48	20,18	57,30	81,32	44,91	36,52	2,63	2,14
Cutinasa-(WP)2_2	1,60	446,73	102,20	10,76	108,53	2,40	1160,76	8,10	1371,49	21,26	64,51	84,63	53,26	45,08	3,07	2,60
Cutinasa-(WP)2_3	1,48	476,95	80,58	11,54	87,72	2,42	714,00	7,81	882,30	21,77	40,52	80,92	34,26	27,73	1,85	1,50
Promedio (WP)2	1,55	454,61	98,87	10,95	99,48	2,27	938,40	7,85	1136,76	21,07	54,11	82,29	44,15	36,44	2,52	2,08
Desviación Estándar	0,06	19,63	16,87	0,52	10,67	0,24	223,39	0,23	245,19	0,81	12,31	2,04	9,52	8,68	0,62	0,55
Cutinasa-(Y)3_1	1,46	438,98	34,68	11,23	29,38	1,39	13,06	3,91	77,11	16,53	4,67	16,93	2,99	0,51	0,18	0,03
Cutinasa-(Y)3_2	1,53	446,73	36,31	10,42	38,35	1,77	20,81	5,94	95,47	18,13	5,27	21,79	3,71	0,81	0,21	0,05
Cutinasa-(Y)3_3	1,53	456,03	36,31	10,71	34,68	1,49	19,18	5,05	90,17	17,25	5,23	21,27	3,50	0,74	0,20	0,04
Promedio (Y)3	1,51	447,25	35,77	10,79	34,14	1,55	17,68	4,97	87,58	17,30	5,05	20,00	3,40	0,69	0,20	0,04
Desviación Estándar	0,04	8,54	0,94	0,41	4,51	0,20	4,09	1,02	9,45	0,80	0,34	2,67	0,37	0,16	0,02	0,01

Tratamiento 12

Tratamiento 12 22 Septiembre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante Réplica	Abs 600	[mg]														
Cutinasa-(WP)2_1	1,48	400,62	348,84	10,44	281,52	3,67	1285,20	8,50	1915,56	22,61	84,71	67,09	86,42	57,98	4,78	3,21
Cutinasa-(WP)2_2	1,42	396,75	434,52	11,74	312,12	3,43	1081,20	8,85	1827,84	24,02	76,10	59,15	82,46	48,78	4,61	2,73
Cutinasa-(WP)2_3	1,48	390,55	408,00	11,62	238,68	3,93	1387,20	9,27	2033,88	24,83	81,92	68,20	91,75	62,58	5,21	3,55
Promedio (WP)2	1,46	395,97	397,12	11,27	277,44	3,68	1251,20	8,87	1925,76	23,82	80,91	64,82	86,88	56,45	4,87	3,16
Desviación Estándar	0,04	5,08	43,86	0,72	36,89	0,25	155,81	0,39	103,40	1,12	4,39	4,94	4,66	7,03	0,31	0,42
Cutinasa-(Y)3_1	1,43	459,90	52,22	9,93	39,17	0,21	255,00	6,20	346,39	16,34	21,20	73,62	15,63	11,50	0,75	0,55
Cutinasa-(Y)3_2	1,41	458,35	53,45	8,76	45,29	1,20	342,72	6,90	441,46	16,86	26,18	77,63	19,92	15,46	0,96	0,75
Cutinasa-(Y)3_3	1,40	471,91	50,18	8,92	43,25	1,20	303,96	6,12	397,39	16,24	24,46	76,49	17,93	13,71	0,84	0,64
Promedio (Y)3	1,41	463,39	51,95	9,21	42,57	0,87	300,56	6,41	395,08	16,48	23,95	75,91	17,82	13,56	0,85	0,65
Desviación Estándar	0,01	7,42	1,65	0,63	3,12	0,57	43,96	0,43	47,57	0,33	2,53	2,07	2,15	1,98	0,11	0,10

Tratamiento 13

Tratamiento 13 Martes 28 Abril	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento			
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma		
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]																
Cutinasa-(WP)2_1	0,82	507,56	36,92	6,10	46,92	0,44	146,88	3,13	230,72	9,67	23,87	63,66	9,89	6,29	0,45	0,29		
Cutinasa-(WP)2_2	0,80	465,33	47,33	6,93	42,02	0,41	110,16	2,38	199,51	9,72	20,52	55,21	8,55	4,72	0,43	0,24		
Cutinasa-(WP)2_3	0,80	478,11	33,86	6,21	66,10	0,56	130,56	3,16	230,52	9,94	23,19	56,64	9,88	5,60	0,48	0,27		
Promedio (WP)2	0,81	483,67	39,37	6,42	51,68	0,47	129,20	2,89	220,25	9,78	22,53	58,50	9,44	5,54	0,46	0,27		
Desviación Estándar	0,01	21,66	7,06	0,45	12,72	0,08	18,40	0,44	17,96	0,15	1,77	4,52	0,77	0,79	0,03	0,03		
Cutinasa-(Y)3_1	0,79	480,05	17,95	6,26	37,86	0,27	32,64	1,54	88,45	8,07	10,96	36,90	3,79	1,40	0,18	0,07		
Cutinasa-(Y)3_2	0,80	479,28	14,48	6,45	34,27	0,57	24,68	2,78	73,44	9,80	7,49	33,61	3,15	1,06	0,15	0,05		
Cutinasa-(Y)3_3	0,80	485,09	15,91	6,40	42,02	0,56	26,32	2,27	84,25	9,22	9,13	31,23	3,61	1,13	0,17	0,05		
Promedio (Y)3	0,80	481,47	16,12	6,37	38,05	0,47	27,88	2,20	82,05	9,03	9,20	33,92	3,52	1,19	0,17	0,06		
Desviación Estándar	0,00	3,16	1,74	0,10	3,88	0,17	4,20	0,62	7,75	0,88	1,73	2,84	0,33	0,18	0,02	0,01		

Tratamiento 14

Tratamiento 14 9 Septiembre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento			
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Especifica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma		
			U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]																
Cutinasa-(WP)2_1	0,73	462,62	381,48	12,45	178,70	4,01	154,22	8,32	714,41	24,78	28,83	21,59	32,47	7,01	1,54	0,33		
Cutinasa-(WP)2_2	0,76	486,64	379,44	14,11	168,91	2,62	215,42	8,74	763,78	25,47	29,98	28,21	34,72	9,79	1,57	0,44		
Cutinasa-(WP)2_3	0,75	465,33	456,96	13,74	181,15	2,33	215,42	8,50	853,54	24,57	34,74	25,24	38,80	9,79	1,83	0,46		
Promedio (WP)2	0,75	471,53	405,96	13,43	176,26	2,99	195,02	8,52	777,24	24,94	31,18	25,01	35,33	8,86	1,65	0,41		
Desviación Estándar	0,01	13,16	44,18	0,87	6,48	0,90	35,33	0,21	70,53	0,47	3,13	3,31	3,21	1,61	0,16	0,07		
Cutinasa-(Y)3_1	0,81	483,93	230,52	10,61	102,82	1,60	210,53	8,98	543,86	21,19	25,67	38,71	24,72	9,57	1,12	0,44		
Cutinasa-(Y)3_2	0,89	501,75	234,60	10,51	81,03	1,37	252,14	9,79	567,77	21,67	26,20	44,41	25,81	11,46	1,13	0,50		
Cutinasa-(Y)3_3	0,88	503,69	189,72	10,06	67,08	1,26	306,00	9,38	562,80	20,69	27,20	54,37	25,58	13,91	1,12	0,61		
Promedio (Y)3	0,86	496,45	218,28	10,39	83,64	1,41	256,22	9,38	558,14	21,18	26,36	45,83	25,37	11,65	1,12	0,52		
Desviación Estándar	0,04	10,89	24,82	0,29	18,01	0,17	47,87	0,40	12,61	0,49	0,78	7,93	0,57	2,18	0,01	0,09		

Tratamiento 15

Tratamiento 15 15 Septiembre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasas-(WP)2_1	1,50	423,87	926,16	12,34	86,90	4,46	171,36	6,79	1184,42	23,60	50,20	14,47	43,87	6,35	2,79	0,40
Cutinasas-(WP)2_2	1,69	485,86	883,32	13,09	92,00	3,86	163,20	7,18	1138,52	24,13	47,18	14,33	42,17	6,04	2,34	0,34
Cutinasas-(WP)2_3	1,50	524,99	491,64	10,44	45,29	1,04	228,48	5,56	765,41	17,04	44,91	29,85	28,35	8,46	1,46	0,44
Promedio (WP)2	1,56	478,24	767,04	11,96	74,73	3,12	187,68	6,51	1029,45	21,59	47,43	19,55	38,13	6,95	2,20	0,39
Desviación Estándar	0,11	50,99	239,46	1,37	25,63	1,82	35,57	0,85	229,82	3,95	2,65	8,92	8,51	1,32	0,68	0,05
Cutinasas-(Y)3_1	1,43	484,31	714,00	13,94	83,03	3,54	147,90	5,40	944,93	22,89	41,29	15,65	37,55	5,88	1,95	0,31
Cutinasas-(Y)3_2	1,50	506,40	871,08	13,83	76,09	3,18	148,31	4,74	1095,48	21,75	50,36	13,54	43,53	5,89	2,16	0,29
Cutinasas-(Y)3_3	1,50	531,58	750,72	14,48	70,38	3,59	140,96	4,76	962,06	22,83	42,14	14,65	38,23	5,60	1,81	0,27
Promedio (Y)3	1,48	507,43	778,60	14,08	76,50	3,44	145,72	4,97	1000,82	22,49	44,59	14,61	39,77	5,79	1,97	0,29
Desviación Estándar	0,04	23,65	82,17	0,35	6,33	0,22	4,13	0,37	82,42	0,64	5,01	1,06	3,28	0,16	0,18	0,02

Tratamiento 16

Tratamiento 16 28 Septiembre	Inducción	Peso Final	Producción por Fracciones						Producción Total				Productividad		Rendimiento	
			Fracción Caldo Cultivo		Fracción Buffer TES		Fracción Periplasma		Actividad Total	Proteínas Totales	Proteína Específica	Porcentaje Periplasma	Productividad Total	Productividad Periplasma	Rendimiento Total	Rendimiento Periplasma
Variante_Réplica	Abs 600	[mg]	U	mg	U	mg	U	mg	U	mg	U/mg	%	U/h	U/h	[U Totales/ mgPesoSeco]	[U Periplasma/ mgPesoSeco]
Cutinasas-(WP)2_1	1,45	502,91	34,07	8,82	6,29	1,40	35,74	4,15	76,10	14,36	5,30	46,97	3,31	1,55	0,15	0,07
Cutinasas-(WP)2_2	1,42	500,20	32,64	10,93	5,65	1,29	33,54	3,28	71,83	15,50	4,63	46,69	3,12	1,46	0,14	0,07
Cutinasas-(WP)2_3	1,50	486,25	33,86	10,42	9,01	1,55	29,62	6,22	72,49	18,19	3,98	40,86	3,15	1,29	0,15	0,06
Promedio (WP)2	1,46	496,45	33,52	10,06	6,98	1,41	32,97	4,55	73,48	16,02	4,64	44,84	3,19	1,43	0,15	0,07
Desviación Estándar	0,04	8,94	0,77	1,10	1,78	0,13	3,10	1,51	2,30	1,97	0,66	3,45	0,10	0,13	0,00	0,01
Cutinasas-(Y)3_1	1,30	483,54	8,32	10,56	2,30	1,50	13,10	4,08	23,72	16,13	1,47	55,21	1,03	0,57	0,05	0,03
Cutinasas-(Y)3_2	1,28	481,60	9,38	10,35	2,89	1,53	13,42	4,11	25,69	15,98	1,61	52,22	1,12	0,58	0,05	0,03
Cutinasas-(Y)3_3	1,48	503,30	8,16	10,10	3,62	1,58	15,30	4,42	27,08	16,10	1,68	56,49	1,18	0,67	0,05	0,03
Promedio (Y)3	1,35	489,48	8,62	10,33	2,94	1,53	13,94	4,20	25,50	16,07	1,59	54,64	1,11	0,61	0,05	0,03
Desviación Estándar	0,11	12,01	0,66	0,23	0,66	0,04	1,19	0,19	1,69	0,08	0,11	2,19	0,07	0,05	0,00	0,00

6.6 ANEXO F: COMPOSICIÓN DE TRIPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla 42: Aminoácidos

Aminoácidos	Triptona %	Extracto de levadura %
Alanina	2,86	5,36
Arginina	3,03	3,02
Ácido aspártico	6,11	6,69
Cisteína	0,42	0,74
Ácido glutámico	17,05	14,2
Glicina	1,75	3,25
Histidina	2,02	1,2
Isoleucina	4,4	3,23
Leucina	7,11	4,69
Lisina	6,7	5,15
Metionina	2,57	1,05
Fenilalanina	3,71	2,53
Prolina	7,75	2,6
Serina	4,29	2,84
Treonina	3,58	2,95
Triptofano	0,71	1,36
Tirosina	1,42	1,2
Valina	0,5	3,79

Tabla 43: Inorgánicos y otros

Inorgánicos y Otros	Triptona %	Extracto de levadura %
Calcio	0,013	0,013
Cloro	0,186	0,38
Magnesio	0,017	0,075
Fosfato	2,669	3,27
Potasio	0,229	3,195
Sodio	2,631	1,49
Sulfato	0,241	0,091
Azufre	0,74	0,634
Zinc	0,003	0,011
Carbohidratos	7,7	17,5
Nitrógeno	13	10,9

Tabla 44: Vitaminas

Vitaminas	Triptona [ug/g]	Extracto de levadura [ug/g]
Biotina	0,1	3,3
Colina	350	300
Ácido fólico	0,3	1,5
Inositol	1400	1400
Ácido nicotínico	97,8	597,9
PABA	3,7	763
Ácido pantoténico	5,3	273,7
Pirodixina	0,6	43,2
Riboflavina	<0,1	116,5
Tiamina	0,4	529,9
Timidina	93,4	217,5