

**Producció de transglutaminasa de blat de moro (TGZ) en Escherichia coli i
Pichia pastoris: Estudi i millora del procés**

Jordi Gibert Amat

<http://hdl.handle.net/10803/416598>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

Títol	Producció de transglutaminasa de blat de moro (TGZ) en <i>Escherichia coli</i> i <i>Pichia pastoris</i> : Estudi i millora del procés.
Realitzada per	Jordi Gibert Amat
en el Centre	IQS School of Engineering
i en el Departament	d'Enginyeria química
Dirigida per	Dr. Eduard Barberà Moral

Barcelona, Juny 2017

“No vagis on et porten els camins, ves on no n’hi ha cap i deixa-hi un rastre”

Ralph Waldo Emerson

Als meus pares,
pel seu recolzament incondicional al llarg de tot el camí.

Agraïments

Ha sigut necessari recórrer un llarg camí per arribar a poder escriure aquestes paraules. Estic segur que no hagués pogut arribar al final sense l'ajuda de moltíssima gent que m'ha permès superar tots els entrebancs que s'han anat plantejats. Encara que no els puc anomenar a tots en aquesta pàgina, m'agradaria destacar els que hi han intervingut de manera més propera.

Al meu tutor de tesi Eduard Barberà, per haver-me transmès no només coneixements sinó una forma de treballar, i sobretot per haver tingut la paciència d'estar al meu costat fins a finalitzar aquest treball .

A la Mireya i el Josep Maria, per fer del laboratori una família i cuidar de tots nosaltres. Gràcies per deixar-me formar part dels vostres projectes de recerca, gran part d'aquest treball ha estat possible gràcies a vosaltres.

Als companys de laboratori, de la secció de biotecnologia de l'IQS i resta de Doctorands. A la Marta, el Luis Mario, el Sergi i el Jordi per haver aportat el vostre gra de sorra a aquest treball. Sergi i Jordi sempre recordaré les aventures a Boston i lo amens que eren amb vosaltres els dies i les nits als laboratoris del MIT.

A l'Albert, per tenir sempre una estona per donarem un cop de mà.

Al Kilian, per haver compartit tantes estones a l'IQS i tenir el teu despatx obert per parlar de qualsevol tema.

Als companys del laboratori de biologia molecular del CRAG. L'Oriol per haver-me fet passar tantes estones divertides al laboratori. A la Patricia per haver-me ensenyat tantes tècniques de proteòmica i biologia molecular.

Als caps del servei de proteòmica i de seqüenciació del CRAG, Sami Irar i Mercè Miquel, per haver-me transmès part del seu coneixement tècnic.

Al professor Jean-François Hamel del MIT, per haver-me permès iniciar el món de la biotecnologia i viure una experiència inoblidable als EEUU.

Al JJ Molins, per haver pogut compartir les seves classes i ensenyar-me la importància de l'exigència.

A la Laura Fernández pel seu ajut amb els dissenys experimentals.

Al Toni Planas i la Montse Agut per obrir-me els seus laboratoris sempre que ho necessitava.

A la Rosa Nomen i el Santi Nonell per implicar-se de ple en que pogués finalitzar aquest treball.

Al personal administratiu de l'IQS per fer amena la burocràcia.

Al conjunt de la comunitat que forma l'IQS per haver-me donat una formació sòlida, que m'ha permès superar tots els reptes científicotècnics que se m'han plantejat.

A la Nefer, per haver-me recolzat i ajudat més que ningú durant tot aquest temps. Al laboratori realitzant els experiments, amb la redacció de la tesi, en els bons i mals moments. No se si hagués pogut finalitzar aquest treball sense tu.

A la meva família, per animar-me a començar i donar-me suport durant tots aquests anys.

Finalment, aquest treball ha estat possible gràcies al recolzament d'IQS i al suport del Comissionat per a Universitat i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Socials Europeu en el període 2009-2011 a través del programa d'ajuts per a la contractació de personal investigador novell (2009FI_B_00610, 2010FI_B1_00060, 2011FI_B2_00057), així com al finançament per al projecte de recerca concedit pel Govern d'Espanya a través dels projectes MEC BFU2006-15115-01/BMC i BFU2009-08575.

Resum

La transglutaminasa (TGasa) és un enzim que catalitza modificacions postraduccionals de proteïnes mitjançant enllaços ϵ -(γ -glutamil) i ponts covalents d'amida. En plantes, aquest enzim està poc estudiat, i només ha estat clonat el gen TGasa de *Zea mays* (tgz).

Aquesta tesi resumeix la feina feta per desenvolupar un sistema d'expressió utilitzant dos microorganismes recombinants, *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) per produir i caracteritzar l'enzim transglutaminasa (TGZ).

Treballs anteriors en *E. coli* van mostrar que la proteïna recombinant era present principalment en forma de cossos d'inclusió (IBs). Per tal d'obtenir la proteïna en forma activa i soluble, es van optimitzar les condicions d'expressió en *E. coli*. Es va assajar la coexpressió de xaperones i es va desenvolupar un sistema no clàssic de solubilització de IBs. A més, es va transformar *P. pastoris* per estudiar la seva expressió i comparar ambdós sistemes.

Les metodologies de Taguchi i de la superfície de resposta es van utilitzar per formular un medi de cultiu que, juntament amb el desenvolupament d'una aplicació informàtica per modelar i simular el procés, va permetre establir un cultiu d'alta densitat d'*E. coli*. Els resultats van mostrar que les condicions òptimes per a expressar TGZ en *E. coli* van ser d'una concentració de IPTG de 100 μ mol IPTG / g de biomassa seca i un temps d'inducció de 5 h. Aquestes condicions van permetre obtenir un rendiment TGZ de 160 mg / L amb una activitat específica de 450 putrescina pmol / mg TGZ ressolubilitzada \cdot h.

Es va realitzar una caracterització bioquímica completa de la TGZ obtinguda mitjançant *E. coli*.

Es va posar a punt un sistema de cultiu d'alta densitat cel·lular en *P. pastoris* i es va expressar TGZ amb èxit. La reacció de reticulació de TGZ a la caseïna es va estudiar, i el resultat va ser igual que la reacció de la caseïna per TGZ expressada en *E. coli*. Es va obtenir una producció de 480 mg / L de proteïna total amb una activitat de 4000 pmol putrescina / mg de proteïna total \cdot h.

Aquests resultats indiquen que també es va establir un procediment eficaç per expressar TGZ en *P. pastoris*.

Resumen

La transglutaminasa (TGasa) es una enzima que cataliza modificaciones postraduccionales de proteínas mediante enlaces ϵ - (γ -glutamil) y puentes covalentes de amida. En plantas, esta enzima está poco estudiada, y sólo ha sido clonado el gen TGasa de *Zea mays* (tgz).

Esta tesis resume el trabajo realizado para desarrollar un sistema de expresión utilizando dos microorganismos recombinantes, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) para producir y caracterizar la enzima transglutaminasa (TGZ).

Trabajos anteriores en *E. coli* mostraron que la proteína recombinante estaba presente principalmente en forma de cuerpos de inclusión (IBs). Con el fin de obtener la proteína en forma activa y soluble, se optimizaron las condiciones de expresión en *E. coli*. Se ensayó la coexpresión de chaperonas y se desarrolló un sistema no clásico de solubilización de IBs. Además, se transformó *P. pastoris* para estudiar su expresión y comparar ambos sistemas.

Se utilizaron las metodologías de Taguchi y de la superficie de respuesta para formular un medio de cultivo que, junto con el desarrollo de una aplicación informática para modelar y simular el proceso, permitieron establecer un cultivo de alta densidad de *E. coli*. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas para expresar TGZ en *E. coli* fueron de una concentración de IPTG de 100 μ mol IPTG / g de biomasa seca y un tiempo de inducción de 5 h. Estas condiciones permitieron obtener un rendimiento TGZ de 160 mg / L con una actividad específica de 450 putrescina pmol / mg TGZ resolubilizada \cdot h. Se realizó una caracterización bioquímica completa de la TGZ obtenida mediante *E. coli*. Se puso a punto un sistema de cultivo de alta densidad celular en *P. pastoris* y se expresó TGZ con éxito. La reacción de reticulación de TGZ en la caseína se estudió, y el resultado fue igual que la reacción de la caseína por TGZ expresada en *E. coli*. Se obtuvo una producción de 480 mg / L de proteína total con una actividad de 4000 pmol putrescina / mg de proteína total \cdot h.

Estos resultados indican que también se estableció un procedimiento eficaz para expresar TGZ en *P. pastoris*.

Abstract

Transglutaminase (TGase) is an enzyme that catalyzes post-translational protein modifications by ϵ -(γ -glutamyl) links and covalent amide bonds. In plant, this enzyme is poorly studied and only the *Zea mays* TGase gene (*tgz*) has been cloned.

This thesis summarizes the work done to develop an expression system using two recombinant microorganisms, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) to produce and characterize the enzyme transglutaminase (TGZ).

Previous works expressing TGZ in *E. coli* showed that the recombinant protein was mainly present as inclusion bodies (IBs). In order to obtain active, soluble protein, expression conditions were optimized in *E. coli*, coexpression of chaperones was tested and a non-classic IBs resolubilizing system was developed. Additionally, the gene was also inserted in *P. pastoris* to study its expression, being able to compare both systems. Taguchi and response surface methodologies were used to develop a culture media that, together with the implementation of a computer application to model and simulate the process, allowed to develop a high-density culture of *E. coli*. Results showed that the optimal conditions to express TGZ in *E. coli* were an IPTG concentration of 100 μ mol IPTG/ g dry biomass and an induction time of 5h. These conditions allowed to obtain a TGZ yield of 160 mg/L with a specific activity of 450 pmol putrescine/mg resolubilized TGZ·h.

A full biochemical characterization of the TGZ obtained using *E. coli* was performed.

A *P. pastoris* high cell density cultivation system was implemented and TGZ was successfully expressed. The cross-linking reaction of TGZ to the casein was also studied, and the result was same as the reaction of casein by TGZ expressed in *E. coli*. A production of 480mg/L of total protein with an activity of 4000 pmol putrescine/mg total protein·h was obtained.

These results indicated that an effective procedure for expressing TGZ in *P. pastoris* was also established.

Índex de continguts

1	Introducció i part teòrica	1
1.1	Transglutaminases	2
1.1.1	Característiques, estructura i funció.	2
1.1.2	Substrats de les transglutaminases i les seves reaccions	3
1.1.3	El paper del calci en l'activitat transglutaminasa.	7
1.1.4	Distribució de les transglutaminases	7
1.1.5	Classificació de las transglutaminases i la seva estructura	8
1.1.6	Importància biotecnològica i industrial de les transglutaminases	13
1.2	Expressió de proteïnes a Escherichia coli	15
1.3	Expressió de proteïnes a Pichia pastoris	26
1.4	Disseny de medis de cultiu per a microorganismes	34
1.4.1	Dissenys de Taguchi	38
1.4.2	Metodologia de la superfície de resposta	42
1.5	Modelatge i simulació del creixement d'un microorganisme	44
2	Objectius	47
3	Materials i mètodes	49
3.1	Expressió de TGZ en Escherichia coli	49
3.1.1	Antecedents al grup de recerca. Obtenció del material de partida.	49
3.1.2	Obtenció de les cèl·lules recombinants d'Escherichia coli BL21 (DE3)	50
3.1.2.1	Obtenció de DNA plasmídic	50
3.1.2.2	Comprovació de la presència del gen tgz15	51
3.1.2.3	Electroforesis en gels d' agarosa per a la visualització de DNA	52
3.1.2.4	Preparació de cèl·lules competents d'Escherichia coli BL21 (DE3)	54
3.1.2.5	Transformació de cèl·lules d'Escherichia coli BL21 (DE3)	54
3.1.2.6	Conservació de les soques	55
3.1.3	Disseny del medi de cultiu per a l'expressió de tgz15 en Escherichia coli BL21(DE3)	56
3.1.3.1	Disseny de Taguchi	56
3.1.3.2	Optimització de la composició del medi mitjançant una superfície de resposta	66
3.1.3.3	Avaluació del consum de nutrients	68
3.1.4	Expressió de TGZ15 en matràs d'Erlenmeyer.	70
3.1.4.1	Inducció amb IPTG	70
3.1.4.2	Inducció amb lactosa	70
3.1.4.3	Extracció de proteïna soluble e insoluble	70
3.1.5	Sistemes de solubilització de cossos d'inclusió	71
3.1.5.1	Procés de replegament "refolding"	72
3.1.5.2	Solubilització de cossos d'inclusió mitjançant detergents no desnaturalitzants	72
3.1.5.3	Solubilització de cossos d'inclusió mitjançant la coexpressió de xaperones	72
3.1.5.4	Refolding in vivo	73
3.1.6	Detecció i quantificació de les proteïnes expressades	74
3.1.6.1	Quantificació de proteïna total	74
3.1.6.2	Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida	75
3.1.6.3	Tinció de gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie	77
3.1.6.4	Protocol d'immunodetecció de proteïnes per Western Blot	78
3.1.6.5	Electroforesi en dues dimensions	80
3.1.7	Mesura de l'activitat enzimàtica	83
3.1.7.1	Mesura de l'activitat per colorimetria	83
3.1.7.2	Mesura de l'activitat pel mètode radioactiu	84
3.1.8	Caracterització bioquímica de la proteïna	86

3.1.8.1	Anàlisi de la seqüència de la proteïna per MALDI-TOF	86
3.1.8.2	Reducció - alquilació	87
3.1.8.3	Assaig de polimerització	87
3.1.9	Producció de TGZ en bioreactor	87
3.1.9.1	Mesura de l'estabilitat plasmídica	87
3.1.9.2	Procés batch	88
3.1.9.3	Procés fed-batch	90
3.1.9.4	Anàlisi de seguiment del creixement cel·lular dels cultius en bioreactor	91
3.1.9.5	Modelització i simulació del creixement d' <i>Escherichia coli</i>	92
3.1.9.5.1	Descripció dels models utilitzats	92
3.1.9.5.2	Determinació del K_{La} pel mètode "gas out – gas in"	99
3.1.9.5.3	Identificació	100
3.1.10	Purificació de TGZ15 expressada en <i>Escherichia coli</i>	102
3.1.10.1	Purificació per afinitat en columna d'heparina	102
3.1.10.2	Purificació per afinitat en columna de Níquel	102
3.1.10.3	Purificació mitjançant anticossos	104
3.2	Expressió en <i>Pichia pastoris</i>	105
3.2.1	Transformació i selecció de clons	105
3.2.1.1	Obtenció del plasmidi pPic9	105
3.2.1.2	Preparació de cèl·lules electrocompetents	105
3.2.1.3	Linealització del plasmidi pPic9	106
3.2.1.4	Transformació de cèl·lules competents per electroporació	106
3.2.1.5	Purificació d'una banda de DNA en gel d'agarosa	106
3.2.1.6	Preservació de les soques transformades	107
3.2.1.7	Selecció de clons	107
3.2.2	Preparació d'inòculs	109
3.2.3	Expressió en matràs d'Erlenmeyer	109
3.2.4	Cultiu d'alta densitat en bioreactor	110
3.2.4.1	Preparació del bioreactor	110
3.2.4.2	Expressió de TGZ15 en bioreactor	111
3.2.5	Quantificació de la producció de la proteïna	113
3.2.6	Mesura de l'expressió del gen <i>tgz15</i>	113
3.2.6.1	Extracció de RNA	114
3.2.6.2	Obtenció del cDNA	115
3.2.6.3	Disseny dels encebadors i avaluació de l'especificitat	115
3.2.6.4	PCR quantitatiu en temps real (RT-qPCR)	116
4	Resultats i discussió	119
4.1	Expressió de TGZ en <i>Escherichia coli</i>	119
4.1.1	Formulació del medi de cultiu	119
4.1.1.1	Disseny de Taguchi	119
4.1.1.2	Optimització de la composició del medi mitjançant una superfície de resposta	124
4.1.1.3	Avaluació del consum de nutrients	130
4.1.2	Cultiu d' <i>Escherichia coli</i> en bioreactor	132
4.1.2.1	Procés batch	132
4.1.2.2	Modelització i del creixement d' <i>Escherichia coli</i> en bioreactor	135
4.1.2.2.1	Determinació del coeficient de transferència de matèria del bioreactor (K_{La})	143
4.1.2.2.2	Estudi de sensibilitat del model	145
4.1.2.2.3	Identificació i aplicació del model a <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	150
4.1.2.3	Procés fed-batch	156
4.1.2.4	Estabilitat plasmídica	157
4.1.3	Expressió de la proteïna TGZ15 en matràs d'Erlenmeyer	159
4.1.3.1	Inducció amb IPTG	159
4.1.3.2	Inducció de l'expressió de la proteïna TGZ15 amb lactosa	164
4.1.3.3	Coexpressió amb xaperones	165
4.1.3.4	Replegament in vivo dels cossos d'inclusió	168

4.1.3.5	Anàlisi de la presència d'una banda de pes molecular inferior a l'esperat identificada com a TGZ15 per Western Blot	170
4.1.3.6	Obtenció de TGZ soluble mitjançant detergents no desnaturalitzants	172
4.1.4	Expressió de la proteïna en bioreactor	178
4.1.5	Purificació de la TGZ expressada	180
4.1.5.1	Afinitat (heparina)	180
4.1.5.2	Afinitat (Níquel) i immunoprecipitació amb T7- Tag Affinity	185
4.1.5.3	Electroforesi 2D i identificació(PMF / MALDI-MS-MSMS)	190
4.2	Expressió en Pichia pastoris	192
4.2.1	Transformació i selecció de clons	192
4.2.2	Expressió de TGZ15 en un cultiu de Pichia pastoris a alta densitat en bioreactor	197
4.2.3	Quantificació de la producció i activitat de la proteïna	197
4.2.4	Expressió del gen tgz15 mesurada per RT-qPCR	201
4.3	Comparació entre els sistemes d'expressió heteròloga d'Escherichia coli i Pichia pastoris	205
5	Conclusions	209
6	Annexos	211
6.1	Annex 1. Preparació dels medis de cultiu utilitzats	211
6.1.1	Medis utilitzats en el cultiu d'Escherichia coli	211
6.1.2	Medis utilitzats en el cultiu de Pichia pastoris	213
6.2	Annex 2. Codi Matlab per a la creació de la superfície de resposta i optimització dels components del medi de cultiu	219
6.3	Annex 3. Codi de control Bioxpert XP per al reactor Applikon	222
6.4	Annex 4. Seqüència del gen tgz15 obtinguda	227
6.5	Annex 5. Gràfiques de la determinació de sensibilitat del model matemàtic	231
6.6	Annex 6. Codi i subrutines del programa de simulació desenvolupat	245
7	Bibliografia	261

índex de figures

Figura 1 Formació de monoderivats mitjançant la interacció de poliamines i proteïnes en que intervé la transglutaminasa.	4
Figura 2 Esquema de les diferents reaccions catalítiques en que intervien les transglutaminases i els seus productes.	5
Figura 3 Reacció de “crosslink” catalitzada per la formació de l'enllaç ϵ -(γ -glutamil)lisina.	6
Figura 4 Reacció d'incorporació d'amina a un residu del grup glutamil catalitzada per TGasa.	6
Figura 5 Reacció d'acilació d'una cadena contigua a la lisina catalitzada per TGasa.	7
Figura 6 Representació esquemàtica de les proteïnes TGZ15 i TGZ21 indicant els seus dominis.	12
Figura 7 Reaccions catalitzades per transglutaminases, per a la formació d'homopolímers i heteropolímers.	14
Figura 8 Evolució de l'estabilitat plasmídica d'un cultiu amb i sense antibiòtic selectiu ⁶⁷ .	18
Figura 9 Ruta del metabolisme del metanol en <i>Pichia pastoris</i> .	28
Figura 10 Sistema d'integració del gen en el genoma de <i>Pichia pastoris</i> . Les figures A i B corresponen a inserció gènica i la C a substitució gènica ¹²⁰ .	31
Figura 11 Exemple de la determinació de interaccions entre factors.	39
Figura 12 Gràfica lineal de al matriu ortogonal $L_8(2^7)$.	40
Figura 13 Comparativa entre disseny factorial complet i disseny central compost per a 3 variables.	44
Figura 14 Disposició espacial dels diferents grups de punts per a un disseny compost de 2 variables.	67
Figura 15 Disposició espacial dels diferents grups de punts per a un disseny compost de 3 variables.	67
Figura 16 Esquema de les rutes metabòliques d' <i>E. coli</i> .	92
Figura 17 Representació de la superfície de resposta obtinguda a l'experiment d'optimització del medi de cultiu representada per a cada parella de factors.	128
Figura 18 Pantalla del programa de Microsoft Visual Studio per un procés batch.	136
Figura 19 Pantalla del programa de Microsoft Visual Studio per un procés en mode fed-batch.	136
Figura 20 Diagrama del codi programat en el Matlab R2007b.	137
Figura 21 Western blot de la fracció soluble de proteïna obtinguda.	167
Figura 22 Western blot de la fracció insoluble de proteïna obtinguda.	167
Figura 23 Anàlisi SDS-PAGE i Western Blot de les mostres tractades per reducció i alquilació.	171
Figura 24 Obtenció de proteïna TGZ 15 soluble a partir de IBs obtinguts a diferents temperatures.	174
Figura 25 DMC reticulada per l'activitat TGasa de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats amb Trítón.	178
Figura 26 Perfil cromatogràfic de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	180
Figura 27 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	181
Figura 28 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	182
Figura 29 Perfil cromatogràfic de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	183
Figura 30 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	184
Figura 31 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.	184
Figura 32 Perfil cromatogràfic de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.	185

<i>Figura 33 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.</i>	186
<i>Figura 34 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.</i>	186
<i>Figura 35 Resultat de l'anàlisi per western blot de les fraccions de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos.</i>	187
<i>Figura 36 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les fraccions de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos.</i>	188
<i>Figura 37 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE les fraccions concentrades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos i la purificació mitjançant columna de níquel.</i>	189
<i>Figura 38 Resultat de l'anàlisi per western blot de les fraccions concentrades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos i la purificació mitjançant columna de níquel.</i>	189
<i>Figura 39 Resultat de l'anàlisi per electroforesi en dues dimensions de la mostra de TGZ15 purificada mitjançant columna de níquel i columna d'anticossos.</i>	191
<i>Figura 40 Resultat de l'amplificació del plasmidi pPIC9 + tgz15 en gel d'agarosa al 2% amb bromur d'etidi.</i>	192
<i>Figura 41 Gel d'agarosa al 2% del plasmidi linealitzat.</i>	193
<i>Figura 42 Gel d'agarosa al 1% on s'aprecia que no hi ha degradació en el DNA genòmic.</i>	194
<i>Figura 43 Gel d'agarosa al 1% on es comprova la correcta transformació de tots els clons.</i>	194
<i>Figura 44 Bandes obtingudes en la reacció de PCR per a cada parella d'encebadors.</i>	194
<i>Figura 45 Resultat obtingut en una SDS-PAGE seguida de tinció de Coomassie d'una de les mostres del cultiu on s'aprecien bandes a l'alçada esperada.</i>	196
<i>Figura 46 Identificació mitjançant Western Blot de TGZ15 expressada en una selecció de mostres.</i>	196
<i>Figura 47 Electroforesi SDS-PAGE i tinció amb blau de Coomassie de la proteïna produïda al llarg del temps.</i>	198
<i>Figura 48 Immunodetecció per Western blot de TGZ15 expressada al llarg del temps.</i>	198
<i>Figura 49 Electroforesi bidimensional amb blau de Coomassie de la proteïna produïda a les 28 hores d'inducció.</i>	199
<i>Figura 50 Western blot de l'electroforesi bidimensional de la proteïna produïda a les 28 hores d'inducció.</i>	199
<i>Figura 51. Bandes d'amplificació en gel d'agarosa dels gens de referència utilitzats, GAP i ACT1.</i>	202
<i>Figura 52 Corbes d'amplificació obtingudes per a les mostres d'expressió de tgz15 a diferents temps d'inducció</i>	203
<i>Figura 53 Variables de control del procés.</i>	224
<i>Figura 54 Constants utilitzades en les subrutines.</i>	224
<i>Figura 55 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina Batch.</i>	225
<i>Figura 56 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina ExpFeed.</i>	225
<i>Figura 57 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina PeriodeControl.</i>	226

índex de taules

Taula 1 Concentracions inhibidores de diversos components del medi de cultiu.	23
Taula 2 Composició elemental d'E. coli.	35
Taula 3 Concentracions inhibidores dels elements traça.	36
Taula 4 Concentracions inhibidores dels elements majoritaris.	36
Taula 5 Producte de solubilitat dels compostos més insolubles formats en el medi.	37
Taula 6 Factors, interaccions i els seus graus de llibertat.	56
Taula 7 Matriu ortogonal L64(2 ⁶³).	59
Taula 8 Nivells de cada un dels factors.	61
Taula 9 Nivells dels elements traça.	62
Taula 10 Matriu experimental.	63
Taula 11 Codificació dels factors en la Taula 10.	64
Taula 12 Resum del disseny central compost de 2 a 9 variables.	68
Taula 13 Paràmetres analitzats i mètode analític utilitzat.	69
Taula 14 Seqüència dels encebadors utilitzats per comprovar la completa inserció del gen tgz15.	108
Taula 15 Densitats òptiques màximes per a cada un dels 64 experiments.	119
Taula 16 Millors nivells per a cada factor.	122
Taula 17 Disseny factorial compost per a l'experiment d'optimització del medi de cultiu.	125
Taula 18 Resultat de les experiències realitzades en el disseny central compost.	126
Taula 19 Resultat de l'anàlisi de variància ANOVA utilitzant MS Excel 2007.	127
Taula 20 Medi de cultiu final (Biotiqs coli).	129
Taula 21 Biomassa generada en els experiments de consum de nutrients.	130
Taula 22 Consum de nutrients en el medi Biotiqs en mg per gram de biomassa generada.	131
Taula 23 Composició del medi d'alimentació fed-batch Biotiqs coli F per a glucosa, fructosa i glicerol.	132
Taula 24 Resultats de rendiment del cultiu d' Escherichia coli BL21 (DE3) per a les fermentacions en mode batch i medi Biotiqs coli.	134
Taula 25 Paràmetres utilitzats per programar el codi. Especificació d'unitats, tipus d'operació del reactor i origen de les dades.	142
Taula 26 K _L a respecte la velocitat d'agitació per al bioreactor Applikon de 7L.	144
Taula 27 Sensibilitat del model respecte dels paràmetres.	146
Taula 28 Resultats de les diferents experiències.	150
Taula 29 Dades extrems de les mostres de l'experiència 1.	151
Taula 30 Paràmetres pels diferents creixements.	155
Taula 31 Seqüència N-Terminal de TGZ15p sobreexpressada en E. coli.	170
Taula 32 Activitat TGasa (μmol de substrat transformat) de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15.	176
Taula 33 Afinitat a substrat de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 resuspesos en Trítón mesurada per concentració saturant de substrat (pmols).	176

Índex de gràfiques

Gràfica 1 Gràfiques factorials per a cada un dels components del medi de cultiu.	121
Gràfica 2 Diagrama de Pareto expressant la influència de cada factor en el creixement cel·lular.	122
Gràfica 3 Creixement del cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en mode batch utilitzant glucosa i medi Biotiqs coli.	133
Gràfica 4 Creixement del cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en mode batch utilitzant fructosa i medi Biotiqs coli.	133
Gràfica 5 Creixement del cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en mode batch utilitzant glicerina i medi Biotiqs coli.	134
Gràfica 6 Representació del coeficient de transport d'oxigen respecte a la velocitat d'agitació pel reactor Applikon de 7L.	145
Gràfica 7 Concentració d'acetat ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) variant el valor del paràmetre $YX/S,ox$.	148
Gràfica 8 Concentració de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i de substrat ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) variant el paràmetre $YX/S,ox$.	148
Gràfica 9 Concentració d'oxigen ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) al llarg del temps (h) variant la variable $YX/S,ox$.	149
Gràfica 10 Velocitat específica de creixement (μ) al llarg del temps (h) variant la variable $YX/S,ox$.	150
Gràfica 11 Evolució de les concentracions de biomassa i substrat per a l'experiment 1.	152
Gràfica 12 Evolució de la concentració d'acetat per l'experiment 1.	153
Gràfica 13 Concentració d'oxigen per l'experiment 1.	154
Gràfica 14 Velocitat específica de creixement per l'experiment 1.	154
Gràfica 15 Demanda d'oxigen per l'experiment 1.	155
Gràfica 16 Evolució de la DO_{600} en el temps d'un cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en mode fed-batch.	156
Gràfica 17 Evolució del consum de glucosa i producció de biomassa i acetat en un cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en fed-batch.	157
Gràfica 18 Estabilitat plasmídica d'un cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) en mode fed-batch al llarg del temps.	158
Gràfica 19 Evolució del creixement cel·lular d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) TGZ15 en el temps en funció de la concentració d'inductor.	159
Gràfica 20 Evolució de l'activitat TGasa del cultiu segons el temps d'inducció i la concentració d'IPTG.	160
Gràfica 21 Evolució de la producció de TGZ15 soluble, mesurada per western blot, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.	161
Gràfica 22 Evolució de la producció de TGZ15 insoluble mesurada per western blot, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.	162
Gràfica 23 Evolució de la producció de proteïna total soluble mesurada pel mètode de Bradford, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.	162
Gràfica 24 Relació entre la proteïna soluble total i la TGZ15 soluble obtingudes en l'experiment d'inducció amb IPTG.	163
Gràfica 25 Evolució de la densitat cel·lular del cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) TGZ15 en el temps amb inducció amb lactosa i un control sense inducció.	164
Gràfica 26 Comparació de la producció de proteïna soluble TGZ15 amb o sense coexpressió de xaperones.	165
Gràfica 27 Comparació de la producció de proteïna TGZ15 insoluble amb coexpressió de xaperones.	166
Gràfica 28 Comparació de l'activitat TGasa de la proteïna soluble amb coexpressió de xaperones.	166

Gràfica 29 Comparativa del creixement cel·lular durant la inducció i el replegament in vivo de la proteïna TGZ15.	169
Gràfica 30 Comparativa l'activitat enzimàtica durant el replegament in vivo.	169
Gràfica 31 Activitat enzimàtica de diferents fraccions cel·lulars tractades amb detergents.	172
Gràfica 32 Activitat TGasa de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats amb Trítón 1% i glicerol 35% (pmols Put / mg proteïna . h), mesurada mitjançant el mètode radioactiu.	175
Gràfica 33 Creixement d'Escherichia coli en fed-batch i posterior expressió de TGZ en bioreactor. La proteïna TGZ s'expressa com a mg/L de proteïna insoluble solubilitzada en Trítón 1%.	179
Gràfica 34 Evolució de l'activitat de la proteïna TGZ15 insoluble resolubilitzada en Trítón 1% durant la inducció.	179
Gràfica 35 Evolució de la concentració de biomassa amb el temps.	197
Gràfica 36 Evolució de la concentració de biomassa i proteïna excretada amb el temps.	198
Gràfica 37 Activitat TG de varies mostres respecte als mil·lígrams de proteïna total.	200
Gràfica 38 Activitat TGasa de les mostres per ml de medi.	201
Gràfica 39 Expressió del gen tgz durant diferents temps d'inducció en reactor.	204

1 Introducció i part teòrica

El progrés en diferents camps del coneixement humà, com la genètica, la biologia molecular, la microbiologia, la química i l'enginyeria química ha permès que la biotecnologia hagi obert camins per la producció d'un gran ventall de substàncies molt diverses.

Actualment la indústria biotecnològica moderna es capaç de proveir productes molt diferents i variats: metabòlits primaris (acetona, àcid cítric), metabòlits secundaris (antibiòtics, esteroides, vitamines), enzims (amilasa, proteasa, lipasa), proteïnes terapèutiques (insulina, interferó, hormones de creixement), vacunes (hepatitis A i B), combustibles (etanol, metà, oli microbià), additius (colorants, aromes, fragàncies, antioxidants, estabilitzadors) i molts d'altres.

El DNA és un component comú de totes les cèl·lules i éssers vius, conté totes les instruccions necessàries per la producció i la completa funcionalitat de la matèria viva; qualsevol alteració en el DNA cel·lular implica la modificació de les propietats de l'organisme. Al llarg de la dècada de 1970 varen aparèixer noves metodologies que permetien realitzar alteracions dirigides a les molècules de DNA, donant lloc a la tecnologia del DNA recombinant que ha estat una de les principals raons per a l'avanç de la recerca biotecnològica. Aquestes tecnologies es basen en introduir a un microorganisme hoste la informació genètica que codifica una proteïna exògena, és a dir, d'un altre organisme. D'aquesta manera es dona lloc a un nou microorganisme apte per la producció de la proteïna d'interès. Mitjançant el cultiu de les cèl·lules modificades es pot arribar a aconseguir una gran població que pot expressar la proteïna recombinant en gran quantitat.

1.1 Transglutaminases

1.1.1 Característiques, estructura i funció.

La primera transglutaminasa (TGasa) va ser descoberta en un conillet d'índies pel grup de Heinrich Waelsch¹ a mitjans dels 50 i la van anomenar "transglutaminase 2 "(TG2), encara que aquest nom no es gaire adient degut a que aquest enzim no reacciona amb residus lliures de glutamina, sinó que realitza funcions carbonilamida en la cadena lateral de residus de glutamina en substrats de proteïnes². La transglutaminasa va ser identificada gracies a la seva propietat d'incorporar amines primàries de baix pes molecular a proteïnes.

L'enzim no va ser descrit fins el 1957¹ i a partir de llavors va començar l'estudi d'aquest grup d'enzims involucrat en múltiples funcions.

Les transglutaminases (R-glutaminil-peptido-aminasa- γ -glutamil transferasa, nombre EC:2.3.2.13) son enzims que originen modificacions post-traduccionals de proteïnes catalitzant unions amida covalents entre un grup amino primari d'una poliamina o d'una lisina (grup donador amino) i un grup γ -carboxamida de un residu glutamina d'algunes proteïnes (grup amino receptor)³. Com a resultat de l'activitat enzimàtica es modifica la conformació de la pròpia proteïna i es produeixen també altres canvis de conformació més extensos com a resultat de los unions entre la mateixa proteïna i entre altres proteïnes donant lloc a conjugats d'elevat pes molecular.

S'han descrit també activitats catalítiques com la hidròlisis d'ATP o GTP⁴ i altres funcions biològiques degudes a processos no catalítics com ara l'adhesió cel·lular i possiblement senyals de transducció.

Les transglutaminases millor descrites son les TGases de mamífers i entre ells, el factor XIIIa de coagulació de la sang es la més estudiada degut a la seva funció. La TG2 es troba relacionada amb funcions que van des de la senyalització cel·lular fins a l'apoptosi i patologies com la malaltia celíaca i el Huntington. La TGasa epidermal (TG3) està relacionada amb el procés de queratinització epidèrmica. En general aquests enzims estan implicats en fenòmens de protecció i estabilització cel·lular així com en fenòmens tals com la cicatrització de ferides, la diabetis i malalties autoimmunes⁵.

1.1.2 Substrats de les transglutaminases i les seves reaccions

La família de les transglutaminases està formada per una sèrie d'enzims molts dels quals actuen amb enllaços peptídics amb residus de glutamina i presenten moltes diferències en quant a la seva especificitat. En contrast amb la limitada especificitat del substrat donador de grup acil, que actua únicament sobre residus aminoglutàmics, les transglutaminases posseeixen una àmplia gamma d'especificitat de substrats acceptors de grup acil (lisina, miosina, putrescina, espermidina, gluten, etc.).

Les TGases són característiques sobretot per les reaccions de transamidació, la seva funció més estudiada i coneguda. L'enzim funciona com a catalitzador de modificacions postraduccional de les proteïnes mitjançant la formació d'enllaços isopeptídics.

Els substrats d'aquest enzim es poden dividir en dos grans grups, per una part proteïnes i per l'altre, molècules que contenen grups amino primaris, que reaccionen com a donadores d'aquests residus.

Les proteïnes substrat es poden dividir alhora en dos famílies principals, aquelles que actuen com acil donadores, per exemple, les que posseeixen el residu de glutamina i aquelles que actuen com acil receptors, les que contenen el residu de lisina. Una excepció a aquesta classificació es el cas del factor V, el qual actua com a proteïna substrat de la transglutaminasa. En alguns casos, una proteïna substrat pot tenir ambdós residus de reacció (glutamina i lisina), en aquest cas, la disponibilitat i quantitat d'aquests residus, representen les característiques bioquímiques que duen a la formació de dímers o polímers per reacció de reticulació o "cross-linking" catalitzada per TGasa⁶.

Dins de les molècules que poden funcionar com a substrat, es a dir acil receptors, s'ha demostrat que les poliamines (molècules de naturalesa policatiónica presents tan en animals com en plantes i microorganismes) són substrats fisiològics de les transglutaminases^{3,7}. De fet, la mesura de l'activitat mitjançant la incorporació de poliamines marcades radioactivament és un mètode àmpliament utilitzat^{8,9}.

Quan un grup amino s'uneix al residu glutamí d'una proteïna mitjançant l'activitat TGasa, aquesta unió dóna lloc a la formació de monoderivats (veure Figura 1); quan, per la mateixa activitat, s'uneixen dos grups amino, s'obtenen els biderivats. Ambdós es detecten com a residus marcats als extractes proteics al mètode radioactiu de detecció de l'activitat TGasa.

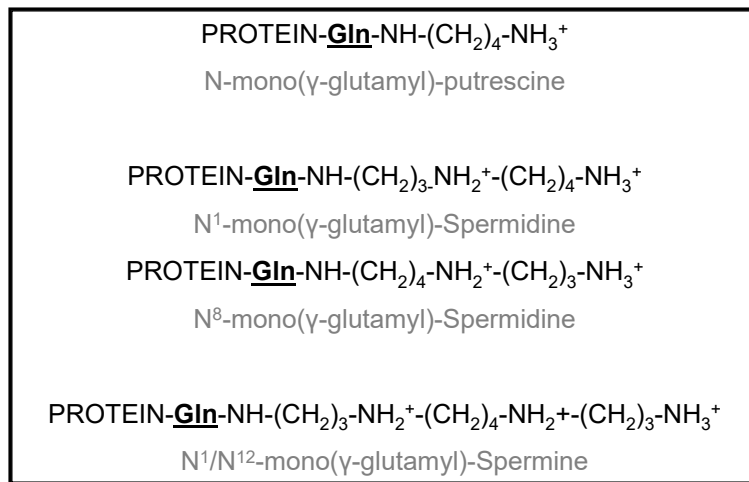


Figura 1 Formació de monoderivats mitjançant la interacció de poliamines i proteïnes en que intervé la transglutaminasa.

A la Figura 1, es representen les diferents formes d'actuació de la TGasa i els diferents productes formats a partir de la seva reacció enzimàtica, depenent dels substrats que utilitzi. Així, la unió del primer substrat, que conté el residu glutamina, amb la cisteïna del centre actiu de l'enzim, forma un intermedi acil-enzim (γ -glutamyl-tiol-èster), amb el consegüent alliberament d'amoni. El segon substrat (donador) s'uneix llavors a l'intermedi i ataca l'enllaç tiol-èster i restableix la cisteïna del lloc actiu de l'enzim en la seva forma original. Depenent de la naturalesa del donador, es poden obtenir diversos productes, formats per la unió poliamina-proteïna (transamidació) o per la unió proteïna-proteïna ("protein crosslinking"). La formació de l'intermedi acil-enzim és l'etapa limitant d'aquestes reaccions.

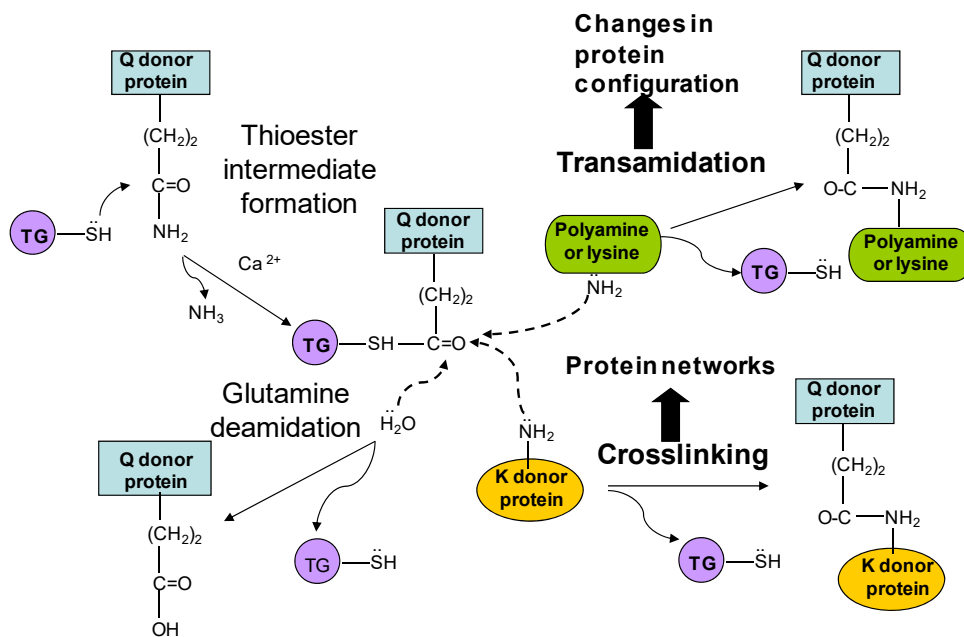


Figura 2 Esquema de les diferents reaccions catalítiques en que intervenen las transglutaminases i els seus productes¹⁰.

Com es pot veure a l'esquema anterior, una molècula de poliamina pot formar una unió covalent intra o intermolecular, podent originar una xarxa de proteïnes d'alt pes molecular. Depenent de la poliamina, la càrrega total de la proteïna pot canviar. La putrescina en forma de mono-(- γ -glutamil)-putrescina, afegeix càrregues positives a la molècula, podent causar un canvi en la conformació de la proteïna. Una proteïna que presenta aquesta modificació, és més susceptible per formar bis-derivats, produint una unió covalent intra o intermolecular. La primera etapa és regulada per la concentració de poliamines lliures, ja que alts nivells de poliamines lliures poden saturar als residus acil donadors de les proteïnes substrat, evitant la segona reacció.

D'aquesta manera, el nivell de poliamines juga un paper crític en la modulació de la unió covalent intra o intermolecular a proteïnes. Els ϵ -(- γ -glutamil)-lisina i els NN-bis-(- γ -glutamil)-amina, són els productes identificats més abundants de la unió covalent intra o intermolecular formada per la catàlisi enzimàtica. A més a més, la mida de la poliamina pot afectar la xarxa proteica produïda per l'abundant unió covalent intra o intermolecular, la qual adquireix característiques de plasticitat i reactivitat en funció del substrat incorporat.

De totes les reaccions que poden ser catalitzades per aquesta família d'enzims, la formació de xarxes entre proteïnes es la de major interès biotecnològic¹⁰. El col·lagen, l'elastina, la fibrina i la capa externa de l'epidermis són exemples d'estructures formades

a partir de l'activitat TGasa, utilitzant proteïnes com a substrat i formant xarxes proteïques.

Pel que fa a les reaccions catalitzades per aquesta família d'enzims, es poden dividir en tres grans grups: transamidació, esterificació i hidròlisis. D'aquests tres grans grups, des de un punt de vista biològic, les més importants són les de transamidació, que a la vegada es poden dividir en tres subfamílies més¹¹:

1. Crosslinking

El paper de substrat acceptor que juguen els grups ϵ -amino en enllaç peptídic amb residus lisina es de gran importància biològica. La transglutaminasa catalitza en aquest cas la reacció de formació del *cross-link* ϵ -(γ -glutamil)lisina. Aquest tipus de reacció, de gran importància en la formació d'estructures proteïques d'alt pes molecular i de creixement cel·lular, també es du a terme amb molts altres residus acceptors com la caseïna, el gluten, la miosina, etc (Figura 3).

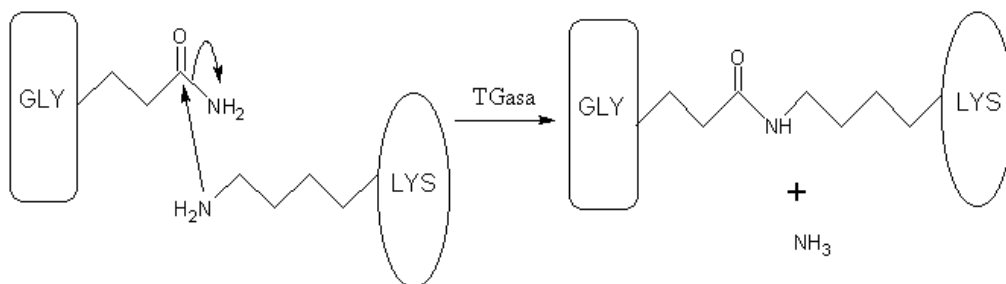


Figura 3 Reacció de "crosslink" catalitzada per la formació de l'enllaç ϵ -(γ -glutamil)lisina.

2. Incorporació d'amines

Es tracta de la incorporació d'una amina (H_2NR) al residu del grup glutamil. Si el residu acceptor inclou diamines o poliamines, aquestes poden actuar com a lligant en un adducte bis-glutamil entre dos molècules acceptores.

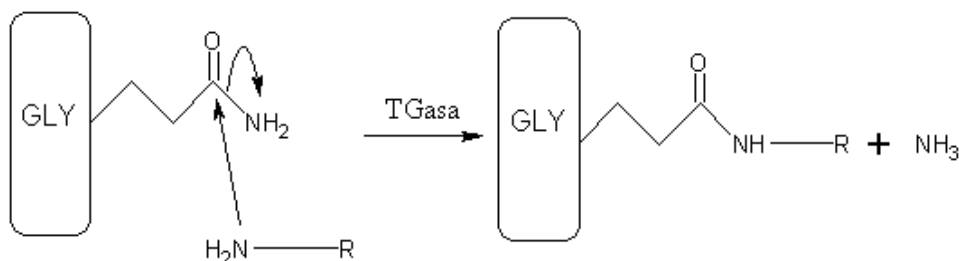


Figura 4 Reacció d'incorporació d'amina a un residu del grup glutamil catalitzada per TGasa.

3. Acilació

Es tracta de l'acilació d'una cadena contigua a la lisina. Les reaccions d'incorporació d'amines i d'acilació competeixen amb la reacció de *crosslinking*.

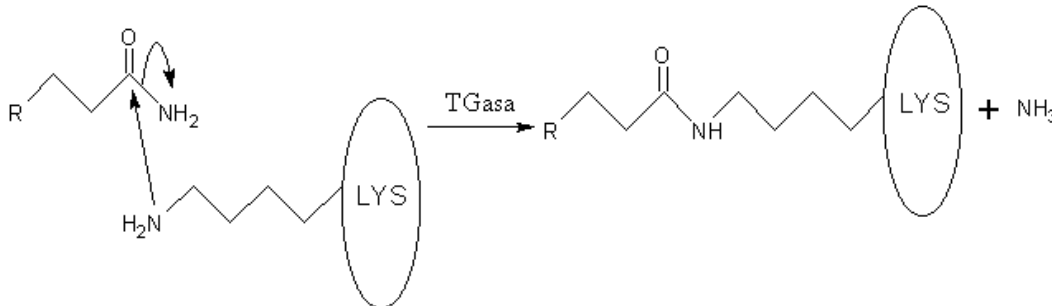


Figura 5 Reacció d'acilació d'una cadena contigua a la lisina catalitzada per TGasa.

Les transamidacions es porten a terme amb un petit canvi en l'energia lliure per la qual cosa en absència de separació de fases (coagulació, precipitació) les reaccions poden ser reversibles.

1.1.3 El paper del calci en l'activitat transglutaminasa.

Aquesta família d'enzims són generalment calci dependents, sent la dependència de calci una de les principals vies per detectar la seva activitat¹². La influència del calci causa una reorganització significativa, en l'estructura d'aquest enzim, per exemple, alguns anticossos reconeixen només les formes actives de TG2 i el factor XIIIa^{13,14}. En el cas de la TGasa d'eritròcit, la unió a calci afecta la seva configuració, afavorint l'exposició del seu lloc actiu¹⁵. D'altra banda, els resultats de cristal·lografia de TG3, revelen que el calci causa canvis conformacionals substancials que involucren l'obertura d'un canal que s'exposa al residu clau, el qual controla l'accés del substrat al lloc d'unió¹⁶.

S'ha demostrat que les transglutaminases de mamífers que es coneixen avui en dia requereixen de ions Ca^{2+} com a cofactor per tal de portar a terme adequadament la seva funcionalitat com a enzim. Per altre banda també s'han descrit alguns casos d'activitat no dependent de calci. En general l'activitat de les TGases microbianes es independent de calci.

1.1.4 Distribució de les transglutaminases

Les transglutaminases s'han trobat en mamífers¹⁷, plantes¹⁸, peixos¹⁹, fongs i bacteris²⁰.

El paper fisiològic de les transglutaminases, aïllades de varies d'aquestes fonts investigades, es bastant divers. Les transglutaminases d'origen vegetal, per exemple, es creu que estan involucrades en la formació del citoesquelet i de les estructures de la paret cel·lular²¹, així com en la formació dels grana dels cloroplasts i en la fotoprotecció²²⁻²⁴.

Les transglutaminases bacterianes que son produïdes per *Bacillus subtilis* i altres bacteris esporulats, actuen en el cross-link de proteïnes durant la formació de les espores²⁵.

La transglutaminasa de peixos com el *Pagrus major* es va aïllar de la llibreria de DNA complementari preparada a partir del fetge d'aquest peix. La transglutaminasa vegetal de blat de moro està involucrada en el "crosslinking" de proteïnes específiques de la miosina i s'han trobat grans similituds amb les transglutaminases d'alguns mamífers com les del fetge del porc de Guinea¹⁹.

Les transglutaminases trobades al plasma de mamífers estan involucrades en el "crosslinking" de les molècules de fibrina durant la coagulació de la sang²⁶ (Factor XIII), mentre que la transglutaminasa dels teixits (TG2) està involucrada en diversos processos fisiològics, entre els que podem destacar la senyalització cel·lular i l'apoptosi. Un nombre divers de malalties ha estat relacionat amb deficiències o sobreproducció d'aquest enzim²⁷ entre les quals està la malaltia celíaca i altres de tipus neurològic, com l'Alzheimer i el Parkinson²⁸⁻³⁰.

1.1.5 Classificació de las transglutaminases i la seva estructura

Les transglutaminases es classifiquen en base a les seves propietats físiques, distribució, mecanismes d'activació, preferència per substrat i per tant, les reaccions enzimàtiques que catalitzen⁴. Amb base a la seva estructura s'han identificat tres tipus de TGases:

- 1) TGases tipus papaïna, que inclouen el factor XIII, TG2 i TG3 humanes. Són membres de la superfamília cisteïna-proteases entre les que s'inclouen la papaïna, la calpaïna, la proteasa viral i les N-acetil-transferases³¹. També ho son les TG1, TG3 i TG5 que s'han anomenat les TGases de la pell i el cabell per la seva activitat relacionada amb l'epidermis o el fol·licle pilós³⁰.
- 2) Les disulfur isomerasas, que a més de presentar activitat TGasa, presenten activitat isomerasa per formar ponts disulfur³².
- 3) Les toxines bacterianes amb activitat TGasa⁴.

Els enzims de la família de les TGases usualment tenen tres dominis: N-terminal, mitja i C-terminal. El domini mitjà és el que es troba normalment més conservat i en la majoria de membres d'aquesta família les majors diferències es presenten en els seus dominis N i C terminal³³.

Homòlogues de les TGases humanes han estat trobades en altres mamífers i invertebrats⁹. L'elevat grau de conservació que presenten aquestes TGases en la seva estructura primària i secundària indica que els membres d'aquesta família podrien presentar 4 dominis en la seva estructura terciària similars als que presenta el factor XIIIa, TG2 i TG3 humanes i inclusivament en alguns exemples de TGases de peixos^{16,34}. La transglutaminasa millor coneguda és el factor XIII de coagulació de la sang, una proteïna tetramèrica del plasma, composta per dues subunitats A catalítiques i dues subunitats B no catalítiques. El factor XIII és el responsable de l'estabilització de les fibrines a la sang, mitjançant la formació de les cadenes de fibrina³⁵. El factor XIII també existeix en forma de dímer, format únicament per les subunitats catalítiques a la placenta, plaquetes, úter, pròstata, macròfags i altres teixits i cèl·lules. L'estructura primària del factor XIIIa va ser la primera descrita per aquesta família d'enzims. En comparar el factor XIIIa amb la transglutaminasa de porc de Guinea, es va establir la primera homologia entre transglutaminases³⁶.

El 1994 es van identificar en transglutaminases animals els aminoàcids essencials que formen el centre actiu per aquest grup d'enzims, el qual va revelar una tríade catalítica formada per una cisteïna, un histidina i un àcid aspàrtic. La reacció enzimàtica procedeix via un intermediari unit a la cisteïna³⁷.

Transglutaminases d'origen vegetal

Si es compara amb altres sistemes, com és el cas dels mamífers, la investigació sobre les TGases en plantes resulta encara incipient. Estudis preliminars suggereixen l'existència d'aquests enzims tant en plantes superiors com inferiors, detectant activitat tipus TGasa¹⁸.

No obstant això, en la majoria de les espècies vegetals aquests enzims no es troben pròpiament caracteritzades. La primera activitat tipus TGasa detectada en plantes va ser trobada en el pèsol, gairebé 30 anys després de la primera activitat descrita en mamífers¹⁸.

Estudis posteriors en *Helianthus tuberosus*, van demostrar activitat tipus TGasa en brots d'aquesta espècie vegetal³⁸. La localització de l'enzim i els seus substrats en diferents

compartiments cel·lulars, és un dels temes d'estudi més interessants d'aquests enzims en plantes, ja que a causa de l'escàs nombre de referències existents dels estudis de funcionalitat de les TGases en plantes tenen un gran interès. En base a les dades disponibles fins ara, es pot assumir que el seu funcionament bioquímic, activitat, etc, podrien ser similars als enzims d'origen animal.

Aquests enzims es localitzen en diferents òrgans de la planta i en diversos compartiments cel·lulars tals com cloroplasts, mitocòndries, citoplasma i parets cel·lulars. Pocs estudis s'han enfocat a la caracterització molecular i funcional d'aquests enzims en les plantes, encara que alguns suggereixen la seva participació en creixement i diferenciació, morfogènesi, fotosíntesi i mort cel·lular programada³⁹⁻⁴².

S'ha demostrat que existeix una relació clara entre les TGases animals i les vegetals. S'ha descrit que aquestes últimes són capaces de reconèixer llocs específics en substrats de TGases animals, i, a més, en assajos amb TGases d'*Heliantus tuberosus* es va demostrar la capacitat de reconèixer substrats sintètics com el dipèptid ZL-glutaminil-L-leucina¹⁵. Altres característiques com ara la dependència al calci, la unió de poliamines a proteïnes dels cloroplasts²³ i el reconeixement de la dimetil caseïna (DMC) com un substrat exogen, han estat descrites per a aquest grup d'enzims vegetals^{43,44}.

La primera clonació d'una transglutaminasa vegetal. La transglutaminasa de blat de moro (TGZ)

El creixent interès de les possibles funcions de les transglutaminases en plantes es degut a la seva habilitat d'unir covalentment poliamides d'algunes proteïnes, per tant modificant la seva estructura i afavorint canvis conformacionals. Tanmateix, tot i que les investigacions han permès interpretar alguns dels mecanismes mitjançant els quals les poliamines afecten al creixement i la diferenciació cel·lular, algunes de les seves propietats bioquímiques i fisiològiques fonamentals encara no han estat explicades⁴⁵.

Un pas important per entendre els processos fisiològics en que estan involucrades les transglutaminases vegetals es va donar al grup del Dr. Torné, i va ser el primer aïllament de dos clons de cDNA a partir d'una llibreria de blat de moro (*Zea mays*), tgz15 (gen de la transglutaminasa amb 15 "repeats") i tgz21 (gen de la transglutaminasa amb 21 "repeats"), que codifiquen una transglutaminasa cloroplàstica activa (TGZ). La lisis d'extractes d' *Escherichia coli* (*E. coli*) transfectada amb els bacteriòfags portadors de cada un dels cDNA va presentar nivells significatius d'activitat transglutaminasa. Es va comprovar que aquests enzims tenien característiques bioquímiques pròpies de les

TGases. Al mateix treball es va demostrar que la llum estimulava l'activitat d'aquest enzim en plantes de blat de moro⁴⁶.

En treballs previs del grup de recerca s'ha establert una relació de l'activitat transglutaminasa amb les poliamines i que aquest procés es sensible a la llum i regulat per un ritme diari^{42,47}. Posteriorment aquest enzim es va immunolocalitzar trobant-se majoritàriament en els grana dels cloroplasts⁴⁸.

Recentment, mitjançant tècniques de proteòmica, s'ha identificat una TGasa que forma part de les proteïnes associades a la membrana de tilacoides de cloroplasts de blat de moro. En aquest treball, s'ha descrit que TGZ es troba associada a les proteïnes antena LHCII, a la proteïna PsbS (relacionada amb la fotoprotecció) i la ATPasa cloroplàstica⁴⁹.

Sobreexpressió de TGZ en hostes heteròlegs

TGZ s'ha sobreexpressat amb èxit en *E. coli*, on manté les seves característiques enzimàtiques. Aquesta proteïna ha estat correctament expressada, i tot i que es troba acumulada en la major part en forma de cossos d'inclusió (IB's), s'ha obtingut prou proteïna activa per ser caracteritzada mitjançant el replegament ("refolding") o la solubilització d'aquesta fracció en detergent no desnaturalitzant ^{43,50}.

Per un altre part, s'ha demostrat que la sobreexpressió de TGZ en cloroplasts de tabac (*Nicotiana tabacum*) mitjançant la transformació plastidial (transplastòmica), indueix un augment significatiu del nombre de tilacoides del grana, el que provoca canvis importants en els paràmetres fotosintètics de les plantes transplastòmiques, sobretot en tot el relacionat amb fotoprotecció. L'activitat TGasa en les plantes transformades de tabac va ser 4 cops major en comparació amb les plantes control. El contingut de poliamines unides a proteïnes de les plantes transformades era significativament més alta que en les plantes silvestres. El fenotip de les plantes transformades amb TGZ, va resultar alterat, presentant fulles de color verd pàl·lid i pèrdua de fertilitat. Una comparació funcional entre el tabac silvestre i el transformat, va mostrar una variació en els paràmetres fotosintètics. A l'augmentar l'edat de la planta, degut a l'excés de sobreexpressió de la proteïna, que s'acumula en forma de cossos d'inclusió en el cloroplast, es produeix un excés oxidatiu seguit de la destrucció de l'organel^{22,24,51}. Aquests estudis han demostrat la relació directa de TGZ amb l'apilació dels grana i la fotoprotecció, probablement mitjançant els mecanismes d'unió de poliamines a les seves proteïnes substrat (preferentment les proteïnes antena).

Durant la redacció d'aquest treball, ha estat publicat un estudi en el que s'expressa TGZ en *Pichia pastoris*⁴⁴ a escala de matràs. Els resultats obtinguts es comparen amb el d'aquest treball en la discussió de resultats.

Característiques de TGZ

Com a la majoria de transglutaminases, la TGZ comparteix un seguit d'estructures comuns dins de la seqüència de la proteïna. Entre els trets més característics hi figuren, la presència d'una tríada catalítica (Cys-His-Asn/Asp), la seva dependència de calci i la presència de seqüències repetides en tàndem ("repeats").

Els anàlisis comparatius de la seqüència d'aminoàcids deduïda de TGZ (estructura primària) predeien la presència d'un pèptid transit a cloroplast amb dos llocs de fosforilació, tres llocs de N-miristoilació i una diana de tipus serin proteasa de l'aminoàcid 58 al 68. Treballs posteriors de transformació de plantes d'arròs amb una seqüència truncada de TGZ van demostrar la presència de aquest pèptid senyal⁵². En la resta de la seqüència es va identificar un lloc putatiu d'unió a ATP/GTP i al calci. Es va identificar la tríada catalítica (Cys439, His446 i Asp471, para la TGasa de 15 "repeats" i Cys493, His500 i Asp525, para la TGasa de 21 "repeats") característica del domini tipus transglutaminasa (Figura 6). El primer anàlisi tipus BLAST d'una seqüència de transglutaminasa vegetal va indicar que el factor V de coagulació sanguínia del porc i humà eren proteïnes afins a aquesta a nivell de la zona de "repeats"⁴⁶.

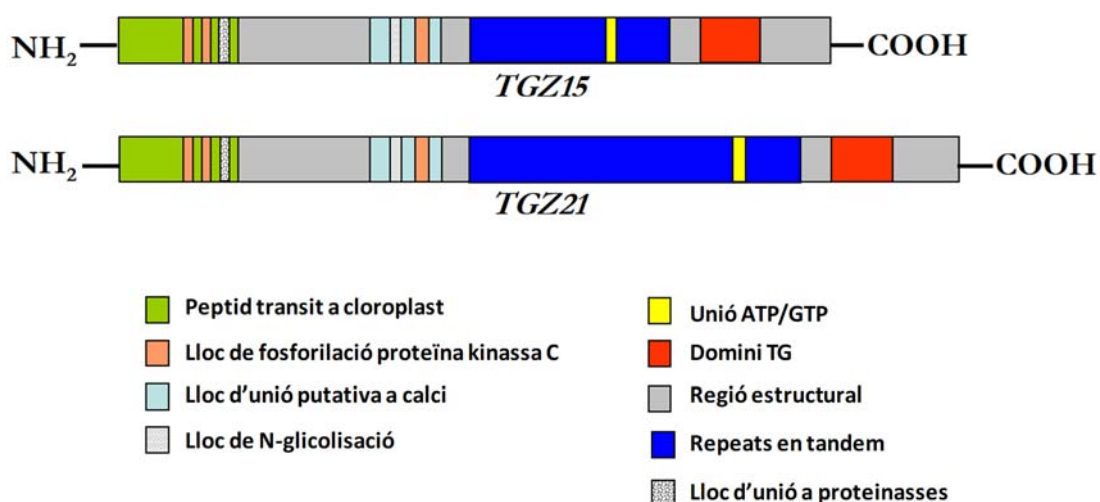


Figura 6 Representació esquemàtica de les proteïnes TGZ15 i TGZ21 indicant els seus dominis.

1.1.6 Importància biotecnològica i industrial de les transglutaminases

Les múltiples aplicacions biotecnològiques de les TGases són conseqüència del tipus de reaccions que catalitzen i que donen com a resultat la modificació de proteïnes o de pèptids, els quals pateixen canvis en les seves propietats físiques, químiques i biològiques. El fet que s'hagin trobat TGases en diferents organismes, explica l'existència de diferències en les seves propietats físiques i bioquímiques.

Les TGases d'origen bacterià (*Streptovorticillum sp*) han estat explotades com a biocatalitzadors en una àmplia gamma de sectors comercials que van des de la indústria tèxtil a la cosmètica, passant pel sector alimentari⁵³. Són nombroses les patents d'aplicació en què intervenen les transglutaminases⁵⁴.

Sota condicions normals, les TGases són presents en molt baixes concentracions, el que fa que el procés d'aïllament i purificació sigui complex. Aquest fet va portar a la recerca de noves fonts de TGases amb el propòsit de desenvolupar processos de producció i purificació, així com per caracteritzar nous membres d'aquesta família d'enzims⁵⁵.

La primera TGasa que es va produir per a fins alimentaris, es va sobreexpressar en *Streptovorticillum sp.*, a l'empresa Ajinomoto (Japó), qui va patentar el procediment i posteriorment les diferents millores d'aquest protocol inicial²⁰. Així mateix aquesta empresa té patentat un altre sistema similar amb l'ostra *Crassostrea gigas*⁵⁶. La patent actual descriu la producció de transglutaminasa microbiana (MTGasa) aïllada a partir de *Streptovorticillum ladakanum* i *Streptovorticillum mobaraense*^{57,58}. La seva aplicació principal és la millora de les propietats mecàniques del gel de surimi i de diversos preparats de peix i carn, donant-li textura i estructuració, així com resistència a la calor. La seva aplicació en la fabricació de preparats de productes làctics i derivats de la soja és també de gran importància.

La seva capacitat de modificar proteïnes i actuar com una cola natural, ha propiciat el descobriment i desenvolupament de nous productes comercials. Recentment, s'ha explorat el seu ús en la indústria dels biopolímers i ha donat bons resultats. Inicialment es va emprar com modificadora de l'estructura i posteriorment per a la formació de homo i heteropolímers (veure Figura 7), o polímers d'alt pes molecular, afavorint una disminució de la solubilitat dels films proteics, el que incrementa la seva elasticitat⁵⁹.

L'obtenció de noves variants de l'enzim és un altre punt d'interès. Quan aquests enzims són destinats a usos terapèutics, la majoria de TGases són extretes de les seves fonts naturals natives, com ara de teixits animals o per fermentació microbiana. Això fa

necessari la utilització de processos de purificació que, en la majoria de casos, son lents i costosos, ja que s'ha de purificar únicament la proteïna activa, eliminant altres formes d'aquesta que poguessin resultar tòxiques⁶⁰.

Respecte de les diferents TGases identificades i les seves aplicacions biotecnològiques, així com d'aquelles en que el DNA ha estat clonat, es pot trobar informació més detallada a Santos i Torné ⁵⁴.

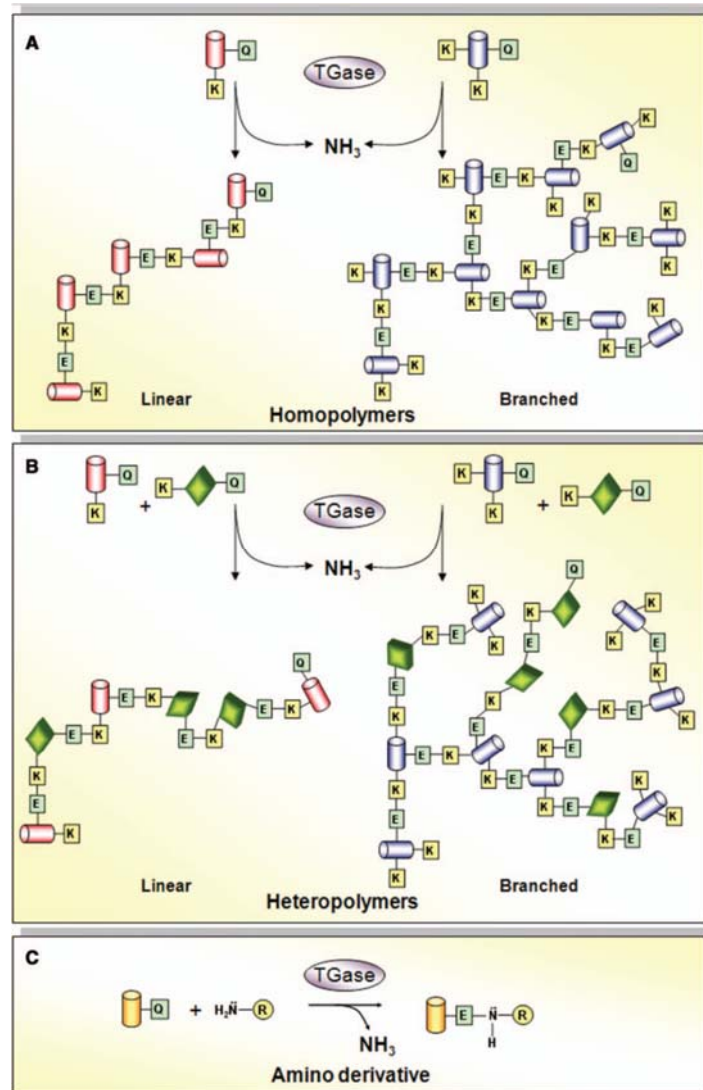


Figura 7 Reaccions catalitzades per transglutaminases, per a la formació d'homopolímers i heteropolímers. La reacció transamidació en presència d'una TGasa, ocorre quan el acil acceptor provinent ja sigui d'una proteïna que conté un residu de lisina o d'una molècula de baix pes que conté el grup amino, genera una reacció d'entrecruament, "crosslink" ja sigui lineal (homopolímers) o ramificada (heteropolímers) mitjançant la formació d'enllaços ε-(γ-glutamil) lisin, (esquema A i B), o aminoderivats de proteïnes (esquema C)

Malgrat el gran esforç i l'interès en aquests enzims, encara hi ha característiques poc conegudes, això es deu principalment a tres factors:

1. No es disposa d'una visió completa de les funcions de la majoria dels membres de la família de les TGases. Això fa difícil emmarcar l'enzim dins d'una classificació estructural / funcional ben definida.
2. La majoria dels membres d'aquesta família posseeixen més d'una o dues funcions enzimàtiques, les quals en ocasions es troben parcialment relacionades o contraposades (TGasa i GTPasa, segons disponibilitat de calci).
3. El nombre de membres de la família i, en conseqüència, la llista completa de les seves substrats està en constant creixement².

Per a l'expressió de transglutaminases més complexes d'origen humà, com ara el factor XIII, s'han hagut de utilitzar sistemes capaços de realitzar les transformacions post-traduccionals adequades perquè la proteïna arribi a la forma activa. Es per aquesta raó que per a l'expressió de factor XIII s'acostuma a utilitzar llevats com *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* com a microorganismes hostes. En aquest camí, s'ha aïllat la seqüència de DNA complementari que codifica el factor XIII que es produeix en la placenta humana. S'han transformat cèl·lules de llevat *Saccharomyces cerevisiae* que disposen del promotor ADH2-4 pel control del sistema d'expressió. Per aquesta via s'ha aconseguit expressar transglutaminasa recombinant que una vegada purificada exhibeix un 100% de activitat enzimàtica respecte el factor XIII original. El fet de disposar de proteïnes recombinants humanes per raons terapèutiques proporciona una alternativa de poc risc al material purificat de fonts humanes⁶¹.

1.2 Expressió de proteïnes a *Escherichia coli*

Escherichia coli és un bacteri de la família *Enterobacteriaceae*, del grec *enterikos* que significa "el que pertany a l'intestí". De fet, *E. coli* es troba de manera molt usual en el tracte intestinal humà i d'altres animals de sang calenta. Existeixen estudis que indiquen que el 0.1% de la flora intestinal d'un adult que segueix una dieta occidental correspon a *E. coli*⁶². En el camp de la bacteriologia sanitària *E. coli* és considerat un indicador primari de pol·lució fecal. El nom del gènere *Escherichia* prové del nom del científic Escherich, que el 1885 va ser el primer en aïllar i caracteritzar aquest bacteri.

Entre els múltiples sistemes d'expressió disponibles per a la producció de proteïnes heteròlogues, *E. coli* es un dels més utilitzats degut a la seva capacitat de créixer

ràpidament a densitats cel·lulars elevades utilitzant substrats econòmics, a que està molt ben caracteritzat genèticament i també per la disponibilitat de multitud de vectors de clonació i soques mutants. Degut a que no hi ha garantia que el producte d'un gen recombinant s'acumuli de forma completa i biològicament activa, s'està treballant constantment en la millora dels sistemes d'expressió⁶³.

Un dels majors desavantatges d'aquest sistema d'expressió recau en l'expressió de proteïnes d'origen eucariota. Malgrat que qualsevol tipus de proteïna eucariota pot ser traduïda per aquest hoste, moltes d'elles no són processades correctament i per tant no són funcionals. *E. coli* construeix l'estructura primària correctament, igual que succeeix quan la proteïna és produïda per la cèl·lula original, però sovint és incapaç de realitzar les transformacions post-traduccionals adequades per arribar a la forma activa.

En els microorganismes bacterians, la informació genètica exògena és introduïda normalment mitjançant plasmidis. El plasmidi és una molècula de DNA circular que pot existir independent del cromosoma bacterià i que conté diversos gens.

Els plasmidis no són essencials per a la vida cel·lular, però plasmidis d'origen natural poden codificar factors que protegeixen les cèl·lules dels antibiòtics o d'altres compostos nocius⁶⁴.

En els plasmidis desenvolupats per les tècniques de DNA recombinant s'acostuma a inserir un marcador selectiu que atorga al microorganisme resistència a certs antibiòtics. Això permet afavorir el creixement únicament de les cèl·lules que contenen el plasmidi. També ha de contenir un promotor, que es un fragment de DNA que està situat abans del gen exogen i que controla la seva expressió.

Nombre de còpies d'un plasmidi i estabilitat plasmídica.

Per aconseguir que la cèl·lula produeixi un elevat nombre de còpies del gen d'interès, el fragment de DNA corresponent es clona en plasmidis que es repliquen dins la cèl·lula. Cada cèl·lula recombinant pot tenir des de 15 a 60 còpies (per exemple, plasmidis pMB1/ColE1 i derivats) a uns pocs centenars de còpies per cèl·lula (per exemple, la sèrie PUC de pMB1 i derivats)⁶⁵.

En condicions de laboratori, els plasmidis multicòpia es distribueixen a l'atzar durant la divisió cel·lular i, en absència de pressió selectiva, es perden a baixa freqüència (10^{-5} - 10^{-6} per generació) principalment com a resultat de multimerització⁶⁶. No obstant això, la pèrdua de plasmidis pot augmentar molt en el cas de plasmidis amb un nombre de còpies molt elevat, també quan l'expressió dels gens que tenen inserits es tòxica per a l'hoste.

Altres situacions que afavoreixen la pèrdua de plasmidis son per exemple, quan la presència del plasmidi provoca una reducció significativa de la velocitat de creixement de l'hoste, o quan les cèl·lules es cultiven a alta densitat o en processos de cultiu continu (elevat nombre de generacions).

La presència d'un alt nombre de còpies d'un plasmidi dins de la cèl·lula condueix generalment a una alta productivitat. El desenvolupament de les cèl·lules lliures de plasmidi pot donar lloc a una pèrdua significativa de la productivitat. Quan una cèl·lula es divideix i passa els plasmidis a les cèl·lules filles, de manera que cada cèl·lula filla té almenys una còpia, el sistema mostra estabilitat del plasmidi⁶⁷. El nombre de còpies del plasmidi es pot definir com "còpies per cèl·lula"⁶⁸ i "còpies per cromosoma"⁶⁹.

La correcta partició de plasmidis a les cèl·lules filles és un problema central en els sistemes d'expressió dependents d'aquests. Els plasmidis són sempre una càrrega metabòlica de les cèl·lules, el que condueix a una tendència cap a les cèl·lules lliures de plasmidi durant els cultius⁷⁰. La fórmula és senzilla: l'aparició de cèl·lules lliures de plasmidi significa una reducció en l'expressió del producte recombinant⁷¹.

Un dels problemes durant els cultius és que, normalment, les cèl·lules lliures de plasmidi tenen una velocitat específica de creixement més alta, en comparació amb la velocitat de creixement de les cèl·lules que alberguen plasmidis⁷². Si sorgeixen cèl·lules lliures de plasmidi a l'inici del cultiu, aquestes poden créixer fins a esdevenir la pràctica totalitat de la població. Al final del cultiu es pot aconseguir una gran quantitat de biomassa, però exempta de plasmidis i per tant inhàbil per l'expressió del producte recombinant. Aquest fet explica el motiu de l'existència de tants estudis enfocats a millorar l'estabilitat dels plasmidis. Això és fàcil d'aconseguir a nivell de tubs d'assaig i matrassos, però és un veritable desafiament en bioreactors o cultius a escala industrial⁶⁷.

La manera més simple d'abordar aquest problema és utilitzar marcadors de resistència a antibiòtics i complementar el medi de creixement amb antibiòtics per eliminar les cèl·lules lliures de plasmidi. Tanmateix, l'ús d'antibiotics preenta inconvenients biològics, ambientals y de cost⁶⁷.

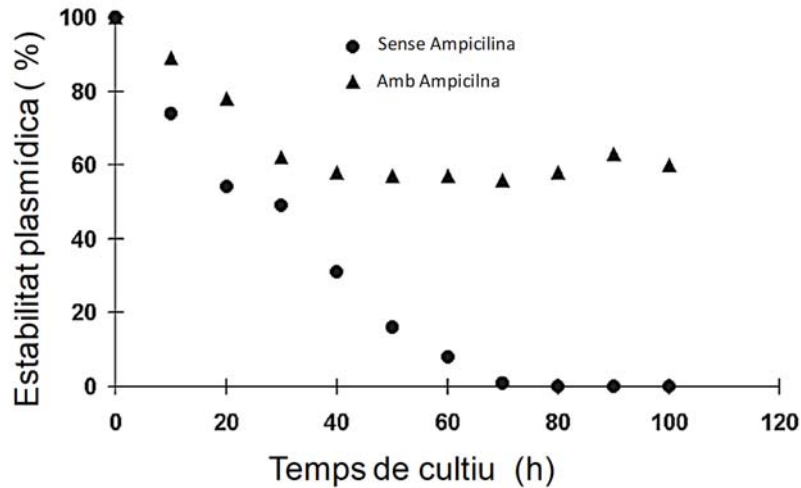


Figura 8 Evolució de l'estabilitat plasmídica d'un cultiu amb i sense antibiòtic selectiu⁶⁷.

Al llarg dels anys s'han desenvolupat un gran nombre d'estratègies alternatives als antibiòtics per tal d'assegurar que les cèl·lules lliures de plasmidis no esdevinguin majoritàries en el cultiu. En la majoria dels casos, els vectors de clonació estan dissenyats per dur un gen o repressor que causen la mort cel·lular després de la pèrdua del plasmidi. Aquests enfocaments han demostrat ser molt útils, però poden establir restriccions en la composició del medi de cultiu i introduir una càrrega metabòlica addicional en la cèl·lula, ja que exigeixen transcripció, traducció, i sovint, de gens codificants en plasmidis addicionals. Per evitar aquests problemes, Williams et al⁷³ van crear una soca hoste que conté un gen condicionalment essencial sota el control de la regió de l'operador / promotor lac i un plasmidi multicòpia company que conté l'operador lac. La regulació de la proteïna repressora LacI per part dels operadors lac codificats pels plasmidis dona lloc a l'expressió del gen cromosòmic (en aquest cas resistent a la kanamicina) i el creixement selectiu de les cèl·lules portadores de plasmidi en un medi complementat amb l'antibiòtic. La substitució del casset de resistència a la kanamicina per un gen essencial per a l'hoste millora el valor d'aquest sistema mitjançant l'eliminació de les desavantatges associades amb l'ús de la resistència als antibiòtics.

Una solució radicalment diferent al problema de la inestabilitat dels plasmidis és la inserció directa de gens heteròlegs dins del cromosoma d'*E. coli*. Tot i que els vehicles de lliurament són simples (per exemple, bacteriòfag λ) i estan disponibles per a aquest propòsit, s'ha posat poc èmfasi en aquesta estratègia a causa de la percepció generalitzada de que la dosi de gens serà necessàriament baixa. No obstant això, un cop s'ha aconseguit la inserció cromosòmica d'un únic fragment de DNA que conté un

marcador de resistència a fàrmacs i flanquejat per dues repeticions directes curtes, tot el fragment pot ser amplificat a 15-40 còpies a través de duplicacions intermedi de RecA, mitjançant l'augment de la concentració d'antibiòtic⁷⁴.

Les limitacions de nutrients en el medi de cultiu pot augmentar el nombre de còpies del plasmidi. Això pot aconseguir per limitacions en els aminoàcids⁷⁵, en fosfat⁷⁶ o en ferro⁷⁷. Es pot suposar que els efectes observats són similars als dels plasmidis durant l'amplificació amb cloranfenicol⁷⁸.

No només les condicions de cultiu per al creixement de microorganismes mostren influències en el nombre de còpies, sinó que, el creixement cel·lular pot ser influenciat pel nombre de còpies. Per mantenir un alt nombre de còpies, les cèl·lules han d'invertir energia i metabòlits en la maquinària de replicació. Aquest fet pot disminuir la taxa de creixement^{79,80}. D'altra banda, una baixa taxa de creixement, aconseguida deliberadament mitjançant les condicions específiques de cultiu, pot augmentar el nombre de còpies⁸¹.

Promotors

Durant molts anys, l'operó d'utilització de lactosa d'*E. coli* (*lac*) ha servit com un dels paradigmes de la regulació procariòtica. Per tant, no és sorprenent que molts dels promotors utilitzats per conduir la transcripció de gens heteròlegs s'han construït a partir d'elements reguladors *lac*-derivats. Tot i que el promotor *lac* i el seu parent proper, *lacUV5*, són més aviat febles i poques vegades s'utilitzen per a nivells alts de producció de polipèptids recombinants, aquestes són eines de gran valor per aconseguir l'expressió gradual de proteïnes tòxiques.

La inducció de l'expressió es realitza mitjançant l'addició d'isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosid (IPTG), un anàleg no metabolitzable de la lactosa. Sovint s'argumenta que el cost de IPTG limita la utilitat d'aquests promotors, encara que això no sol ser un problema en els productes d'alt valor afegit. D'altra banda, normalment una concentració molt baixa, d'entre 50 i 100mM IPTG, és en general suficient per aconseguir la inducció completa. La toxicitat de l'IPTG pot esdevenir el problema més greu en certs casos, encara que es pot evitar mitjançant la utilització de lactosa com a inductor o de variants termosensibles de la proteïna repressora *Lacl* que permeten la inducció tèrmica de la síntesi de proteïna recombinant⁸².

En els últims anys, els vectors pET (comercialitzats per Novagen, Madison, WI) han guanyat cada vegada més popularitat. En aquest sistema, els gens diana es col·loquen

aigües avall del promotor bacteriòfag T7 en plasmidis de nombre mitjà de còpies. Típicament, els amfitrions de producció contenen un pròfag (λ DE3) que codifica l'enzim sota el control del promotor induïble per IPTG lacUV5. Mentre que aquest sistema condueix a la síntesi de grans quantitats d'ARN missatger (ARNm), i, molts casos, l'acumulació de la proteïna desitjada a concentracions molt altes (40-50% de la proteïna cel·lular total), pot presentar inconvenients.

Una limitació dels sistemes de promotors T7 i altres promotors forts és que la proteïna diana és sovint incapaç d'arribar a una conformació nativa i s'acumula parcialment o totalment en forma de cossos d'inclusió. Encara que aquest problema pot ser abordat coexpressant moduladors del plegament o per mitjà de la tecnologia de les proteïnes de fusió (veure més a baix), un enfocament alternatiu és utilitzar promotors que s'activen per reducció de la temperatura. Aquesta estratègia té l'avantatge addicional de que el plegament de les proteïnes és veu sovint afavorit per les condicions de cultiu a baixa temperatura.

Entre els diversos promotors induïbles nutricionalment (per exemple, *phoA* i *trp*, que són induïts pel fosfat i la limitació de triptòfan respectivament), el promotor d'arabinosa (*araBAD* o P_{BAD}) es molt utilitzat degut a que fa servir el sucre de baix cost L-arabinosa com a inductor i que és una mica més feble que el promotor lac. Encara que en general es creu que *araBAD* es pot utilitzar per aconseguir nivells variables d'expressió de la proteïna mitjançant la variació de la concentració d'arabinosa, hi ha una àmplia heterogeneïtat en les poblacions de cèl·lules tractades amb concentracions subsaturants l'inductor, obtenint-se alguns bacteris completament induïts i d'altres sense res d'inducció⁸³. Per tant, *araBAD* no es útil per controlar de forma precisa els nivells d'acumulació de proteïna. Existeixen promotors addicionals regulats per una varietat de senyals (pH, concentració d'oxigen dissolt, la osmolaritat, etc) que estan disponibles comercialment⁸⁴.

Les diferències en l'ús de codons entre procariotes i eucariotes, poden tenir un impacte significatiu en la producció de proteïnes heteròlogues. Els codons d'arginina AGA i AGG poques vegades es troben en els gens d'*E. coli*, mentre que són comuns en *Saccharomyces cerevisiae* i altres eucariotes. La presència de tals codons en els gens clonats afecta els nivells d'acumulació de la proteïna, l'ARNm i l'estabilitat del plasmidi i, en casos extrems, inhibeix la síntesi de proteïnes i el creixement cel·lular⁸⁵. Afortunadament, aquests problemes generalment es poden tractar mitjançant l'ús de

mutagènesi dirigida per reemplaçar els codons d'arginina rars pels codons CGC (més adients en *E. coli*).

Plegament en el citoplasma i les xaperones

La sobreproducció de proteïnes heteròlogues en el citoplasma d'*E. coli* provoca sovint el seu mal plegament i l'acumulació en agregats insolubles coneguts com a cossos d'inclusió. Tot i que la formació de cossos d'inclusió pot simplificar en gran mesura la purificació de proteïnes, no es garanteix que el replegament *in vitro* donarà lloc a grans quantitats de producte biològicament actiu. L'enfocament tradicional per reduir l'agregació de proteïnes és a través la reducció de la temperatura de cultiu^{86,87}. Un altre estratègia molt utilitzada es el plegament de proteïnes assistit per xaperones moleculars, que promouen la correcte isomerització i interactuen temporalment com a intermediaris del plegament accelerant els passos limitants. Les xaperones per tant han proporcionat noves i potents eines per combatre el problema de la formació de cossos d'inclusió⁸⁶.

Les xaperones moleculars millor caracteritzades en *E. coli* són els sistemes ATP dependents de DnaK-DnaJ-GrpE i de GroEL-GroES^{88,89}. DnaK s'uneix a regions hidròfobes exposades al dissolvent evitant d'aquesta manera les reaccions de la ruta metabòlica que condueix a l'agregació. DnaJ s'uneix de forma independent als intermediaris del plegament i activa DnaK per a que formi una unió ferma amb el substrat i així poder dirigir-lo a llocs d'alta afinitat. El factor GrpE d'intercanvi de nucleòtids intervé en el procés d'alliberament de les proteïnes ja replegades. En el cas de que el replegament no sigui complet, les guia per a ser recapturades per DnaK-DnaJ per a cicles addicionals d'interacció o bé per a ser transferides de forma reversible al processat corrent avall de les xaperonines GroEL-GroES.

GroEL és un toroide buit d'uns 800kDa format per dos anells homoheptamèrics apilats. Uneix les proteïnes substrat i Groes (un homoheptàmer de 70kDa en forma de cúpula) a través d'un anell de residus hidrofòbics situats en el seu domini apical. Un cop GroES s'uneix, els intermedis de plegament s'alliberen a la cavitat interior de GroEL on es poden plegar en un entorn encapsulat i hidròfil. Hi ha una àmplia evidència que la coproducció excessiva de xaperones GroEL-GroES DnaK-DnaJ pot augmentar en gran mesura els rendiments de producció de proteïnes solubles propenses a l'agregació⁹⁰. Existeixen varis plasmidis compatibles amb vectors de clonació derivats de pMB1 que estan disponibles per a aquest propòsit⁹¹⁻⁹³. Aquest procés no implica la dissolució de cossos d'inclusió recombinants ja formats, sinó que està relacionat amb la millora de plegat de

les cadenes de proteïnes recent sintetitzades⁹³. És important assenyalar que l'efecte beneficiós associat amb un augment en la concentració intracel·lular de DnaK-DnaJ i GroEL-GroES és altament dependent de la naturalesa de la proteïna sobreexpressada, i que l'èxit és de cap manera garantit (i molt poc probable si la proteïna és inherentment incapaç de plegar-se).

Les proteïnes de fusió

Encara que les proteïnes de fusió van ser construïdes originalment per facilitar la purificació i la immobilització de proteïnes i per acoblar l'activitat dels enzims que actuen en una mateixa ruta metabòlica, aviat es va fer evident que certes proteïnes de fusió poden millorar en gran mesura la solubilitat de les proteïnes que d'una altra manera s'acumulen dins dels cossos d'inclusió en el citoplasma de la cèl·lula. Sistemes adequats per a la construcció de fusions amb la proteïna d'unió a maltosa (MBP), tioredoxina i glutatió s-transferasa estan disponibles comercialment^{94,95}. La raó més probable per a la millora de plegat (i/o reducció de la degradació) de les proteïnes és que la parella de fusió arriba de manera eficient i ràpidament en una conformació nativa quan es desprèn dels ribosomes (o poc després del seu llançament), i promou l'adquisició de l'estructura correcta en unitats plegables aigües avall, en afavorir reaccions d'isomerització a la via. Actualment els principals desavantatges de les tecnologies de proteïna de fusió són: en primer lloc, que l'alliberament de les proteïnes d'acompanyament requereixen proteases cares (per exemple, factor Xa i enteroquinasa), en segon lloc, que l'escissió poques vegades es completa totalment, amb la consegüent reducció dels rendiments, en tercer lloc, pot ser que siguin necessaris passos addicionals per obtenir un producte actiu (per exemple, formació i isomerització d'enllaços disulfur) i finalment, que la solubilitat mai està garantida.

Cultius d'alta densitat.

E. coli és la plataforma bacteriana més important per a l'expressió de proteïnes heteròlogues simples. El cultiu d'*E. coli* a altes densitats ha estat l'objecte de nombrosos estudis des de principis de la dècada de 1970, explorant els límits de la densitat de cultiu bacterià per tal d'aconseguir la màxima productivitat. Les investigacions s'han centrat en la millora de les tècniques de cultiu, la manipulació de la fisiologia del bacteri, o ambdós alhora. Com a resultat s'han desenvolupat les estratègies de cultiu batch (per lots), fed-batch (lots alimentats) i tècniques de cultiu utilitzant diàlisi. Aquestes estratègies de

creixement, juntament amb l'optimització de la composició dels medis de cultiu i l'aplicació de mètodes de biologia molecular, fan possible el cultiu d'*E. coli* a densitats cel·lulars molt elevades⁹⁶.

La limitació i/o inhibició de substrat, la capacitat de transferència d'oxigen, la formació de subproductes del metabolisme i l'evacuació del calor, son els principals problemes que apareixen en els cultius d'alta densitat.

La màxima densitat cel·lular teòrica que es podia obtenir seria la corresponent a un cultiu en que les cèl·lules ocupessin tot l'espai disponible en el medi. Aquest valor s'estima en 400g/L⁹⁷ i coincideix a la densitat cel·lular que s'obté al centrifugar un cultiu a altes revolucions. A la pràctica les màximes densitats cel·lulars que s'han publicat estan per sota dels 220g/L⁹⁸⁻¹⁰⁰ degut a totes les limitacions que es descriuen a continuació:

1. Les concentracions necessàries d'alguns dels components del medi per a arribar a altes densitats cel·lulars poden resultar inhibidores per al creixement cel·lular. A la Taula 1. es presenten les concentracions inhibidores d'alguns dels components més comuns del medis de cultiu.

Taula 1 Concentracions inhibidores de diversos components del medi de cultiu⁹⁷.

Component	Concentració inhibidora
Glucosa	50 g/L
Amoni	3 g/L
Fòsfor	10 g/L
Magnesi	8,7 g/L
Molibdè	0,8 g/L
Bor	44 mg/L
Coure	4,2 mg/L
Manganès	68 mg/L
Cobalt	0,5 mg/L
Zenc	38 mg/L
Ferro	1,15 g/L

Per tal d'evitar la inhibició per substrat se sol començar el cultiu amb una concentració inferior a la inhibidora i s'afegeix la quantitat necessària de cada un dels components a mesura que progressa el cultiu i aquests es van consumint. Aquesta forma de cultiu es coneix com a fed-batch (lot alimentat).

2. Un altre possible punt limitant per arribar a altes densitats cel·lulars es la gran quantitat d'oxigen que requereix el cultiu. La transferència d'oxigen de la fase gasosa a la fase líquida depèn fonamentalment de l'aireació (flux i composició), l'agitació (tipus de pala i velocitat), la pressió parcial d'oxigen i la composició i temperatura del medi de cultiu.
- aireació: el flux d'aire està limitat per la velocitat d'evaporació i per la formació d'espuma. A escala de laboratori es pot incrementar considerablement el flux d'aire i es pot enriquir el corrent d'entrada amb oxigen pur. En aquest últim cas cal tenir en compte l'efecte oxidant, important sobretot si el producte s'excreta extracel·lularment. A escala industrial, una aireació molt elevada o l'ús d'oxigen pur poden encarir molt el procés.
 - agitació: depenent del cultiu cel·lular s'utilitzen diversos tipus d'agitadors que proporcionen una transferència d'oxigen més o menys bona. El punt limitant en aquest apartat es l'esforç tallant que s'exerceix sobre les cèl·lules. Una agitació massa intensa pot provocar danys a les cèl·lules.
 - pressió: a l'augmentar la pressió dins del reactor on es realitza el cultiu s'aconsegueix augmentar la pressió parcial d'oxigen i per tant la seva solubilitat. L'inconvenient d'aquesta estratègia es que a part de l'oxigen també augmenta la solubilitat del diòxid de carboni que pot tenir un efecte tòxic sobre el cultiu, altes pressions parcials de CO_2 ($>0,3$ bar) poden fer baixar la velocitat específica de creixement i estimular la producció d'acetat¹⁰¹. Una altra limitació d'aquesta estratègia es que es pot aplicar només a reactors pressuritzables.
 - composició i temperatura del medi de cultiu: la composició del medi de cultiu i la temperatura en que es realitza el creixement afecten la solubilitat de l'oxigen. Tanmateix aquests dos paràmetres no s'acostumen a variar i simplement cal tenir-los en compte a l'hora de dissenyar el procés.
3. Tot i que la formació de subproductes del metabolisme, com ara l'acetat, pot reduir-se creixent les cèl·lules a baixes velocitats de replicació, la seva formació no es pot eliminar totalment. Normalment la formació d'aquests subproductes ve lligada a la saturació de la cadena de transport electrònic que es manifesta quan la velocitat de creixement es molt elevada o quan hi ha limitació d'oxigen en el medi.

4. En grans fermentadors industrials, pot ser que l'element limitant esdevingui l'eliminació de la calor metabòlica ja que degut a la geometria del canvi d'escala resulta molt més complicat extreure la calor que en reactors de laboratori o pilot⁹⁷.

Estratègies per a cultius d'alta densitat cel·lular

L'estratègia utilitzada per a alimentar els nutrients en un cultiu es crítica per a poder obtenir altes densitats cel·lulars ja que no només determina la concentració màxima a la que arribarà el cultiu sinó que també determina la productivitat del procés. Normalment totes les estratègies es realitzen mitjançant limitació de carboni ja que d'aquesta manera es pot controlar la velocitat específica de creixement.

Estratègies amb control per previsió

- 1- Alimentació constant: s'addicionen els nutrients a un flux constant, això provoca que la velocitat vagi disminuint a mesura que el cultiu progressa.
- 2- Alimentació variable: l'alimentació s'incrementa al llarg del temps. L'increment pot ser gradual, esglaonat o lineal. El que busca aquest tipus d'alimentació es compensar la disminució en la velocitat específica de creixement que es produeix en l'alimentació constant augmentant la velocitat d'addició de nutrients al llarg del temps.
- 3- Alimentació exponencial: s'alimenten els nutrients de forma exponencial, d'aquesta manera es pot obtenir una velocitat específica de creixement constant al llarg del temps. Aquesta estratègia funciona molt bé a l'inici dels cultius, però si apareix qualsevol pertorbació (limitació d'oxigen, acumulació d'inhibidors, etc) pot ser que la velocitat de creixement real es desviï de la prevista i es produeixi una acumulació de nutrients en el medi. Per tal d'assegurar una velocitat de creixement constant es necessita un control amb realimentació.

Estratègies de control amb realimentació

- a) Control per realimentació indirecte

- 1- DO-stat: quan es detecta una pujada constant en el nivell d'oxigen dissolt indica que el substrat s'ha acabat; en aquest moment el controlador afegeix nutrients al medi i el nivell d'oxigen dissolt torna a baixar. Aquesta estratègia es molt útil sobretot quan es treballa amb substrats que són tòxics per als microorganismes, fins i tot a baixes concentracions.
- 2- pH-stat: aquesta estratègia funciona d'un mode molt similar a l'anterior. El controlador alimenta nutrients quan hi ha una pujada en el pH. Aquesta pujada es deguda a l'esgotament de la font de carboni i com a conseqüència augmenta la concentració de ions amoni excretats per les cel·lules¹⁰². Un cop s'addiciona la font de carboni el pH torna a baixar.
- 3- CER: de l'anglès "Carbon dioxide Evolution Rate". Es mesura la producció de diòxid de carboni a la sortida de gasos del cultiu. Aquest valor es pràcticament proporcional a la velocitat de consum de nutrients en el medi i per tant permet determinar la quantitat de nutrients a afegir per a que les cèl·lules tinguin un ritme metabòlic determinat. Es un mètode molt utilitzat per obtenir una velocitat específica de creixement constant.
- 4- Concentració cel·lular: es basa en la mesura de la concentració cel·lular en línia mitjançant un analitzador (òptic, capacitiu, etc) i a partir d'aquesta mesura s'afegeix la quantitat de nutrients corresponent per tal de mantenir la velocitat de creixement desitjada.

b) Control per realimentació directe

Control de la concentració de substrat: L'adició de nutrients es controla directament segons la concentració de la font de carboni principal. Un exemple d'aquesta estratègia seria la introducció d'un analitzador de glucosa en línia.

1.3 Expressió de proteïnes a *Pichia pastoris*

Koichi Ogata i col·laboradors¹⁰³ van descriure per primer cop l'any 1969 l'habilitat de certs llevats per utilitzar el metanol com a única font de carboni i energia. Els llevats metilotròfics van atraure ràpidament l'atenció degut a la possibilitat de ser utilitzats com a font de proteïnes de baix cost per a alimentació animal. Durant els anys 70 la companyia Phillips Petroleum Company va desenvolupar medis de cultiu i protocols per fer créixer *Pichia pastoris* a altes concentracions cel·lulars en cultiu continu, utilitzant

metanol com a font de carboni¹⁰⁴. La crisi del petroli dels 70 va provocar un augment dramàtic del preu del metanol, provocant que el preu de la proteïna obtinguda dels llevats mai arribés a ser rendible.

Entrada la següent dècada, Philips Petroleum va contactar amb el Salk Institute Biotechnology/Industrial associates, INC. (SIBIA, La Jolla, CA) per desenvolupar el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* com organisme per a la producció de proteïnes heteròlogues. Els investigadors a SIBIA van aïllar el gen i el promotor de l'alcohol oxidasa i van generar vectors d'expressió, soques i protocols per a la manipulació genètica d'aquest llevat.

La combinació dels mètodes de producció de llevats desenvolupats per la Philips Petroleum Company i el promotor fortament regulat de l'alcohol oxidasa van permetre obtenir nivells sorprenentment alts d'expressió de proteïnes heteròlogues. El 1993 la Philips Petroleum va vendre la patent del sistema d'expressió de *Pichia pastoris* a la Research Corporation Technologies (Tucson, AZ). Actualment Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) comercialitza els components del sistema d'expressió¹⁰⁵.

Metabolisme del metanol

La base conceptual per al sistema d'expressió de *Pichia pastoris* és l'observació de que alguns dels enzims necessaris per al metabolisme del metanol estan presents a nivells substancials només quan les cèl·lules es fan créixer en presència de metanol com a font de carboni. Estudis bioquímics han demostrat que la utilització del metanol requereix d'una ruta metabòlica en la que estan implicats varis enzims que són exclusius d'aquesta ruta^{106,107}.

L'enzim alcohol oxidasa (AOX) catalitza l'oxidació del metanol a formaldehid i peròxid d'hidrogen, primer pas en la ruta metabòlica del metanol. L'AOX està confinat al peroxisoma juntament amb la catalasa que s'encarrega de degradar el peròxid d'hidrogen a oxigen i aigua. Una porció del formaldehid generat abandona el peroxisoma i s'oxida a formiat i diòxid de carboni mitjançant la participació de dues deshidrogenases citoplasmàtiques, reaccions que proporcionen energia a les cèl·lules que creixen en metanol. La resta del formaldehid s'assimila per tal de formar els constituents cel·lulars mitjançant una ruta metabòlica cíclica que comença amb la condensació del formaldehid amb la xilulosa-5-monofosfat, reacció catalitzada per un tercer enzim peroxisomal, la dihidroxiacetona sintasa (DHAS). Els productes d'aquesta reacció, gliceraldehid-3-fosfat i dihidroxiacetona, surten del peroxisoma i entren en una ruta metabòlica citoplasmàtica que genera xilulosa-5-monofosfat i, per cada 3 cicles, una molècula de gliceraldehid-3-

fosfat. Tant l'AOX com el DHAS estan presents en alts nivells durant el creixement cel·lular en metanol, però no es detecten en cèl·lules crescudes en la majoria d'altres fonts de carboni (glucosa, glicerol, etanol, etc). En les cèl·lules crescudes en bioreactors en condicions limitants de metanol, l'AOX representa més del 30% de les proteïnes solubles totals^{108,109}.

A la Figura 9 es mostra una esquema d'aquesta ruta.

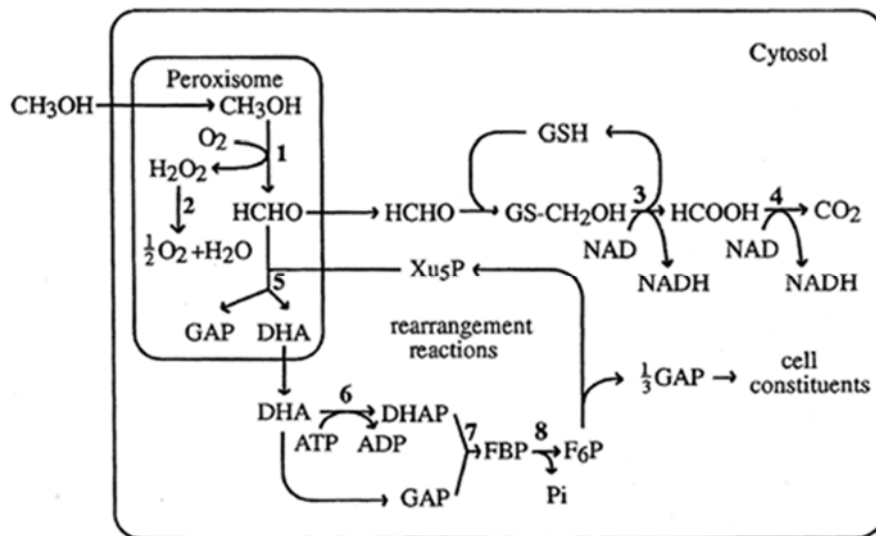


Figura 9 Ruta del metabolisme del metanol en *Pichia pastoris*.
1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehid deshidrogenasa; 4, formiat deshidrogenasa; 5, dihidroxiacetona sintasa; 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa-1,6-bisfosfat aldolasa; 8, fructosa-1,6-bisfosfatasa¹⁰⁵.

Promotor AOX1

Hi ha dos gens que codifiquen l'alcohol oxidasa en *Pichia pastoris*, l'AOX1 i l'AOX2. L'AOX1 es responsable de la gran majoria de l'activitat alcohol oxidasa de la cèl·lula¹¹⁰. L'expressió del gen AOX1 està controlada a nivell de transcripció¹¹⁰. En cèl·lules crescudes en metanol, aproximadament el 5% de l'ARN poli(A)⁺ prové de l'AOX1; no obstant, en les cèl·lules crescudes en la majoria d'altres fonts de carboni, no es pot detectar l'ARN missatger de l'AOX1¹¹¹. La regulació del gen AOX1 implica dos mecanismes. Un mecanisme de repressió/expressió sumat a un mecanisme d'inducció similar al de la regulació del gen GAL1 en *Saccharomyces cerevisiae*. De manera diferent a la regulació de GAL1, l'absència d'una font de carboni repressora, com ara la glucosa, no provoca una transcripció substancial del gen AOX1. Per tant la presència de metanol es imprescindible per induir alts nivells de transcripció¹¹⁰.

Promotors alternatius

Encara que el promotor AOX1 ha estat utilitzat satisfactòriament per expressar multitud de gens heteròlegs, hi ha circumstàncies per a les quals pot no ser el més adient. Per exemple, no es recomana l'ús de metanol per a la inducció d'un gen que codifiqui una proteïna d'ús alimentari degut a que el metanol és un producte derivat del petroli. Un altre inconvenient és també el possible perill d'incendi que implica la utilització de metanol en reactors a gran escala¹⁰⁵. A continuació es citen una sèrie de promotors que poden presentar avantatges respecte a l'AOX1 en alguns casos.

P_{GAP}

El promotor del gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAP) de *Pichia pastoris*, proporciona una forta expressió constitutiva, utilitzant glucosa com a font de carboni, a nivells comparables als observats en AOX1¹¹². L'avantatge del promotor GAP és que no requereix metanol per a la inducció i que tampoc és necessari canviar de font de carboni simplificant el procés d'expressió. Com a inconvenient cal destacar que al ser un promotor constitutiu no es poden separar les fases de creixement cel·lular i inducció, per tant no és una bona elecció per a expressar proteïnes potencialment tòxiques per al llevat.

P_{FLD1}

El gen FLD1 codifica una formaldehid deshidrogenasa glutatió dependent, un enzim clau necessari per a metabolitzar certes amines metilades com a font de nitrogen i metanol com a font de carboni¹¹³. El promotor FLD1 es pot induir tant amb metanol com a única font de carboni (i sulfat d'amoni com a font de nitrogen) com amb metilamina com a única font de nitrogen (i glucosa com a font de carboni). Utilitzant qualsevol dels dos mètodes es poden obtenir nivells d'expressió similars als obtinguts amb el promotor AOX1. Aquest promotor ofereix la flexibilitat d'induir tant amb metanol com amb una font de nitrogen barata i no tòxica com la metilamina.

P_{PEX8}, P_{YPT1}

Per a algunes aplicacions, els promotors anteriors poden provocar una inducció massa forta del gen, provocant un desbordament de la maquinaria postraduccional de la cèl·lula amb el consegüent mal procés, mal plegament, o deslocalització de la proteïna expressada.

El gen PEX8 codifica una proteïna de la matriu peroxisomal que és essencial per a la biogènesi del peroxisoma¹¹⁴. Aquest gen s'expressa a un nivell baix però significatiu quan s'addiciona metanol com a única font de carboni. Per la seva banda el gen YPT1 codifica una GTPasa involucrada en el procés de secreció, i el seu promotor proporciona un baix però constitutiu nivell d'inducció en un medi que contingui metanol, glucosa o mannitol com a font de carboni¹¹⁵. Ambdós promotors produeixen una inducció molt més suau que la resta, obtenint també uns nivells d'expressió molt més baixos.

Vectors d'expressió

Tots els vectors d'expressió han estat dissenyats com a vectors llançadora per a *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*, que contenen un origen de replicació pel manteniment del plasmidi en *E. coli* i marcadors funcionals per ambdós organismes. La majoria de vectors d'expressió estan formats per un fragment de 0.9Kb de l'AOX1 format per la seqüència 5' del promotor i una segona seqüència curta, derivada d'AOX1, amb les seqüències necessàries per a la terminació de la transcripció¹¹⁶. Entre les seqüències del promotor i del terminador hi ha un lloc de clonació o multiclonació on s'insereix el gen a expressar. Addicionalment, hi ha vectors que contenen senyals de secreció per tal de que s'excretin les proteïnes sobreexpressades a l'exterior de la cèl·lula.

Marcadors de selecció

Encara que les tècniques clàssiques i moleculars estan ben desenvolupades per a *Pichia pastoris*, s'han descrit molts pocs gens utilitzables com a marcadors per a la manipulació genètica del llevat. Els marcadors existents es limiten als de la ruta biosintètica del gen HIS4 de *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*, i el gen ble de *Streptoalloteichus hindustanus* (Sh ble) que dona resistència a l'antibiòtic zeocina.

Transformació de *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es transforma mitjançant la integració d'un casset d'expressió al cromosoma, en un locus específic per generar transformants genèticament estables^{111,117}. La integració en cromosoma es preferible a l'ús de plasmidis episomals ja que aquests tenen tendència a tenir baix nombre de còpies, cosa que afecta a la quantitat de producte obtingut. La mida del plasmidi també pot afectar la seva estabilitat en l'hoste, ja que els plasmidis episomals grans es poden perdre després de varies generacions ja que són mitòticament inestables^{118,119}. A més a més, les cèl·lules que

contenen plasmidis episomals han de ser cultivades sota condicions de pressió selectiva d'additius, com ara antibiòtics, ja que sinó poden tenir problemes d'estabilitat plasmídica^{118,119}. Això provoca un increment en els costos de producció. Per tant es molt desitjable generar soques productores genèticament estables¹¹⁹.

La integració al genoma es produeix per recombinació homòloga, quan el vector conté regions que són homòlogues al genoma de *Pichia pastoris*, llavors la inserció es produeix via inserció o desplaçament gènic (Figura 10 A-C).

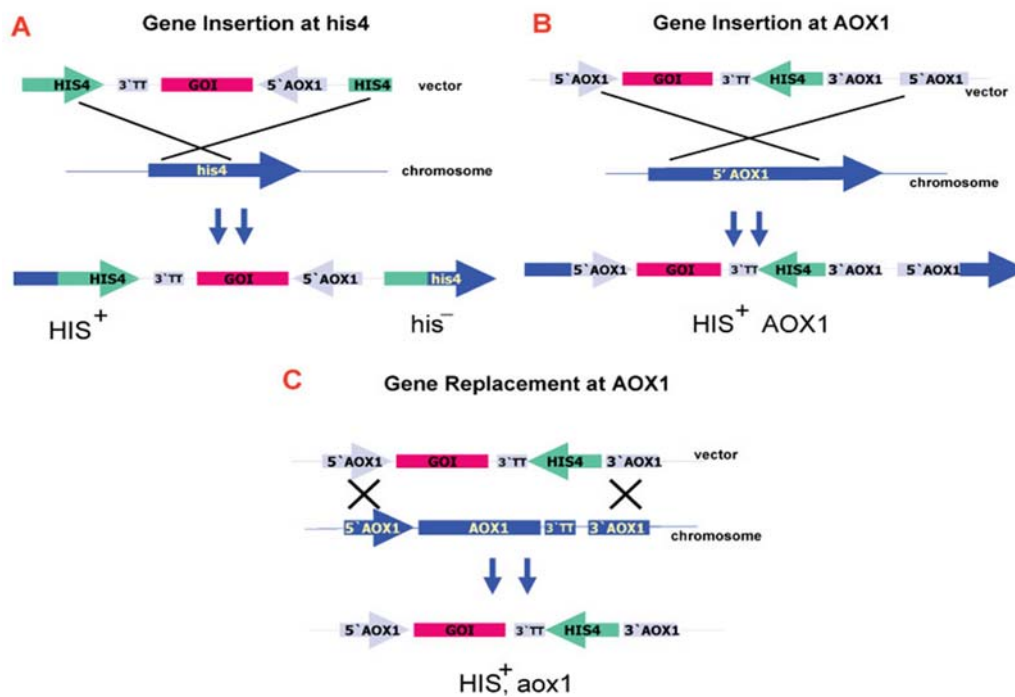


Figura 10 Sistema d'integració del gen en el genoma de *Pichia pastoris*. Les figures A i B corresponen a inserció gènica i la C a substitució gènica¹²⁰.

La integració per inserció gènica pot provocar un tàndem d'integracions múltiples degut a fenòmens de recombinació repetits a una freqüència del 1 al 10% dels transformants¹²¹. Les transformacions que busquen la substitució d'un gen normalment tenen com a resultat transformants amb una sola còpia, tanmateix aquests transformants solen ser més estables genèticament^{118,121}. La substitució del gen s'aconsegueix digerint el vector d'expressió de manera que els extrems 5' i 3' del vector corresponguin amb les regions AOX1 5' i 3' del locus cromosomal AOX1. La transformació, per tant, dona com a resultat una deleció localitzada i específica del gen AOX1 (Figura 10 C). Aquest fenomen passa amb una freqüència del 5-25% dels transformants obtinguts^{117,122}. Els altres

transformants són o bé conversions his⁺ o de fenotip Mut⁺ com a resultat de fenòmens d'inserció gènica als locus his4 o AOX1 (Figura 10 A,B)¹¹⁸.

La introducció del casset d'expressió al cromosoma del llevat es pot aconseguir de varies maneres entre les quals estan la formació d'esferoplasts, l'electroporació i el tractament amb clorur de liti. L'electroporació es un dels mètodes més utilitzats ja que requereix de menys passos i per tant hi ha menys risc de contaminació.

Efecte del fenotip Mut⁺ i Mut^s

Un cop obtinguts els transformants, es molt important classificar-los segons el seu fenotip ja que aquest determinarà les condicions de cultiu. Els dos possibles fenotips que es poden obtenir són el Mut⁺ i el Mut^s. El fenotip Mut⁺ es comporta com la soca original pel que fa al metabolisme del metanol, mentre que les soques amb fenotip Mut^s tenen la capacitat de metabolitzar el metanol reduïda per haver perdut el gen AOX1 i comptar només amb l'AOX2 que proporciona una activitat alcohol oxidasa molt inferior al AOX1. Per tal de diferenciar els dos fenotips es pot fer sembrant cada una de les colònies per duplicat en plaques Petri de medi sòlid, primer en un medi mínim que contingui metanol com a única font de carboni i després en un medi mínim que tingui com a única font de carboni glucosa. Les cèl·lules amb fenotip Mut⁺ creixeran d'igual forma en els dues plaques, mentre que les cèl·lules Mut^s presentaran un molt baix creixement o un creixement nul en la placa que contingui metanol com a font de carboni.

El creixement de les soques Mut^s es pot mantenir subministrant mannitol o sorbitol i realitzant la inducció amb concentracions de metanol inferiors a les soques Mut⁺. El menor creixement i producció de proteïnes en les soques Mut^s pot ser preferible quan es volen expressar proteïnes on el plegament es un factor limitant¹²³. Les soques Mut⁺ són més resistents que les Mut^s al metanol i per tant es més difícil que s'arribi a un nivell de toxicitat excessiu en el medi. Per contra el consum d'oxigen es molt més elevat en les soques Mut⁺ que en les Mut^s, degut al metabolisme del metanol que requereix molt d'oxigen. Això provoca que sigui més probable que els cultius de cèl·lules Mut⁺ esdevinguin limitats en oxigen¹²³.

S'ha observat que les cèl·lules Mut^s solen produir igual o més quantitat de proteïna que les Mut⁺ quan es cultiven en matràs d'Erlenmeyer, probablement això es degut a que aquets tenen una capacitat limitada d'aportar d'oxigen i el creixement de les cèl·lules amb fenotip Mut⁺ esdevé limitat¹¹⁸.

Expressió extracel·lular. Utilització de la seqüència senyal

Quan s'expressen proteïnes recombinant amb llevats, es important plantejar-se si és més convenient una expressió intracel·lular o extracel·lular. L'elecció dependrà del tipus de proteïna a expressar. Si la proteïna a sobre expressar no es excretada en el seu sistema nadiu, es possible que al passar a través del sistema de secreció sigui alterada per glicosilació o que li manquin modificacions postraduccionals essencials per a la seva funció. D'altra banda, la purificació de les proteïnes expressades intracel·lularment acostuma a ser força més costosa ja que la proteïna desitjada representa normalment menys de un 1% del total de proteïnes intracel·lulars del microorganisme¹²⁰. Per tant l'elecció dependrà molt en les característiques de la proteïna que es vulgui obtenir.

En el cas de voler utilitzar una expressió extracel·lular s'ha d'escollir un senyal d'excreció específic. Aquesta tria es pot fer basada en el propi senyal de secreció de la proteïna (si es que en té un), la pre-pro seqüència líder del factor alfa d'unió (α -MF) de *Saccharomyces cerevisiae*, la seqüència senyal de la fosfatasa àcida (PHO) o la seqüència senyal de la invertasa (SUC2)¹²⁴.

La seqüència senyal més utilitzada en *Pichia pastoris* es la pre-pro seqüència líder del factor d'unió alfa (α -MF). Aquesta seqüència està formada per un pèptid senyal de 19 aminoàcids (pre-seqüència), seguida per 60 aminoàcids de la pro-regió àcida. Quan es genera la construcció, es normal separar la proteïna expressada de la pre-regió amb un lloc de tall d'endopeptidasa. Un cop traduïda la proteïna, la seqüència senyal s'elimina mitjançant el senyal peptidasa i el lloc de tall de la pro-regió es reconegut per la proteasa del llevat Kex2, amb el consegüent alliberament la proteïna madura i completament processada¹²⁵.

Els llevats com *Saccharomyces cerevisiae* tenen una baixa especificitat pel que fa al reconeixement de seqüències senyal i degut a les similituds amb *Pichia pastoris*, es pot anticipar que aquesta tindrà també una baixa especificitat de seqüències senyal. De fet s'han expressat satisfactòriament varies proteïnes en *Pichia pastoris* utilitzant les seves seqüències senyal natives¹²⁰.

Cultiu d'alta densitat cel·lular

Un dels majors avantatges de *Pichia pastoris* front *Saccharomyces cerevisiae* es que la primera té molt poca tendència al metabolisme anaerobi. En els cultius d'alta densitat de

Saccharomyces cerevisiae, l'etanol, producte de la fermentació, s'acumula ràpidament a nivells en que inhibeix el creixement i la producció de proteïnes. Degut a la seva preferència per al metabolisme aerobi, *Pichia pastoris* pot ser cultivada a densitats cel·lulars molt altes en condicions controlades. El creixement fins a altes densitats cel·lulars es important degut a que l'expressió de proteïnes està molt relacionada amb la concentració de cèl·lules en el cultiu. Un altre avantatge de fer créixer el llevat en bioreactor és que el nivell de transcripció del promotor pot ser de 3 a 5 vegades superior en condicions de creixement limitat en metanol que no amb metanol en excés (condicions de cultiu en matràs). El creixement en bioreactor permet també mantenir constant el nivell d'oxigen dissolt en el medi, evitant així els efectes adversos que la limitació d'oxigen té sobre la producció de proteïnes¹⁰⁵.

Les condicions de creixement de *Pichia pastoris* la fan ideal per la producció a gran escala de proteïnes recombinants heteròlogues, perquè els components del medi són definits i barats, font de carboni (glicerol i metanol), biotina, sals, elements traces i aigua. Aquest medi es lliure de components no definits i, per tant, es compatible amb la producció de medicaments per us humà. A més a més, al desenvolupar-se el creixement en condicions de pH baix i amb presència de metanol, fa que sigui més difícil que el cultiu es contami amb microorganismes externs¹⁰⁵.

1.4 Disseny de medis de cultiu per a microorganismes

Un dels paràmetres més importants quan es planteja el cultiu d'un microorganisme és la formulació del medi de cultiu. Es necessari que satisfaci tots els requeriments nutricionals del microorganisme i proporcioni les condicions ambientals favorables per al seu creixement.

Al formular un medi per a processos fed-batch es pot procedir de dues maneres per arribar a una densitat cel·lular determinada. Afegir des de l'inici tots els components del medi menys un, en les concentracions necessàries, o bé mantenir la concentració de cada un dels components en un valor determinat constant i anar reposant-les amb l'alimentació. Afegir tots els components de cop es una estratègia més senzilla però pot presentar problemes de solubilitat dels components i d'inhibició del creixement.

El primer pas en la formulació d'un medi de cultiu es la determinació de la composició elemental del microorganisme ja que aquesta permet calcular el mínim absolut que s'haurà de subministrar al medi.

La concentració dels elements inorgànics majoritaris d'*E. coli* es presenta a la Taula 2.

Taula 2 Composició elemental d'*E. coli*¹²⁶.

Component	% en pes
Nitrogen	14
Fòsfor	3
Magnesi	0,5
Calci	0,5
Ferro	0,5

A part d'aquests elements es necessari aportar al medi una font de carboni i diversos elements traça que tot i estar presents en molt baixa concentració són essencials per a la vida del microorganisme.

Tots aquests elements es poden subministrar en forma de varis compostos químics i a la bibliografia es troben descrits exemples de l'efecte que té sobre el creixement la utilització d'un compost o altre.

La font de carboni més àmpliament utilitzada es la glucosa ja que es una substancia de fàcil i ràpida assimilació per part de la major part dels microorganismes, tot i així alguns autors han trobat avantatges substituint-la per fructosa o glicerol.

Aristidou i col·laboradors¹²⁷ proposen la fructosa, isòmer estructural de la glucosa, com una font de carboni alternativa a la glucosa ja que l'assimilació i utilització d'aquesta està més finament regulada dins del metabolisme que la de la glucosa. En estudis fets s'ha comprovat que utilitzant fructosa en creixements fed-batch d'*E. coli* es produeixen nivells més baixos d'acetat (30-40%) i s'obtenen rendiments més alts de biomassa (fins un 40%) comparat amb medis complementats amb glucosa, degut a aquestes dues millores s'aconsegueix també arribar a unes densitats cel·lulars més elevades amb més facilitat. El procés d'esterilització per calor a l'autoclau provoca conversió parcial de fructosa a glucosa, per tal d'evitar aquest inconvenient els autors recomanen esterilitzar la fructosa per filtració.

Altres autors proposen substituir la glucosa per glicerol. Entre els avantatges descrits són rellevants la seva major solubilitat¹²⁸ que permet que el medi d'alimentació sigui més concentrat i també la reducció de la formació d'acetat¹⁰⁰ o la formació d'aquest en etapes més avançades del creixement⁹⁹. L'acetat es un subproducte del metabolisme que, en el

cas de que es formi, provoca reduccions en el rendiment biomassa-substrat i es inhibidor del creixement cel·lular.

La font de fòsfor més utilitzada en la bibliografia es l'ortofosfat. Un dels seus avantatges es la seva capacitat d'esmoreir les variacions de pH del medi, característica molt útil en cultius en matrassos d'Erlenmeyer. Craig Curless i col·laboradors¹²⁶ proposen utilitzar polifosfat com a font de fòsfor, aquest es més soluble que l'ortofosfat i no forma compostos metal·lofosfats que són molt insolubles. La possible formació i precipitació d'aquests compostos fa que es modifiqui la concentració d'aquests elements en el medi i provoca posteriors problemes en els processos de purificació.

Un problema comú a tots els cultius d'alta densitat es formació d'espuma que afecta negativament el funcionament del bioprocés. Per tal de reduir la seva formació el mètode més utilitzat es l'addició d'antiespumant. S'ha descrit a la bibliografia que l'addició de compostos antiespumants redueix la capacitat de transferència d'oxigen dels reactors. També pot provocar canvis en l'activitat respiratòria de les cèl·lules¹²⁹.

Com ja s'ha comentat, un dels problemes que es planteja al formular un cultiu per a altes densitats cel·lulars es la concentració a la qual els nutrients inhibeixen el creixement cel·lular ja que aquesta pot ser inferior a la total necessària per arribar a la densitat cel·lular desitjada. A les taules 3 i 4 es mostren les concentracions inhibidores dels components majoritaris dels medis de cultiu per a *E. coli*.

Taula 3 Concentracions inhibidores dels elements traça¹³⁰.

Element	Concentració inhibidora (mM)
Cobalt	2×10^{-1}
Manganès	5×10^{-1}
Borat	2
Molibdè	2×10^{-2}
Coure	1×10^{-4}
Zenc	6×10^{-2}

Taula 4 Concentracions inhibidores dels elements majoritaris^{97,131}.

Element	Concentració inhibidora (g/L)
Glucosa	50

Amoni	3
Ferro	1,15
Magnesi	8,7
Fòsfor	10

Un altre problema que ja s'ha plantejat es la solubilitat d'alguns compostos que es formen al barrejar els diferents components del medi. A la taula 5 es mostren els compostos més insolubles que es poden formar al medi de cultiu.

Taula 5 Producte de solubilitat dels compostos més insolubles formats en el medi¹²⁶.

Compost	Producte de solubilitat
MgNH ₄ PO ₄	2,5x10 ⁻¹³
Ca ₃ (PO ₄) ₃	2x10 ⁻²⁹
Mg ₃ (PO ₄) ₂	1x10 ⁻²³ – 1x10 ⁻²⁷
FePO ₄	1,3x10 ⁻²²
Zn ₃ (PO ₄) ₂	9x10 ⁻³³
Co ₃ (PO ₄) ₂	2x10 ⁻³⁵
Cu ₃ (PO ₄) ₂	1,3x10 ⁻³⁷

En un medi amb precipitats es pot obtenir una densitat cel·lular baixa (de 2 a 20 g/L), sobretot per la formació de fosfat de ferro. Per tal d'obtenir una densitat cel·lular més elevada, alguns autors han afegit àcid cítric i EDTA per afavorir la formació de complexos i evitar així la precipitació^{99,132}.

Per tal de trobar la composició del medi que complexi millor els requeriments nutricionals de microorganisme, es necessari la variació de la concentració de cadascun dels seus components. Per tal de realitzar aquestes variacions de manera ordenada i optimitzant els recursos es necessària l'aplicació de mètodes de disseny d'experiències.

El disseny d'experiències es pot dividir en tres etapes.

- 1.- Selecció/reducció de factors a estudiar en el sistema.
- 2.- Predicció del comportament del sistema.

3.- Optimització del sistema.

Per tal d'abordar la primera part existeixen els dissenys factorials complets, factorials fraccionats i els dissenys de Taguchi. Per a les següents parts s'acostuma a utilitzar la metodologia de la superfície de resposta.

1.4.1 Dissenys de Taguchi

Els dissenys de Taguchi sorgeixen en el camp de la qualitat. El procés que normalment s'utilitza per garantir que un producte compleix les especificacions que li dona el fabricant és establir una tolerància. Les toleràncies no garanteixen la qualitat, només estableixen els límits dins dels quals el producte funciona. La qualitat s'aconsegueix d'una millor forma minimitzant les desviacions de l'objectiu que no ajustant un error a les especificacions.

El disseny de Taguchi es una eina important per al disseny robust. Les dues eines més importants utilitzades en un disseny robust son:

1. La relació senyal-soroll, la qual mesura la qualitat amb un especial èmfasi en la variació.
2. Les matrius ortogonals, les quals acomoden varis factors de disseny (paràmetres) de forma simultània.

En el camp de l'enginyeria de telecomunicacions existeix un paràmetre anomenat relació senyal-soroll que ha estat utilitzat com a la característica per a definir la qualitat. Taguchi, que té formació en el camp d'enginyeria de telecomunicacions i enginyeria elèctrica, ha introduït aquest concepte al disseny d'experiments. La relació senyal-soroll transforma varies repeticions en un valor que reflexa la quantitat de variació present i la resposta mitjana.

En un equip de telecomunicacions es mesura la relació senyal soroll com a la relació entre la potencia del senyal i la potencia del soroll.

Per tal d'utilitzar aquest concepte en un experiment estadístic es substitueixen les potencies per la relació entre la mitja de la distribució i la desviació estàndard expressada en l'Equació 1.

$$N = \frac{\text{Potència del senyal}}{\text{Potència del soroll}} = \frac{\mu^2}{\sigma^2}$$

Equació 1 Relació senyal-soroll

Una matriu ortogonal es una matriu factorial fraccionada que assegura una comparació equilibrada dels nivells de qualsevol factor o interacció de factors. Es una matriu de nombres distribuïts en files i columnes on cada fila representa el nivell dels factors en cada experiència, i cada columna representa un factor específic que pot canviar-se de nivell en cada experiència. La matriu es diu ortogonal perquè totes les columnes es poden avaluar independentment les unes de les altres. Les matrius ortogonals es representen com a una lletra L amb un subíndex que representa el nombre d'experiències que conté la matriu seguit d'un parèntesi dins del qual hi ha un número o varis números elevats a un exponent. Els números representen els nivells de cada factor i l'exponent el número de factors que es poden estudiar a aquells nivells.

Les matrius més comunes son: $L_4(2^3)$, $L_8(2^7)$, $L_{16}(2^{15})$, $L_{32}(2^{31})$, $L_{64}(2^{63})$, $L_9(3^4)$, $L_{27}(3^{13})$, $L_{81}(3^{40})$, $L_{25}(5^6)$, $L_{12}(2^{11})$, $L_{18}(2^1 \times 3^7)$, $L_{54}(2^1 \times 3^{25})$, $L_{36}(2^{11} \times 3^{12})$, i $L_{50}(2^1 \times 5^{11})$

Per tal d'ubicar les columnes en que se situen les interaccions entre factors s'utilitza la taula triangular on la interacció se situa mirant el número que marquen la intersecció entre el número de fila i el número de columna corresponents a dos factors. Cada matriu ortogonal té una taula triangular associada.

Exemple (Figura 11): En una matriu ortogonal $L_8(2^7)$, per trobar la interacció del factor situat a la columna 2 i factor que es troba a la columna 4, es baixa per la columna 4 de la taula triangular fins que trobem la fila (2). La cel·la en que es creuen conté el número 6, això vol dir que la interacció entre el factor que es troba a la columna 2 i el factor que es troba a la columna 4 es troba a la columna 6.

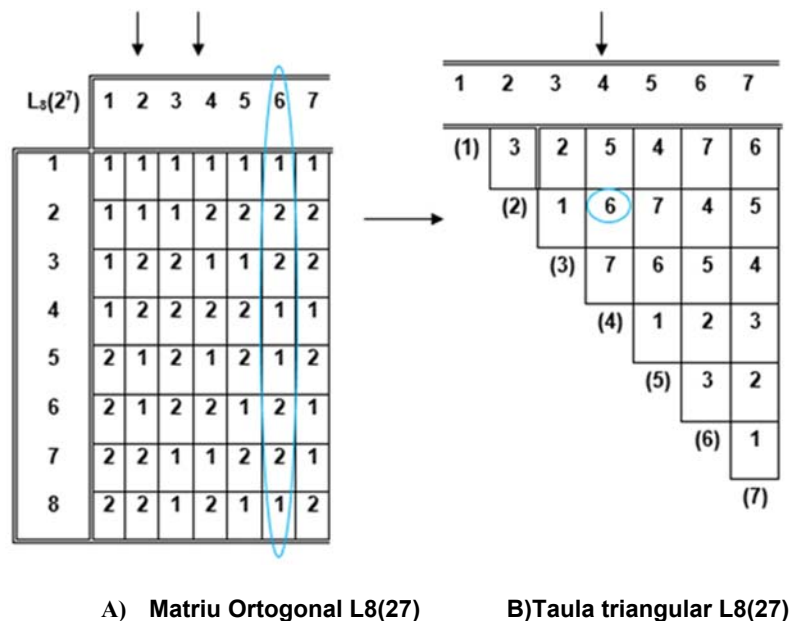


Figura 11 Exemple de la determinació de interaccions entre factors.

També es poden distribuir els factors utilitzant les gràfiques lineals, que representen la informació de les interaccions i faciliten l'assignació de factors i interaccions a les columnes de la matriu ortogonal. Les gràfiques lineals estan formades per punts, línies i números. El punt s'utilitza per indicar un efecte principal, la línia representa la interacció entre dos efectes principals (els que connecta) i el número assignat a un punt o línia representa la posició (columna) que ocupa en la matriu ortogonal. Pot haver-hi més d'una gràfica lineal per a cada matriu ortogonal.

Per exemple, una de les gràfiques lineals de la matriu ortogonal $L_8(2^7)$ la podem veure a la Figura 12. Es pot apreciar que a l'igual que utilitzant la taula triangular, la interacció entre els factors 2 i 4 (punts gruixuts) està en la columna 6 (número de la línia que els uneix).

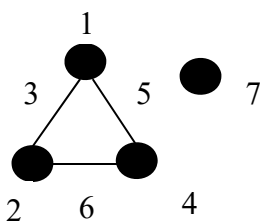


Figura 12 Gràfica lineal de al matriu ortogonal $L_8(2^7)$.

En el disseny d'experiències es recomana sempre la utilització de matrius ortogonals. Tanmateix per raons de disseny, econòmiques o de temps, moltes vegades interessa reduir al màxim el nombre d'experiències, en aquests casos, una bona solució es utilitzar una matriu quasi-ortogonal en la qual es perd la qualitat de matriu equilibrada. Les matrius quasi-ortogonals s'obtenen al modificar les matrius ortogonals per introduir factors a diferents nivells dels de la matriu original. Per tal de realitzar aquestes modificacions s'utilitzen una sèrie de tècniques anomenades dissenys especials.

Per a calcular l'ortogonalitat es fa servir el concepte de J_2 desenvolupat per Xu¹³³. El grau d'ortogonalitat disminueix amb el nombre de cops que s'aplica una tècnica. No totes les tècniques produeixin la mateixa pèrdua d'ortogonalitat.

Dissenys especials

- Tècnica de la combinació
 - o Permet incorporar factors a dos nivells en un sistema a tres nivells o factors a 3 nivells en una matriu a 4 nivells.

- A partir d'una columna de nivell superior permet crear dues columnes de nivell inferior.
- Tècnica de la columna desocupada
 - Permet introduir un factor a 3 nivells en una matriu a 2 nivells
 - A partir de dues columnes a 2 nivells es genera una columna a 3 nivells.
 - Per tal d'aplicar aquesta tècnica s'ha d'escollir una columna en la que no es podrà col·locar cap factor ni interacció. Les dues columnes la interacció de les quals sigui la columna seleccionada es substitueixen per una sola columna on estarà el factor a 3 nivells.
- Tècnica del nivell fictici
 - Permet incorporar un factor a n nivells en una matriu a s nivells sempre que s sigui més gran que n.
 - Aquesta tècnica s'aplica normalment quan es vol incorporar un factor a 2 nivells en una matriu a 3 nivells o un factor a 3 nivells en una de 4 nivells. Per aplicar aquesta tècnica, un dels nivells de la columna de menor número nivells es duplica i substitueix a 1 nivell columna de major número de nivells de manera que hi ha un nivell amb el doble d'experiències que els altres. Aquesta tècnica no afecta a la interacció.
- Tècnica de la formació de nivells múltiples.
 - No canvia l'ortogonalitat.
 - Permet incorporar factors de quatre i vuit nivells en matrius ortogonals de sèrie 2^n (L_8 , L_{16} i L_{64}) i factors de nou nivells en matrius de series 3^n (L_{27} i L_{54}).
 - El mètode es basa en la combinació de nivells i la recodificació de les combinacions. Per exemple, si es vol introduir un factor a 4 nivells, que té 3 graus de llibertat en una matriu amb columnes a 2 nivells, que tenen un sol grau de llibertat, es necessita utilitzar 3 columnes a 2 nivells per generar una columna a 4 nivells. Dos columnes a dos nivells generaran una columna a 4 nivells i s'ha d'eliminar la tercera que correspon a la interacció entre les anteriors.

Passos en la planificació experimental:

1- Elecció de la matriu ortogonal.

2- Ajust de la matriu ortogonal mitjançant dissenys especials.

- 3- Assignació de factors a columnes (amb l'ajut de matrius triangulars).
- 4- Eliminació de les columnes no assignades (es poden utilitzar per calcular l'error experimental).

Anàlisi de variància de Pareto

Per tal d'analitzar els resultats del disseny experimental s'utilitza un mètode ANOVA simplificat, que no requereix taules ANOVA ni tests-F. Aquest mètode s'anomena ANOVA de Pareto¹³⁴. L'objectiu de l'anàlisi és determinar els factors que contribueixen més a la variació en l'experiment.

Els resultats de l'anàlisi de Pareto es presenten en forma gràfica en el diagrama de Pareto en el qual es mostren ordenats segons la contribució a la variació de cada un dels factors que intervenen en l'experiment i de les seves interaccions. Normalment es considera que els factors tenen contribució en l'experiment quan la col·laboració acumulativa dels factors (començant pel que té més contribució) explica un 90 % de la variació. En aquest cas a més a més, els factors que es considerarà que tenen un efecte apreciable sobre el disseny seran els que estiguin per sobre de la contribució dels errors, ja que els que estiguin per sota no es poden distingir de l'error experimental i per tant la seva contribució no es apreciable en front de l'error experimental.

L'anàlisi de Pareto es pot fer tant sobre la mitja de la resposta com sobre la relació senyal-soroll d'aquesta. Si es busca trobar els factors que s'han de controlar perquè la resposta sigui reproducible, es fa servir la relació-senyal soroll. Si el que es busca es trobar els nivells dels factors per ajustar la resposta al valor desitjat, s'utilitza la mitja de la resposta.

1.4.2 Metodologia de la superfície de resposta

La metodologia de superfície de resposta és un conjunt de models matemàtics i tècniques estadístics per a la construcció de models empírics. Aquesta metodologia es molt utilitzada en el disseny d'experiments, on l'objectiu és optimitzar una resposta d'un sistema (variable de sortida) que està influenciada per diverses variables independents (variables d'entrada). En aquest context, un experiment consisteix en una sèrie de proves en les que es van fer canvis en les variables d'entrada per tal d'identificar les raons dels canvis en la resposta de sortida.

L'aplicació de la metodologia de resposta en el disseny d'un experiment està dirigida a reduir el cost de les experiències, es a dir obtenir la informació requerida amb el menor nombre d'experiències possibles.

En general, la relació entre la resposta i la variable independent és desconeguda. El primer pas per tant, és trobar una aproximació adequada a la relació real entre les variables. Les formes més comunes són polinomis d'ordre baix (primer o segon ordre), sent el de segon ordre el que millor s'adapta a la majoria de casos.

Un aspecte molt important de la metodologia de la superfície de resposta és el disseny d'experiments¹³⁵. Aquestes estratègies van ser desenvolupades originalment per a l'ajust del model d'experiments físics, però també es pot aplicar a experiments numèrics. L'objectiu del disseny d'experiències és la selecció dels punts on ha de ser avaluada la resposta.

La major part dels criteris per al disseny òptim dels experiments estan associats amb la modelització matemàtica del procés. En general, aquests models matemàtics són polinomis amb una estructura desconeguda, de manera que els experiments corresponents són dissenyats per a cada problema particular.

L'elecció del disseny d'experiments pot tenir una gran influència en l'exactitud de l'aproximació i el cost de la construcció de la superfície de resposta.

Disseny central compost (CCD)

El disseny central compost va ser un dels primers en desenvolupar-se¹³⁶ i actualment segueix sent molt utilitzat ja que es un dels models més simples per a obtenir una superfície de resposta i funciona molt bé per a la majoria d'aplicacions possibles.

Si es compara el disseny central compost amb el disseny factorial complet, es pot apreciar que el principal avantatge es una gran reducció en el nombre d'experiències a realitzar per obtenir la superfície de resposta. Tal i com es pot apreciar a la Figura 13, per a 3 variables, amb un disseny factorial complet farien falta 27 experiències (33), i per a 4 variables 64 experiències (43) mentre que per a un disseny central compost en farien falta tan sols entre 15 i 18 experiències per al primer cas i entre 25 i 28 per al segon (depenent dels punts centrals utilitzats).

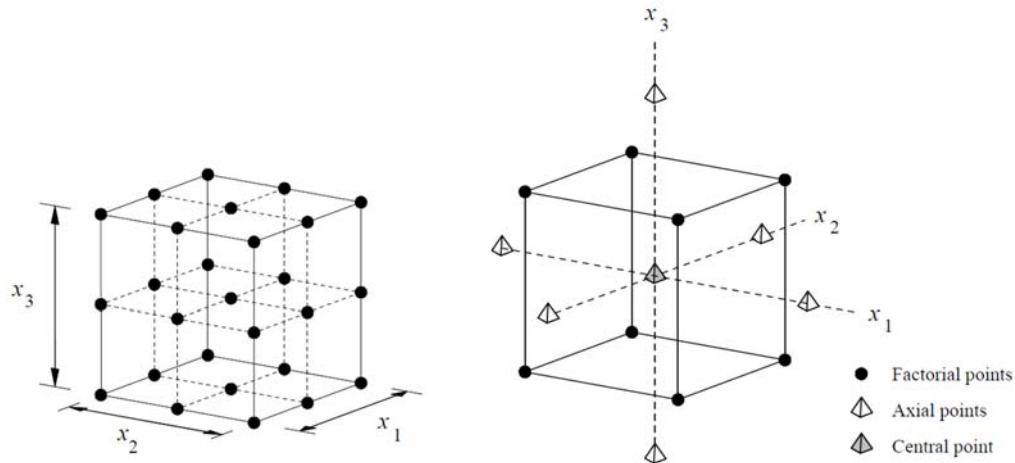


Figura 13 Comparativa entre disseny factorial complet i disseny central compost per a 3 variables.

1.5 Modelatge i simulació del creixement d'un microorganisme

Preparar i dur a terme un creixement d'un microorganisme en un bioreactor en el laboratori o planta pilot comporta molta feina i moltes hores de preparació. Si aquest fet se li agrega la necessitat de variar i optimitzar algunes variables, això suposa, a part d'un gran cost econòmic, un gran cost de temps. Per aquestes raons és important fer una simulació prèvia dels processos que tenen lloc en un reactor, de forma que l'experimentació quedi reduïda al mínim indispensable, estalviant temps i recursos.

La simulació és l'experimentació amb un model d'un sistema real amb la finalitat de comprendre el comportament del sistema o avaluar noves estratègies pel funcionament del sistema (dins dels límits imposats per un cert criteri o un conjunt d'ells).

Tal i com descriu Winsberg^{137,138}, per a realitzar un estudi de simulació s'han de seguir unes etapes.

1. **Definició del sistema:** Primerament s'ha de definir el sistema. És necessari fer una anàlisi preliminar d'aquest, per tal de determinar la interacció amb altres sistemes, les seves restriccions, les variables que interactuen dins el sistema i les seves interrelacions, les mesures d'efectivitat que s'han d'utilitzar per definir i estudiar el sistema i els resultats que s'esperen obtenir de l'estudi.
2. **Formulació del model:** Un cop definits amb exactitud els resultats que s'esperen obtenir de l'estudi, es defineix i es construeix el model. En la seva formulació és necessari definir totes les variables que formen part, les seves relacions lògiques i els diagrames de flux que el descriuen de forma completa.

3. **Col·lecció de valors:** És important que es defineixin amb claredat i exactitud els valors que el model requerirà per produir els resultats desitjats.
4. **Implementació del model en l'ordinador:** Amb el model definit, el següent pas és decidir el llenguatge de programació, com Fortran, Basic, C, etc. per processar-lo a l'ordinador.
5. **Validació:** A través d'aquesta etapa és possible detallar les deficiències en la formulació del model o ens els valors alimentats al model. Les formes més comuns de validar un model són:
 - a. L'opinió d'experts sobre els resultats de la simulació.
 - b. L'exactitud amb la que es prediuen valors històrics.
 - c. L'exactitud amb la predicció del futur.
 - d. La comprovació de fallada del model de simulació al utilitzar valors que fan fallar el sistema real.
 - e. L'acceptació i confiança en el model de la persona que farà ús dels resultats que doni l'experiment de simulació.
6. **Experimentació:** L'experimentació amb el model es realitza després que aquest hagi estat validat. L'experimentació consisteix en generar els valors desitjats i en realitzar una anàlisi de sensibilitat dels índexs requerits.
7. **Interpretació:** En aquesta etapa de l'estudi, s'analitzen i interpreten els resultats que proporciona la simulació.

2 Objectius

L'objectiu d'aquesta tesi es estudiar i optimitzar la producció de la proteïna TGZ en dos models heteròlegs d'expressió de proteïnes recombinants com son *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*, així com caracteritzar i purificar la proteïna expressada.

Aquest objectiu es desglossa en els següents apartats:

- Expressió de TGZ en *Escherichia coli*
 - o Dissenyar un medi de cultiu que permeti assolir altes densitats cel·lulars i la correcta expressió de la proteïna.
 - o Millorar la metodologia d'expressió per tal de maximitzar la quantitat de proteïna activa obtinguda.
 - o Escalar el sistema de producció a reactor, avaluant l'estratègia d'alimentació, inducció i modelització matemàtica del procés.
 - o Caracteritzar bioquímicament la proteïna TGZ.
 - o Confirmar l'existència dels dominis putatius de TGZ, deduïts a la seva seqüència proteica, a partir de la caracterització bioquímica.
 - o Purificar la proteïna.

- Expressió de TGZ en *Pichia pastoris*
 - o Clonar el gen tgz en un vector d'expressió de *Pichia pastoris*.
 - o Transformar i seleccionar una soca sobreproductora que expressi correctament la proteïna.
 - o Obtenir la major quantitat de TGasa soluble i activa possible.
 - o Comprovar l'activitat de la proteïna i caracteritzar-la.

- Comparar ambdós sistemes d'expressió.

3 Materials i mètodes

3.1 Expressió de TGZ en *Escherichia coli*

3.1.1 Antecedents al grup de recerca. Obtenció del material de partida.

El gen *tgz15* es va aconseguir clonar en el vector d'expressió pET28a+ i introduir, via transformació, en cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3) (la clonació del gen ha sigut duta a terme prèviament dins del grup de recerca¹³⁹). Posteriorment, es van efectuar les primeres expressions de transglutaminasa originària de *Zea mays* a escala de matràs d'Erlenmeyer. El procediment d'expressió d'aquesta transglutaminasa es va realitzar segons el *pET System Manual 10th Edition* (Novagen, 2003). El protocol per l'expressió es basa en dues etapes principals: primera, creixement de l'inòcul de *E. coli* BL21 durant unes 12 a 16 hores en presència de kanamicina per assegurar l'estabilitat del plasmidi¹⁴⁰, segona, inducció de l'expressió de proteïna objectiu mitjançant isopropil- β -D-tiogalactopiranosil (IPTG) quant la densitat òptica (600nm) del cultiu està entre 0.4 i 1.

Es va escollir el sistema pET perquè es un dels sistemes més potents per al clonatge i expressió de proteïnes recombinants en *E. coli*. Els gens objectiu que són clonats en plasmidis pET estan sota el control de la transcripció del bacteriòfag T7. L'expressió és induïda per una font de T7 ARN polimerasa en la cèl·lula hoste.

La soca BL21(DE3) conté una copia cromosòmica del gen que codifica la T7 ARN polimerasa, el gen *1* de T7. Aquest hoste és lisogènic del bacteriòfag DE3, un lambda derivatiu que té la regió d'immunitat del fag *21* i porta un fragment de DNA que conté el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, i el gen per la T7 ARN polimerasa^{141,142}. Una vegada el lisogen DE3 s'ha format, l'únic promotor conegut que transcriu directament el gen de la T7 ARN polimerasa és el *lacUV5*. Aquest promotor és induïble mitjançant IPTG. L'addició de IPTG en el medi de cultiu de *E. coli* BL21(DE3) induïx la producció de T7 ARN polimerasa que al seu torn transcriu el DNA del gen inserit en el plasmidi del sistema pET.

Altres raons les quals s'escullen soques amb el lisogen DE3 son:

- Deficiència de proteases.
- Auxotròfia d'aminoàcids (incapacitat per sintetitzar alguns aminoàcids).
- Realçament de la solubilitat de proteïnes.

- Suplement de codons poc usuals.

Mitjançant aquest procediment s'ha aconseguit expressar amb èxit la transglutaminasa a escala de matràs Erlenmeyer i es pretén millorar l'expressió i estudiar el procés a una major escala.

En anteriors treballs en el grup de recerca¹⁴³ s'ha determinat que la major part de la proteïna TGZ15 s'acumula en forma de cossos d'inclusió. S'han provat diverses alternatives per tal de poder augmentar la quantitat de proteïna soluble i activa.

Alguns investigadors han desenvolupat sistemes per intentar l'alta producció en *E. coli* de MTGasa originària de *Streptovercillium*. L'expressió directe del gen de transglutaminasa en cèl·lules de *E. coli* no causa la sobreproducció, segurament degut a la toxicitat que representa per la pròpia cèl·lula la influència de l'activitat transglutaminasa, que provocaria la formació de *cross-links* covalents entre les seves pròpies proteïnes. Per evitar-ho es fusiona el gen de TGasa microbiana que codifica 331 residus aminoàcids en el terminal amino amb el gen 10 del bacteriòfag T7 de 260 aminoàcids, utilitzant un vector d'expressió induïble. Originalment el gen s'expressava com a cossos d'inclusió en el citoplasma de *E. coli*. Restablint 15 residus aminoàcids a l'extrem amino terminal de la TGasa es va poder facilitar la solubilització de la TGasa però l'activitat va disminuir respecte a la TGasa nativa¹⁴⁴.

Amb la mateixa idea base també s'ha clonat i caracteritzat el gen *tgl* que codifica una transglutaminasa de *Bacillus subtilis*. El gen *tgl* conté una estructura formada per 735 nucleòtids que codifiquen 245 residus aminoàcids amb un pes molecular de 28,3kDa. La seqüència d'aminoàcids té similituds amb la transglutaminasa de *Streptovercillium* i d'alguns mamífers²⁵. L'activitat transglutaminasa trobada amb el gen *tgl* expressat amb cèl·lules transformades de *E. coli* ha resultat força acceptable comparada amb la de *Streptovercillium*.

3.1.2 Obtenció de les cèl·lules recombinants d'*Escherichia coli* BL21 (DE3)

3.1.2.1 Obtenció de DNA plasmídic

Aquest protocol descriu el procediment d'extracció i purificació del DNA plasmídic de cèl·lules d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) conservades a -80°C que contingui un dels

plasmidis utilitzats en aquest treball. Aquests poden ser el plasmidi pET-28 amb el gen *tgz15* o be el plasmidi pGro7 d'expressió de xaperones.

1- Activació del cultiu i obtenció de colònies

Es parteix d'un cultiu de cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) criopreservat a -80°C que conté el plasmidi.

Per tal d'obtenir colònies viables d'aquest cultiu s'activa el cultiu sembrant 100µL del contingut del criovial en un matràs de 250mL amb 50mL de medi LB selectiu* líquid estèril i s'introdueix a l'incubador orbital a 37°C i 250rpm durant 12 hores. Un cop transcorregut aquest temps, es sembra en una placa de medi LB selectiu* sòlid utilitzant una nansa bacteriològica i s'incuba a 37°C durant 24 hores.

*Antibiòtic selectiu: kanamicina 30µg/mL per al plasmidi pET28 i cloramfenicol 34µg/mL per al plasmidi pGro7.

2- Obtenció i purificació de plasmidis

A partir d'una colònia obtinguda en el pas anterior i utilitzant el "Plasmid Mini Kit" de Qiagen, es purifica el plasmidi seguint el protocol del fabricant¹⁴⁵. Es quantifica el DNA obtingut utilitzant l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-8000 de Thermo Scientific.

3- Comprovació de la presència del gen *tgz15*.

Un cop obtingut el plasmidi, es comprova la presència del gen *tgz15* mitjançant PCR segons esta descrit a l'apartat 3.1.2.2.

3.1.2.2 **Comprovació de la presència del gen *tgz15***

Per tal de comprovar la presència del gen *tgz15* en el plasmidi purificat es fa una reacció de PCR amb dos encebadors d'una seqüència interna del gen *tgz15*.

Com a encebador anvers s'utilitza 5'-ATACA ACTATGCTTATGATGCTGGCACG-3' i com a encebador revers 5'-ATTTGTCTGCTCAACAAATGTGCATG-3'

Les condicions de la reacció de PCR utilitzant els reactius del "PCR amplification kit" de Takara i el termociclador MJ Research PTC 200 Thermal Cycler son les següents:

Composició: 5 µL DNA plasmídic

5 µL tampó PCR 10x

4 µL dNTPs (2mM)
1 µL d'encebador anvers
1µL d'encebador revers
0,25 µL de Taq polimerasa
33,5 µL d' aigua MilliQ

Programa del termociclador

- Desnaturalització inicial 30" a 98°C
- 42 cicles:
 - Desnaturalització 10" a 98°C
 - Alineament 2' a 55°C
 - Extensió 2' a 72°C
- Extensió final 2' a 72°C

Es comprova la presència d'una única banda de 371 pb en un gel d'agarosa al 2% segons es descriu a l'apartat 3.1.2.3.

3.1.2.3 ***Electroforesis en gels d' agarosa per a la visualització de DNA***

Per tal de visualitzar el DNA, es realitza una electroforesi en gel d'agarosa segons la següent metodologia:

Preparació del gel d'agarosa

1. Preparar el suport del gel d'agarosa i col·locar la pinta que servirà per a formar els pouets del gel.
2. Abocar en un matràs 50mL del tampó d'electroforesi TBE 1X i la quantitat d'agarosa necessària per preparar el gel desitjat: Per exemple: 0,4g d'agarosa per un gel al 0,8% o 1g d'agarosa per a un gel al 2% .
3. Dissoldre completament la solució d'agarosa en el microones.
4. Deixar refredar la dissolució fins aproximadament 50°C (que es pugui agafar amb la mà).
5. Afegir, amb molt de compte, 1 gota/50µL de bromur d'etidi la dissolució d'agarosa i agitar el matràs amb suavitat.
6. Abocar la dissolució d'agarosa amb bromur d'etidi sobre el suport amb la pinta i deixar refredar durant 30 minuts.

Electroforesi

7. Col·locar el gel amb el suport dins de la cubeta d'electroforesi. Els pouets han d'estar al costat del càtode.
8. Afegir tampó d'electroforesi TBE dins de la cubeta, de forma que cobreixi bé el gel d'agarosa.
9. Retirar la pinta del gel amb suavitat.
10. Barrejar la mostra de DNA 4 a 1 amb tampó de carrega (6x). Per exemple 20µl de DNA i 5µl de tampó de carrega.
11. Aplicar 10µl de la mostra als pouets que es desitgi.
12. Aplicar 5µl de marcadors de pes molecular al davant i al darrera de les mostres.
13. Tapar la cubeta d'electroforesi i connectar els elèctrodes a la font d'alimentació.
14. Programar la font a 100 volts i mantenir aquest voltatge durant uns 30 a 45 minuts, fins que la banda que migra més ràpid arribi al final del gel (sense arribar a sortir-ne).
15. Un cop acabada l'electroforesi es visualitzen els fragments de DNA mitjançant l'exposició del gel a llum UV i si es desitja es pot realitzar una fotografia.

Tampons utilitzats:

Tampó de mostra 6x

Blau de bromofenol	0,25 %
Xilè cianol	0,25 %
Glicerol	30 %
Agua mili Q	Fins a 100mL

Tampó TBE 10X

Tris de Boehringer	108 g
Àcid bòric	55 g
EDTA 0.5 M. pH 8	40 ml
H ₂ O	Fins a 1L

3.1.2.4 **Preparació de cèl·lules competents d'*Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Per tal d'obtenir cèl·lules competents (susceptibles de ser transformades amb un plasmidi), s'utilitza la següent metodologia basada en el mètode del clorur càlcic descrit per Sambrook i col·laboradors¹⁴⁶ que es descriu a continuació:

- 1- Preparar un cultiu líquid de 3mL de medi LB en un tub de centrifuga de 15mL i inocular-lo amb d'una colònia d'*E. coli* BL21(DE3) aïllada d'un cultiu en medi sòlid. Incubar el cultiu a 37°C i 250rpm durant 12 hores.
- 2- Preparar 30mL de medi LB en un matràs d'Erlenmeyer de 100mL amb 300µL del cultiu anterior. Incubar a 37°C i 250rpm fins a una DO₆₀₀ d' aproximadament 0,6UA.
- 3- Transferir el cultiu a un tub de centrifuga de 50mL i mantenir-lo a 0°C durant 20 minuts.
- 4- Centrifugar el cultiu a 3000xg durant 10 minuts a 4°C.
- 5- Decantar el sobrenedant i resuspendre suaument les cèl·lules en 15 mL de CaCl₂ 50mM a 4°C. Manténir 15 minuts a 0°C.
- 6- Centrifugar el cultiu a 3000xg durant 10 minuts a 4°C.
- 7- Decantar el sobrenedant i resuspendre suaument les cèl·lules en 2,4 mL de CaCl₂ 50mM a 4°C.
- 8- Afegir 600 µL de glicerol pur i congelar les cèl·lules a -80°C en parts alíquotes de 100µL en tubs de microcentrifuga.

3.1.2.5 **Transformació de cèl·lules d'*Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Per tal de transformar el bacteri *E. coli*, es parteix de les cèl·lules preparades segons la metodologia descrita a l'apartat 0 i DNA del plasmidi pET-28 que conté el gen *tgz15* o bé el plasmidi pGro7 obtingut segons està descrit a l'apartat 3.1.2.1. A continuació es segueix el següent procediment:

- 1- Descongelar una part alíquota de 100µL de cèl·lules competents submergint-les en gel.
- 2- Afegir 15ng de DNA plasmídic i deixar la barreja en gel durant 30 minuts.

- 3- Introduir les cèl·lules en un bany termostatitzat a 42°C durant 2 minuts i seguidament deixar-les en gel durant 10 minuts.
- 4- Afegir 100µL de medi SOB i incubar a 37°C i 250 rpm durant una hora.
- 5- Sembrar varies parts alíquotes en plaques de medi LB sòlid (1,5% agar) amb l'antibiòtic selectiu adient* utilitzant una nansa de Digrafsky. Incubar a 37°C durant 12-24 hores fins l'aparició de colònies.

*Antibiòtic selectiu: kanamicina 30µg/mL per al plasmidi pET28 i cloramfenicol 34µg/mL per al plasmidi pGro7.

3.1.2.6 **Conservació de les soques**

Per tal de conservar les soques transformades obtingudes en l'apartat 3.1.2.5, es prepara un banc cel·lular. Es procedeix de la següent forma:

- 1- Preparar 50 mL de medi LB líquid en un matràs d'Erlenmeyer de 250mL i afegir-hi l'antibiòtic selectiu*.
*Antibiòtic selectiu: kanamicina 30µg/mL per al plasmidi pET28 i cloramfenicol 34µg/mL per al plasmidi pGro7.
- 2- Inocular amb d'una colònia aïllada d'un cultiu en medi sòlid obtingut mitjançant el procediment descrit a l'apartat 3.1.2.5.
- 3- Incubar a 250rpm i 37°C durant aproximadament 12 hores i que la DO₆₀₀ estigui entre 0,6 i 0,8 UA.
- 4- Afegir 0,8 mL del cultiu a un criovial de 2mL i completar el volum a 1mL amb glicerol pur estèril. Procedir d'aquesta manera fins a esgotar el cultiu de l'apartat 3.
- 5- Congelar ràpidament a -80°C.

Cadascun dels tubs obtinguts s'anomena glicerinat.

3.1.3 Disseny del medi de cultiu per a l'expressió de *tgz15* en *Escherichia coli* BL21(DE3)

Per tal d'obtenir un medi de cultiu el més adequat possible per al creixement d'*E. coli* BL21 (DE3), es realitza un disseny experimental a partir dels components del medi de cultiu que s'han mencionat a l'apartat 1.4 de la introducció.

3.1.3.1 Disseny de Taguchi

Els factors i interaccions que s'estudiaran son els següents.

Taula 6 Factors, interaccions i els seus graus de llibertat.

Factor / Interacció	Nivells	Graus de llibertat
Font de fòsfor	2	1
Font de carboni	3	2
Concentració nitrogen	4	3
Concentració fòsfor	4	3
Concentració magnesi	4	3
Concentració calci	4	3
Concentració ferro	4	3
Concentració d'elements traça	4	3
Presència antiespumant	2	1
Interacció magnesi/fòsfor	-	9
Interacció fòsfor/nitrogen	-	9
Interacció nitrogen/magnesi	-	9

L'estudi dels factors i interaccions que es descriuen a la taula correspon a un disseny ($2^2 \times 3^1 \times 4^7$). Per abordar el problema amb un disseny factorial complet s'haurien de realitzar 196.608 experiències. Encara que aquest nombre d'experiències es podria reduir utilitzant un disseny factorial fraccionat i establint confusions entre els factors i les interaccions, el nombre d'experiències continuaria sent elevat. Tal i com s'ha dit a la introducció, un dels avantatges dels dissenys de Taguchi es que permeten obtenir la informació desitjada utilitzant menor nombre d'experiències.

Degut a la gran quantitat d'elements traça que conte un medi de cultiu i les baixes concentracions en que estan presents, sembla raonable incloure'ls en el disseny de

forma conjunta, variant la concentració de tots els elements en bloc. S'ha pres com a referència la concentració utilitzada en dos publicacions en les que s'han obtingut de forma satisfactòria cultius d'alta densitat^{99,100} i ajustant-la a les condicions de l'experiment. Els elements traça considerats són: manganès, cobalt, coure, molibdè i bor. S'ha inclòs també l'alumini com a factor independent ja que no està presents en molts dels medis revisats.

Aplicant la metodologia de Taguchi es pot calcular la matriu ortogonal més petita per a poder encabir l'experiment.

Per tal de seleccionar la matriu ortogonal més adequada es realitza el càlcul dels graus de llibertat del disseny de la següent manera:

1. Es troben els graus de llibertat (gdl_f) de cadascun dels factors segons l'Equació 2

$$gdl_f = n^{\circ} \text{ nivells} - 1$$

Equació 2.

2. Es troben els graus de llibertat de cada interacció (gdl_i) segons l'Equació 3

$$gdl_i = gdl_{f1} \cdot gdl_{f2}$$

Equació 3.

3. Es calculen els graus de llibertat totals (gdl_t) segons l'Equació 4

$$gdl_t = \sum_1^{\text{factors}} gdl_f + \sum_1^{\text{interaccions}} gdl_i$$

Equació 4.

4. La matriu ortogonal mínima, L_n es troba a partir de l'Equació 5

$$n = gdl_t + 1$$

Equació 5.

Si no existeix cap L_n s'escull la matriu ortogonal immediatament superior que existeixi.

La suma dels graus de llibertat es 49 amb la qual cosa es necessari com a mínim una matriu L_{50} . Al haver-hi factors a 2 nivells i a 4 nivells i ja que inserir factors a 4 nivells en una matriu a 2 nivells no provoca una pèrdua d'ortogonalitat, es decideix treballar amb una matriu 2^n . La matriu més petita per encabir l'experiment es una $L_{64}(2^{63})$, la qual requereix 64 experiments.

S'ha de tenir en compte que una de les limitacions del dissenys de Taguchi es que només permeten calcular interaccions de 2on ordre considerant menyspreables les d'ordre superior. En el cas d'utilitzar un disseny factorial complet es podrien calcular totes les

interaccions d'ordre superior i entre tots els factors, però a la pràctica aquesta informació no acostuma a ser rellevant i no compensa l'elevadíssim nombre d'experiments que es requereixen per dur-lo a terme.

A continuació es presenta la matriu $L_{64}(2^{63})$.

La matriu L_{64} s'ha de modificar per tal de poder introduir-hi 7 factors a 4 nivells i un factor a 3 nivells utilitzant les tècniques explicades a l'apartat 1.4.1 de la introducció.

Per tal d'introduir factors a 4 nivells en una matriu a dos nivells s'ha d'utilitzar la tècnica de la formació de nivells múltiples amb la qual s'utilitzen 3 columnes a 2 nivells per generar-ne una a 4 nivells. S'utilitza aquesta tècnica 7 cops per introduir els 7 factors a 4 nivells. Per tal d'introduir el factor a 3 nivells s'utilitza la tècnica de la columna desocupada que permet utilitzar 3 columnes a 2 nivells (1 desocupada i dos pel factor) per generar una columna a 3 nivells. Després d'aplicar aquestes modificacions la matriu passarà a tenir 47 columnes que es repartiran de la següent manera. 7 columnes per als factors a 4 nivells. Cadascuna de les interaccions entre els factors a 4 nivells ocuparà 9 columnes per tant sumaran un total de 27 columnes. El factor a 3 nivells ocuparà una columna i els 2 factors a 2 nivells 1 columna cadascun. Això fa un total de 37 columnes ocupades. La resta de columnes queden desocupades i es poden utilitzar per a calcular l'error experimental.

El següent pas es distribuir els 9 factors i les seves interaccions en les columnes de la matriu. Això com s'ha dit abans es pot fer utilitzant la taula triangular de la matriu L_{64} . En matrius d'aquesta grandària resulta força laboriós distribuir els factors i interaccions de forma manual amb la qual cosa s'ha utilitzat una aplicació informàtica desenvolupada a l'IQS¹⁴⁷. El programa ha permès veure també que era possible introduir la interacció entre la font de fòsfor i la presència d'antiespumant (ambdós factors a 2 nivells) utilitzant una columna, quedant al final 38 columnes ocupades i 7 columnes destinades al càlcul de l'error experimental. S'ha obtingut també la pèrdua d'ortogonalitat que ha suposat introduir les modificacions a la matriu i que ha estat d'un 0,45%.

Pel que fa als nivells de cada factor, en el cas de la font de carboni s'ha fixat a 2 g/L per la glucosa i la fructosa ja que tenen el mateix contingut de carboni, per al glicerol s'han afegit 2,2 g/L per a què hi hagi el mateix nombre de mols de carboni que en les anteriors. Per a la resta de factors, s'ha pres com a nivell mínim la concentració necessària per obtenir 1 g/L de biomassa i com a nivell màxim la concentració necessària per obtenir 150 g/L de biomassa.

Segons Herbert¹⁴⁸ i confirmat per Bauer i Shiloach¹⁴⁹, Shiloach i Bauer¹⁵⁰ i Bauer i Ziv¹⁵¹, es requereixen 0,94 g d'oxigen per obtenir un gram de biomassa. Un

bioreactor pot proveir de mitjana 1,5 mols d'oxigen per litre i per hora, quan s'aireja amb oxigen pur⁹⁶, amb aquesta transferència es podria arribar teòricament una concentració cel·lular de 350 g/L⁹⁶ si els altres requeriments nutricionals estan presents. Aquest valor està per sobre dels 220-250 g/L on es perdria la fluïdesa del medi^{150,152}, per tant l'oxigen no seria un paràmetre limitant en el creixement.

Es recomana que la concentració de cadascun dels components sigui ajustable independentment sempre que sigui possible¹³⁰, tot i que alguns autors no han pres aquesta recomanació i han utilitzat factors no independents com ara fosfat com a font de fòsfor i fosfat amoni com a font de nitrogen¹⁵³ amb el consegüent solapament de factors, atribuint després la falta de correlació a aquest fet.

Els nivells que s'han definit per a cada factor han estat els que figuren a la taula següent:

Taula 8 Nivells de cada un dels factors.

Factor	Compost / formula	Nivells	Valors
Font fòsfor	Ortofosfat / KH_2PO_4 Polifosfat / $(\text{NaPO}_3)_n \cdot \text{Na}_2\text{O}$	1	Ortofosfat
		2	Polifosfat
Font de carboni	Glucosa / $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ Glicerol / $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ Fructosa / $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1	2,0 g/L
		2	2,2 g/L
		3	2,0 g/L
Antiespumant	Antifoam 204 Sigma	1	Si (100□L)
		2	No
Nitrogen	Clorur amònic / NH_4Cl	1	0,5349 g/L
		2	3,3750 g/L
		3	6,2150 g/L
		4	9,0551 g/L
Fòsfor	Ortofosfat / KH_2PO_4 Polifosfat / $(\text{NaPO}_3)_n \cdot \text{Na}_2\text{O}$	1	Ortofosfat / Polifosfat 0,1318 / 0,1100 g/L
		2	6,6784 / 5,5769 g/L
		3	13,2251 / 11,0438 g/L
		4	19,7717 / 16,5106 g/L
Magnesi	Clorur de magnesi / $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1	0,0507 g/L
		2	0,3671 g/L
		3	0,6836 g/L
		4	1,0000 g/L
Ferro	Sulfat de ferro / $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0,0102 g/L
		2	0,3401 g/L
		3	0,6701 g/L
		4	1,0000 g/L
Calci	Clorur de calci / $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	0,0238 g/L
		2	0,3492 g/L
		3	0,6746 g/L
		4	1,0000 g/L
Alumini	Clorur d'alumini / AlCl_3	1	0,0000 g/L
		2	0,0255 g/L
		3	0,0511 g/L
		4	0,0766 g/L
Elements traça	Els elements traça utilitzats es detallen a la Taula 9	1	La concentració dels
		2	elements traça està detallada
		3	a la
		4	Taula 9

Taula 9 Nivells dels elements traça.

Compost / formula Elements traça	Nivell mL/L			
	1	2	3	4
Clorur de cobalt / $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0301	1,5234	3,0167	4,5100
Clorur de manganès / $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1790	9,0860	17,9930	26,9000
Sulfat de coure / $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0340	1,7227	3,4113	5,1000
Borat de sodi / $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,0564	2,8576	5,6588	8,4600
Molibdat de sodi / $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0301	1,5234	3,0167	4,5100
Clorur de zinc / ZnCl_2	0,1440	7,2960	14,4480	21,6000

Un cop aplicats tots els canvis en la matriu ortogonal i distribuïts els factors i interaccions, la matriu experimental es la de la Taula 10.

Taula 11 Codificació dels factors en la Taula 10.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Antiespumant	Font de fòsfor	Font de C	Nitrogen	Fòsfor	Magnesi	Calci	Ferro	Elements traça	Alumini

Les columnes amb dues lletres representen la interacció entre els factors codificats per aquestes lletres.

Preparació dels medis de cultiu

S'utilitzen matrassos d'Erlenmeyer de 250mL amb deflectors. Cadascuna de les dissolucions s'enrasa a un volum final de 100mL amb les concentracions que indica la matriu experimental.

Es prepara cada dissolució pesant per separat la quantitat de cadascun dels elements utilitzant una balança analítica i es dissolen en aigua ultra pura. S'afegeix la font de carboni, s'ajusta el pH amb hidròxid sòdic i s'enrasa la dissolució a 100mL en un matràs aforat. Per altre banda s'esterilitzen els matrassos d'Erlenmeyer, buits i tapats amb un tap d'espuma hidrofòbic, a l'autoclau durant 30 minuts a 121°C. S'esterilitzen les dissolucions per filtració (filtre hidrofòbic de 0,22µm) i posteriorment s'afegeix la dissolució estèril als matrassos Erlenmeyer a la campana de flux laminar.

Per a preparar l'inòcul, s'introdueixen 100mL de medi LB a pH 7,0 en un matràs Erlenmeyer de 250mL amb deflectors i s'esterilitza a l'autoclau 30 minuts a 121 °C. Un cop fred, s'afegeix kanamicina prèviament esterilitzada per filtració a una concentració final de 30µg/mL a la campana de flux laminar i seguidament s'inocula el medi amb 100µL d'un glicerinat d'*E. coli* BL21 (DE3) tgz15 obtingut com està descrit a l'apartat 3.1.2.

S'introdueix a l'incubador orbital a 37°C i 250rpm i deixa créixer (durant unes 12 a 16 hores) fins que la densitat òptica estat entre 1,5 i 4,5 unitats d'absorbància mesurada a 600nm.

Quan l'absorbància del contingut de l'inòcul està en el marge indicat, s'inocula cadascun dels matrassos Erlenmeyer de que consta l'experiment amb 400µL del contingut del matràs d'inòcul dins la campana de flux laminar en condicions asèptiques. Seguidament s'introdueixen els matrassos en un incubador orbital a 37°C i 250rpm. Es va mesurant l'absorbància a 600nm cada mitja hora fins que

aquesta comenci a disminuir. La dada que es pren per al càlcul es la de màxima biomassa produïda, mesurada com a absorbància a 600nm.

Procediment per a l'anàlisi de Pareto

Un cop obtinguts els valors de creixement cel·lular segons les condicions marcades en la matriu experimental, els resultats es processen mitjançant l'anàlisi de Pareto.

1. Es fa la mitjana de les repeticions de les experiències.
2. Es calcula la mitjana de cada columna sumant totes les respostes corresponents a aquell nivell i dividint pel nombre d'experiències del nivell. Representant gràficament la mitjana de cada nivell en front els nivells s'obtenen les gràfiques factorials. Aquestes gràfiques s'han de representar en la mateixa escala per a tots els nivells i permeten comparar els nivells de cada factor entre ells i veure si al canviar de nivell es produeixen canvis significatius o no.
3. Es calcula la suma dels quadrats de les diferències. En el cas de les interaccions, si aquestes es troben en més d'una columna, es sumen les sumes de diferències dels quadrats de cada columna.
4. Es calcula la mitjana dels quadrats de cada factor i cada interacció dividint la suma de quadrats de les diferències entre el nombre de graus de llibertat de cada factor i interacció.
5. Es calcula el percentatge de contribució de cada factor i cada interacció dividint la mitjana de quadrats per la suma de totes les mitges de quadrats i multiplicant per 100.
6. S'ordenen les dades de forma ascendent i es representen en un gràfic de barres.

3.1.3.2 *Optimització de la composició del medi mitjançant una superfície de resposta*

Un cop finalitzat i analitzat el disseny de Taguchi, es passa a optimitzar la composició del medi de cultiu obtingut mitjançant la metodologia de la superfície de resposta.

El model que s'ha escollit per ajustar la superfície de resposta es el del polinomi de segon ordre.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

Equació 6 Model a la superfície de resposta de 2on ordre.

El model quadràtic té un terme constant, k termes de primer ordre, k termes quadràtics, i $k(k - 1)/2$ interaccions que sumen un total de $p=(k + 1)(k + 2)/2$ termes¹⁵⁴.

Tal i com s'indica a l'apartat 1.4.2 de la introducció, s'utilitza un disseny CCD.

Disseny central compost (CCD)

Es construeix a partir de 3 grups de punts que poden ser descrits de la següent manera:

- Els 2^k vèrtex $(\pm 1, \pm 1, \dots, \pm 1)$ d'un "cub" de k dimensions (sent $k \leq 4$), o una fracció del cub (quan $k \geq 5$).
- Els $2k$ vèrtex $(\pm \alpha, 0, \dots, 0), (0, \pm \alpha, \dots, 0), \dots, (0, 0, \dots, \pm \alpha)$ d'una estrella.
- Un nombre n_0 de "punts centrals", $(0, 0, \dots, 0)$.

K= numero de variables a estudiar en el disseny.

El primer conjunt està compost per un disseny factorial complet 2^k o bé una fracció del factorial 2^{k-p} si $k \geq 5$. La notació $(\pm 1, \pm 1, \dots, \pm 1)$ representa que els 2^k punts que s'obtenen de totes les possibles combinacions de signes es fan servir per al disseny factorial complet (normalment aquests punts se'ls anomena cub, sigui quin sigui el nombre de factors).

El segon conjunt està format per parells de punts en els eixos de coordenades, tots a distància α de l'origen (el valor d'alfa s'especificarà més endavant; fa referència a si aquest conjunt de punts queda dins o fora del cub format els punts

del primer conjunt). Per a dissenys de tres dimensions aquests punts formen un octaedre, i a vegades es fa servir aquest mateix terme per a dissenys d'altres dimensions, tanmateix com s'ha dit anteriorment, el nom general que es recomana utilitzar per a dissenys de k dimensions es estrella.

El valor de α determina si els punts de l'estrella es troben dins ($\alpha < 1$), fora ($\alpha > 1$) o a les parets ($\alpha = 1$) del cub. Box i Hunter¹³⁶ van demostrar que els valors de α venen definits per l'equació $\alpha = 2^{(k-p)/4}$, on p adquireix el valor de 0, 1 ó 2 depenent de la fracció del cub utilitzada en el disseny.

Respecte a l'elecció del nombre de punts centrals, existeixen varis criteris els quals han estat recollits per Draper¹⁵⁵. De forma general per tal d'avaluar tots el coeficients se'n necessita almenys un i normalment en fan falta entre 2 i 4.

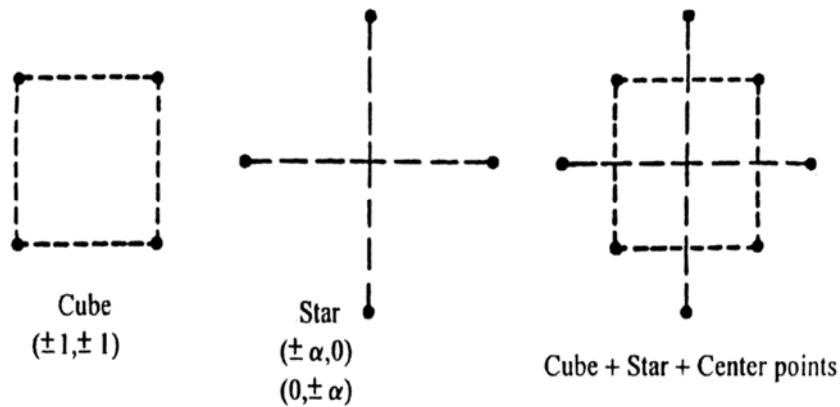


Figura 14 Disposició espacial dels diferents grups de punts per a un disseny compost de 2 variables¹⁵⁶.

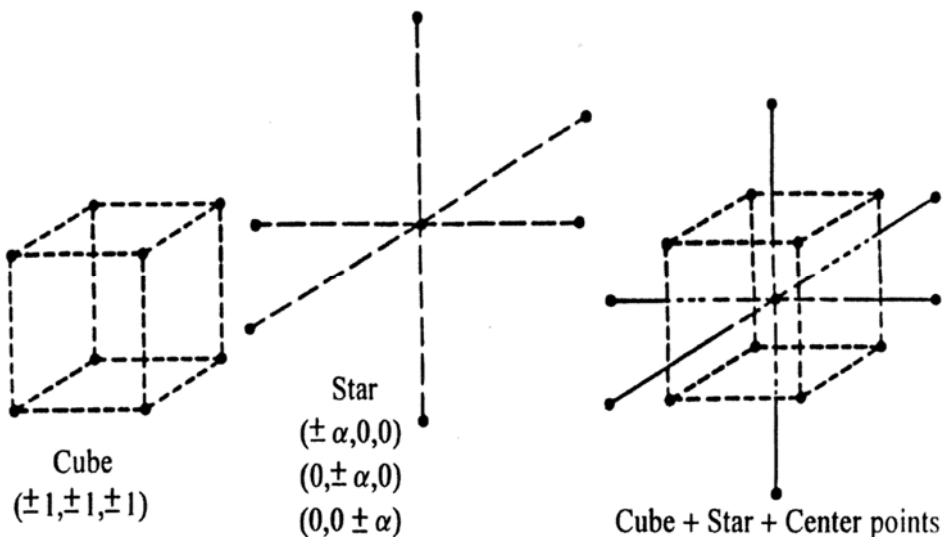


Figura 15 Disposició espacial dels diferents grups de punts per a un disseny compost de 3 variables¹⁵⁶.

El cub es pot fraccionar sempre que el disseny resultat permeti avaluar individualment els coeficients de l'Equació 6. Això està garantit sempre que k sigui major o igual a 5. Per tant el disseny fraccionat més petit es el 2^{k-1} , on $k=2$, 6 o 7, 2^{k-2} per a $k=8$ o 9 i 2^{k-3} per a $k=10$ i següents¹⁵⁷.

A la següent taula es pot veure un resum les característiques del disseny per als casos de 2 a 9 variables.

Taula 12 Resum del disseny central compost de 2 a 9 variables¹⁵⁶.

No. of variables	k	2	3	4	5	6	7	8	9
No. of parameters	$(k+1)(k+2)/2$	6	10	15	21	28	36	45	55
Cube + star	$2^k + 2k$	8	14	24	—	—	—	—	—
$\frac{1}{2}$ (cube) + star	$2^{k-1} + 2k$	—	—	—	26	44	78	—	—
$\frac{1}{4}$ (cube) + star	$2^{k-2} + 2k$	—	—	—	—	—	—	80	130
α (rotatable)	$2^{(k-p)/4}$	1.414	1.682	2	2	2.378	2.828	2.828	3.364
Suggested n_0		2-4	2-4	2-4	0-4	0-4	2-4	2-4	2-4

3.1.3.3 *Avaluació del consum de nutrients*

Un cop s'ha optimitzat la composició del medi de cultiu mitjançant el mètode de Taguchi i de la superfície de resposta, es procedeix a determinar el consum de cada component durant el creixement cel·lular. D'aquesta manera es podrà formular un medi d'alimentació que permeti mantenir la concentració de cada un dels components en el punt òptim. Segons Lee¹⁵², un medi amb concentracions màximes no inhibidores permet assolir una concentració de 15 g/L *E. coli*. Aquesta afirmació dona suport a la idea d'afegir els components a mesura que es van consumint. No s'avalua el consum d'amoni perquè es considera que ja es manté constant amb el control de pH. Tampoc s'avalua el consum de bor perquè l'analitzador utilitzat no n'és capaç.

S'utilitza un bioreactor NBS Bioflo 110 de 1,3L de volum total amb 900mL de medi BIOTIQS Coli, el medi que s'ha obtingut com a resultat d'aplicar el disseny de Taguchi i la metodologia de la superfície de resposta (veure composició a la de l'apartat 4.1.1.2). S'afegeixen tots els components al medi menys la font de carboni (10g/L) que s'esterilitza de forma separada per filtració. S'esterilitza el

reactor 45 minuts a l'autoclau a 121°C i un cop a temperatura ambient s'afegeix la font de carboni i s'inocula amb 50mL d'inòcul preparat de la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment.

S'utilitza control de pH amb hidròxid amònic 4 M, control de l'oxigen dissolt variant la velocitat d'agitació i de temperatura mitjançant una camisa calefactora i un serpentí de refrigeració.

Es prenen dues mostres, una després d'inocular i un altre quan s'acaba la font de carboni (aquest punt es detecta mitjançant la detecció una pujada brusca en la concentració d'oxigen dissolt, que es produeix quan s'ha acabat la font de carboni i per tant les cèl·lules deixen de consumir oxigen).

Es realitzen 3 creixements diferents per avaluar el consum de cada component per a cada font de carboni. Com a font de carboni s'utilitza glucosa, fructosa i glicerina. Es fan 3 experiments per a cada font de carboni.

Es quantifiquen els paràmetres que figuren a la Taula 13 de per a la mostra inicial i final de cada experiment.

Taula 13 Paràmetres analitzats i mètode analític utilitzat.

Analit	Mètode d'anàlisi
Fòsfor	Mètode colorimètric de l'àcid vanadomolibdofosfòric. Es fa seguint el procediment descrit a Standard Methods ¹⁵⁸ . S'utilitza un espectrofotòmetre per a les lectures.
Ions metàl·lics (Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo i Zn)	Es quantifiquen per "inductive coupled plasma (ICP)" segons el mètode descrit a Standard Methods ¹⁵⁸ . S'utilitza un aparell Spectro Ciros Vision ICP, amb el software Smart Analyzer Vision v2.10.620.
Biomassa	Densitat òptica a 600nm amb un espectrofotòmetre . Pes sec en tubs de microcentrífuga assecats a l'estufa a 70°C fins a pes constant.

3.1.4 Expressió de TGZ15 en matràs d'Erlenmeyer.

3.1.4.1 Inducció amb IPTG

Per tal d'expressar la proteïna TGZ15 s'utilitzen cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) transformades amb el plasmidi pET-28 que té clonat el gen *tgz15*. S'introdueixen 100mL de medi BIOTIQS Coli (veure Annex 1) amb 15g/L de glucosa en un matràs d'Erlenmeyer de 500mL. S'inocula el matràs amb 100 μ L d'un glicerinat del bacteri i s'introdueix a l'incubador orbital a 37°C i 220rpm. Quan la densitat òptica arriba a 0,4UA (mesurada 600nm) es baixa la temperatura fins a 25°C i s'indueix la producció de la proteïna recombinant afegint IPTG a una concentració final de 50 μ M a 1000 μ M. Un cop transcorregudes 5h d'inducció, es centrifuga el cultiu 10 minuts a 4500xg i es congelen les cèl·lules a -80°C.

3.1.4.2 Inducció amb lactosa

S'utilitzen cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) transformades amb el plasmidi pET-28 que té clonat el gen *tgz15*.

S'introdueixen 100mL de medi BIOTIQS Coli amb 0,9g/L de glucosa en un matràs d'Erlenmeyer de 500mL. S'inocula el matràs amb 100 μ L d'un glicerinat del bacteri transformat i s'introdueix a l'incubador orbital a 37°C i 220rpm. Quan la densitat òptica arriba a 0,4UA (mesurada 600nm) es baixa la temperatura a 25°C i s'indueix la producció de la proteïna recombinant afegint lactosa (120g/L) a una concentració final de 15g/L. Un cop transcorregudes 5h d'inducció, es centrifuga el cultiu 10 minuts a 4500xg i es congelen les cèl·lules a -80°C.

3.1.4.3 Extracció de proteïna soluble e insoluble

Un cop s'ha expressat la proteïna TGZ15 segons està descrit als apartats 3.1.4.1 o 3.1.4.2, els cossos d'inclusió i la fracció soluble s'obtenen utilitzant el reactiu B-PER® II "Bacterial Protein Extraction Reagent" (Pierce 78260) i es segueix el "Protocol for Maxi-Scale Bacterial Protein Extraction" del fabricant amb algunes modificacions. Les quantitats de cadascun dels reactius suposen un cultiu de 250mL amb una OD600 entre 1.5 i 3, de manera que per cultius amb diferent volum i/o densitat òptica, els volums de reactiu utilitzats s'han d'ajustar de

manera que es mantingui la relació volum de reactiu / biomassa. A continuació es detalla el protocol modificat:

1. Resuspendre les cèl·lules en 7 mL del reactiu, fins a obtenir una suspensió homogènia utilitzant una pipeta de 10mL. Un cop s'obté la suspensió, s'incuba 10 minuts a temperatura ambient en agitació.
2. Separar la proteïna soluble de la insoluble centrifugant la suspensió a 27000xg durant 15min. Es recull el sobrenedant (proteïna soluble) i guardar-lo en gel.
3. Continuar treballant amb el precipitat per obtenir la proteïna restant en forma de cossos d'inclusió.
4. Resuspendre el precipitat en 7mL de B-PerII.
5. Afegir lisozima (L6876 SIGMA) fins a una concentració final de 200µg/mL i 10µL de Dnase I (Roche Cat.no. 04716728001). Incubar a temperatura ambient durant 5 min.
6. Agregar 100mL de B-Per II diluït 1 a 20, barrejar i centrifugar a 27000xg durant 15min.
7. Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 100mL de B-Per II diluït 1 a 20 i repetir el procés dues vegades més.
8. Finalment es solubilitza el precipitat obtingut en urea 8M (desnaturalitzant) per a la detecció i quantificació de la proteïna expressada o bé es segueixen els procediments d'obtenció de proteïna soluble descrits als apartats 3.1.5.1 i 3.1.5.2

3.1.5 Sistemes de solubilització de cossos d'inclusió

Per tal d'augmentar la quantitat de proteïna soluble (i per tant activa) recuperada del total de la proteïna TGZ15 expressada, es plantegen dues estratègies. La primera consisteix en obtenir proteïna soluble mitjançant procediments d'extracció i replegament dels cossos d'inclusió. Aquesta metodologia està descrita als apartats 3.1.5.1 i 3.1.5.2. La segona estratègia consisteix en actuar sobre el procés de formació dels cossos d'inclusió dins de la cèl·lula. Aquests procediments estan descrits als apartats 3.1.5.3 i 3.1.5.4.

3.1.5.1 **Procés de replegament “refolding”**

Es parteix de la fracció de cossos d'inclusió obtinguda a l'apartat 8 del procediment 3.1.4.3. S'incuba una alíquota de 0,1 a 1mg/ml de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 en tampó de replegament B9 (Fold Screening kit, Hampton Research, Foldt™ HR2-229) (MES 55 mM, NaCl 264 mM, KCl 11 mM, PEG 3350 0,055% [p/v], guanidina-HCl 550 mM, MgCl₂ 2,2mM, CaCl₂ 2,2mM i sacarosa 440mM) durant 6 hores a 4°C en agitació orbital a 4rpm. Les solucions es dialitzen utilitzant el tampó de recuperació (MES 55mM, NaCl 50mM, DTT 1mM, Ca²⁺ 1,5mM, L-Arg/L-Glu 50mM, i β-octil-glucopiranosid 0,5%) per eliminar el tampó B9 i precipitar les proteïnes que no s'hagin replegat correctament. Per tal de verificar que les proteïnes s'han replegat correctament es realitza un dels assajos d'activitat TGasa (protocols descrits als apartats 0 i 3.1.7.2).

3.1.5.2 **Solubilització de cossos d'inclusió mitjançant detergents no desnaturalitzants**

Es parteix de la fracció de cossos d'inclusió obtinguda a l'apartat 8 del procediment 3.1.4.3. El precipitat es solubilitza en trítion X-100 1% + tris-HCl 20 mM durant 12h a 4°C (7mL por cada 250mL de cultiu original del que s'han extret els cossos d'inclusió). Passat aquest temps el cultiu es centrifuga a 27000xg durant 15min i s'analitza el sobrenedant i el precipitat per tal de determinar el percentatge de recuperació de proteïna soluble i activa segons els procediments descrits als apartats 3.1.6 i 3.1.7.

3.1.5.3 **Solubilització de cossos d'inclusió mitjançant la coexpressió de xaperones**

Transformació

Es parteix de cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) transformades amb el plasmidi pET28 que conté el gen tgz15. S'aplica el procediment 0 a aquestes cèl·lules per tal de fer-les competents. Seguidament, es transformen aquestes cèl·lules amb el plasmidi pGro7 de TAKARA Bio inc mitjançant el protocol 3.1.2.5. Aquest plasmidi confereix resistència a cloramfenicol, per tant a l'hora de seleccionar els transformants s'haurà de fer amb plaques que continguin medi LB sòlid amb

cloramfenicol (34 µg/mL) i kanamicina (30 µg/mL). Un cop s'obtenen colònies es prepara un banc cel·lular com està descrit al protocol 3.1.2.6.

Coexpressió de TGZ15 i xaperones

Es prepara un matràs de 500mL amb 100mL de medi LB i, després d'esterilitzar a l'autoclau (20 minuts a 121°C), s'hi afegeix kanamicina a una concentració final de 30 µg/mL i cloramfenicol a una concentració final de 34 µg/mL. S'inocula aquest matràs amb 100µL del banc cel·lular preparat a l'apartat anterior i s'introdueix a l'incubador orbital a 250rpm i 37°C durant 12 hores.

Es prepara un matràs d'Erlenmeyer de 500 mL amb 100mL de medi BIOTIQS Coli (veure Annex 1). Després d'esterilitzar el medi a l'autoclau (20 minuts a 121°C) s'afegeix glucosa estèril a una concentració final de 15g/L. S'inocula aquest matràs amb 500µL de l'inòcul preparat en medi LB i s'incuba a 37°C i 250rpm fins que la densitat òptica esta entre 0,4 i 0,6 unitats d'absorbància. En aquest moment s'indueix l'expressió de xaperones mitjançant l'addició d'arabinosa a una concentració final del 0,05% durant 30 minuts a 37°C i 250rpm. Passats els 30 minuts s'indueix l'expressió de TGZ15 afegint IPTG fins a una concentració final de 50µM i s'incuba el cultiu durant 5 hores a 25°C.

3.1.5.4 Refolding in vivo

El procediment està basat en l'article de Villaverde et al¹⁵⁹. El refolding in vivo es un procediment que pretén aconseguir el replegament dels cossos d'inclusió (IB) formats quan encara estan a l'interior de la cèl·lula.

Es realitza un cultiu d'*E. coli* DL21 (DE3) tgz15 a 37°C i 200rpm en 2 matrassos erlenmeyer de 500 ml que contenen 200 mL de medi BiotIQS coli (veure Annex 1) i una concentració de glucosa de 15 g/L.

Quan la concentració de biomassa (mesurada com absorbància a 600nm) assoleix un valor d' aproximadament 1 unitat es procedeix a induir la producció de TGZ15 afegint 10 µL d'una dissolució de IPTG d'1 M per arribar a una concentració final 50 µM.

Es pren una mostra del medi cada hora durant 5 hores. Per a cada mostra es mesura la concentració de biomassa (mesura com absorbància a 600nm) i es quantifica la seva activitat .

Transcorregudes 3 hores després de la inducció es centrifuga el contingut, s'elimina el sobrenedant i es substitueix per 140 ml de medi BiotIQS coli, s'afegeixen 5 ml de glucosa 500 g / l i 170 µl de dissolució de cloramfenicol 100 mg/mL (per obtenir una concentració final de 34 µg/ml) per aturar el creixement i es retorna el matràs a la incubadora orbital en les mateixes condicions anteriors durant 7 hores.

3.1.6 Detecció i quantificació de les proteïnes expressades

Per tal de detectar i/o quantificar l'expressió de la proteïna TGZ15, es separa per electroforesi l'extracte de proteïnes obtingut seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.6.2. Seguidament es tenyeix amb blau de Coomassie (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.3) o es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa per a detectar la proteïna TGZ15 mitjançant un western blot (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.4).

Les concentracions de proteïna es determinen amb un assaig de proteïna colorimètric (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.1) utilitzant albúmina de sèrum boví (BSA) com a estàndard.

3.1.6.1 Quantificació de proteïna total

Per tal de quantificar la proteïna total expressada ja sigui en forma soluble o insoluble (IB), s'utilitza el reactiu BioRad© Protein Assay que està basat en el mètode de Bradford. Es segueix el protocol de l'assaig estàndard descrit en el manual del fabricant.

1. Preparar el reactiu diluint el colorant BioRad© una part en quatre amb aigua desionitzada.
2. Filtrar la dissolució amb paper de filtre Watman no. 1.
3. Preparar quatre dilucions de BSA (sèrum d'albúmina boví): 0,2, 0,4, 0,6 i 0,9mg/ml. Es parteix d'un estoc amb una concentració de 10mg/mL i es prepara la següent taula de dilucions.

BSA (µl)	H2O (µl)
2	98
4	96
6	94
9	91

- Preparar tres dilucions de cada una de les mostres a analitzar, tal i com s'indica en la següent taula:

Mostra (μl)	H ₂ O (μl)
5	95
10	90
15	85

- Pipetejar 100 μl de cada una de les dissolucions estàndard de BSA i de cada una de les mostres en un tub d'assaig de vidre.
- Afegir 5ml del reactiu de Biorad preparat a l'apartat 1 a cada tub i homogeneïtzar.
- Incubar a temperatura ambient durant 15 minuts.
- Llegir l'absorbància a una longitud d'onda de 600nm. Construir una recta d'absorbància front concentració utilitzant les lectures dels estàndards i interpolar-hi les lectures de les mostres per tal d'obtenir la concentració de proteïna total de cada una.

3.1.6.2 *Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida*

Per tal de separar i visualitzar les proteïnes expressades i extretes es realitza una electroforesi en gel de poliacrilamida.

Preparació dels gels

En aquest protocol es descriu la preparació de 4 gels de 0,75 mm de gruix utilitzant el kit per a preparació de gels de Biorad (Miniprotean 3). Cada gel de poliacrilamida consta de dos parts, el gel concentrador i el separador.

Reactius	Gel separador	Gel concentrador
Solució A 40 % (acrilamida/bisacrilamida; 37.5:1. Amresco).	3,75ml	0,48ml
"Lower Buffer", pH 8,8	3.75ml	-
"Upper Buffer", pH 6,8	-	1,25ml
H ₂ O	7,5ml	3,26ml
Plus One TEMED Amersham	10 μl	10 μl
APS (10%)	50 μl	25 μl

“Lower Buffer”: 1.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS. Ajustar a pH 8.8.

“Upper Buffer”: 0.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS. Ajustar a pH 6.8.

1. Preparar la dissolució del gel separador com esta descrit a la taula anterior.
2. Muntar els vidres en el suport del kit utilitzant els separadors de 0,75mm.
3. Utilitzant una pipeta, afegir el gel separador fins a omplir $\frac{3}{4}$ parts de l'espai entre els vidres. Cobrir la resta del volum amb isopropanol fred (4°C) i deixar polimeritzar durant 35 minuts.
4. Preparar el gel concentrador com s'ha descrit anteriorment, eliminar l'isopropanol dels suports i omplir-los de gel concentrador fins al cap de munt.
5. Col·locar les pintes de 10 pouets i deixar polimeritzar durant 40 minuts.
6. Un cop transcorreguts els 40 minuts, els gels es poden guardar a la nevera embolicats amb paper humit per evitar que s'assequin.

Electroforesi

Es preparen 100mL del tampó de mostra (TM2) i 1L del tampó d'electroforesi de la següent manera:

Tampó de mostra per a electroforesi de proteïna (TM2)

Tris-HCl pH 6.8	125 Mm
Glicerol	20% (v/v)
SDS	4% (p/v)
Blau de bromo-fenol	0.04% (p/v)
β -Mercaptoetanol	10%

Tampó d'electroforesi

Glicina	1.9 M
Tris-HCl	0.25 M
SDS	1.0 % (p/v)

Un cop preparats els tampons es procedeix de la següent manera:

1. Preparar la mostra afegint tampó TM2 1 a 1 i bullir-la durant 5 minuts.
2. Treure les pintes dels gels preparats amb anterioritat i netejar els pouets amb aigua desionitzada.
3. Col·locar els gels a la cubeta d'electroforesis miniprotean 3 de Biorad.
4. Carregar 15 μ L de cada una de les mostres i 5 μ L del marcador de pes molecular (29 a 205kDa) als pouets dels gels.
5. Afegir el tampó d'electroforesi a la cubeta miniprotean 3 de forma que ompli completament l'espai interior entre els dos gels d'acrilamida i 5 cm d'alçada a la part l'exterior (200mL).
6. Sotmetre els gels a un voltatge constant de 200V durant aproximadament 35 minuts (vigilat que el front de color no surti de la superfície del gel).
7. Un cop transcorreguts 35 minuts, desconnectar la font de voltatge i procedir a desmuntar els gels del suport de vidre. Un cop finalitzada la separació per electroforesi, es pot tenyir els gels mitjançant Blau de Coomassie (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.3) per visualitzar el resultat de la separació o bé transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa per a realitzar una immunodetecció de proteïnes per Western blot (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.4).

3.1.6.3 **Tinció de gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie**

Per tal de visualitzar les proteïnes separades mitjançant electroforesi es realitza una tinció utilitzant blau de Coomassie.

El reactiu de tinció es prepara dissolent 1g de blau de Coomasie en 100 mL d'àcid acètic glacial, s'afegeixen 400mL de metanol i s'enrasa a 1L amb aigua desionitzada.

S'incuba el gel de proteïnes obtingut mitjançant el protocol descrit a l'apartat 3.1.6.2 en el reactiu de blau de Coomasie en agitació orbital constant durant una hora.

Un cop s'ha tenyit el gel, es necessari eliminar l'excés de colorant per tal de poder apreciar el patró de bandes de les proteïnes. Per fer-ho es realitza un rentat en 50mL d'una dissolució de destinció (àcid acètic al 7%(v/v) i metanol al 35% (v/v))

durant una hora en agitació orbital. Seguidament es descarta la dissolució, s'afegeixen 50mL més de la dissolució de destinció i es deixa en agitació orbital fins que el fons del gel sigui translúcid.

Per últim es realitza un rentat amb aigua desionitzada i es pren una imatge utilitzant l'equip Fuji LAS 4000.

3.1.6.4 **Protocol d'immunodetecció de proteïnes per Western Blot**

Per tal d'assegurar que s'ha expressat la proteïna TGZ15 i comprovar que el pes molecular es l'esperat, s'immunolocalitza per Western Blot.

Els anticossos primaris utilitzats en aquest protocol son l'anti-T7.tag (Novagen; Dilució 1:10.000) o l'abTGZ15 (dilució 1:5.000). Ambdós anticossos es detecten amb l'anticòs secundari (conjugat) anti-ratolí IgG fosfatasa alcalina (3,33µL en 50 mL de PBS). L'anticòs anti-T7.tag reconeix un pèptid amb 11 aminoàcids codificats en el seqüència líder del gene10 del bacteriòfag T7 i una regió interna de les proteïnes de fusió T7. En el vector pET28, aquesta seqüència està situada abans de la seqüència His-tag que s'afegeix a la proteïna sobreexpressada. L'anticòs anti-TGZ15 es produeix a partir de TGZ15 sobreexpressada en *E. coli* semipurifica⁵⁰.

Aquest protocol parteix del gel que s'ha obtingut per l'electroforesi mitjançant el protocol descrit a l'apartat 3.1.6.2. S'utilitza el kit de transferència Transblot de Biorad.

1. Es prepara un litre de tampó de transferència amb la següent composició:

Tris-HCl	5.82 g/l
Glicina	2.93 g/l
Metanol	200 ml/l
SDS 20 %	1.875 ml/l

2. Es retalla un tros de membrana per a transferència Western, Amersham Hybond™ ECL™ de la mida del gel de proteïnes.
3. S'equilibren les esponges, membrana i papers de filtre submergint-los en tampó de transferència fred (4°C) durant 5 minuts.

4. Es munta el sandvitx com es descriu a continuació: S'apilen els elements començant per la part negra del casset. Es col·loca una esponja, paper de filtre, gel de poliacrilamida (procedent del protocol descrit a la secció 3.1.6.2), membrana de transferència, paper de filtre i finalment l'altre esponja. Un cop apilats es compacta el sandvitx per la part superior amb l'ajuda d'un tub d'assaig (fent-lo rodar) per tal d'eliminar les possibles bombolles que hagin quedat retingudes.
5. Es tanca el casset i es col·loca a la cambra de transferència. La part negra del casset ha de coincidir amb l'elèctrode negre (negatiu). S'introdueix a la cubeta de transferència un bloc de gel i s'omple fins al cap de munt de tampó de transferència fred (4°C).
6. S'afegeix una barra magnètica al fons de la cubeta i es posa en agitació a sobre d'un agitador magnètic. Per tal de mantenir la temperatura baixa es pot posar el sistema en una càmera freda (4°C).
7. Un cop està tot el sistema muntat i en agitació es connecta a una font de voltatge a 110V durant 90 minuts.
8. Després de finalitzar la transferència es desmunta el sandvitx i es tenyeix la membrana amb vermell de Ponceau durant 5 minuts en agitació. Un cop passats els 5 minuts es comprova que hi ha hagut transferència mitjançant la visualització de les bandes. Seguidament es marquen amb llapis les bandes del marcador de pes molecular i es procedeix a destenyir la membrana en PBS 5 minuts en agitació.
9. Es bloqueja la membrana afegint 50mL d'una dissolució de llet desnatada al 5% (2,5g llet desnatada en 50mL de PBS) en agitació orbital durant una hora a temperatura ambient. En aquest punt es pot interrompre el protocol fins al dia següent guardant la membrana en agitació a 4°C.
10. Després del bloqueig es fa un rentat amb 50mL Tween (0.05% v/v) en PBS dues vegades durant 5 minuts en agitació.
11. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari en Tween (0.1% v/v) en PBS (5µL abTGZ15 o anti-T7 tag en 50 mL) durant una hora en agitació orbital a temperatura ambient.
12. S'elimina l'excés d'anticòs primari rentant 3 vegades durant 5 minuts en agitació orbital amb 50mL de Tween (0,1% v/v) en PBS a temperatura ambient.

13. S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari, una hora en agitació orbital a temperatura ambient.
 14. Es fan tres rentats en Tween (0,3%v/v) en PBS, tres rentats en Tween (0,1% v/v) en PBS i un rentat en PBS, tots els rentats amb 50 mL, 5 minuts, en agitació orbital i a temperatura ambient.
 15. Un cop es finalitza l'últim rentat es pot procedir a revelar la membrana per quimioluminescència utilitzant el reactiu Pierce ECL Western Blotting Substrat (ThermoScientific) i l'aparell de captura d'imatges Fuji LAS 4000.
- A continuació es mostra la composició del tampó PBS i el Vermell de Ponceau.

PBS

NaCl	0,8g/L
KH ₂ PO ₄	0,24g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44g/L
KCl	0,22g/L
pH (HCl 1N o NaOH 1N)	7,5

Vermell de Ponceau

Ponceau S 0,2% (p/v)

Àcid tricloroacètic 3% (p/v).

3.1.6.5 *Electroforesi en dues dimensions*

a) Preparació de la mostra

1. Dialitzar la mostra amb una columna PD10 de General Electric i canviar la dissolució a Tris 0.01 M, pH 7. Aquest pas es realitza per tal d'eliminar els fosfats de la mostra ja que interfereixen en el procés d'electroforesi 2D.
2. Precipitar la proteïna amb àcid tricloroacètic 15% (respecte al volum final de la mostra) i incubar 30 minuts en gel.
3. Centrifugar a 10.000xg durant 15 minuts a 4 °C. Decantar el sobrenedant.
4. Rentar el pellet amb acetona a -80 °C (passar per las parets) deixant el tub submergit en neu carbònica. Afegir la quantitat d'acetona necessària per a que el pellet quedi cobert però no es resuspendre ni agitar. Incubar 5 minuts i retirar l'acetona. Es repeteix el mateix procés una segona vegada.

5. Deixar assecar el pellet a l'aire, a temperatura ambient i en el cas de que no es segueixi amb els següents passos del protocol, guardar a -20 °C.
6. Resuspendre el pellet (si està congelat, deixar que es descongeli a temperatura ambient prèviament) en 500µl de Buffer de lisis.

Composició Buffer de lisis:

7 M urea

2 M Tiourea

2 % CHAPS

40 mM Tris-HCl pH 8

No és necessari ajustar el pH

7. Realitzar una determinació de proteïna total a la mostra mitjançant el protocol descrit a l'apartat 3.1.6.1.
8. Diluir la mostra de manera que la concentració de proteïna total sigui 4,41mg/mL.
9. Agafar 226,6µl de mostra (contindran 1 mg de proteïna total, la quantitat necessària per a l'electroforesi 2D) i afegir:

7µl Strick (DeStreak TM Reagent)

17,5µl DTT 1 M

3µl IPG Buffer (pH 3-10)

95,9µl Buffer rehidratació (es prepara afegint una punta de microespatula de blau de bromofenol a 1ml de Buffer de lisis)

Barrejar amb l'ajuda d'un vòrtex. A partir d'aquest punt la mostra està preparada per sotmetre's a isoelectroenfoc.

10. Realitzar una electroforesi amb tinció de Coomassie (descrita a l'apartat 3.1.6.2 i 3.1.6.3) i un Western Blot (descrit a l'apartat 3.1.6.4) de la mostra restant de l'apartat 8 per tal de verificar que la proteïna no s'ha perdut durant el procés de preparació de la mostra.

b) Electroforesi de primera dimensió

S'introdueix la mostra preparada al punt 9 de l'apartat anterior en un sarcòfag (contenedor per a l'electroforesi de primera dimensió) de manera que quedi repartida per tota la superfície. Es col·loca a sobre de la mostra una tira IPG pH (3-10) de 7cm vigilant que no es formin bombolles i es cobreix amb oli mineral. Es tapa el sarcòfag, es col·loca a la font de potencial Ettan IPGphor II (GE Healthcare) i es programa el següent cicle:

Rehidratació activa: 12h 50V

Isoelectoenfoc:

- Voltatge inicial: 0V
- Voltatge final: 4000V
- Volts – hores: 8-10.000 V-hr
- Rampa: ràpida
- Temperatura: 20°C

Després del procés es pot guardar la tira a -80°C.

c) Equilibrat i electroforesi de segona dimensió

Es descongela la tira 5-10 minuts a temperatura ambient i es realitza una incubació de 10 minuts en agitació orbital amb 10mL de dissolució d'equilibrat + DDT i un altre amb 10mL de dissolució d'equilibrat + iodoacetamida:

Dissolució d'equilibrat: Urea 6M
Tris-HCl, pH 8,8 50 mM
Glicerol 30%
SDS 2%
Blau de bromofenol 0,002% (una punta de microespàtula)

Per preparar la dissolució d'equilibrat + DDT s'afegeix aquest últim a una concentració final de 10g/L. En el cas de la dissolució d'equilibrat + iodoacetamida, s'afegeix aquesta última a una concentració final de 25g/L.

Un cop equilibrada la tira es realitza una electroforesi segons està descrit a l'apartat 3.1.6.2 però canviant el gel apilador per la tira coberta per agarosa al 2%. Posteriorment es realitza una tinció de Coomassie com està descrit a l'apartat 3.1.6.3.

3.1.7 Mesura de l'activitat enzimàtica

Es disposa de dues metodologies per a mesurar l'activitat enzimàtica transglutaminasa de la proteïna TGZ15 expressada. El primer es un mètode colorimètric i es el que s'utilitza preferentment ja que es senzill i només requereix d'un espectrofotòmetre. La segona metodologia es basa en un mètode radioactiu el qual requereix de més temps i de mesures de seguretat addicionals. Aquest segon mètode s'utilitza només quan l'activitat a mesurar es molt baixa (ja que es més sensible) o quan hi ha interferències en el mètode colorimètric (coloració de la mostra a analitzar).

3.1.7.1 Mesura de l'activitat per colorimetria

El mètode colorimètric es basa en el procediment de Grossowicz et al.¹⁶⁰ utilitzant el procediment de l'hidroxamat amb el substrat sintètic específic per a TGases N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-Cln-Gly-OH). La reacció estàndard es de 10 min a 30 ° C. Una unitat (U) d'activitat de l'enzim es defineix com la quantitat d'enzim que catalitza la formació d'1 µmol d'hidroxamat per minut. Es prepara una corba de calibració cada cop que es fa l'assaig. Per tal d'obtenir aquesta corba es segueix el mateix procediment que en les mostres substituint la mostra per àcid L-glutàmic gamma-monohidroxamat (SIGMA-ALDRICH, ref G2253).

Tub	µL de L-àcid glutàmic γ-mono-hidroxamat (Stock 100mM)	µL aigua
1	0,6	299,4
2	3	297
3	6	294
4	18	282
5	30	270
6	120	180
7	300	-

Es preparen els següents reactius:

Dissolució A:

Tris Base 0,2M	0,2M
Hidroxilamina (SIGMA-ALDRICH, ref 159417)	0,1M
CaCl ₂	0,05M
Reduced glutathione (SIGMA-ALDRICH, ref G-6013)	0,01M
Z-Gln-Gly-OH (BACHEM, ref C-1635)	0,03M

Dissolució B:

Es preparen les següents dissolucions:

Àcid clorhídric 37%	3,0M
Àcid tricloroacètic	12%(p/v)
FeCl ₃ .6H ₂ O	5%(p/v) (dissolt en HCl 0,1M)

Un cop preparades es barreja 1 volum de cada una.

La reacció es du a terme de la següent manera:

- 1- En un tub de microcentrífuga, s'afegeixen 400µL de mostra a analitzar i 400µL de dissolució A.
- 2- Agitar el tub i incubar a 30°C durant 10 minuts.
- 3- Afegir 400µL de dissolució B.
- 4- Agitar i centrifugar 5minuts a 12.000xg.
- 5- Llegir l'absorbància a 525nm.

Les mostres s'analitzen per triplicat. Es preparen blancs de reacció bullint durant dos minuts les mostres.

3.1.7.2 **Mesura de l'activitat pel mètode radioactiu**

Aquest mètode es basa en la incorporació de 1.4 (n) - ³H] - putrescina (activitat específica 962 GBq/mmol)⁴² a proteïnes de tilacoides o N,N-dimetilcaseïna (DMC) per acció de la TGZ15. Es mesura la radioactivitat en un comptador de centelleig (Beckman LS 6000 SC , Fullerton , CA), i l'activitat s'expressa en pmols de putrescina transformada per mg de proteïna i per hora. Per els assajos amb llum s'utilitza una font de llum blanca amb una intensitat de 90-100 µmol/m²/s.

Les mostres es preparen per triplicat i es realitza un blanc de cada una, que s'obté bullint la mostra durant 5 minuts.

1. Quantificar la concentració de proteïna de la mostra mitjançant el mètode de Bradford (protocol que es descriu a l'apartat 3.1.6.1).
2. En un tub de microcentrífuga de 1,5ml agregar 100µL d'una dissolució que conté Tris-HCl 200 mM (pH 6,5), putrescina 0,6 mM i clorur de calci 5 mM.
3. Afegir 25 µl de dimetil caseïna (73 mg/mL).
4. Afegir la quantitat de proteïna amb la que es realitzarà l'assaig (mg de proteïna total). El volum màxim son 300 µL.
5. **A partir d'aquest punt s'ha de treballar en un laboratori de radioactivitat.** Afegir 3µl de putrescina (³H) [110 KBq].
6. Enrasar a 300µL amb Tris-HCl 200mM.
7. Incubar 30 min a 30°C en un bany termostatitzat.
8. Parar la reacció afegint a cada tub 300µL d'una dissolució a 4°C d'àcid tricloroacètic (TCA) al 10% i putrescina no marcada 5mM.
9. Barrejar i deixar precipitant tota la nit a 4°C.
10. Al dia següent, centrifugar la mostra 10 minuts a 20000xg i descartar el sobrenedant.
11. Resuspendre el precipitat en 300µL de NaOH 0,1N i incubar a 60°C durant 2 hores.
12. Transcorregudes les 2 hores, tornar a precipitar amb 300µL de TCA i putrescina durant 1 hora a 4°C.
13. Un cop transcorreguda l'hora, centrifugar un altre vegada i resuspendre de nou amb hidròxid sòdic.
14. Incubar durant 2 hores a 60°C.
15. Finalment transvasar tota la mostra a un tub de plàstic i afegir-hi 4mL de líquid de centelleig. Barrejar-ho tot molt bé.
16. Llegir les mostres al comptador de centelleig utilitzant el protocol per a quantificar triti.
17. El resultat es llegeix en DPM (desintegracions per minut) i s'estima l'activitat de la següent manera:

Les unitats del valor absolut d'activitat enzimàtica s'expressen com a pmols de putrescina conjugada per mil·ligram de proteïna utilitzada i per unitat de temps (per hora). L'Equació 7 representa la fórmula simplificada:

$$\frac{\text{pmols putrescina}}{\text{mg proteïna} \times \text{hora}} = \frac{\text{dpm} \times V \times \text{Put nM} \times 6}{\text{mg prot} \times \text{dpmPut}}$$

Equació 7 Càlcul d'activitat.

on:

dpm	El valor obtingut del comptador de centelleig.
V	El volum de l'assaig. Es una constant (300µL).
Put nM	Nanomols de putrescina no radioactiva utilitzada a l'assaig (200.000nM).
mg prot	Mil·ligrams de proteïna total utilitzada a l'assaig.
dpmPut	Els microlitres de putrescina tritiada utilitzada en l'assaig multiplicada per la constant $2,2 \times 10^6$.

NOTA: 1 µl de putrescina tritiada = 1µCi = $2,2 \times 10^6$. Es multiplica per 2 ja que l'assaig dura 30 minuts.

Preparació de la caseïna: dissoldre 7,3 g de caseïna en 100 mL de Tris-HCl (50 mM) pH 7,5, incubar a 80°C durant 30 minuts. Després centrifugar a 20.000xg durant 20 minuts. Recollir el sobrenedant i quantificar pel mètode de Bradford (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.1). Repartir en alíquotes i guardar a -20°C.

3.1.8 Caracterització bioquímica de la proteïna

3.1.8.1 Anàlisi de la seqüència de la proteïna per MALDI-TOF

Les proteïnes es van identificar per MALDI-TOF/TOF (model 4700 de Proteomics Analyzer ABI) i/o per Cromatografia líquid-masses CapLC-QTOF (Waters Micromass). Les mostres de proteïna s'aïllen de gels tenyits amb blau de Coomassie. Les mostres es redueixen, s'alquilen i finalment digereixen amb tripsina modificada de qualitat de seqüenciació¹⁶¹. El criteri d'identificació es fixa en el d'homologia significativa en Mascot amb un mínim de 4 pèptids de coincidència amb una cobertura de la seqüència de la proteïna superior al 10%.

3.1.8.2 **Reducció - alquilació**

Per reduir la mostra s'afegeixen 10 μ L de DTT (20mM) i 10 μ L de NH₄HCO₃ (100mM) a 10 μ L de fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 (30 μ g de proteïna total). Després d'incubar a 56°C durant 45 min, s'afegeixen 10 μ L de iodoacetamida 110mM i NH₄HCO₃ 100mM, i s'incuba la mescla 30 min a temperatura ambient a la foscor (alquilació). Els controls negatiu i positiu es sotmeten al mateix procés. Finalment es realitza una separació per electroforesi SDS-PAGE a cada mostra (20 μ L incloent el tampó de carrega).

3.1.8.3 **Assaig de polimerització**

La polimerització de DMC catalitzada per TGZ15 es realitza incubant 3mg/mL de proteïna total de fracció de TGZ15 amb 8mg/mL de DMC diluïda en Tris-HCl 20mM durant 16h a pH 6,5 i 8. Es separen les mostres en parts alíquotes de 10 μ L per electroforesi SDS-PAGE 10% segons està descrit a l'apartat 3.1.6.2 però utilitzant condicions no desnaturalitzants (tampó sense DTT). Les bandes resultants es quantifiquen per densitometria.

3.1.9 **Producció de TGZ en bioreactor**

3.1.9.1 **Mesura de l'estabilitat plasmídica**

El mètode més senzill per a determinar l'estabilitat d'un plasmidi transformant en un microorganisme, és la tècnica de sembrat en paral·lel en un medi selectiu i medi no selectiu¹⁶².

El vector plasmídica utilitzat, el pET-28a, té un marcador de selecció, un operó de resistència a l'antibiòtic kanamicina, per tant les cèl·lules que tinguin alguna còpia del plasmidi podran créixer en presència de kanamicina i les que no el tinguin no es multiplicaran. La relació de colònies que apareixen a les plaques amb antibiòtic respecte les que apareixen en les plaques sense antibiòtic representa l'estabilitat del plasmidi.

Preparació de les plaques de cultiu:

Es preparen plaques de Petri amb una solució de 1,5% d'agarosa en medi LB. La solució s'esterilitza a l'autoclau 15 minuts a 121°C i s'aboquen 25 mL de medi

asèpticament en cada una de les plaques de Petri quan encara està calent ($T > 50^{\circ}\text{C}$). Per a les plaques selectives, s'afegeix kanamicina a una concentració final de $30\mu\text{g/mL}$ al medi LB abans d'abocar-lo.

Factors de dilució a aplicar i càlcul :

La concentració aproximada de cèl·lules per unitat de DO_{600} és 10^8 cèl·lules per mil·lilitre de medi. La quantitat desitjada de les cèl·lules per placa no selectiva és d'aproximadament 300. Per tal d'aconseguir aquest nombre de cèl·lules per placa, la mostra es dilueix primer amb aigua desionitzada estèril per assolir una densitat òptica d'una unitat. A continuació, la mostra es dilueix de nou 4 a 10^5 en medi LB. Finalment, $50\mu\text{L}$ de la solució es sembren asèpticament en una placa amb medi LB selectiu (kanamicina a una concentració final de $30\mu\text{g/mL}$) i en una placa amb medi LB no selectiu. Les plaques s'incuben 12 h a 37°C . La relació d'unitats formadores de colònia entre les dues plaques és la fracció de cèl·lules que conserven almenys un dels seus plasmidis (Equació 8).

$$\% \text{plasmidis} = \frac{\text{unitats formadores de colònia en medi selectiu}}{\text{unitats formadores de colònia en medi no selectiu}} \times 100$$

Equació 8 Càlcul del percentatge de conservació de plasmidis.

3.1.9.2 **Procés batch**

S'utilitza un bioreactor Applikon de 7L amb controlador ADDI 1030 (control de temperatura, pH, oxigen dissolt, espuma, aireació i agitació), dues balances Sartorius ED 3202S per tal de seguir l'addició de carboni i base, una placa d'interfase Applikon ADDA per connectar el detector de CO_2 i el software Applikon Bioxpert XP que permet monitoritzar les variables del reactor. La programació del control de l'addició de nutrients es realitza mitjançant el programa Bioxpert XP que es pot veure a l'Annex 3. Per tal de refrigerar el cultiu, es connecta al sistema de control un bany termostàtic Laura Alpha RA8 amb 4°C de consigna.

El volum inicial de medi de cultiu és de 2700mL i el volum d'inòcul es de 300mL (10% del volum final). S'introdueixen al bioreactor 2700mL de medi Biotiqs coli (veure Annex 1) amb 5g/L de glucosa i s'incorporen els sensors de pH, oxigen

dissolt i espuma. Finalment es connecten tres ampolles de 500mL al reactor mitjançant tub de silicona flexible Masterflex®. S'utilitza una ampolla de 500mL per al control de pH que s'esterilitza buida. Per al control d'espuma s'esterilitza una botella de 500mL amb 100mL d'antiespumant 204 de Sigma-Aldrich (A6207) a dins. Per a l'addició de substrat s'utilitza una botella de 500mL que s'esterilitza amb 500mL d'una dissolució de glucosa 700g/L.

Es comprova que el reactor i les ampolles estiguin ben tancats, havent-hi només una obertura a l'exterior corresponent a la sortida del condensador que manté l'esterilitat mitjançant un filtre de 0,22µm (Midisart®2000, Sartorius Stedim Biotech). S'esterilitza el muntatge a l'autoclau 30 minuts a 121°C.

Un cop es treu el reactor de l'autoclau es connecta al sistema de control i es posa en marxa el sistema refrigeració. Es marca com a consigna de temperatura 25°C i l'agitació a 200rpm. Un cop s'arriba a la temperatura de treball s'omple asèpticament la botella assignada al control de pH amb 500mL d'hidròxid amònic al 25 %. Es marca com a punt de consigna de pH 6,8 unitats i es posa en marxa el controlador. Seguidament es procedeix a calibrar el sensor d'oxigen. Es marca com a punt de consigna de l'agitació 500 rpm i es fa passar nitrogen per l'airejador del bioreactor a 1vvm fins que s'obté una lectura constant que es defineix com a 0 % d'oxigen dissolt. Seguidament es passa aire a 1,5vvm fins que s'arriba a una lectura constant; en aquest punt es considera que existeix saturació d'oxigen en el medi i es defineix com a 100 % en el controlador. Un cop s'arriba a aquest punt el reactor està preparat per a ser inoculat amb un cultiu d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) tgz15.

Per tal de preparar l'inòcul del reactor, s'esterilitzen 2 matrassos de 500mL amb 150mL de medi BIOTIQS coli. S'inocula cada matràs amb 100µL de l'estoc cel·lular d'*E. coli* BL21 (DE3) tgz15 conservat a -80°C i es posa a l'incubador orbital a 200rpm i 30°C durant aproximadament 12h.

En el controlador, es marca com a punt de consigna de l'agitació 500rpm i un cabal d'aire de 4,5L/min (1,5vvm). Es barreja el contingut dels dos matrassos que contenen l'inòcul i s'introdueix de forma asèptica dins del reactor. Es programa el controlador en cascada perquè mantingui el nivell d'oxigen dissolt del medi per sobre del 30%. El controlador primer augmenta progressivament l'agitació fins arribar a un màxim de 1000 rpm, a partir d'aquest moment fixarà

aquest valor i en cas de ser necessari es passa a enriquir l'aire d'entrada amb oxigen pur amb un cabal del 25% del total d'aireació.

Durant aquesta primera fase, anomenada fase batch, es deixa que el cultiu progressi durant aproximadament 15h fins que s'esgoti la font de carboni que conté el medi de cultiu. Durant aquesta fase es pren mostra del cultiu cada hora durant 10h. En cada mostra s'analitza la densitat òptica a 600nm OD₆₀₀ (espectrofotòmetre Jenway 6300), el pes humit de la mostra centrifugada (5 minuts a 4000xg) i el pes sec (mostra humida assecada en estufa a 70°C fins a pes constant).

3.1.9.3 *Procés fed-batch*

En el cas de que es desitgi obtenir més concentració de biomassa, es pot continuar el cultiu en fed-batch. Un cop s'ha acabat la fase batch, comença la fase fed-batch en la qual es mantenen les condicions de cultiu de la fase batch i s'addiciona una dissolució de glucosa 700g/L amb un cabal exponencial que permeti mantenir la velocitat específica de creixement a 0,2h⁻¹ (veure Annex 3). Aquesta fase dura aproximadament unes 25h (fins les 40h totals de fermentació). Per tal de detectar el final de la fase batch i donar inici a la fase batch es programa la condició de que el temps de creixement sigui superior a 15h i l'oxigen dissolt (dO₂) sigui superior al 90% de saturació (veure Annex 3). Durant aquesta fase es pren mostra del cultiu cada hora i es determina la densitat òptica a 600nm, el pes humit i el pes sec de la mostra.

Inducció de l'expressió de la proteïna TGZ15 durant el procés fed-batch

La inducció de l'expressió per la producció de TGZ15 es realitza a les 35h de creixement mitjançant l'addició de 15 mL d'IPTG 1000mM per tal d'assolir una concentració final 5mM (equivalent a la utilitzada en els experiments en matrassos d'Erlenmeyer, mantenint la relació entre biomassa i IPTG a 110 μmols d'IPTG per gram de pes sec cel·lular) en el medi de cultiu. Després de la inducció es prenen les mateixes mostres que durant la fase fed-batch cada hora, però a més a més, es prenen mostres de 50mL de cada punt per tal d'analitzar l'expressió de TGZ15.

3.1.9.4 **Anàlisi de seguiment del creixement cel·lular dels cultius en bioreactor**

Mesura de la concentració de glucosa i acetat per HPLC

Preparació de la mostra

Es pren 1mL del sobrenedant del cultiu i es filtra mitjançant un filtre de nitrocel·lulosa de 0,22µm. Per eliminar els cations i protonar la mostra s'addiciona la resina DOWEX (FLUKA, Ref. 44547) (aproximadament 0.1g / 1mL mostra) fins a obtenir un pH àcid proper a 1 (agitant-lo amb el vòrtex durant 1 minut). A continuació es centrifuga la mostra 1 minut a 12.000xg, es separa el sobrenedant i s'eliminen les proteïnes de la mostra addicionant 1mg de Octadecyl, sílica gel (PANREAC, Ref. 211335). Es filtra la mostra utilitzant un filtre de nitrocel·lulosa de 0,22µm i la mostra ja esta preparada per injectar a l'HPLC.

Preparació de patrons

Es preparen sis solucions estàndards de glucosa i àcid acètic, utilitzant àcid acètic 100% (PANREAC, Ref. 141008.1611) i glucosa (FLUKA, Ref. 49150). Les concentracions dels estàndards de glucosa són 0,1, 1, 5 i 10g/L, i les d'àcid acètic són 0,10, 1 i 3g/L. Cada mostra es filtra mitjançant un filtre de nitrocel·lulosa de 0,22µm.

Procediment

Per realitzar aquestes anàlisis es va utilitzar un cromatògraf HPLC Agilent 1100 amb una columna Transgenomic ICE-COREGEL 87H3 i precolumna Transgenomic ICE-COREGEL 87H. El detector utilitzat va ser un d'índex de refracció Agilent Technologies G1365A i el software va ser Chemstation per LC Rev. A.10.02(1757).

Els paràmetres de l'anàlisi van ser:

Eluent:	àcid sulfúric 0.01N
Cabal:	0,5 mL/min
Volum injectat:	100 µL
Temps d'anàlisi:	25 min
Temperatura de la columna:	45 °C

3.1.9.5 Modelització i simulació del creixement d'*Escherichia coli*

3.1.9.5.1 Descripció dels models utilitzats

Descripció del 1er model

Aquest model¹⁶³ està basat en les velocitats específiques metabòliques (q , [g (g de cèl·lules)⁻¹ h⁻¹]) i representat a la Figura 16.

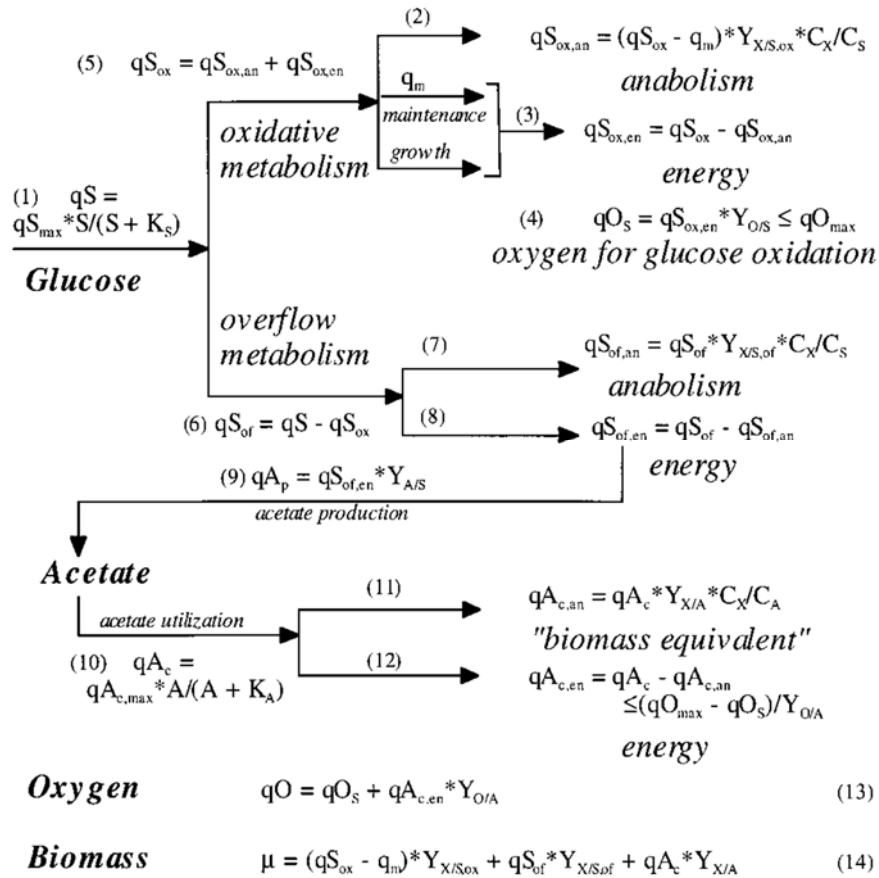


Figura 16 Esquema de les rutes metabòliques d'*E. coli*.

La velocitat específica de consum total de glucosa (qS) es suposa que segueix el model de Monod. La inhibició que produeix l'acetat en el consum de glucosa es donada per observacions experimentals, i es formula amb un terme d'inhibició no competitiva:

$$qS = \frac{qS_{max}}{1 + A / K_{i,S}} \cdot \frac{S}{S + K_S}$$

Equació 9.

Es pot diferenciar clarament entre les dues rutes metabòliques de la glucosa, la via oxidativa (qS_{ox} , 5, Figura 16.) que és la més eficaç per l'obtenció de energia i la resta ("overflow metabolism", qS_{of} , 6, Figura 16), que té lloc quan es supera la capacitat respiratòria del microorganisme. La segona via genera acetat com a subproducte de la respiració anaeròbia, la qual cosa fa disminuir la formació de biomassa.

A velocitats petites de consum de glucosa, tot el sucre es canalitza per la via oxidativa ($qS = qS_{ox}$). Aquest flux també es pot considerar dividit en un flux utilitzat per la via anabòlica o de biosíntesi ($qS_{ox,an}$) i la resta, que s'utilitza per l'obtenció d'energia ($qS_{ox,en}$). La partició dels dos fluxos s'obté a partir de dues expressions.

- La primera expressió s'obté mitjançant el balanç màssic del carboni de la via anabòlica [mol de C (g de cèl·lules) $^{-1} h^{-1}$]:

$$\text{Flux de carboni a l'anabolisme} = qS_{ox,an} \cdot C_S$$

a on C_S és el carboni que conté la glucosa en mols per gram.

- L'altre expressió s'extreu del balanç de carboni per produir biomassa:

$$\text{Flux de carboni convertit a biomassa} = (qS_{ox} - q_m) \cdot Y_{X/S,ox} \cdot C_X$$

a on $Y_{X/S,ox}$ és el coeficient del rendiment aeròbic exclusiu pel creixement per via oxidativa considerant inclosa la energia emprada i C_X és el contingut de carboni en mols per gram de cèl·lules.

Mentre els dos fluxos de carboni siguin iguals, el flux de glucosa a l'anabolisme energètic oxidatiu s'obté com:

$$qS_{ox,an} = (qS_{ox} - q_m) Y_{X/S,ox} \frac{C_X}{C_S}$$

Equació 10.

La glucosa restant és utilitzada per l'obtenció d'energia per la ruta metabòlica aeròbica,

$$qS_{ox,en} = qS_{ox} - qS_{ox,an}$$

Equació 11.

i oxidat per la respiració, l'oxigen utilitzat per l'oxidació d'aquesta glucosa, qO_S , es pot avaluar a partir de l'estequiometria de la respiració, en el cas de la glucosa $Y_{O/S} = 6 \times 32 / 180 = 1.067 \text{ g}_{ox} / \text{g}_{glu}$, conduint a:

$$qO_s = qS_{ox,en} Y_{O/S}$$

Equació 12.

No obstant, quan la velocitat de consum de la glucosa augmenta progressivament també s'incrementa la concentració de glucosa i s'observa una velocitat de respiració màxima (qO_{max}). Aquest punt és un estat metabòlic crític a on comença la saturació del metabolisme aerobi. A més a més, se sap que el valor de qO_{max} està inhibït per l'acetat, d'aquesta manera, s'introdueix un terme d'inhibició representat per la constant $K_{i,o}$.

Per això, l'algoritme utilitzat per simular inclou una condició límit:

$$qO_s \leq \frac{qO_{max}}{1 + \frac{A}{K_{i,o}}}$$

Equació 13.

quan el valor calculat de qO_s és més gran, els valors de consum per la via anabòlica ($qS_{ox,an}$) i la energia metabòlica oxidativa ($qS_{ox,en}$) es redueixen proporcionalment fins a satisfer les condicions límit. El flux total de glucosa utilitzada pel metabolisme oxidatiu es calcula de la següent manera:

$$qS_{ox} = qS_{ox,an} + qS_{ox,en}$$

Equació 14.

La fracció de glucosa consumida (overflow) que supera la capacitat del metabolisme oxidatiu, s'obté com la diferència entre el consum total de glucosa (qS) i el flux total oxidatiu (qS_{ox}):

$$qS_{of} = qS - qS_{ox}$$

Equació 15.

aquest excés es metabolitza per via anaeròbia conduït a la formació de biomassa, energia i acetat. La contribució d'aquesta fracció al creixement s'obté anàlogament a la deducció de l'Equació 10,

$$qS_{of,an} = qS_{of} Y_{X/S,of} \frac{C_X}{C_S}$$

Equació 16.

i el flux restant és utilitzat per la producció d'energia per la via de la formació d'acetat,

$$qS_{of,en} = qS_{of} - qS_{of,an}$$

Equació 17.

Des d'aquest flux, la velocitat de formació de l'acetat s'obté mitjançant l'estequiometria corresponent:

$$qA_p = qS_{of,en} Y_{A/S}$$

Equació 18.

Quan la velocitat de consum de la glucosa és tan baixa que fa que la respiració no estigui saturada [$qO_s < qO_{max}/(1+A/K_{i,o})$], l'acetat, si està present en el medi, es reconsumeix. En absència de glucosa, aquesta pot ser generada per gluconeogènesis, encara que en els processos fed-batch no tindrà lloc donat que es subministra glucosa de forma continuada.

Assumint que el consum d'acetat també segueix el model de Monod, la velocitat específica de consum d'acetat serà:

$$qA_c = qA_{c,max} \frac{A}{A + K_A}$$

Equació 19.

Un flux hipotètic cap a l'anabolisme es pot obtenir mitjançant els balanços màssics de la fixació de carboni en les cèl·lules anàlogament a l'Equació 10.

$$qA_{c,an} = qA_c Y_{X/A} \frac{C_X}{C_A}$$

Equació 20.

Quan l'acetat es va consumint, es converteix a acetil-CoA, i aquest acetat pot produir energia mitjançant el cicle TCA (cicle dels àcids tricarbòxílics). En aquesta via, una part de glucosa que s'utilitzaria per energia pel metabolisme, es guarda per utilitzar-ne com a biosíntesi. D'aquesta manera, s'anomena $qA_{c,an}$ al flux "equivalent de biomassa".

La resta del flux anabòlic del consum total d'acetat dona el flux d'acetat utilitzat per la respiració mitjançant la combustió, aquest valor ha de ser inferior o igual a

la capacitat respiratòria restant alliberada per la disminució del metabolisme de la glucosa:

$$qA_{c,en} = qA_c - qA_{c,an} \leq (qO_{max} - qO_S)Y_{O/A}$$

Equació 21.

Si $qA_{c,en}$ s'ha de reduir degut a aquesta restricció, es calculen les corresponents reduccions en el $qA_{c,an}$ i qA_c .

Aleshores la velocitat de consum total de l'oxigen s'obté com la suma de les parts utilitzades per l'oxidació de la glucosa i la del acetat, respectivament.

$$qO = qO_S + qA_{c,en}Y_{O/A}$$

Equació 22.

La velocitat específica de creixement s'obté com la suma de les contribucions produïdes a partir de les tres vies mitjançant els coeficients de producció relacionats.

$$\mu = (qS_{OX} - q_m)Y_{X/S,ox} + qS_{of}Y_{X/S,of} + qA_cY_{X/A}$$

Equació 23.

Les equacions dels balanços màssics per la glucosa, acetat, biomassa i volum que utilitza el model, així com l'equació per la velocitat de consum volumètric del oxigen per un procés fed-batch són:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F(t)}{V}(S_{feed} - S) - qSX$$

Equació 24

$$\frac{dA}{dt} = (qA_p - qA_c)X - \frac{F(t)}{V}A$$

Equació 25

$$\frac{dX}{dt} = -\left(\frac{F(t)}{V} + \mu\right)X$$

Equació 26.

$$\frac{dV}{dt} = F(t) - F_{Sample}$$

Equació 27.

$$\frac{dC_o}{dt} = k_L a(C_o^* - C_o) - qO \cdot X$$

Equació 28.

a on F_{Sample} és el volum de medi extret per analitzar diferents mostres i $F(t)$ és el cabal d'alimentació per un reactor fed-batch.

Els autors¹⁶³ proposaven una altre equació per calcular l'oxigen dissolt en el medi enlloc de l'Equació 28:

$$\frac{dDOT}{dt} = k_L a (DOT^* - DOT) - qO \cdot X \cdot H$$

Equació 29..

A on DOT és la tensió d'oxigen dissolt respecte un tant per cent de saturació, DOT^* és a un 100% de saturació, i H és una constant derivada de la llei de Henry. Sabent que $C_o = DOT \cdot C_o^*$ es modifica l'equació Eq. 2.21. per donar lloc a la Eq. 2.20.

Per portar a terme la simulació de processos fed-batch, s'ha utilitzat un cabal d'alimentació exponencial:

$$F(t) = \frac{\mu}{Y_{X/S}} (XV / S_{feed}) \cdot \exp[\mu(t - t_0)]$$

Equació 30.

Descripció del segon model

El segon model¹⁶⁴ utilitzat és una evolució del primer model exposat en l'apartat anterior. Els autors es van adonar que un canvi de les situacions de creixement dels experiments duts a terme, comporta un regim transitori fins que el metabolisme s'adequa a la nova situació, el que es reflecteix en que ni la glucosa absorbida ni l'oxigen absorbit es mantenen constants. Aleshores, van assumir que la concentració dels enzims relacionats amb el consum de substrat (glucosa) i oxigen (qO i qS) canvia per adaptar-se a la nova situació. Per aquesta raó, els autors van introduir dues equacions cinètiques addicionals, una pels enzims relacionats amb el consum de glucosa i d'altre per l'oxigen. Per deduir aquestes expressions introdueixen la degradació en el balanç de biomassa (Equació 31) i en el balanç dels enzims (Equació 32).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - q_{Xd} \cdot X$$

Equació 31.

$$\frac{dE}{dt} = Y_{E/X} \mu \cdot X - E(q_{Ed} + q_{Xd})$$

Equació 32

Nomenant que $r = \frac{E}{X}$, concentració d'enzims a la cèl·lula

$$\frac{dr}{dt} = \frac{d\frac{E}{X}}{dt} = \frac{X \cdot \frac{dE}{dt} - E \frac{dX}{dt}}{X^2}$$

Equació 33.

Substituint les equacions diferencials s'obté:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{X[Y_{E/X} \mu \cdot X - E(q_{Ed} + q_{Xd})] - E \cdot X(\mu - q_{Xd})}{X^2}$$

Equació 34.

Simplificant l'Equació 34. s'obté la següent equació:

$$\frac{dr}{dt} = Y_{E/X} \mu - r(q_{Ed} + \mu)$$

Equació 35.

Les dues noves equacions diferencials s'obtenen mitjançant l'Equació 35.

$$\frac{dr_S}{dt} = Y_{E_S/X} \cdot \mu - r_S(q_{ESd} + \mu)$$

Equació 36.

$$\frac{dr_O}{dt} = Y_{E_O/X} \cdot \mu - r_O(q_{EOd} + \mu)$$

Equació 37.

Per introduir aquests dos balanços nous és necessari calcular uns valors inicials per r_S i r_O .

$$r_{S0} = C_S \cdot \frac{\mu_{max}}{q_{d_{ES}} + \mu_{max}}$$

Equació 38.

i

$$r_{O0} = C_O \cdot \frac{\mu_{max}}{q_{d_{EO}} + \mu_{max}}$$

Equació 39.

a on

$$\mu_{max} = (qS_{max} - q_m) \cdot Y_{X/Sox}$$

Equació 40.

Per poder incorporar les equacions es va haver de modificar algunes constants del model de Monod com és la velocitat específica de consum de la glucosa (qS_{cap}) i la d'oxigen (qO_{cap}) per les capacitats reals de consum:

$$qS_{cap} = qS_{max} \cdot \frac{r_S}{r_{S0}}$$

Equació 41.

$$qO_{cap} = qO_{max} \cdot \frac{r_O}{r_{O0}}$$

Equació 42.

$$qS = qS_{cap} \cdot \frac{S}{S + K_S}$$

Equació 43.

3.1.9.5.2 Determinació del K_La pel mètode “gas out – gas in”

En aquest cas el líquid que es va utilitzar en el bioreactor va ser el medi que s'utilitzà pels creixements. La temperatura del procés era de 30°C, la qual es va mantenir constant durant totes les experiències.

Un cop es té l'electrode calibrat i el bioreactor amb 0% d'oxigen dissolt (això s'aconsegueix introduint un corrent de nitrogen) i amb la velocitat d'agitació desitjada, es substitueix el corrent de nitrogen per un d'aire, d'aquesta manera la concentració d'oxigen dissolt en el medi va augmentant. Un cop l'oxigen dissolt es manté constant, proper al 100%, ja es pot donar per acabada l'experiència. Aquest procés es va repetir a diferents velocitats d'agitació. La velocitat de mostreig va ser d'un valor per segon.

Les diferents equacions utilitzades que relacionen l'oxigen dissolt amb el coeficient K_La són les següents:

$$dC_{O_2} = \begin{cases} 1 - e^{-\frac{t-t_{dead}}{\tau}} & t \geq t_{dead} \\ 0 & t < t_{dead} \end{cases}$$

$$\tau = \frac{1}{K_L a}$$

Equació 44.

3.1.9.5.3 Identificació

Procediment d'optimització

Per tal assolir els valors òptims es va utilitzar la funció *fminsearch* que inclou *Matlab R2007b*. Aquesta funció serveix per calcular els mínims locals de funcions d'una o varies variables.

```
x = fminsearch(fun,Y0,options,parameters)
```

Aquesta instrucció calcula un mínim local de la funció *fun*, mitjançant un procés iteratiu que comença en uns valors inicials introduïts en *Y0*.

Per poder assegurar que el valor òptim resultant d'aquest criteri és el més correcte possible, s'ha fet una doble optimització, de forma que primer s'executava *fminsearch* amb els valors inicials procedents de diferents fonts d'informació^{163,164} i els valors dels paràmetres obtinguts en aquesta primera optimització s'utilitzaven com a valors inicials per tornar a fer una altre optimització.

El codi programat és el següent:

```
Y0=[Yxsox,Yxsof,Yxa,Ka,Ks,Kio,Kis,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,Vsmax,Csat,S0,X0]
Y0new=fminsearch(@err,Y0,[],KLA,Yas,Yoa,Yos,Ca,Cs,A0,t,dades)
Y0new=fminsearch(@err,Y0new,[],KLA,Yas,Yoa,Yos,Ca,Cs,A0,t,dades)
```

En el vector *Y0* es troben els valors inicials dels diferents paràmetres a optimitzar. Seguidament es crida la funció *fminsearch* amb la funció error (*err*), el vector dels valors inicials i totes les dades necessàries per la funció error, incloent les dades experimentals del creixement. Finalment es torna a cridar la funció *fminsearch* amb el vector que contenia els nous valors dels paràmetres optimitzats.

Criteri

El criteri d'error que es va utilitzar per assolir uns valors òptims per la funció va ser la suma de les diferències, en valor absolut, dels valors experimentals respecte els valors calculats.

```
err1=abs(y(:,1:3)-dades)
yerr=sum(sum(err1))
```

A on *dades* són els valors experimentals i en la matriu *y* es troben els valors calculats pel model.

Tot i així es va haver d'aplicar una restricció ja que si algun dels paràmetres inicials era menor o igual a 0, la funció localitzava un mínim local el qual no era el desitjat. Així doncs es va programar la següent sentència, la qual comprovava si dins el vector *Y0* (paràmetres inicials) existia algun valor més petit o igual a 0 i si era així s'assignava a l'error total (*yerr*) un valor elevat (en aquest cas 10000) i a continuació un *return* per sortir d'aquesta iteració i continuar iterant en un altre sentit.

```
if min(Y0)<=0
    yerr=10000;
    return
end
```

3.1.10 Purificació de TGZ15 expressada en *Escherichia coli*

3.1.10.1 Purificació per afinitat en columna d'heparina

La fracció soluble extreta mitjançant B-Per II es canvia de solució també utilitzant una columna GE PD-10 "desalting" a una solució de fosfat sòdic 10mM.

La mostra es separa en un sistema AKTA FPLC de GE equipat amb una columna d'heparina GE HiTrap Heparin HP de 5mL. L'estratègia de separació consisteix en utilitzar un gradient de concentració de clorur sòdic. La solució de càrrega és fosfat sòdic 10mM i la d'elució, fosfat sòdic 10mM i 1,5 molar de clorur sòdic.

Es programa un gradient de concentració de manera que es comença amb el 100% de solució de càrrega i es passa a 100% de solució d'elució amb un gradient lineal de 40 minuts. El flux es en tot moment de 2mL/min i es col·lecten les fraccions de sortida en tubs de 1mL.

3.1.10.2 Purificació per afinitat en columna de Níquel

S'utilitza l'equip FPLC AKTA (GE Healthcare) equipat amb dues bombes P-920 i un col·lector de fraccions FRAC 900. Tot el sistema està controlat a través d'un ordinador amb el software UNICORN V3.

S'utilitza una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) de 5ml.

La mostra de partida es prepara a partir de 250mL de cultiu d'*E. coli* BL21 (DE3) TGZ15 pGro7 a una densitat òptica OD600 de 4,5 aproximadament, 30 minuts d'inducció amb arabinosa i 4 hores d'inducció amb IPTG. La part soluble s'ha obtingut lisant amb 10 mL de B-Per II (procediment descrit a l'apartat 3.1.4.3).

Preparació de la columna de níquel (5mL).

1. Omplir una xeringa amb connector Luer Lok amb 20mL d'aigua desionitzada, retirar el tap superior de la columna i unir aquest extrem a la xeringa evitant que es formin bombolles d'aire.
2. Eliminar el tap inferior de la columna i fer passar 15mL d'aigua a través de la columna per tal d'eliminar la dissolució d'etanol al 20% que conté (dissolució de conservació).
3. Preparar una dissolució de NiSO₄ 0,1M.

4. Fes passar 2,5mL de la dissolució de sulfat de níquel a través de la columna de la mateixa manera que en els punts 1 i 2 d'aquest protocol.
5. Netejar la columna amb 15mL d'aigua desionitzada com s'ha descrit als punts 1 i 2 d'aquest protocol. Tapar la columna per la part inferior i superior vigilat que no es formin bombolles. En aquest moment la columna esta preparada per a utilitzar-la. Si no es preveu utilitzar la columna en un període superior a 24h es recomana passar 15mL d'etanol al 20% (dissolució de conservació), tapar-la i guardar-la a -4°C .

Preparació de la mostra i purificació per gradient d'imidazole

Gradient imidazole 40mM a 0.5M en 40mL. Flux 5ml/min. Fraccions recol·lectades de 1ml/tub.

1. Es filtra l'extracte de proteïnes mitjançant un filtre de 0.45µm i es guarda a 4°C.
2. Es realitza un rentat de les bombes del FPLC amb aigua desionitzada (50mL) per eliminar la solució de conservació (etanol 20%).
3. Es connecta la columna al sistema i es condiciona fent passar 25mL de "binding buffer".
4. Es carrega la mostra a l'injector i seguidament s'introdueix a la columna, bombejant a continuació 20mL de "binding buffer" a un flux de 5mL/min. Es recull la fracció que elueix a traves de la columna i es guarda per verificar mitjançant electroforesi que la proteïna TGZ15 ha quedat fixada a l'interior de la columna.
5. S'inicia el fraccionament aplicant un gradient d'imidazol de manera que es fixa el flux de la bomba a 5mL/min i es programa el sistema de forma que a l'inici el flux correspongui al 100% a "binding buffer" i passi linealment a 100% "elution buffer" al cap d'haver bombejat 40mL a través de la bomba. El flux de sortida es recull en fraccions de 1mL en tubs de microcentrífuga de 1,5mL.
6. Basant-se en el cromatograma de l'equip, es seleccionen les fraccions que poden contenir la proteïna TGZ15 per tal de ser analitzades per electroforesis i western blot (protocols descrits a l'apartat 3.1.6.2 i 3.1.6.4).

Binding buffer: pH 7,4

Reactiu	Concentració
NaPO ₄	0,02 M
NaCl	0,5M
Imidazole	5mM

Elution buffer: pH 7,4

Reactiu	Concentració
NaPO ₄	0,02 M
NaCl	0,5M
Imidazole	0,5M

3.1.10.3 *Purificació mitjançant anticossos*

S'utilitza el T7•Tag® Affinity Purification Kit Novagen. La purificació es fa en discontinu mitjançant la columna proporcionada juntament amb els reactius, segons el següent protocol.

1. Filtrar la mostra per un filtre de 0,45µm.
2. Resuspendre suaument la suspensió al 50% d'anticòs de T7 • Tag agarosa per inversió i afegir la quantitat desitjada de mostra a purificar. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient en un agitador orbital durant 30 minuts.
3. Centrifugar tot el volum a 500×g durant 10 minuts i decantar acuradament el sobrenedant.
4. Tornar a resuspendre les perles en 5mL 1X Bind/Wash buffer i barrejar suaument per inversió repetida (evitar el vòrtex vigorós).
5. Repetir els passos 2 i 3 dues vegades més per d'eliminar les proteïnes no unides. Eliminar el sobrenedant.
6. Eluir la proteïna resuspenent les perles en 1,5 volums de 1X Elute Buffer. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient. Barrejar suaument cada pocs minuts per tal de mantenir la resina en suspensió.

7. Centrifugar a 500×g durant 10 minuts. Recuperar el sobrenedant, aquest conté la proteïna purificada.

7. Repetir els passos 5 i 6 i ajuntar amb el sobrenedant amb el de l'apartat anterior.

8. Neutralitzar neutralitzar el sobrenedant mitjançant l'addició de 150µl de 1X Neutralization Buffer per mil·lilitre de sobrenedant.

3.2 Expressió en *Pichia pastoris*

3.2.1 Transformació i selecció de clons

3.2.1.1 Obtenció del plasmidi pPic9

Es parteix de cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades amb el plasmidi pPic9 que contenen el gen *tgz15* inserit entre les dianes de restricció EcoR1 i Not1. El codó stop es el propi del vector, el pes molecular esperat per a la proteïna es de 57KDa i el seu punt isoelèctric esperat de 10,5⁵⁰.

Per extreure el plasmidi, es fa servir el kit de purificació "QIAGEN Plasmid Mini Kit" seguint les instruccions del manual.

Un cop purificat el plasmidi, s'analitza la seva concentració utilitzant l'espectrofotòmetre Nanodrop de Thermo Científic.

3.2.1.2 Preparació de cèl·lules electrocompetents

S'inocula 5mL de medi YPD estèril en un tub cònic de 50mL amb una colònia de *Pichia pastoris* GS115 i s'incuba en un agitador orbital New Brunswick Scientific model Innova 4300 a 30°C i 250rpm durant tota la nit (unes 12 hores).

S'inoculen 500mL de medi YPD en un matràs d'Erlenmeyer de 2L amb 0,5mL del cultiu que ha crescut durant la nit. Es deixa créixer tota la nit fins a una densitat de entre 1,3 i 1,5 unitats de OD₆₀₀.

Se centrifuguen els 500mL de cultiu a 1500xg durant 5 minuts a 4°C, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 500mL d'aigua estèril refredada amb gel.

Es torna a centrifugar el cultiu igual que en el pas anterior però aquest cop es resuspenen les cèl·lules en 250mL d'aigua estèril refredada en gel.

Es torna a centrifugar una vegada més el cultiu i aquest cop es resuspenen les cèl·lules en 20mL de sorbitol 1M estèril refredat en gel.

Es centrifuga el cultiu una vegada més i es resuspenen les cèl·lules en 1mL de sorbitol 1M estèril refredat en gel. S'obté un volum final d'uns 1,5mL de cèl·lules preparades per a ser transformades. Si no es fa la transformació al moment es poden guardar les cèl·lules en alíquotes de 80µL a -80°C encara que això provoca que l'eficiència de transformació disminueixi (manual *Pichia pastoris* Novagen versió M).

3.2.1.3 *Linealització del plasmidi pPic9*

Es parteix de 42µL de DNA plasmídic i es digereixen amb l'enzim Sac1 segons recomanacions del fabricant (Roche). S'ha triat aquest enzim entre els possibles per digerir pPic9 perquè s'ha comprovat per bioinformàtica (www.bioinformatics.org) que no talla en cap lloc la seqüència del gen *tgz15*.

La reacció es realitza de la següent manera. S'addicionen a un tub de microcentrífuga 42µL de DNA, 5µL de tampó de l'enzim 10X i 3 µL de l'enzim Sac1. S'incuba 2h a 37°C i seguidament es para la reacció escalfant a 65°C 15 minuts.

3.2.1.4 *Transformació de cèl·lules competents per electroporació*

Es barregen 80µL de cèl·lules competents amb de 5 a 20µg de DNA linealitzat i es col·loquen en una cubeta d'electroporació de 0,2cm de camí òptic refredada en gel.

S'incuba la cubeta amb les cèl·lules 5 minuts en gel.

Es fa un pols en un electroporador Biorad Gen pulser II amb un voltatge de 1,5KV, una resistència de 200Ω i una capacítància de 25µF.

Immediatament s'afegeix 1mL de sorbitol 1M estèril refredat en gel.

Es sembren en tres plaques de medi RDB (sense histidina) parts alíquotes de 100, 200 i 600µL i s'incuben a 30°C fins que apareixin colònies.

3.2.1.5 *Purificació d'una banda de DNA en gel d'agarosa*

S'utilitza el procediment del QIAquick Gel Extraction Kit de l'empresa QIAGEN.

1. Col·locar el gel en un trans il·luminador, utilitzar guants i ulleres de protecció UV.

2. Retallar amb l'ajuda d'un bisturí la banda d'interès i col·locar-la en un tub de microcentrifuga prèviament tarat.
3. Pesar el tub de microcentrifuga amb la banda a dins i estimar el pes del fragment d'agarosa. Afegir 3 volums de reactiu QC per cada volum de gel.
4. Incubar a 50°C durant 10min o fins que es fongui l'agarosa. Barrejar utilitzant un vòrtex cada 3 minuts.
5. Assegurar-se de que el color de la dissolució després de solubilitzar l'agarosa sigui groc, si no fos així, afegir, 10µl d'acetat de sodi 3M.
6. Afegir 1 volum d'isopropanol i barrejar.
7. Col·locar una QIAquick spin column dins d'un tub col·lector, aplicar la mostra i centrifugar durant 1 minut.
8. Descartar el líquid del tub col·lector i col·locar de nou la columna en el tub col·lector.
9. Afegir 500µL de reactiu QC, centrifugar i descartar novament el líquid i col·locar la columna en el tub.
10. Afegir 750µL de reactiu PE i centrifugar durant 1 minut.
11. Descartar el filtrat i centrifugar la columna 1 minut a 10000xg.
12. Col·locar la columna en un tub de microcentrifuga de 1,5mL.
13. Eluir el DNA afegint entre 30 i 50µL de reactiu EB al centre de la membrana i centrifugar 1 minut a màxima velocitat.

3.2.1.6 *Preservació de les soques transformades*

Per tal de preservar les soques transformades aquestes es criopreserven afegint glicerol pur i estèril, a una concentració final del 30 %(v/v), a un cultiu en fase de creixement exponencial (DO₆₀₀ de 2 a 6) de la soca a preservar. Seguidament es reparteix el cultiu en criovials de 2mL i es guarden al congelador a -80°C.

3.2.1.7 *Selecció de clons*

Selecció del fenotip (Mut⁺ Mut^s)

Utilitzant una nansa estèril es selecciona una colònia i es sembra a una petita secció d'una placa de cultiu amb medi MM prèviament dividida en unes 40 a 50 seccions numerades. Amb la mateixa nansa i sense esterilitzar-la, es sembra en una altre placa també dividida amb seccions numerades (el mateix nombre que

la anterior), però aquest cop amb medi MD. Es repeteix el procediment per a unes 100 colònies. S'incuben les plaques a 30°C durant dos dies. Després dels dos dies es comparen les colònies que han crescut a les mateixes seccions numerades de les plaques de medi MM i MD. Les cèl·lules que creixin igual de bé a les dues plaques tenen un fenotip Mut⁺ mentre que les que presentin un creixement escàs o nul en la placa de medi MM tenen un fenotip Mut^s.

Un cop s'ha comprovat el fenotip, es seleccionen 10 dels clons que presenten fenotip Mut⁺ i es comprova que el gen s'hagi introduït correctament, fent una extracció de DNA genòmic total utilitzant el Dneasy® Plant mini kit de Qiagen. Es realitza el procediment seguint el protocol per a teixit vegetal (apte també per a llevats). La única variació és que es trenquen les cèl·lules en el primer pas utilitzant nitrogen líquid i sorra de quars fina estèril amb un micromorter.

Un cop s'ha extret el DNA total es comprova que aquest no estigui degradat en un gel d'agarosa al 1% amb bromur d'etidi (seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.2.3).

Comprovació correcta inserció del gen *tgz15*

Per comprovar que el gen *tgz15* s'ha inserit correctament, es fa una reacció PCR utilitzant encebadors que reconeixen regions del gen AOX1 i del pèptid senyal factor alfa. Es fan dues reaccions paral·leles, una amb l'encebador anvers del factor alfa i l'encebador revers AOX1 i l'altre amb els encebadors anvers i revers del gen AOX1 seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.2.2 però utilitzant els encebadors descrits a la

Taula 14.

Taula 14 Seqüència dels encebadors utilitzats per comprovar la completa inserció del gen *tgz15*.

Encebador	Seqüència
5' AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
Factor alfa	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

Pesos de bandes esperats:

Pes del gen TGZ15: 1625pb.

Pes d'amplificació esperat amb parella d'encebadors AOX1 2200pb i 2117pb (dues bandes, AOX endogen i pes del gen + 492pb).

Pes d'amplificació esperat amb parella d'encebadors factor alfa com a envers i AOX1 com a revers 1820bp (pes del gen + 195pb).

Els pesos esperats a obtenir de les reaccions de PCR s'han extret del manual "Pichia expression kit version M"¹⁶⁵.

3.2.2 Preparació d'inòculs

Per a creixement en matràs:

Es prepara 1 matràs d'Erlenmeyer de 250mL amb 50mL de medi BMGY. S'esterilitzen a l'autoclau durant 20 minuts a 121°C. Un cop a temperatura ambient s'inocula amb una colònia del clon de *Pichia pastoris* a avaluar i s'introdueix a l'incubador orbital a 250rpm i 30°C fins que arriba a una densitat òptica d'entre 2 i 6 unitats d'OD₆₀₀ (de 16 a 24h).

Per a inoculació d'un bioreactor:

Es preparen 2 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi BMGY cadascun. S'esterilitzen a l'autoclau durant 20 minuts a 121°C. Un cop a temperatura ambient s'inoculen tots dos amb una colònia del clon de *Pichia pastoris* a avaluar i s'introdueixen a l'incubador orbital a 250 rpm i 30°C fins que arribin a una densitat òptica de 2 a 6 unitats d'OD₆₀₀ (de 16 a 24 h).

3.2.3 Expressió en matràs d'Erlenmeyer

Es seleccionen 10 dels clons que presenten fenotip Mut⁺ a l'atzar i es comprova la seva producció de transglutaminasa en matrassos d'Erlenmeyer.

Es preparen 10 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb deflectors i s'hi introdueix a cadascun d'ells 150 mL de medi BMMY.

Es preparen 10 matrassos d'Erlenmeyer de 250 mL amb deflectors i a cada un d'ells s'introdueixen 25 mL de medi BMGY. Un cop estèrils s'inocula cadascun

amb una de les colònies a avaluar i s'introdueixen a l'incubador orbital New Brunswick Scientific model Innova 4300 a 30°C i 250 rpm.

Es deixen créixer les cèl·lules en els matrassos de 250 mL fins que arribin a una densitat òptica de entre 2 i 6 unitats d'OD₆₀₀ (de 16 a 18 hores).

Un cop han arribat a la densitat desitjada, es centrifuga el cultiu 10 minuts a 3000 x g. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en el contingut dels matrassos de 1 L de manera que al passar al medi BMMY on la font de carboni es el metanol s'activa l'expressió del gen AOX i per tant s'indueix l'expressió de la transglutaminasa. S'afegeixen 950 µL de metanol pur (concentració final al medi de 1 %(v/v)) a cada matràs d'Erlenmeyer cada 24 hores per tal de mantenir la inducció.

Es pren una mostra del cultiu de cada matràs 2 cops al dia, una a les 8:00 h i una a les 16:00 h. En aquesta mostra es mesura la densitat òptica i la quantitat de proteïna expressada mitjançant SDS-PAGE i tinció de Coomassie.

3.2.4 Cultiu d'alta densitat en bioreactor

3.2.4.1 Preparació del bioreactor

S'utilitza un bioreactor Applikon de 7L amb controlador ADDI 1030 (control de temperatura, pH, oxigen dissolt, espuma, aireació i agitació), dues balances Sartorius ED 3202S per tal de seguir l'addició de font de carboni i base, una placa d'interfase Applikon ADDA per connectar el sensor de CO₂ i el software Applikon Bioxpert XP que permet monitoritzar les variables del reactor. L'addició de nutrients en mode fed-batch es realitza mitjançant una bomba peristàtica Gilson Minipuls 3 on s'introdueix la consigna de funcionament de forma manual. Per tal de refrigerar el cultiu es connecta al sistema de control un bany termostàtic Lauda Alpha RA8 amb 4 °C de consigna.

S'introdueixen al bioreactor 2700 mL de medi de sals basals (veure Annex 1), s'incorporen els sensors de pH, oxigen dissolt i espuma, i es connecten les botelles d'alimentació al reactor mitjançant tub flexible de silicona Masterflex®. S'utilitza una ampolla de 500mL per al control de pH que s'esterilitza buida. L'ampolla del control d'espuma de 250 mL s'esterilitza amb 100 mL d'antiespumant a dins. L'ampolla d'addició de glicerol de 500 mL s'esterilitza amb

300 mL de dissolució de glicerol al 50% a dins i la de 2 L d'addició de metanol s'esterilitza buida.

Es comprova que el reactor estigui ben tancat i tots els tubs pinçats llevat de la sortida del condensador i el tub d'equilibrat de pressió de les botelles, que mantenen l'esterilitat mitjançant filtres de 0,22µm Midisart®2000 de Sartorius Stedim Biotech. S'esterilitza el reactor i les botelles a l'autoclau 30 minuts a 121°C. Un cop estèril, es connecten les sondes de temperatura, pH i oxigen dissolt al controlador. Es connecta el reactor al sistema de refrigeració, es marca com a consigna 30°C i es posa com a punt de consigna de l'agitació 100rpm. Un cop s'arriba a la temperatura de treball s'omple asèpticament l'ampolla de control de pH amb 500mL d'hidròxid amònic al 30%, s'afegeixen a l'ampolla d'addició de glicerol 3,6mL de la dissolució d'elements traça PTM1 i s'introdueixen a l'ampolla d'addició de metanol, 1500 mL de metanol i 18mL de dissolució d'elements traça PTM1. També s'afegeixen al medi del reactor 11,75mL de la dissolució d'elements traça PTM1. Seguidament es connecten els tubs que uneixen les ampolles amb el reactor a les bombes de control i s'omplen. Es marca com a punt de consigna de pH a 5.0 unitats i es posa en marxa el controlador de pH. Seguidament es procedeix a calibrar el sensor d'oxigen. Es marca com a punt de consigna de l'agitació 500 rpm i es fa passar nitrogen pel medi del bioreactor a 1vvm fins que s'obté una lectura constant que es defineix com a 0 % d'oxigen dissolt en el controlador. Seguidament es passa aire a 1 vvm fins que s'arriba a una lectura constant, aquest punt correspon a la saturació d'oxigen del medi i es defineix com a 100 % en el controlador. Un cop s'arriba a aquest punt el reactor està preparat per a ser inoculat amb el cultiu de *Pichia pastoris*.

3.2.4.2 *Expressió de TGZ15 en bioreactor*

El protocol utilitzat es basa en el descrit en el manual "Pichia Fermentation Process Guidelines" d'Invitrogen¹⁶⁶.

Un cop preparat el reactor, es fixa com a punt de consigna de l'agitació 500 rpm i un cabal d'aire de 1,5 vvm al controlador.

Es preparen dos inòculs de 150 mL segons el procediment 2.2.4.1. Es barreja el contingut dels dos matrassos que contenen l'inòcul i s'introdueix de forma asèptica dins del bioreactor. Es programa el controlador perquè mantingui un nivell d'oxigen dissolt per sobre del 30% de manera que primer s'augmenti

progressivament l'agitació fins arribar al màxim de 1000 rpm, a partir d'aquest punt es fixa el valor d'agitació i en cas de ser necessari es passa a enriquir l'aire d'entrada amb un 25% d'oxigen pur.

Durant aquesta primera fase, anomenada batch, es prenen mostres de cultiu cada 4 hores de les quals s'analitza la densitat òptica (OD_{600}) i el pes humit de la mostra. Aquesta primera fase dura entre 18 i 24 hores.

Quan s'acaba la fase fed-batch de glicerol, marcada per una pujada pronunciada en el nivell d'oxigen dissolt, comença la fase fed-batch en la qual s'addiciona una solució de glicerol amb un cabal de 18,15 ml/h per litre de cultiu inicial fins que s'arriba a un pes humit d'entre 180 i 220 g/L.

Un cop s'arriba a aquesta densitat cel·lular, s'atura l'addició de glicerol i comença l'addició de metanol a 3,6 mL/h per litre de cultiu a l'inici de la fase batch. Aquest flux d'alimentació es manté fins que el cultiu s'habitua a la nova font de carboni (activa les rutes enzimàtiques necessàries per tal de metabolitzar el metanol), aproximadament unes 6 hores. Per tal de confirmar que el cultiu s'ha adaptat al metanol, es para momentàniament la bomba d'addició. Si l'oxigen dissolt del medi puja en menys de 2 minuts el cultiu està adaptat, en cas contrari es reprèn l'alimentació de metanol i es torna a comprovar al cap de mitja hora. Un cop adaptat el cultiu es dobla el cabal d'addició de metanol fins a 7,3 mL/h per litre de cultiu (referit al volum a l'inici de la fase batch) i es deixa així fins al dia següent (aproximadament 12h). Al principi del dia s'augmenta el flux fins a 10,9 mL/h per litre de cultiu (referenciat al volum a l'inici de la fase batch) i es deixa així fins que es decideixi finalitzar el cultiu.

Durant la inducció es prenen mostres del contingut del reactor 3 cops al dia. A les 8:00h, a les 14:00h i a les 21:00h aproximadament.

En cada mostra es prenen uns 100mL de cultiu. D'aquests es centrifuga 1 mL a 8000 xg durant 5 minuts en un tub de microcentrífuga tarat per tal de determinar el pes humit. Aquest mateix tub es posa a l'estufa a 70 °C fins a pes constant per tal de determinar el pes sec. Paral·lelament es mesura la densitat òptica i la resta de la mostra es centrifuga 10 minuts a 4000 xg. Es guarda tant la fracció de cèl·lules com el sobrenedant a -80 °C per analitzar l'expressió de proteïna més tard.

3.2.5 Quantificació de la producció de la proteïna

Es quantifica la concentració de proteïna total en el sobrenedant mitjançant el mètode colorimètric de Bradford descrit a l'apartat 3.1.6.1.

Seguidament es concentra la mostra utilitzant concentradors Amicon de Millipore amb una mida de partícula de 10KDa. Es parteix de 50mL de mostra i es concentra el volum unes 10 vegades. Un cop concentrades totes les mostres es torna a determinar la proteïna total pel mètode de Bradford per tal d'estimar la quantitat de mostra a utilitzar en els assajos d'activitat.

3.2.6 Mesura de l'expressió del gen *tgz15*

La tecnologia de RT-qPCR combina l'amplificació exponencial d'un transcrit de RNA específic mitjançant PCR amb el seguiment del nou DNA format en cada cicle de PCR¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

La transcripció reversa (RT) seguida per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es una eina molt potent de detecció i quantificació de RNA missatger (mRNA). Es el mètode més sensible per a la quantificació dels nivells d'expressió d'un gen fins al moment, en particular per a transcrits de RNA poc abundants en teixits amb baixa concentració de RNA, per a mostres de teixit limitades i per a determinar petites variacions en les concentracions de mRNA. El procediment es va realitzar com esta descrit a Campos i col·laboradors¹⁷⁰.

El procés es pot dividir en 3 fases:

- 1- Extracció de RNA de la mostra d'interès. La integritat del RNA purificat es crítica per a totes les tècniques d'anàlisi d'expressió gènica¹⁷¹. Per confirmar l'absència de DNA residual s'ha d'afegir sempre un control negatiu en el disseny experimental. L'extracció de RNA s'ha de realitzar en un ambient, reactius i material lliure de RNAses. Aquest procediment es realitza seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.6.1.
- 2- Transcripció reversa per a l'obtenció de cDNA. El següent pas important en la RT-qPCR es la producció d'una cadena complementària simple de DNA (cDNA) a partir del RNA mitjançant l'ús de l'enzim transcriptasa reversa (RT).

El pas de transcripció reversa es la major font de variabilitat en la RT-qPCR en temps real i s'han d'optimitzar les condicions de reacció per a cada enzim.

Normalment els controls es fan mitjançant amplificacions per PCR de gens de referència¹⁷¹. El procediment utilitzat es descriu a l'apartat 3.2.6.2.

3- Amplificació i mesura de l'expressió del gen.

Prèviament a la determinació de la quantificació de l'expressió del gen *tgz* en les diferents condicions s'han de dissenyar els encebadors específics per a la seqüència dels gens d'interès. Aquesta metodologia es realitza seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.6.3.

Per a la detecció quantitativa del fragment d'interès s'ha utilitzat un agent específic d'unió de doble cadena de DNA basat en la fluorescència de la transferència de l'energia de ressonància (FRET). Concretament s'ha utilitzat el sistema SYBR Green descrit a l'apartat 3.2.6.4.

3.2.6.1 *Extracció de RNA*

L'extracció del RNA total es realitza mitjançant el mètode del Trizol® (Invitrogen).

1. Es parteix de 100mg (pes humit) de cèl·lules en un tub de microcentrífuga de 1,5mL.
2. S'afegeix 1mL del reactiu Trizol®, s'homogeneïtza utilitzant un vòrtex VWR i s'incuba 5 minuts a temperatura ambient.
3. S'afegeixen 0,2mL de cloroform, s'agita manualment durant 15 segons i s'incuba 3 minuts a temperatura ambient.
4. Es centrifuga a 11.500 xg a 4 °C durant 15 minuts. Després d'aquesta centrifugació s'obtenen 3 fases. El RNA es troba a la fase aquosa que correspon a la fracció superior del tub. La fase orgànica es guarda en el cas que es vulgui obtenir el DNA o les proteïnes intracel·lulars.
5. Es separa la fase aquosa, es col·loca en un nou tub de microcentrífuga de 1,5mL i se li afegeixen 500µl d'isopropanol. S'incuba 10 minuts a temperatura ambient i es centrifuga a 11.500 xg a 4 °C durant 10 minuts.
6. S'elimina el sobrenedant i es neteja el precipitat amb 1mL d'etanol al 75% utilitzant un vòrtex VWR. Es centrifuga a 7.500 xg durant 5 minuts a 4°C.

7. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecat el precipitat a l'aire durant 5 a 10 minuts.
8. Es resuspèn el sobrenedant amb 50µL d'aigua lliure de RNAses i que conté inhibidor de RNAses. S'incuba 10 minuts a 55 °C. Es quantifica i determina la qualitat de l'ARN mitjançant l'espectròmetre NanoDrop ND-8000® de Thermo Scientific. El quocient d'absorbància a 260nm/280nm ha d'estar compres entre 1,8 i 2.

3.2.6.2 *Obtenció del cDNA*

Per tal d'obtenir el cDNA a partir del RNA s'utilitza el kit d'Applied Biosystems High capacity cDNA reverse transcription kit.

1. Es prepara un "master-mix" amb la següent composició:
 - 2,0µL 10x RT buffer
 - 0,8µL 25x dNTP Mix
 - 2,0µL 10x RT random Primer
 - 1,0µL Multixcribe transcriptase
 - 1,0µL inhibidor RNAses
 - 3,2µL d'aigua lliure de nucleases
2. La composició del medi de reacció es la següent:
 - 10µL del "master-mix" descrit anteriorment
 - 10µL de RNA (1 µg de RNA total)
3. S'introdueix el medi de reacció en un tub de PCR, es centrifuga breument i s'introdueix el tub en un termociclador MJ Research PTC 200 Thermal Cycler amb la següent programació:
 - 10 minuts a 25°C
 - 120 minuts a 37°C
 - 5 minuts a 85°C

3.2.6.3 *Disseny dels encebadors i avaluació de l'especificitat*

Com a gens de referència (gens de control endogen) s'utilitzen el gen de l'actina act1 i el gen gap¹⁷²⁻¹⁷⁵. Com a encebadors dels gens de referència l'act1 i gap s'utilitzen els proposats per Taicheng Zhu¹⁷³ i pel que fa al gen d'interès *tgz15*,

es dissenyen els encebadors amb el programa Primer express 2.0 d'Applied Biosystems.

Encebador	Seqüència
gap Fw	5' ATGACCGCCACTCAAAGAC 3'
gap Rv	5' GCACCAGTGGAAGATGGAAT 3'
act1 Fw	5' AGTGTTCCTATCGGTCGTAG 3'
act1 Rv	5' GGTGTGGTGCCAGATCTTTT 3'
tgz Fw	5' CAGCGGTGCAGCTACGAAC 3'
tgz Rv	5' GGCTGAACTTGCCCAGTAGG 3'

Per tal de provar l'especificitat dels encebadors, s'utilitza una reacció de PCR sobre el cDNA obtingut prèviament:

1. Composició de la reacció
 - 5 µL de 10x Ex Taq™ buffer (Takara)
 - 1 µL Takara Ex Taq™
 - 4 µL de dNTPs (Takara)
 - 7,6 µL aigua desionitzada
 - 2 µL cDNA
 - 0,2 µL encebador anvers [100 pmol/µL]
 - 0,2 µL encebador revers [100 pmol/µL]
2. Condicions de reacció
 - 3 minuts a 94 °C
 - 30 cicles:
 - 15 segons a 94 °C
 - 15 segons a 58 °C
 - 2 minuts a 72 °C
 - 5 minuts a 72 °C

Es visualitza en un gel d'agarosa al 2 % la presència d'una única banda a l'alçada esperada segons el procediment descrit a l'apartat 3.1.2.3.

3.2.6.4 *PCR quantitatiu en temps real (RT-qPCR)*

S'utilitza el sistema SYBR Green I que es descriu a continuació.

Es preparen 3 condicions de reacció per cada mostra a analitzar. Totes les condicions contenen el “master-mix” i la mostra, i es diferencien en els encebadors utilitzats:

- Els encebadors del gen de referència.
- Els encebadors del gen d'interès.
- Se substitueixen els encebadors per aigua.

1. Es realitza una corba de dilucions en aigua, anomenada corba estàndard, tant per al gen de referència com per al gen d'interès utilitzant una de les mostres a analitzar, normalment la que es preveu que tindrà la major expressió del gen d'interès. Es realitza una dilució del cDNA 1 a 2 seguida de 3 dilucions seriades 1 a 5, obtenint 4 dissolucions per a la corba estàndard.
2. La resta de mostres es dilueixen de tal manera que estiguin dins dels límits de detecció de l'aparell.
3. Es preparen dos “master-mix”, un amb els encebadors del gen de referència i un altre amb els encebadors del gen d'interès. La composició per mostra es la següent:

10 μ L de SyBr green I Takara
0,3 μ L d'encebador envers (20 μ M)
0,3 μ L d'encebador revers (20 μ M)
7,4 μ L aigua

4. En una placa de 96 pouets s'afegeixen a cada pouet 18 μ L de “master mix” corresponent (encebadors del gen de referència o del gen d'interès) al que s'afegeixen 2 μ L de la mostra a analitzar o de les dilucions estàndard. Totes les mostres es preparen per triplicat.
5. Un cop està llesta la placa, es segella, s'agita per barrejar el contingut de cada pouet i seguidament es centrifuga breument per tal de que tot el contingut quedi al fons.
6. Es programa el termociclador LightCycler® 480 de Roche amb els següents paràmetres mitjançant el software LightCycler 1.5.0:

Activació: 10 segons 95 °C

Amplificació: 95 °C 5 segons – 60 °C 35 segons 45 cicles

Corba de fusió (per confirmar l'especificitat d l'amplificació i l'absència de formació de dímers dels encebadors): 95°C 2 segons – 65°C 15 segons – 95°C continu.

Refredament: 60°C 30 segons

En cada assaig s'inclou (per triplicat) una corba estàndard de quatre punts de dilució en sèrie (que van des de 200ng a 3125ng) per a la determinació de l'eficiència.

Els valors d'expressió del gen diana es corregeixen mitjançant els resultats d'expressió del gen de referència utilitzant el mètode descrit per Pfaffl¹⁷¹ mitjançant la següent equació: $R = 2^{(-\Delta CP \text{ mostra} - \Delta CP \text{ referència})}$.

4 Resultats i discussió

4.1 Expressió de TGZ en *Escherichia coli*

4.1.1 Formulació del medi de cultiu

4.1.1.1 Disseny de Taguchi

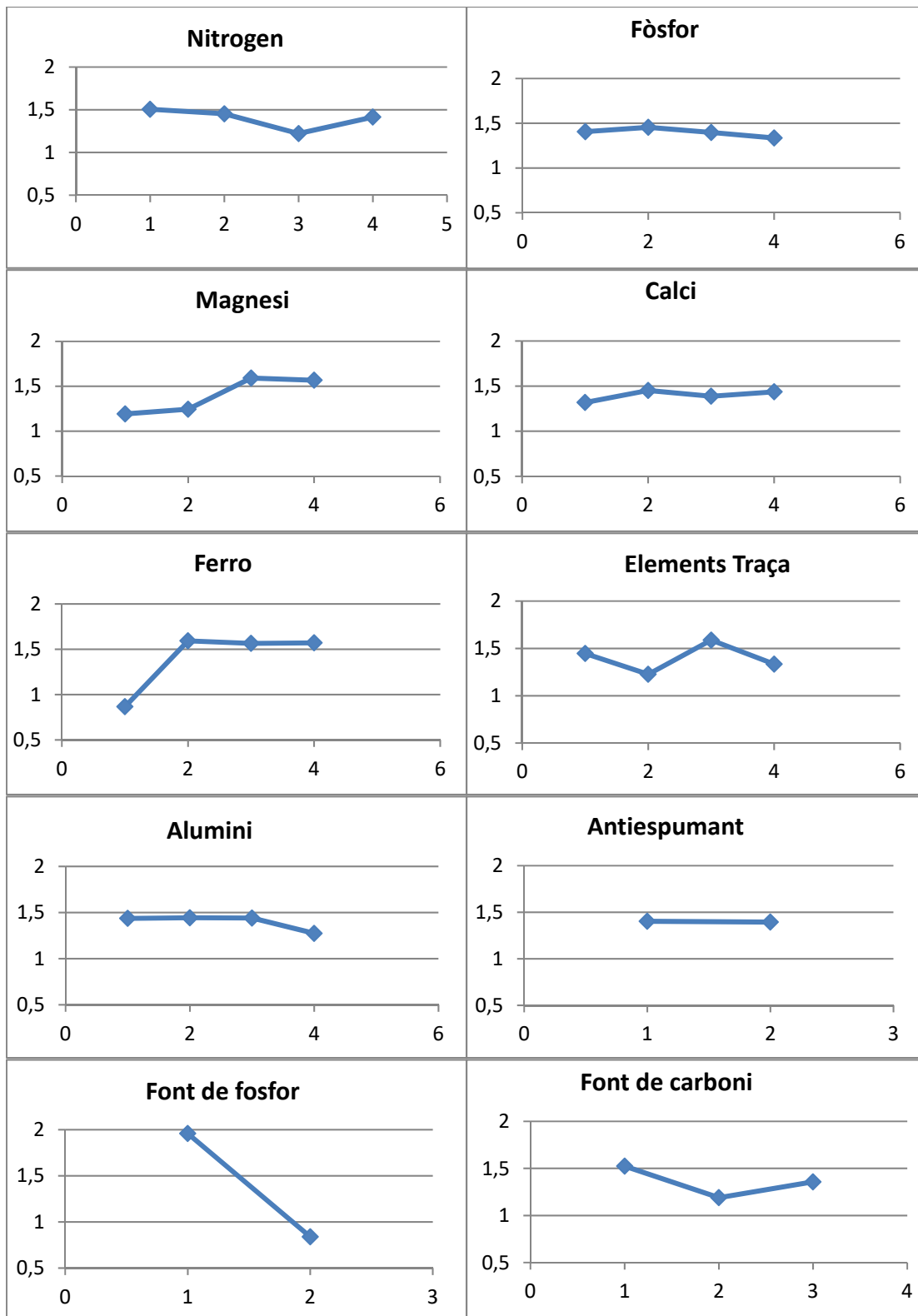
A partir del disseny experimental de Taguchi per a formular el medi de cultiu (descrit a l'apartat 3.1.3.1) es van obtenir els resultats de creixement cel·lular en forma de densitat òptica mesurada a 600nm. Es va realitzar l'experiment per duplicat i es va calcular la mitjana.

Taula 15 Densitats òptiques màximes per a cada un dels 64 experiments.

Densitat Òptica a 600nm			Densitat Òptica a 600nm				
	Repetició 1	Repetició 2	Mitjana		Repetició 1	Repetició 2	Mitjana
1	0,556	0,588	0,572	33	0,954	0,800	0,877
2	0,797	0,632	0,715	34	1,032	0,878	0,955
3	2,820	2,592	2,706	35	0,690	0,512	0,601
4	0,792	0,830	0,811	36	2,540	2,446	2,493
5	0,958	0,798	0,878	37	1,048	0,998	1,023
6	0,788	0,867	0,828	38	0,671	0,578	0,625
7	1,033	0,852	0,943	39	2,010	2,185	2,098
8	2,596	2,498	2,547	40	0,870	0,591	0,731
9	1,082	1,260	1,171	41	1,062	1,065	1,064
10	2,496	2,330	2,413	42	0,930	0,806	0,868
11	0,859	0,874	0,867	43	2,490	2,422	2,456
12	2,886	2,717	2,802	44	0,918	0,877	0,898
13	2,586	2,646	2,616	45	0,701	0,642	0,672
14	0,798	0,892	0,845	46	1,978	2,103	2,041
15	2,550	2,103	2,327	47	1,023	1,356	1,190
16	1,055	1,056	1,056	48	1,054	0,862	0,958
17	2,616	2,395	2,506	49	0,696	0,503	0,600
18	1,035	0,768	0,902	50	2,482	2,513	2,498
19	2,532	2,510	2,521	51	0,829	0,458	0,644
20	0,529	0,542	0,536	52	2,594	2,547	2,571
21	0,747	0,577	0,662	53	2,662	2,861	2,762
22	2,664	2,802	2,733	54	0,827	0,728	0,778
23	1,103	0,793	0,948	55	2,358	2,515	2,437
24	2,566	2,429	2,498	56	0,811	0,777	0,794
25	1,048	0,750	0,899	57	0,861	0,853	0,857
26	0,725	0,812	0,769	58	1,008	0,989	0,999
27	0,698	0,727	0,713	59	2,018	2,224	2,121
28	2,568	2,657	2,613	60	0,881	0,820	0,851
29	0,880	0,873	0,877	61	1,014	1,067	1,041
30	0,910	0,849	0,880	62	1,066	1,054	1,060
31	2,106	2,124	2,115	63	0,892	0,669	0,781
32	1,144	1,002	1,073	64	1,876	1,814	1,845

Dels resultats de la Taula 15 es dedueix la gran influència que té la composició del medi en la producció de biomassa ja que hi ha una gran diferència entre el valor mínim de densitat cel·lular (0,529) i el màxim (2,886).

A partir d'aquests dades es van calcular les gràfiques factorials per a cada un dels components del medi de cultiu o factors. En l'eix d'ordenades es va representar la resposta mitjana de cada nivell i en el d'abscisses el nivell de cada factor.



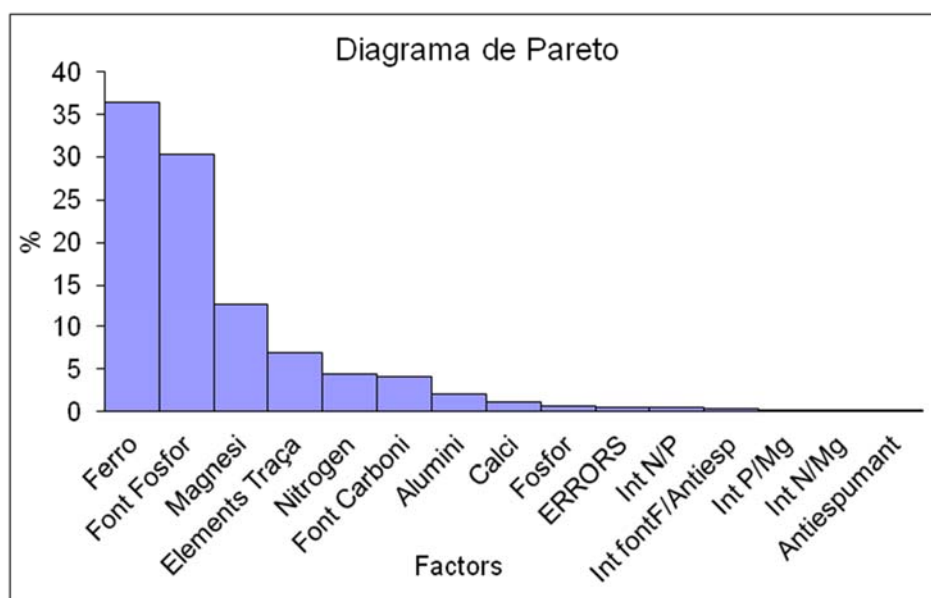
Gràfica 1 Gràfiques factorials per a cada un dels components del medi de cultiu.

A partir de les gràfiques factorials es pot veure l'efecte de la variació de cadascun dels nivells sobre el creixement cel·lular. Això va permetre determinar el nivell més beneficiós de cada un dels factors per a la producció de biomassa. També es poden apreciar, qualitativament, els factors que tenen més influència en la resposta del sistema ja que tots els nivells estan representats a la mateixa escala i es poden comparar directament. A la Taula 16 es poden veure els millors nivells per a cadascun dels factors.

Taula 16 Millors nivells per a cada factor.

Factor	Nivell	Valor
Font fòsfor	1	Ortofosfat
Font de carboni	1	Glucosa
Antiespumant	1,2	Indiferent
Nitrogen	1	0,535 g/L
Fòsfor	1	6,678 g/L
Magnesi	1	0,684 g/L
Ferro	2	0,340 g/L
Calci	2	0,349 g/L
Alumini	1	0,000 g/L
Elements traça	3	La concentració dels elements traça està detallada a la Taula 9

Es va calcular l'ANOVA de Pareto i es presenta el resultat final gràficament en forma del diagrama de Pareto (Gràfica 2).



Gràfica 2 Diagrama de Pareto expressant la influència de cada factor en el creixement cel·lular.

El diagrama de Pareto presenta els factors ordenats segons l'efecte que tenen sobre la resposta del sistema. S'aprecia que totes les interaccions entre factors així com el factor antiespumant queden per sota de l'error experimental, de manera que es pot afirmar que la seva influència en el resultat experimental es menystenible.

En el diagrama de Pareto es reflexa molt clarament que els factors: ferro, font de fòsfor, magnesi, elements traça, nitrogen i font de carboni expliquen un 94% de la variació total del sistema amb la qual cosa es pot dir que són els factors que més influeixen en el creixement del microorganisme.

La font de fòsfor i la font de carboni son factors qualitius amb el que es tria com a nivell més adient el que ha donat una resposta més elevada en les gràfiques factorials, es a dir, glucosa com a font de carboni i ortofosfat com a font de fòsfor. Per a la resta de factors, que expliquen el 94 % de variació, es pren com a millor nivell el que dona un major senyal a les gràfiques factorials. És aconsellable per a aquests factors un posterior procés d'optimització per tal d'afinar més el valor obtingut ja que el resultat de l'experiment indica que tenen una influència notable en el creixement del microorganisme i, per tant, l'optimització de la seva concentració pot millorar la producció de biomassa. Per tal de realitzar aquesta optimització es planteja utilitzar la metodologia de la superfície de resposta que permetrà ajustar un model i predir la concentració òptima per a aquests components del medi.

Pel que fa a la resta de factors que estan per sobre de l'error, alumini, calci i fòsfor, l'ANOVA de Pareto va senyalar que tenen molt poca influència en la resposta del sistema i per tant es va considerar suficient utilitzar el millor nivell obtingut en les gràfiques factorials sent innecessària cap optimització posterior. Finalment, pel que fa al factor antiespumant, tot i que els antiespumants sovint s'utilitzen en bioprocessos, se sap que alguns d'ells, poden afectar les taxes de creixement de tots dos organismes procarïotes i eucariotes així com la producció de proteïnes recombinants¹⁷⁶. En aquest cas es va comprovar que l'ús d'aquest no té cap efecte en el creixement del microorganisme a la concentració provada, per tant es pot afirmar que, en les concentracions utilitzades, no afecta negativament la producció de biomassa.

Es destacable el fet de que els resultats per als factors magnesi, ferro i elements traça van presentar uns valors que estan força per sobre de la composició

d'aquests elements en el microorganisme. Això indica que la concentració extracel·lular d'aquests elements té més influència en el creixement que la deguda senzillament a l'estequiometria del procés.

Destaca també el factor amoni que va presentar les condicions més favorables per a la producció de biomassa en el nivell mínim, que correspon aproximadament a la composició estequiomètrica en el bacteri. Això denota que l'amoni, tot i ser indispensable per al creixement, presenta un fort efecte inhibidor. En el cas de realitzar un creixement fed-batch es necessari aconseguir que s'excreti la quantitat mínima d'acetat en el medi ja que si s'utilitza hidròxid amònic per regular el pH pot provocar que s'acumuli amoni en el medi i que interfereixi en el creixement cel·lular.

4.1.1.2 *Optimització de la composició del medi mitjançant una superfície de resposta*

Un cop acotats els factors que tenen més influència en el creixement, molts cops es aconsella caracteritzar la regió de resposta per tal de trobar la resposta òptima. Continuant amb els resultats obtinguts a l'apartat anterior, es va plantejar optimitzar els 4 factors que més influència van tenir en el creixement cel·lular segons el disseny de Taguchi.

El disseny central compost es àmpliament utilitzat en dissenys experimentals para estimar una aproximació polinòmica de segon ordre per tal d'obtenir una superfície de resposta i poder estimar la concentració idònia dels components del medi de cultiu¹⁷⁷.

Es va optimitzar per tant la concentració de clorur d'amoni, sulfat de ferro, clorur de magnesi i elements traça. Per a la resta dels components, tal com s'ha dit anteriorment, es va fixar la concentració més beneficiosa obtinguda en el disseny de Taguchi.

Es van definir els següents nivells:

		Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	nivell	FeSO ₂ ·7H ₂ O g/L	MgCl ₂ ·6H ₂ O g/L	Traces mL	NH ₄ Cl g/L
α	2	0,850	0,950	4,0	1,100
factorial	1	0,700	0,800	3,5	0,900
n_0	0	0,550	0,650	3,0	0,700
- factorial	-1	0,400	0,500	2,5	0,500
$-\alpha$	-2	0,250	0,350	2,0	0,300

Seguint el disseny central compost per a 4 variables es va obtenir la següent taula dels experiments a realitzar.

Taula 17 Disseny factorial compost per a l'experiment d'optimització del medi de cultiu.

	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	2	0	0	0
18	-2	0	0	0
19	0	2	0	0
20	0	-2	0	0
21	0	0	2	0
22	0	0	-2	0
23	0	0	0	2
24	0	0	0	-2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

La llei de creixement dels organismes es basa en la regulació de la distribució de nutrients entrants entre dues funcions: les necessitats de manteniment bàsiques i la de síntesi de biomassa. D'una manera senzilla, això estarà definit per les característiques externes com la disponibilitat de nutrients i la maquinària bioquímica del microorganisme¹⁷⁸.

Per tant, un dels paràmetres essencials a optimitzar es va definir com el producte de la velocitat específica de creixement i la concentració de biomassa, mesurada com densitat òptica, ja que es buscava obtenir la concentració màxima de biomassa i una velocitat de creixement alta (indicatiu de l'absència d'inhibició i per tant de màxima productivitat).

Els resultats de l'experiment es mostren a la Taula 18.

Taula 18 Resultat de les experiències realitzades en el disseny central compost.

exp	Resposta		
	μ max	DO max	Objectiu
1	0,637	2,63	1,68
2	0,635	2,49	1,58
3	0,661	2,50	1,65
4	0,640	2,45	1,57
5	0,660	2,61	1,72
6	0,643	2,51	1,61
7	0,667	2,65	1,77
8	0,646	2,49	1,61
9	0,651	2,62	1,71
10	0,644	2,55	1,64
11	0,647	2,52	1,63
12	0,640	2,51	1,61
13	0,656	2,63	1,73
14	0,645	2,53	1,63
15	0,652	2,66	1,74
16	0,622	2,50	1,56
17	0,625	2,54	1,59
18	0,630	2,50	1,58
19	0,615	2,58	1,59
20	0,623	2,45	1,53
21	0,645	2,57	1,66
22	0,660	2,62	1,73
23	0,629	2,20	1,38
24	0,669	2,37	1,59
25	0,643	2,56	1,65
26	0,647	2,55	1,65
27	0,645	2,53	1,63

Utilitzant l'eina Regressió de MS Excel 2007, es van obtenir els coeficients reals del polinomi de segon ordre que representa la superfície de resposta.

$$y = 1,64259 + 0,00285 \cdot A + 0,01755 \cdot B - 0,01333 \cdot C - 0,0505 \cdot D - 0,0033 \cdot A^2 - 0,0095 \cdot B^2 + 0,02472 \cdot C^2 - 0,0275 \cdot D^2 - 0,0108 \cdot A \cdot B - 0,0113 \cdot A \cdot C + 0,0052 \cdot A \cdot D + 0,0077 \cdot B \cdot C - 0,0169 \cdot B \cdot D - 0,0055 \cdot C \cdot D$$

Equació 45 Polinomi de segon ordre que representa la superfície de resposta.

També es va fer l'anàlisi de variància ANOVA de l'ajust amb un nivell de confiança del 95% (Taula 19).

Taula 19 Resultat de l'anàlisi de variància ANOVA utilitzant MS Excel 2007.

<i>Estadístiques de la regressió</i>	
Coefficient de correlació múltiple	0,896781375
Coefficient de determinació R ²	0,804216835
R ² ajustat	0,575803142
Error típic	0,051157254
Observacions	27

**ANÀLISI DE
VARIANÇA**

	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F</i>	<i>Valor crític de F</i>
Regressió	14	0,129001127	0,009214366	3,520878	0,01751553
Residus	12	0,031404775	0,002617065	395	7
Total	26	0,160405902			

A partir de l'anàlisi de variància ANOVA es va obtenir una correlació de l'ajust de 0,896. Es pot interpretar aquest valor com a que l'ajust obtingut explica bona part de la variació experimental en els valors de la resposta, gairebé un 90%. El valor de F crítica, 0,017, es inferior a 0,05 que marca una confiança del 95% ; per tant, aquest paràmetre, juntament amb l'alta correlació de l'ajust, va indicar la validesa estadística dels coeficients obtinguts.

A continuació es presenten gràficament els resultats de l'ajust obtinguts mitjançant el programa MATLAB versió 2007b (Mathworks).

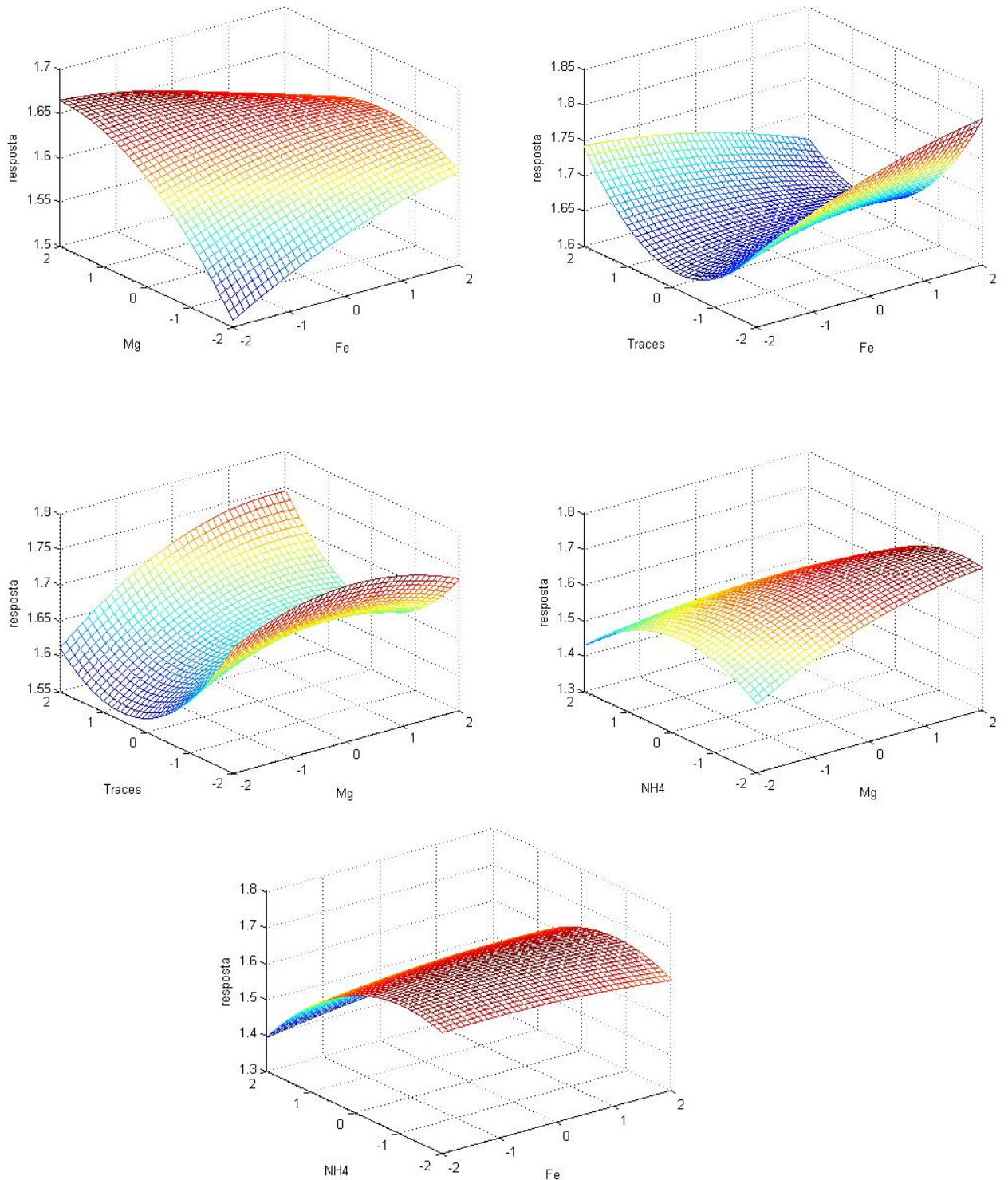


Figura 17 Representació de la superfície de resposta obtinguda a l'experiment d' optimització del medi de cultiu representada per a cada parella de factors.

Un cop obtingut el polinomi que representa la superfície de resposta, es va buscar l'òptim dins del domini experimental mitjançant el mètode SIMPLEX de Nelder-Mead utilitzant la funció "fminsearch" de MATLAB 2007b. L'algoritme de

Nelder-Mead o algoritme de cerca simplex, és un dels algorismes més coneguts per a l'optimització multivariable sense restriccions. L'algoritme bàsic és senzill d'entendre i molt fàcil d'utilitzar. Per aquestes raons, és molt popular en molts camps de la ciència i la tecnologia, especialment en química i medicina. És àmpliament utilitzat per resoldre problemes d'estimació de paràmetres i estadístiques similars, on els valors de la funció són incerts o subjecte al soroll¹⁷⁹.

El codi utilitzat tant per a la representació gràfica com per a l'optimització es pot trobar a l'annex 2.

A continuació es presenten les concentracions òptimes que es van obtenir numèricament:

A (sulfat de ferro)	=	-0,4572	(0,481 g/L)
B (clorur de magnesi)	=	1,972	(0,946 g/L)
C (elements traça)	=	-2	(2 mL/L)
D (clorur d'amoni)	=	-1,371	(0,426 g/L)

Combinant aquests resultats amb els del disseny de Taguchi es va obtenir la composició final del medi de cultiu que figura a la Taula 20 i que es va anomenar medi Biotiqs coli.

Taula 20 Medi de cultiu final (Biotiqs coli).

Factor	Valor
Font de carboni	Glucosa
Antiespumant	100µL/L
NH ₄ Cl	0,426 g/L
KH ₂ PO ₄	6,678 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,946 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,481 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,349 g/L
Elements traça (concentració detallada a la Taula 9)	2 mL/L

Finalment es va confirmar la optimització realitzant un creixement en matràs per triplicat utilitzant el medi Biotiqs coli. Es va obtenir un valor de resposta (producte

de la densitat òptica i la velocitat específica de creixement) de 1,78, que va ser el més alt obtingut en totes les experiències.

4.1.1.3 *Avaluació del consum de nutrients*

Seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.1.3.3, es van obtenir els valors de producció de biomassa i la variació de la concentració de cada un dels components del medi de cultiu *Biotiqs coli* (Taula 20).

Les mesures es van realitzar per a les 3 fonts de carboni utilitzades en el disseny experimental, ja que tot i que de l'anàlisi de les dades es va veure que la glucosa es la font de carboni que més afavoreix la formació de biomassa, es va tenir en compte que en referències bibliogràfiques consultades^{100,127} es mostraven els avantatges de la utilització de fructosa i glicerol realitzant els experiments en reactor i en mode fed-batch. Els resultats de producció de biomassa es poden veure a la Taula 21.

Taula 21 Biomassa generada en els experiments de consum de nutrients.

Experiment	Font de carboni	Biomassa Generada	
		OD600	Pes sec g/L
1	Glucosa	18,06	6,31
2	Glucosa	18,37	6,41
3	Glucosa	19,85	6,93
4	Fructosa	17,05	5,95
5	Fructosa	15,83	5,53
6	Fructosa	15,25	5,32
7	Glicerol	10,11	3,53
8	Glicerol	9,31	3,25
9	Glicerol	10,21	3,56

A partir dels valors de biomassa produïda i la determinació del consum total de cada component, es va calcular el consum de cada nutrient per gram de biomassa. Els resultats es presenten a la Taula 22.

Taula 22 Consum de nutrients en el medi Biotiqs en mg per gram de biomassa generada.

	Ca	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Zn	P
Glucosa	7,111	0,100	0,076	9,557	4,349	0,357	0,068	0,462	198,759
Fructosa	7,481	0,104	0,063	10,106	6,697	0,360	0,072	0,460	220,235
Glicerol	11,215	0,151	0,066	15,048	7,501	0,543	0,092	0,762	201,904

A partir d'aquests resultats es va formular un medi d'alimentació per a creixement fed-batch que es va anomenar Biotiqs coli F. Aquest medi hauria de permetre mantenir la concentració òptima de tots els components del medi al llarg del procés.

Un cultiu fed-batch (discontinu alimentat) és una operació semicontínua en el qual els nutrients necessaris per a el creixement cel·lular i la formació de producte són alimentats ja sigui intermitent o contínua a través d'una o més corrents d'alimentació durant el curs d'una operació que d'un altre manera seria per lots discontinus. El brou de cultiu es recull, en general, només al final del període operatiu, ja sigui totalment o parcialment (la resta que serveix com el inòcul per a la següent execució repetida). Aquest procés es pot repetir (fed-batch repetit) un nombre determinat de vegades si les cèl·lules són totalment viables i productives al final del procés. A través de la manipulació d'un o més velocitats d'alimentació, l'operació fed-batch pot proporcionar mitjans únics de la regulació de la concentració de compostos que controlen les velocitats de reacció clau i, per tant, pot proporcionar un avantatge rellevant sobre l'operació discontinua o contínua¹⁸⁰.

En el cas d'aquest experiment, es va partir d'una concentració de font de carboni a l'alimentació de 700 g/L. La resta de components es van afegir calculant la biomassa que es podria formar a partir de la font de carboni (rendiment de conversió de carboni a biomassa per la glucosa i fructosa 0,5 i per al glicerol 0,45) i aplicant la Taula 22.

Taula 23 Composició del medi d'alimentació fed-batch Biotiqs coli F per a glucosa, fructosa i glicerol.

Compost	g/L		
	Glucosa	Fructosa	Glicerol
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,489	2,618	4,318
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,035	0,036	0,058
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,027	0,022	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,345	3,537	5,794
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,522	2,344	2,888
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,125	0,126	0,209
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,024	0,025	0,035
ZnCl ₂	0,162	0,161	0,293
KH ₂ PO ₄	69,566	77,084	77,732

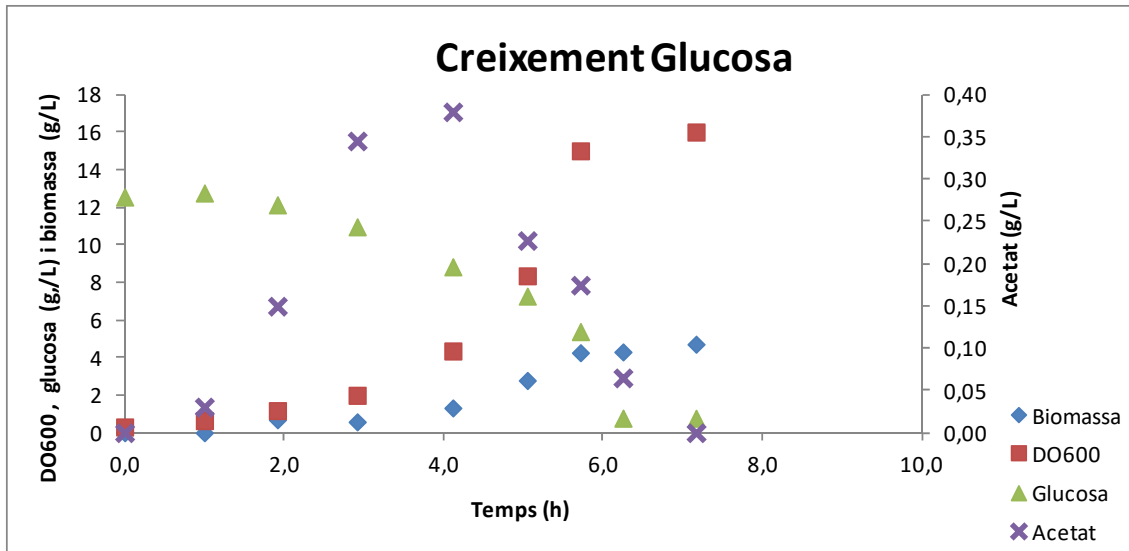
4.1.2 Cultiu d'*Escherichia coli* en bioreactor

4.1.2.1 Procés batch

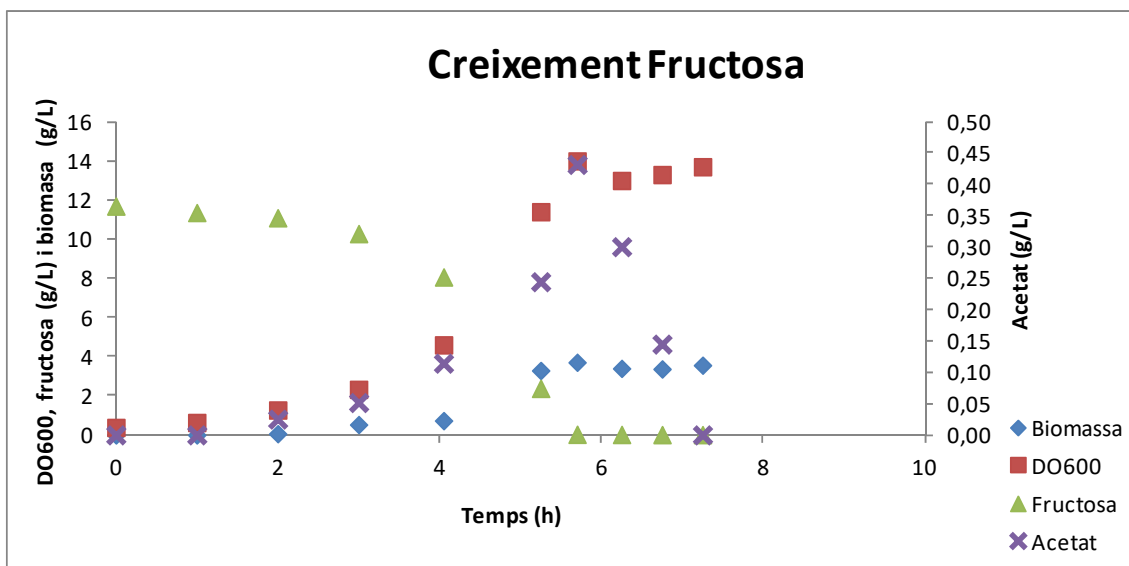
En una operació batch (per lots), s'afegeixen tots els components del medi necessaris i l'inòcul a l'inici i no es reposen durant el període de creixement. Per tant, les seves concentracions no estan controlades, varien a mesura que les cèl·lules els consumeixen¹⁸⁰.

Per tal de determinar la millor font de carboni per al creixement d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) en reactor, es van realitzar cultius en mode batch amb cada una de les fonts de carboni a estudiar (glucosa, fructosa i glicerina).

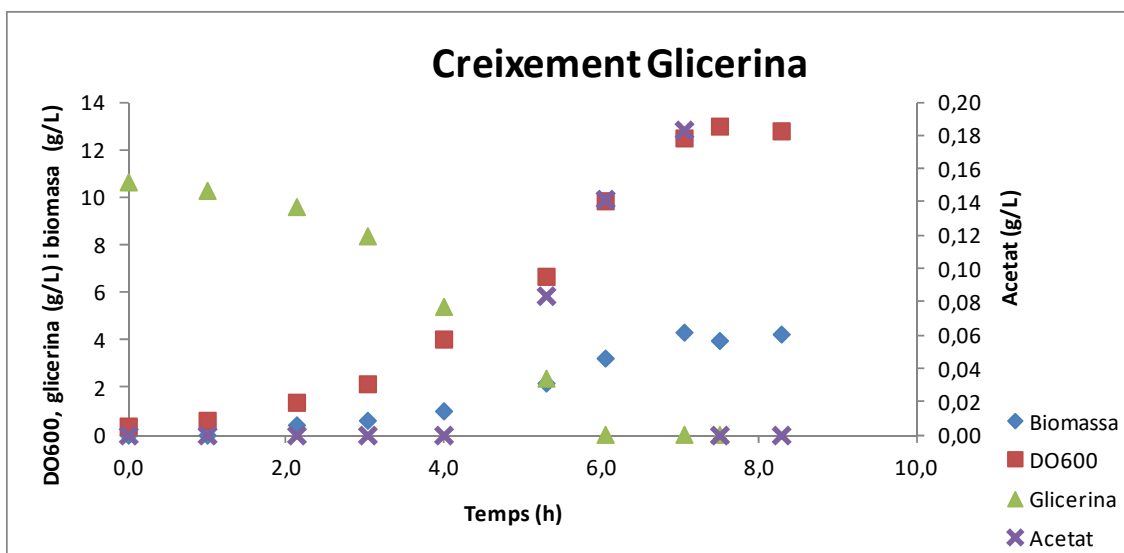
Es va utilitzar la composició del medi Biotiqs coli descrit a la Taula 20. Els cultius es van realitzar seguint el procediment descrit a l'apartat 3.1.9.2 de materials i mètodes. En cada un dels cultius es va seguir l'evolució de la densitat òptica (DO₆₀₀), la biomassa formada mesurada per gravimetria (pes sec), la concentració de glucosa i la concentració d'acetat en el medi de cultiu (HPLC). A continuació, a les gràfiques 3, 4 i 5 es presenten els resultats obtinguts per a un cultiu representatiu utilitzant cada una de les fonts de carboni.



Gràfica 3 Creixement del cultiu d' *Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode batch utilitzant glucosa i medi Biotiqs coli.



Gràfica 4 Creixement del cultiu d' *Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode batch utilitzant fructosa i medi Biotiqs coli.



Gràfica 5 Creixement del cultiu d' *Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode batch utilitzant glicerina i medi Biotiqs coli.

A la Taula 24 es pot veure els resultats de rendiment (g de biomassa / g de font de carboni) que es van obtenir utilitzant cada una de les fonts de carboni.

Taula 24 Resultats de rendiment del cultiu d' *Escherichia coli* BL21 (DE3) per a les fermentacions en mode batch i medi Biotiqs coli.

Font de carboni	Biomassa g/L	Velocitat específica de creixement (h ⁻¹)	Rendiment %
Glucosa	40	0,65	40
Fructosa	30	0,65	30
Glicerina	40	0,55	37

A partir d'aquestes dades, es va observar que els creixements utilitzant glucosa i glicerina eren equivalents en quant a producció de biomassa i rendiment, mentre que els resultats obtinguts utilitzant fructosa eren inferiors als dos primers. Pel que fa a la producció d'acetat s'aprecia que va ser més alta en el cas de la glucosa i la fructosa. Això es degut a que la velocitat específica de creixement que permeten la glucosa i la fructosa és més alta que la que s'obté utilitzant glicerina i per tant hi ha una major saturació de la cadena de transport electrònic i per tant del metabolisme aerobi¹⁰⁰. A partir dels resultats obtinguts i les dades de l'optimització de la composició del medi en matràs (apartat 4.1.1.2) es va decidir utilitzar la glucosa com a font de carboni, ja que era la que permetia un major rendiment i velocitat específica de creixement.

4.1.2.2 *Modelització i del creixement d'Escherichia coli en bioreactor*

Per tal d'ajudar a optimitzar el procés de creixement en bioreactor es va programar una aplicació informàtica basada en els models descrits per Enfors i col·laboradors¹⁶³ i Neubauer i col·laboradors¹⁶⁴. En aquest dos articles, es proposa un model per descriure el creixement de *Escherichia coli* K12 W3110 que inclou la producció de acetat. En el primer article¹⁶³ es proposa un model que descriu el creixement de cèl·lules, la respiració cel·lular, la formació d'acetat i el consum d'acetat durant els processos batch, a la etapa de transició de batch a fed-batch i durant el fed-batch. El segon article¹⁶⁴ és una evolució de l'article anterior, en el que incorporen dos nous balanços, que consideren la dinàmica d'utilització de la glucosa i l'oxigen amb més detall. Tot i la nova incorporació dels nous balanços, el model continua tenint una sèrie de limitacions, com per exemple: es considera que el transport d'oxigen en el medi és un valor constant i no té present que el consum d'oxigen pugui ser una limitació del creixement. Així que es van introduir modificacions en la programació per a solventar-ho.

Per tal de dur a terme la simulació, es va considerar una combinació de dos llenguatges: *Matlab R2007b* per programar tot el sistema d'equacions i variables (primer model apartat 3.1.9.5.1) i *Microsoft Visual Basic* dintre del paquet de programari *Microsoft Visual Studio 2005* per tal de crear la interfície amb l'usuari. *Matlab R2007b* és una eina preparada per treballar amb equacions diferencials de forma senzilla i eficient, al mateix temps que permet fer tot tipus de càlculs i representacions gràfiques fàcilment.

Tot i que *Matlab R2007b* permet crear formularis per la interfase amb l'usuari, la facilitat de treball de *Microsoft Visual Basic 2005* és molt superior i com les versions escollides permeten la seva interconnexió, s'ha optat per aquesta possibilitat.

Mitjançant la pantalla principal del programa (veure Figura 18.) l'usuari pot modificar els paràmetres, com els rendiments, les velocitats específiques, el coeficient k_{LA} o els valors de les condicions inicials del procés que vol simular. Al mateix temps, pot escollir el model a simular entre els dos programats i el tipus de procés, batch o fed-batch. Finalment l'usuari pot escollir les gràfiques que vol visualitzar.

Rendiments Yas <input type="text" value="0.667"/> [g/g] Yoa <input type="text" value="1.067"/> [g/g] Yos <input type="text" value="1.067"/> [g/g] Yxa <input type="text" value="0.4"/> [g/g] Yxsof <input type="text" value="0.15"/> [g/g] Yxsox <input type="text" value="0.51"/> [g/g]	Constants Ka <input type="text" value="0.05"/> [g/L] Ks <input type="text" value="0.05"/> [g/L] Kis <input type="text" value="5"/> [g/L] Kio <input type="text" value="4"/> [g/L]	Opcions <input checked="" type="radio"/> Simulació <input type="radio"/> Sensibilitat	Gràfiques <input type="checkbox"/> Biomassa <input type="checkbox"/> Glucosa <input checked="" type="checkbox"/> Acetat <input checked="" type="checkbox"/> Consum oxigen <input checked="" type="checkbox"/> Biomassa/Glucosa <input checked="" type="checkbox"/> Velocitat específica
Condicions inicials S0 <input type="text" value="13.86"/> [g/L] X0 <input type="text" value="0.05"/> [g/L] A0 <input type="text" value="0"/> [g/L]	Contingut en carboni Ca <input type="text" value="0.0333"/> [mol C/g] Cs <input type="text" value="0.0333"/> [mol C/g] Cx <input type="text" value="0.04"/> [mol C/g]	Opcions models <input checked="" type="checkbox"/> Model antic <input type="checkbox"/> Model nou	
	Transport oxigen KLA <input type="text" value="100"/> [1/h] Csat <input type="text" value="0.03488"/>	Batch/Fed-Batch <input checked="" type="radio"/> Batch <input type="radio"/> Fed-Batch	
		Velocitats específiques qAcmax <input type="text" value="0.06"/> [g/g·h] qm <input type="text" value="0.04"/> [g/g·h] qOmax <input type="text" value="0.4992"/> [g/g·h] qSmax <input type="text" value="1.3"/> [g/g·h]	
		<input type="button" value="Simulació"/>	<input type="button" value="Sortir"/>

Figura 18 Pantalla del programa de Microsoft Visual Studio per un procés batch. A l'escollir l'opció de fed-batch, apareixen automàticament les variables necessàries per simular el procés, com el cabal inicial, la concentració de glucosa afegida o el cabal de mostra que es vol extreure (veure Figura 19).

Rendiments Yas <input type="text" value="0.667"/> [g/g] Yoa <input type="text" value="1.067"/> [g/g] Yos <input type="text" value="1.067"/> [g/g] Yxa <input type="text" value="0.4"/> [g/g] Yxsof <input type="text" value="0.15"/> [g/g] Yxsox <input type="text" value="0.51"/> [g/g] Yesx <input type="text" value="0.51"/> [g/g] Yeox <input type="text" value="0.23"/> [g/g]	Constants Ka <input type="text" value="0.05"/> [g/L] Ks <input type="text" value="0.05"/> [g/L] Kis <input type="text" value="5"/> [g/L] Kio <input type="text" value="4"/> [g/L]	Opcions <input checked="" type="radio"/> Simulació <input type="radio"/> Sensibilitat	Gràfiques <input type="checkbox"/> Biomassa <input type="checkbox"/> Glucosa <input checked="" type="checkbox"/> Acetat <input checked="" type="checkbox"/> Consum oxigen <input checked="" type="checkbox"/> Biomassa/Glucosa <input checked="" type="checkbox"/> Velocitat específica
Condicions inicials S0 <input type="text" value="7.47"/> [g/L] X0 <input type="text" value="0.05"/> [g/L] A0 <input type="text" value="0"/> [g/L]	Contingut en carboni Ca <input type="text" value="0.0333"/> [mol C/g] Cs <input type="text" value="0.0333"/> [mol C/g] Cx <input type="text" value="0.04"/> [mol C/g]	Opcions models <input checked="" type="checkbox"/> Model antic <input checked="" type="checkbox"/> Model nou	
	Transport oxigen KLA <input type="text" value="100"/> [1/h] Csat <input type="text" value="0.03488"/>	Batch/Fed-Batch <input type="radio"/> Batch <input checked="" type="radio"/> Fed-Batch	
Variables Fed-Batch F sample <input type="text" value="0.015"/> [L/h] SFR <input type="text" value=""/> [1/h] F <input type="text" value="0.188"/> [L/h] Spulse <input type="text" value=""/> [g/L] Sfeed <input type="text" value="520"/> [g/L] V0 <input type="text" value="1"/> [L] Mu Cte <input type="text" value="0.3"/> [1/h] Yxs <input type="text" value="0.5"/> [g/g]		Velocitats específiques qAcmax <input type="text" value="0.2"/> [g/g·h] qm <input type="text" value="0.04"/> [g/g·h] qOmax <input type="text" value="0.4288"/> [g/g·h] qSmax <input type="text" value="1.25"/> [g/g·h] qEsd <input type="text" value="0.9"/> [g/g·h] qEod <input type="text" value="0.35"/> [g/g·h]	
		<input type="button" value="Simulació"/>	<input type="button" value="Sortir"/>

Figura 19 Pantalla del programa de Microsoft Visual Studio per un procés en mode fed-batch.

El codi programat en *Matlab R2007b* es centra a la funció “Principal” que crida a una funció “equacions” i aquesta crida a dues subfuncions: “MuFinal” i “Cabal” (Figura 20).

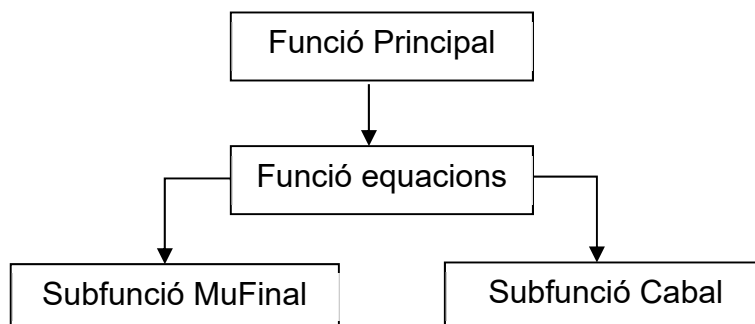


Figura 20 Diagrama del codi programat en el Matlab R2007b.

A continuació es presenta el codi corresponent a un creixement de *E. coli* en un bioreactor fed-batch utilitzant el primer model¹⁶³.

“reaccionsAnticFed” és la funció més important del codi, a partir de la qual es crida el sistema d’equacions diferencials, format, en aquest cas, pels diferents balanços de matèria (Equació 24, Equació 25, Equació 26, Equació 27 i Equació 28).

Com es pot observar, tant en el codi adjunt com en les equacions descrites a l’apartat 3.1.9.5.1, és necessari, segons els dos models, disposar dels valors d’un conjunt de variables que son funció del temps. Així doncs la funció principal cridarà a una subfunció, “MuFinal”, que retorna les variables al llarg del temps. També crida una altre subfunció, “Cabal”, la qual retorna el valor del cabal d’alimentació de glucosa.

La funció “equacions”, utilitza les variables inicials que estan descrites en la Taula 25. Aquesta funció retorna un vector columna “dy” amb les derivades de les variables respecte els temps. Les variables estan codificades de la següent forma:

- | | |
|--------------------------------|------------------------------|
| y(1) ≡ concentració biomassa | y(4) ≡ concentració d’oxigen |
| y(2) ≡ concentració de glucosa | y(5) ≡ volum |
| y(3) ≡ concentració d’acetat | |

```

function dy=reaccionsAnticFed(t,y,Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,...
    Yxa,Yxsof,Yxsox,Yxs,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,...
    KLA,Sfeed,Fsample,MuCte,t0,V0,X02)

% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen,
% x5=volum
[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuFinal(y(3),y(2)...
    ,Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,...
    Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax);

F=Cabal(t,MuCte,Yxs,Sfeed,t0,X02,V0);

%Creixement
dy=[(-F/y(5)+Mu)*y(1);
    %Consum de substrat
    (F/y(5)*(Sfeed-y(2))-Vs*y(1)).*(y(2)>=0);
    %Acetat
    (-F/y(5)*y(3)+(Vap-Vac)*y(1)).*(y(3)>=0);
    %Consum d'oxigen
    (KLA*(Csat-y(4))-Vo*y(1)).*(y(4)>=0);
    %Volum
    F-Fsample];

```

La subfunció “MuFinal”, segueix l’esquema i les equacions exposades a l’apartat

3.1.9.5.1.

```

function [Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=...
    MuFinal(A,S,Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,...
    Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax)
% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen
Vscap=Vsmax;
Vocap=Vomax./(1+A/Kio);

%tota la glucosa va a via oxidativa
Vs=Vscap.*S./((S+Ks).*(1+A/Kis));

[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuComu(A,...
    Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vs,...
    Vocap,Vacmax);

function [Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=...
    MuComu(A,Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,...
    Ca,Vm,Vs,Vocap,Vacmax)

Vsox=Vs;
Vm=Vsox.*(Vm>Vsox)+Vm*(Vm<=Vsox);

Vsoxan=(Vsox-Vm)*Yxsox*Cx/Cs;
Vsoxen=Vsox-Vsoxan;
Vos=Vsoxen*Yos;

%Es mira si el consum d'oxigen es superior al màxim
%Consum d'oxigen per creixement és el limitant
AuxOx= Vos>Vocap;
Vos=Vocap.*(AuxOx)+Vos.*(~AuxOx);
Vsoxen=(Vos/Yos).*AuxOx+Vsoxen.*~AuxOx;
Vsox=(Cs*Vsoxen-Vm*Yxsox*Cx)/(Cs-Yxsox*Cx).*AuxOx+Vsox.*~AuxOx;

```

```
Vsoxan=(Vsox-Vsoxen). *AuxOx+Vsoxan. *~AuxOx;
```

```
%el manteniment és el limitant
```

```
AuxVm=AuxOx. *(Vm>Vsox);
```

```
NotAuxVm=AuxOx. *(Vm<=Vsox);
```

```
Vsoxan=Vsoxan. *AuxOx. *(Vm<=Vsox);
```

```
Vm=Vsox. *AuxVm+Vm. *NotAuxVm;
```

```
%tot va a manteniment és a dir energia
```

```
Vsoxen=Vm. *AuxVm+Vsoxen. *NotAuxVm;
```

```
%ara està a la via overflow
```

```
Vsof=(Vs-Vsox). *(AuxOx);
```

```
Vsofan=(Vsof*Yxsof*Cx/Cs). *(AuxOx);
```

```
Vsofen=(Vsof-Vsofan). *(AuxOx);
```

```
Vap=(Vsofen*Yas). *(AuxOx);
```

```
%Consum d'acetat
```

```
Vac=Vacmax*A./(A+Ka);
```

```
Vacan=Vac*Yxa*Cx/Ca;
```

```
Vacen=Vac-Vacan;
```

```
%Ara anirà part del acetat a respiracio(energia)
```

```
%Es torna a calcular Vac i Vacan
```

```
AuxAc=Vacen>(Vocap-Vos)/Yoa;
```

```
Vacen=Vacen. *(~AuxAc)+((Vocap-Vos)/Yoa). *AuxAc;
```

```
Vac=Vac. *(~AuxAc)+(Vacen/(1-Yxa*Cx/Ca)). *AuxAc;
```

```
Vacan=Vacan. *(~AuxAc)+(Vac-Vacen). *AuxAc;
```

```
Vs=Vsox+Vsof;
```

```
Vo=Vos+Vacen*Yoa;
```

```
%velocitat especifica de creixement
```

```
Mu1=(Vsox-Vm)*Yxsox. *((Vsox-Vm)>=0);
```

```
Mu2=Vsof*Yxsof;
```

```
Mu3=Vac*Yxa;
```

```
Mu=Mu1+Mu2+Mu3;
```

La subfunció “Cabal” proporciona una alimentació exponencial de glucosa (com s’ha explicat anteriorment el l’apartat 3.1.9.5.1) per un reactor fed-batch:

```
function df=Cabal(t,MuCte,Yxs,Sfeed,t0,X,V)
    %Calcula el cabal exponencial d'alimentació en fed-batch
    df=MuCte/Yxs*(X*V/Sfeed)*exp(MuCte*(t-t0));
```

Seguidament s’ha d’executar la funció “principal”. Els paràmetres utilitzats per cridar aquesta funció es mostren a la Taula 25. Aquesta funció “principal” cridarà a la funció “equacions” i retornarà dues variables, t i y , a on la variable t és un vector amb els temps i la variable y és una matriu a on cada columna correspon a les concentracions de biomassa, glucosa, acetat i oxigen i el volum, respectivament. Seguidament es representen gràficament les variables

obtingudes. Es poden observar els gràfics en l'apartat 4.1.2.2.2, estudi de sensibilitat.

```

clear
clc
%Modeling of overflow metabolism in Batch and Fed-Batch cultures of
Escherichia coli, by Bo Xu 1999
%
%Valors de les constants per reactor Batch
%Rendiments
Yas=0.667; %[g/g]
Yoa=1.067; %[g/g]
Yos=1.067; %[g/g]
Yxa=0.4; %[g/g]
Yxsof=0.15; %[g/g]
Yxsox=0.51; %[g/g]
%Constants de saturacio i inhibicio
Ka=0.05; %[g/L]
Ks=0.05; %[g/L]
Kis=5;
Kio=4;
%Concentracio en mols per gram de substrat
Ca=0.0333; %[mol C/g]
Cs=0.0333; %[mol C/g]
Cx=0.04; %[mol C/g]
%velocitat especifica
Vacmax=0.06; %[g/g·h] consum maxim d'acetat
Vm=0.04; %[g/g·h] manteniment

Vomax=0.4992; %[g/g·h] consum maxim d'oxigen
Vsmax=1.30; %[g/g·h] consum maxim de sustrat
%transport d'oxigen
KLA=100;
Csat=0.03488;
%Concentracio de sustrat inicial
S0=13.86; %[g/L]
X0=.05;
A0=0;
ti=[0 15];
[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vo,OUR]=AnticOriginal(Yas,Yoa,Yos,Yxa,Yxsof,Yxsox,
Ka,Ks,Kio,Kis,Ca,Cs,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,Vsmax,KLA,Csat,S0,X0,A0,ti);
figure(1)
plot(t,y(:,3))
grid
xlabel('temps [t]')
ylabel('acetat[g/L]')

figure(2)
plot(t,y(:,2),t,y(:,1))
xlabel('temps [t]')
ylabel('biomassa[g/L] i substrat')

figure(3)
plot(t,y(:,4)*1000) %mmoles
grid
xlabel('temps [t]')
ylabel('concentracio oxigen')

figure(4)
plot(t,Mu1,t,Mu2,t,Mu3)

```

```

grid
xlabel('temps [t]')
ylabel('Creixement')

figure(5)
plot (t,OUR*1000/32)
grid
xlabel('temps [h]')
ylabel('OUR')

figure(6)
plot (t,Vo)
grid
xlabel('temps [h]')
ylabel('Vo')

```

Finalment, per aconseguir que el programa en Visual Basic pogués obrir i executar les funcions de Matlab, es va haver de crear una variable objecte la qual es va anomenar Matlab. Després de crear aquesta variable, només faltava assignar-li que, al executar aquesta variable, s'executés el programa Matlab 2007b. Les dues sentències claus per poder fer-ho van ser:

```

Private Matlab As Object
Matlab = CreateObject("Matlab.application")

```

A partir d'aquest moment utilitzant la propietat "execute" de la variable objecte creada es podien enviar les sentències en format Matlab directament. Com es pot observar a continuació, primerament es busca la direcció de l'arxiu de Matlab, i posteriorment se li entra la sentència amb les diferents variables d'execució:

```

Matlab.execute("cd ' " & ApplicationPath & "\Resultats'")
cadena = "[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3]=AnticOriginal(" & Str(Yas) _
& "," & Str(Yoa) & "," & Str(Yos) & "," & Str(Yxa) _
& "," & Str(Yxsof) & "," & Str(Yxsox) & "," & Str(Ka) _
& "," & Str(Ks) & "," & Str(Kio) & "," & Str(Kis) _
& "," & Str(Ca) & "," & Str(Cs) & "," & Str(Cx) & "," _
& Str(Vacmax) & "," & Str(Vm) & "," & Str(Vomax) _
& "," & Str(Vsmax) & "," & Str(KLA) & "," & Str(Csat) _
& "," & Str(S0) & "," & Str(X0) & "," & Str(A0) & ",[0 15])"
Matlab.execute(cadena)

```

La Taula 25 mostra els valors de les variables que es van utilitzar per programar els dos models tan per a procés batch com per a procés fed-batch. Alguns paràmetres es van calcular a partir dels valors obtinguts en les diferents experiències de l'apartat 4.1.2.1 i els restants es van extreure de la bibliografia.

Taula 25 Paràmetres utilitzats per programar el codi. Especificació d'unitats, tipus d'operació del reactor i origen de les dades.

Variable	Unitats	Batch	Fed-batch	Origen
C_A	$\text{mol C}\cdot\text{g}^{-1}$	0.0333	0.0333	Fórmula química
C_S	$\text{mol C}\cdot\text{g}^{-1}$	0.0333	0.0333	Fórmula química
C_X	$\text{mol C}\cdot\text{g}^{-1}$	0.04	0.04	Valor experimental, Enfors, 1999
F_0	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	na	0.04	Procediment experimental
F_{const}	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	na	0.188	Procediment experimental
G	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.10	1.10/1.30	Data fitting
K_A	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.05	0.05	Data fitting
$K_{i,O}$	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4	4	Valor experimental, Enfors, 1999
$K_{i,S}$	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5	5	Valor experimental, Enfors, 1999
K_S	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.05	0.05	Data fitting
$qA_{c,\text{max}}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.06	0.20	Data fitting
$qESd$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.9	0.9	Data fitting
$qEOd$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.35	0.55	Data fitting
q_m	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.04	0.04	Data fitting
qO_{max}	$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	15.6	13.4	Valor experimental
qS_{max}	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	1.30	1.25	Valor experimental
S_0	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	13.86	7.47	Procediment experimental
S_{feed}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	na	520	Procediment experimental
SFR	h^{-1}	na	0.3	Procediment experimental
S_{pulse}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	na	3.70	Procediment experimental
$Y_{A/S}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.667	0.667	constant estequiomètrica
$Y_{ES/X}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.51	0.1	Data fitting
$Y_{EO/X}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.23	0.1	Data fitting
$Y_{O/A}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1.067	1.067	constant estequiomètrica
$Y_{O/S}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1.067	1.067	constant estequiomètrica
$Y_{X/A}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.4	0.4	Valor experimental, Enfors, 1999
$Y_{X/S,\text{of}}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.15	0.15	Chen et al., 1997
$Y_{X/S,\text{ox}}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.51	0.51	Valor experimental, Enfors, 1999

Amb la finalitat d'apropar el model al comportament del procés, es van introduir diferents modificacions.

Una de les limitacions dels models descrits^{163,164} era la manca de consideració del transport d'oxigen. Per incorporar aquest concepte es va introduir una

equació matemàtica que relaciona el coeficient global de transport, K_La , amb la velocitat d'agitació.

Un cop incorporada l'equació al model, va permetre avaluar la concentració d'oxigen dissolt en el medi. Tot i que a totes les proves es va considerar que la velocitat d'agitació era constant durant tota l'experiència, és a dir, que el valor del coeficient K_La era constant durant tot l'experiment, no hi hauria cap dificultat en contemplar el manteniment de la concentració d'oxigen dissolt constant mitjançant un algorisme de control.

Es pot consultar el codi del programa i totes les subrutines utilitzades a l'annex6.

4.1.2.2.1 Determinació del coeficient de transferència de matèria del bioreactor (K_La)

L'oxigen dissolt (DO) és sovint el substrat limitant en els sistemes de fermentació i cultiu cel·lular. Per als bacteris i llevats, la concentració crítica d'oxigen és en general 10-50% de saturació d'aire. Per sobre d'aquest nivell crític, la concentració d'oxigen no limita el creixement. Per a un creixement òptim, per tant, és important mantenir els nivells d'OD per sobre del valor crític mitjançant el bombolleig del medi del bioreactor amb aire o oxigen pur. Per descomptat, per a ser eficaç, la taxa de transferència de massa d'oxigen al medi líquid ha d'igualar o superar la velocitat a la qual les cèl·lules que creixen consumeixen l'oxigen. Les mesures de K_La proporcionen informació important sobre aquest procés de transferència. Aquestes determinacions ajuden a garantir que les condicions de processament són les adients per tal garantir que el subministrament d'oxigen es l'adequat per a la proliferació de les cèl·lules¹⁸¹.

Donat que el procés de creixement i d'expressió de TGZ15 en *E. coli* es aeròbic i la solubilitat de l'oxigen en el medi de cultiu es limitada, el transport d'oxigen esdevé un dels problemes fonamentals d'aquest procés si es vol portar a altes concentracions de biomassa i per tant alta productivitat.

El transport gas-líquid depèn de la solubilitat de l'oxigen i del coeficient K_La . Aquest últim es funció de diferents factors, geometria del reactor, tipus d'agitador, composició del medi, velocitat d'agitació i cabal de gas.

És molt important disposar de correlacions dels valors del coeficient K_La en funció del paràmetre que més influeix, és a dir, la velocitat d'agitació.

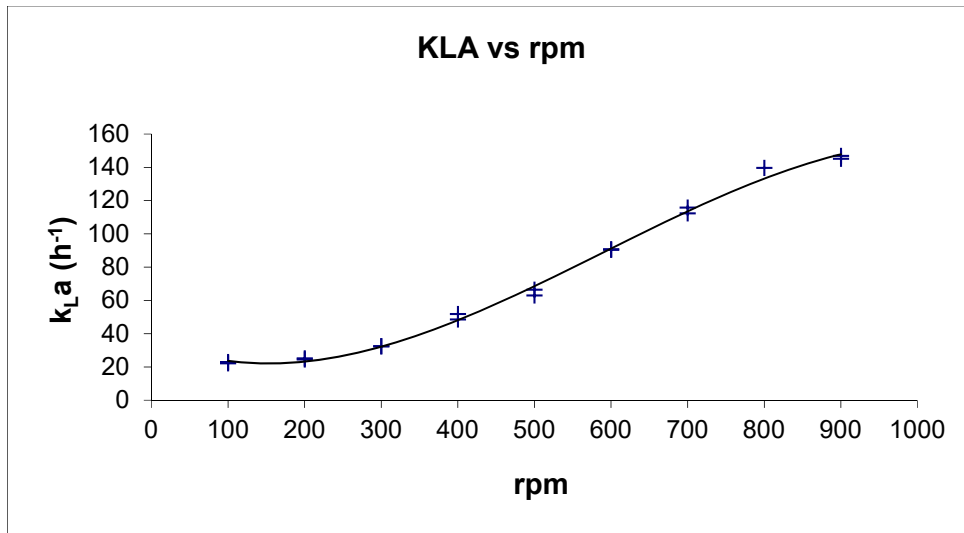
Per mesurar el coeficient K_{La} d'un reactor existeixen diferents mètodes, en el present treball es va utilitzar el del "gas out - gas in" que està descrit a l'apartat 3.1.9.5.2. El mètode "gas out - gas in" pot determinar directament el coeficient de transferència de massa volumètrica en un sistema de bioreactor i proporcionar estimacions de la taxa de consum volumètrica d'oxigen microbià i la concentració mitjana de saturació d'oxigen a la interfase gas-líquid¹⁸¹

Ajustant, mitjançant un mètode no lineal, l'Equació 44 als valors experimentals s'obté el coeficient K_{La} del reactor per cada velocitat d'agitació (Taula 26).

Taula 26 K_{La} respecte la velocitat d'agitació per al bioreactor Applikon de 7L.

rpm	tau		$K_{La}(h^{-1})$	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
0	135.77	144.21	24.96	26.52
100	162.41	157.28	22.89	22.17
200	143.63	147.58	25.06	24.39
300	111.48	110.96	32.29	32.44
400	74.27	69.49	48.47	51.80
500	54.22	57.23	66.40	62.90
600	39.84	39.68	90.36	90.73
700	31.11	32.06	115.71	112.28
800	25.79	-	139.61	-
900	24.80	24.51	145.16	146.88

Com es pot observar en la Taula 2.3., tal i com s'esperava, el coeficient K_{La} del bioreactor augmenta quan la velocitat d'agitació també augmenta (Gràfica 16). Totes les experiències es van repetir com a mínim dues vegades.



Gràfica 6 Representació del coeficient de transport d'oxigen respecte a la velocitat d'agitació pel reactor Applikon de 7L.

Finalment es va ajustar un polinomi de grau 3 a les dades de la Gràfica 6 (Equació 46).

$$y = -4E-07 \cdot x^3 + 0.0007 \cdot x^2 - 0.1894 \cdot x + 35,874$$

Equació 46.

4.1.2.2.2 Estudi de sensibilitat del model

Aquest estudi es va realitzar per tal de facilitar la planificació dels experiments necessaris per avaluar els paràmetres del model, tenint més cura d'aquells paràmetres amb una major sensibilitat o dissenyant experiments específics per tal de facilitar la mesura d'aquells d'una menor sensibilitat.

Per tal de dur a terme aquest estudi, es va modificar el valor de cadascun dels paràmetres, per sobre i per sota del seu valor, per veure com afectava al comportament del sistema. Es van representar les variables corresponents a les 5 equacions diferencials de l'apartat 3.1.9.5.1 (és a dir: concentracions de biomassa, de glucosa, d'acetat, d'oxigen i velocitat de producció/consum d'acetat) i la velocitat específica de creixement (μ).

Per avaluar la sensibilitat del model respecte de cada variable, es va quantificar un punt en comú en cada una de les gràfiques para cada una de les variables (veure la Taula 27).

Taula 27 Sensibilitat del model respecte dels paràmetres.

Paràmetre	Variació	Sensibilitat	Paràmetre	Variació	Sensibilitat
C_O^*	Oxigen	3.4	$Y_{A/S}$	Acetat	1.2
K_A	No influeix			Oxigen	0.6
k_{La}	Oxigen	2.4		Creixement	0.05
K_{IS}	Acetat	0.6	$Y_{O/A}$	No influeix	
K_{IO}	Acetat	-0.8	$Y_{O/S}$	Acetat	8.4
	Oxigen	-1.0		Biomassa	0.9
K_S	No influeix			Glucosa	0.9
$q_{A_{c,max}}$	Acetat	-0.1		Oxigen	5.8
q_m	Acetat	0.5		Creixement	1.0
	Oxigen	0.4	$Y_{X/A}$	No influeix	
	Creixement	0.1	$Y_{X/S,of}$	Acetat	-0.3
$q_{O_{max}}$	Acetat	-8.3	$Y_{X/S,ox}$	Acetat	-10.0
	Biomassa	0.7		Biomassa	2.2
	Glucosa	0.9		Glucosa	2.1
	Oxigen	-8.3		Oxigen	-8.1
	Creixement	-1.0		Creixement	-2.1
$q_{S_{max}}$	Acetat	7,9			
	Biomassa	-0.9			
	Glucosa	-0.1			
	Oxigen	5.6			
	Creixement	-0.1			

Com es pot observar tant a la Taula 27 com a les gràfiques de l'annex 5, el paràmetre que afecta més al model és el rendiment de glucosa a biomassa per via oxidativa $Y_{X/S,ox}$. Aquest valor fa variar el consum de glucosa, la formació de biomassa, la producció/consum d'acetat, la velocitat de consum d'oxigen i el coeficient de creixement. Aquest resultat és molt previsible degut a que la ruta metabòlica principal és la via oxidativa.

Aquest no és l'únic paràmetre que influeix a tot el model, com es pot observar en l'annex, $q_{O_{max}}$, $q_{S_{max}}$ i $Y_{O/S}$ també influeixen molt en els resultats del model obtingut.

Pel contrari, els paràmetres K_S , K_A , $Y_{O/A}$ i $Y_{X/A}$, no van tenir gairebé cap influència a l'hora d'executar el model, és a dir, tenen una sensibilitat molt petita. Aquest

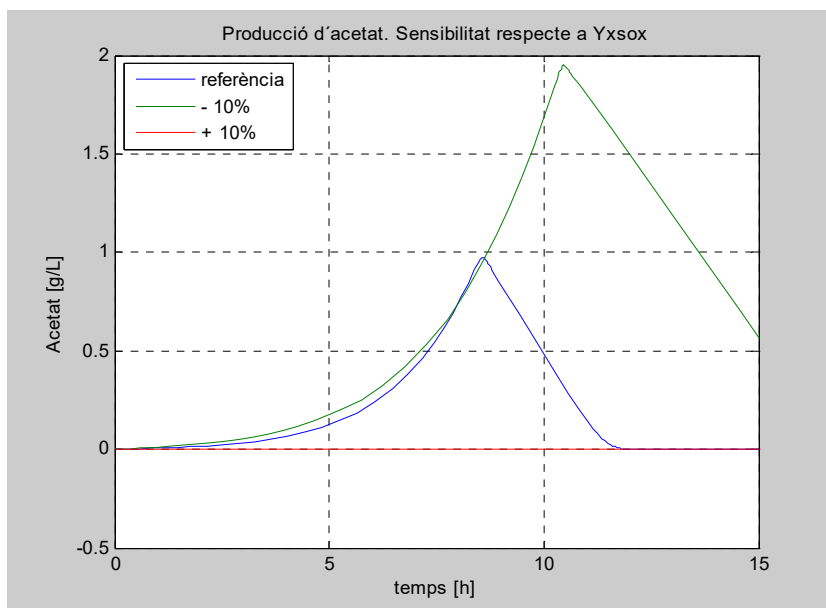
resultat també és perfectament previsible, tenint en compte que, en el model de Monod, la influència del paràmetre K_S és molt petita, en conseqüència la influència de K_A encara serà menor.

Així doncs entre els paràmetres que tenen una gran sensibilitat i les que gairebé no en tenen gens, hi ha tot un seguit de paràmetres que afecten amb un grau d'intensitat variable. $Y_{A/S}$, $Y_{X/S,of}$, $K_{i,S}$ i el $q_{A_c,max}$ només afecten a la concentració d'acetat al llarg del temps, encara que el temps del màxim és el mateix.

Per altra banda, els valors del coeficient K_{La} i C_O^* , relacionats amb la transferència d'oxigen, només afectaran a la concentració d'oxigen. El primer només afecta en la concentració mínima d'oxigen en el bioreactor, la qual es troba sempre en el mateix temps, en canvi el C_O^* (sensibilitat = 3.4) afecta a la concentració en tot moment. Degut a que el model considera que el transport d'oxigen màxim en el medi és un valor constant al que no s'arriba, això implica que no es vegin afectats ni la producció de biomassa ni el consum de glucosa.

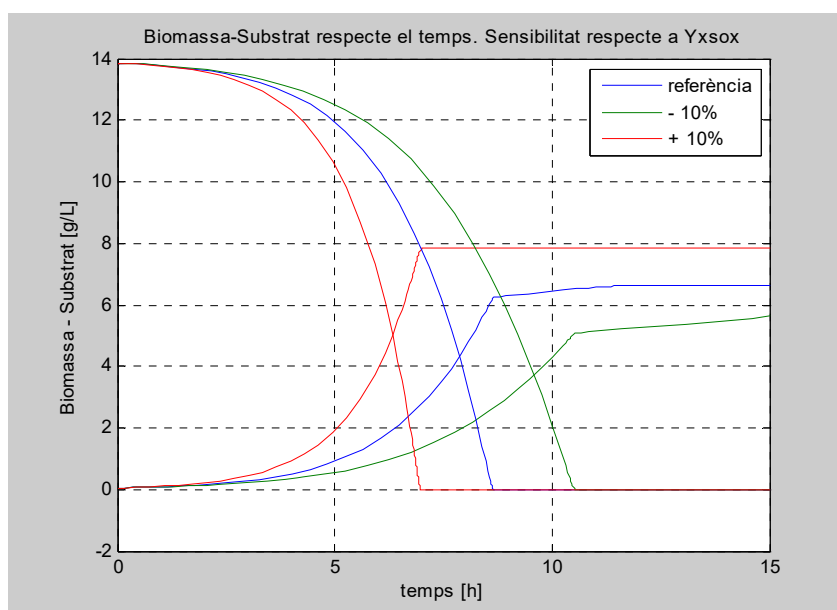
Finalment els paràmetres $K_{i,O}$ i qm , afecten a ambdues propietats, és a dir a la concentració d'acetat i a la concentració d'oxigen.

Seguidament es mostra un exemple de la influència que pot arribar a tenir la variació de $\pm 10\%$ en el rendiment de glucosa a biomassa, $Y_{X/S,ox}$. La primera gràfica, Gràfica 7, mostra la concentració de l'acetat al llarg del temps. Com es pot observar amb una disminució del 10%, la concentració màxima d'acetat augmenta significativament, el contrari passa si es tracta d'un increment del 10%. També es produeix un desplaçament del pic de concentració cap a la dreta al disminuir el valor del paràmetre.



Gràfica 7 Concentració d'acetat ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) variant el valor del paràmetre $Y_{X/S,ox}$.

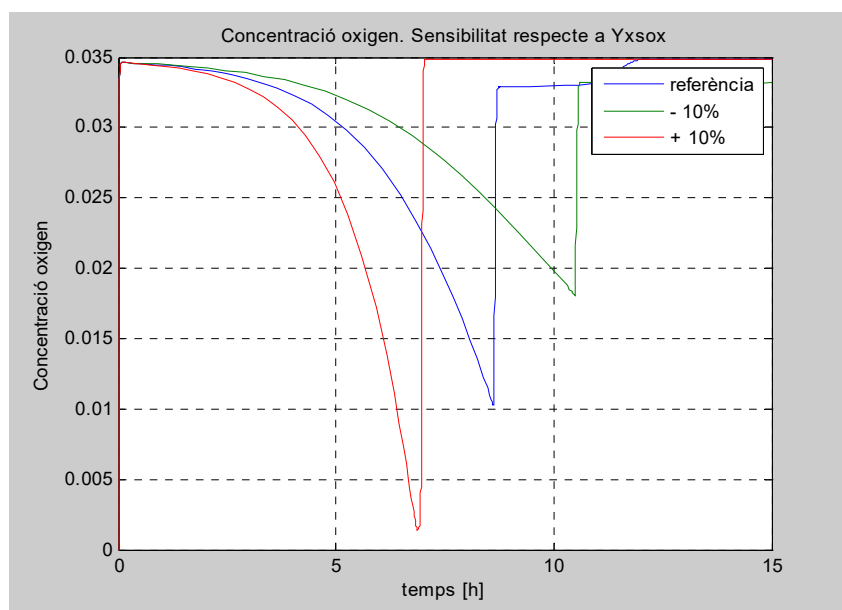
Observant la influència del paràmetre anterior a la concentració de biomassa i glucosa (Gràfica 8), es pot comprovar que la glucosa es consumeix més ràpidament quan el paràmetre $Y_{X/S,ox}$ s'incrementa en un 10 %, el que correspon amb un creixement més ràpid. També es pot apreciar que la quantitat final de biomassa augmenta al augmentar el valor del paràmetre. Per aquesta raó quan s'acaba el creixement exponencial de biomassa, depenent de la concentració d'acetat en el medi, finalitzarà pràcticament el creixement o en canvi hi haurà una etapa (no exponencial) de creixement.



Gràfica 8 Concentració de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i de substrat ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) variant el paràmetre $Y_{X/S,ox}$.

La Gràfica 9, correspon a la concentració d'oxigen en el medi al llarg del temps. Com es pot observar a l'augmentar el valor de $Y_{X/S,ox}$, la velocitat de consum de l'oxigen augmenta i el valor del mínim de la concentració d'oxigen dissolt disminueix considerablement (línia vermella de la Gràfica 9), i el temps del mínim es desplaça cap a la esquerra.

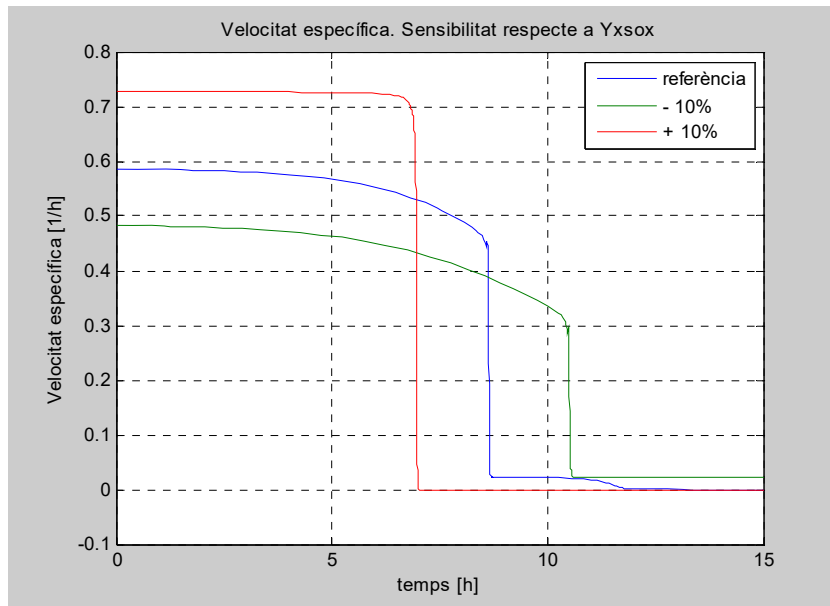
Finalment es pot observar en la mateixa Gràfica 9 que, un cop acabada la fase principal de producció de biomassa a partir de la glucosa, tot i que la concentració d'oxigen en el medi hauria d'augmentar fins a la concentració inicial (és a dir a la concentració d'oxigen de l'aire saturació), apareix un esglaó abans d'arribar a aquesta concentració. Això és degut al consum de l'acetat que es troba en el medi. Com s'ha comentat anteriorment al disminuir el valor de $Y_{X/S,ox}$, augmentava la concentració d'acetat, per tant apareix un esglaó de més gran durada.



Gràfica 9 Concentració d'oxigen ($g \cdot L^{-1}$) al llarg del temps (h) variant la variable $Y_{X/S,ox}$.

Finalment, la velocitat específica de creixement (μ) al llarg del temps (Gràfica 10), presenta que l'augment del valor de $Y_{X/S,ox}$ fa que el valor de μ augmenti i el creixement disminueix dràsticament a les 7 hores i a partir d'aquest moment para de créixer. En canvi si la variació en $Y_{X/S,ox}$ és un 10% de disminució, es pot comprovar que el valor inicial de la velocitat específica de creixement és menor, per tant, el creixement dura més i no disminueix dràsticament fins més enllà de les 10 hores. A partir d'aquell moment continua creixent, tot i que ho fa amb un

valor molt petit, aquest últim tram de creixement correspon a la assimilació de l'acetat produït, en concordança amb els altres gràfics.



Gràfica 10 Velocitat específica de creixement (μ) al llarg del temps (h) variant la variable YX/S,ox.

4.1.2.2.3 Identificació i aplicació del model a *E. coli* BL21 (DE3)

Per tal d'obtenir els paràmetres del model per a *Escherichia coli* BL21 es van utilitzar els resultats dels experiments descrits a l'apartat 4.1.2.1. Aquests experiments es van dur a terme amb diferents fonts de carboni (glucosa, fructosa i glicerina). Totes les simulacions i l'estudi de sensibilitat es van realitzar amb els paràmetres que es poden veure en la Taula 27 i els resultats gràfics en l'annex 5. A la Taula 28 es mostra un resum d'alguns dels experiments que es van dur a terme per a la identificació del model programat.

Taula 28 Resultats de les diferents experiències.

	V_{TOTAL} [L]	Font de carboni	[] FONT CAR. [g/L]	[] _{max} ACETAT [g/L]	[] _{max} BIOMASSA [g/L]
Exp 1	4	Glucosa	10.74	0.31	4.55
Exp 2	4	Glucosa	10.64	0.10	4.52
Exp 3	4	Glucosa	12.75	0.38	5.21
Exp 4	4	Fructosa	11.69	0.43	4.49
Exp 5	4	Glicerina	10.67	0.18	4.27

Les dades experimentals emprades pel procés d'identificació van ser: la concentració de la font de carboni, la concentració de l'acetat i la concentració de la biomassa produïda.

Es presenten només els resultats mesurats per l'experiment 1 com a exemple de la resta d'experiments.

En la Taula 29 es mostra un resum de les dades extretes de les diferents mostres del reactor de l'experiment 1.

Taula 29 Dades extretes de les mostres de l'experiència 1.

	Temps (h)	DCW (g/L)	OD ₆₀₀	Glucosa (g/L)	Acetat (g/L)
Mostra 1	0.0	0.1	0.195	10.74	0.000
Mostra 2	0.48	0.15	0.286	9.54	0.000
Mostra 3	0.98	0.20	0.378	10.00	0.000
Mostra 4	1.48	0.40	0.533	9.70	0.000
Mostra 5	1.98	0.40	0.725	9.92	0.000
Mostra 6	2.48	0.50	1.004	9.44	0.000
Mostra 7	3.15	0.80	1.82	8.97	0.005
Mostra 8	3.57	0.85	2.33	8.51	0.013
Mostra 9	4.07	1.30	3.33	7.80	0.010
Mostra 10	4.57	1.70	4.84	6.81	0.011
Mostra 11	5.07	2.25	6.64	6.93	0.027
Mostra 12	5.57	3.1	8.57	2.92	0.021
Mostra 13	5.83	3.60	10.12	1.97	0.031
Mostra 14	6.17	4.45	14.01	0.21	0.009
Mostra 15	6.57	4.55	13.8	0.08	0.000
Mostra 16	7.23	4.40	13.5	0.00	0.000

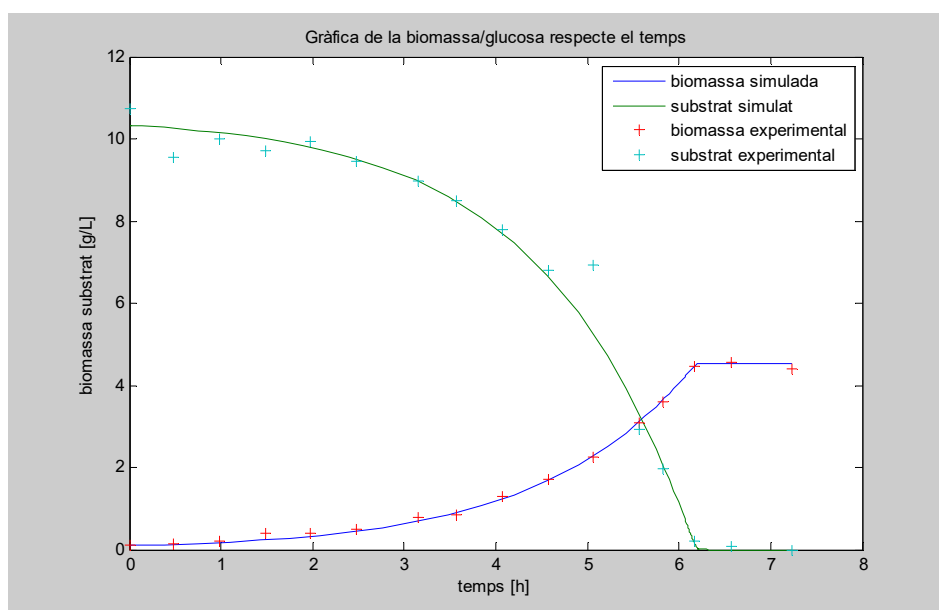
Un cop es va disposar dels valors dels diferents paràmetres de les mostres dels diversos experiments, ja es podia comparar aquests resultats amb els de la simulació.

El programa d'identificació, avalua primer els resultats obtinguts per simulació segons uns paràmetres inicials i, segons el valor del criteri d'error escollit i el procediment d'optimització, va variant els valors del paràmetres fins que el criteri assoleix el valor òptim. Per cada simulació s'ha d'introduir uns certs valors inicials

i paràmetres que són identificatius de l'experiment que es vol simular. El procediment esta descrit a l'apartat 3.1.9.5.3.

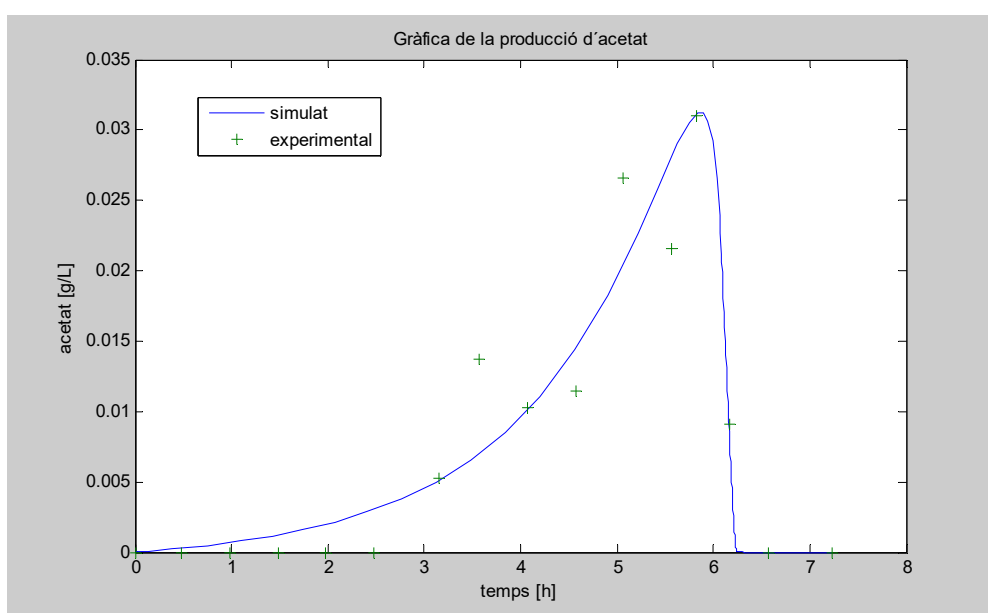
Així doncs, per simular l'experiment 1, es va haver d'especificar els valors inicials de glucosa, acetat i biomassa. Alhora s'ha d'introduir el valor del K_La i de manteniment (q_m). De la mateixa manera, s'han de conèixer i introduir en la simulació els diferents rendiments de glucosa a biomassa i d'acetat a biomassa. Un cop introduïts tots aquests paràmetres es pot procedir amb la simulació. S'haurà d'escollir entre els dos models programats, el primer model¹⁶³ o el segon model¹⁶⁴. Seguidament s'ha d'escollir el tipus de procés que es vol dur a terme (procés Batch o Fed-Batch). Finalment només cal seleccionar les gràfiques de la simulació que es vol representar.

Com es pot observar (Gràfica 11), tant la simulació de la concentració de biomassa com la de la concentració de glucosa es van ajustar als punts experimentals de l'experiment 1. Com és normal hi ha alguns valors experimentals que es van desviar de la tendència dels altres punts, però tot i així es van deixar a la gràfica per mostrar que el model programat és robust. Tal com s'esperava la quantitat de biomassa produïda va correspondre gairebé al 50 per cent en pes de la quantitat inicial de glucosa. Hi ha un punt en la gràfica en que la concentració de biomassa continua augmentant tot i que la concentració de glucosa és 0 g/L. Això és degut al consum de l'acetat produït, tal com es pot observar en la gràfica del acetat (Gràfica 12).



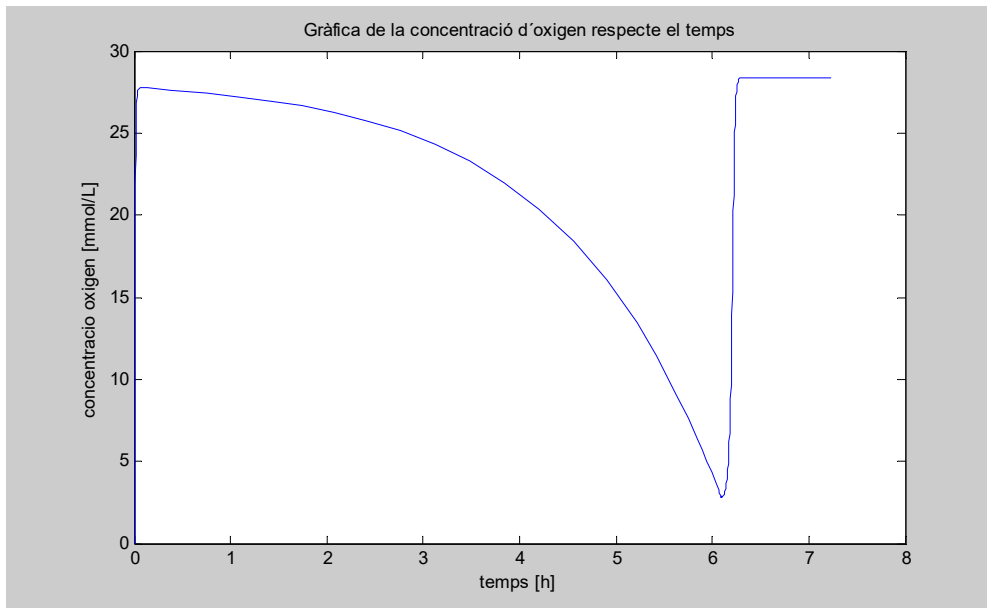
Gràfica 11 Evolució de les concentracions de biomassa i substrat per a l'experiment 1.

La Gràfica 12 mostra la simulació de la concentració d'acetat al llarg del temps per l'experiment 1 conjuntament amb els valors experimentals. En aquest cas a primera vista es podria dir que l'ajust de la simulació a les dades experimentals no va ser gaire bo, però s'ha de tenir en compte que els valors de concentració d'acetat són molt petits i, per tant, més subjectes a error. Per aquesta raó, tot i tenint uns valors experimentals que contenen molt soroll, l'ajust simulat és molt representatiu del procés que té lloc en el bioreactor. Així doncs es pot dir que la simulació s'ajusta acceptablement als valors experimentals.



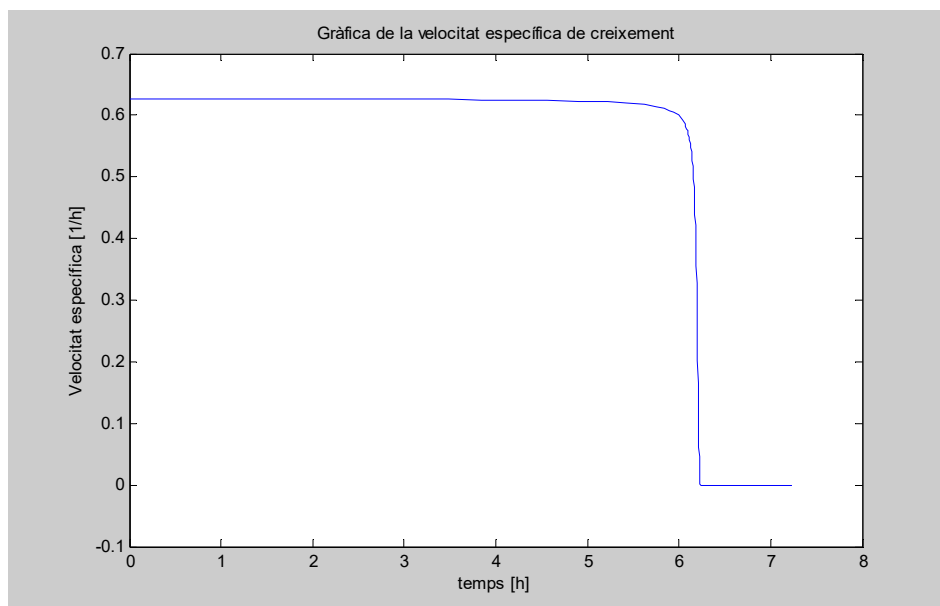
Gràfica 12 Evolució de la concentració d'acetat per l'experiment 1.

La concentració d'oxigen al llarg del temps (Gràfica 13) correspon a les necessitats del procés. Com que per simular els experiments el model programat utilitza un coeficient de $K_L a$ constant, la corba simulada no és representativa dels valors experimentals.

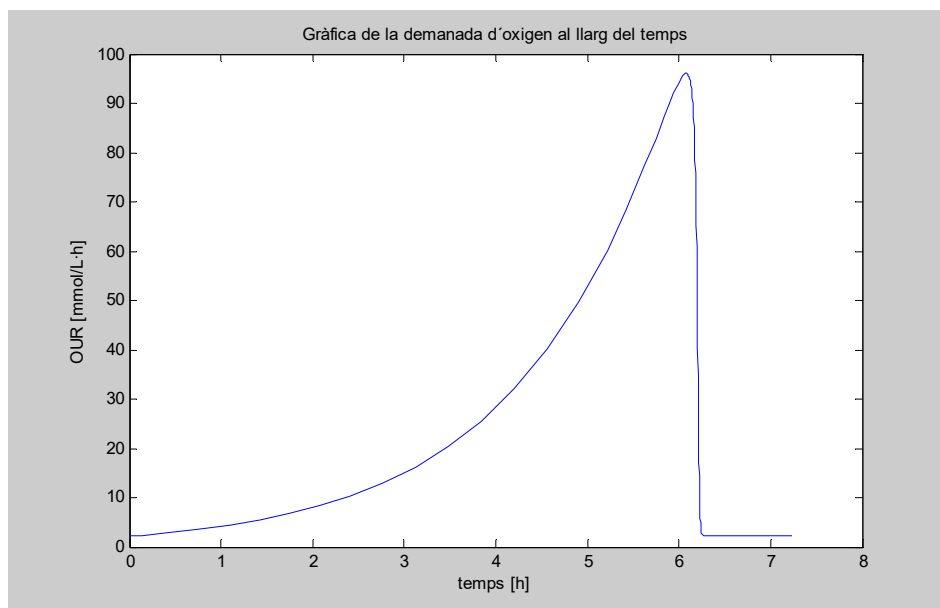


Gràfica 13 Concentració d'oxigen per l'experiment 1.

Es presenten les corbes corresponents a la velocitat específica de creixement (Gràfica 14) i la demanda d'oxigen (OUR) (Gràfica 15). Donada la petita quantitat d'acetat obtinguda, una concentració màxima de 0,031 g/L d'acetat, el seu consum no es pot apreciar en cap de les dues corbes.



Gràfica 14 Velocitat específica de creixement per l'experiment 1.



Gràfica 15 Demanda d'oxigen per l'experiment 1.

Els valors obtinguts per cadascun dels paràmetres es mostren a la Taula 30. S'ha de tenir en compte que només s'han calculat els paràmetres que depenen de valors experimentals de forma directa o indirecta, perquè hi han paràmetres del model que són constants estequiomètriques i per tant el seu valor no s'ha d'ajustar.

Taula 30 Paràmetres per als diferents creixements.

	$Y_{X/S,ox}$ (g _X /g _S)	$Y_{X/S,of}$ (g _X /g _S)	$Y_{X/A}$ (g _X /g _A)	K_a (g _A /L)	K_s (g _S /L)	$K_{i/o}$ (g _O /L)	$K_{i/s}$ (g _S /L)
Exp 1	0.437	0.473	7.11e-05	1.12e-03	0.054	2.241	11.079
Exp 2	0.402	0.530	1.33e-05	1.25e-09	7.29e-07	1.814	11.738
Exp 3	0.388	0.561	1.33e-05	1.38e-09	8.35e-07	1.742	12.41
Exp 4	0.334	0.445	6.93e-05	1.23e-10	7.11e-07	0.570	170
Exp 5	0.354	0.555	1.35e-05	1.38e-09	8.10e-07	1.758	12.297
	$V_{ac,max}$ (g _A /(g _X ·h))	V_m (g _S /(g _X ·h))	V_{Omax} (g _O /(g _X ·h))	V_{Smax} (g _S /(g _X ·h))	S_0 (g _S /L)	X_0 (g _X /L)	
Exp 1	0.038	0.028	0.728	1.467	10.336	0.095	
Exp 2	0.034	0.028	0.996	1.532	10.699	0.251	
Exp 3	0.076	0.026	0.894	1.287	13.011	0.218	
Exp 4	0.063	0.057	0.661	1.756	12.077	0.146	
Exp 5	0.046	0.026	0.914	1.272	11.277	0.216	

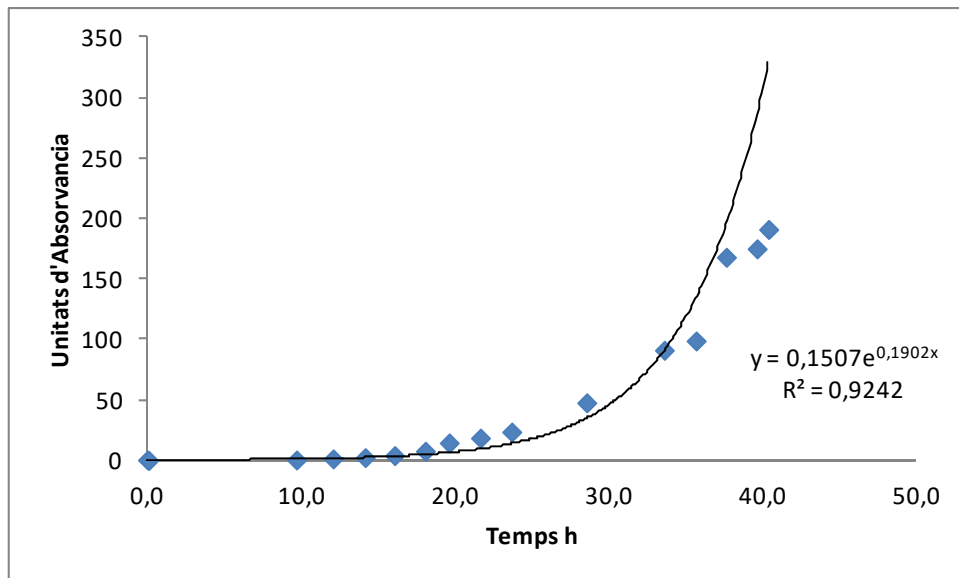
Els paràmetres relacionats directament amb la concentració d'acetat, com el rendiment, $Y_{X/A}$, i la velocitat específica màxima, $V_{ac,max}$, tenen una gran variabilitat degut al poc pes de la concentració d'acetat.

4.1.2.3 *Procés fed-batch*

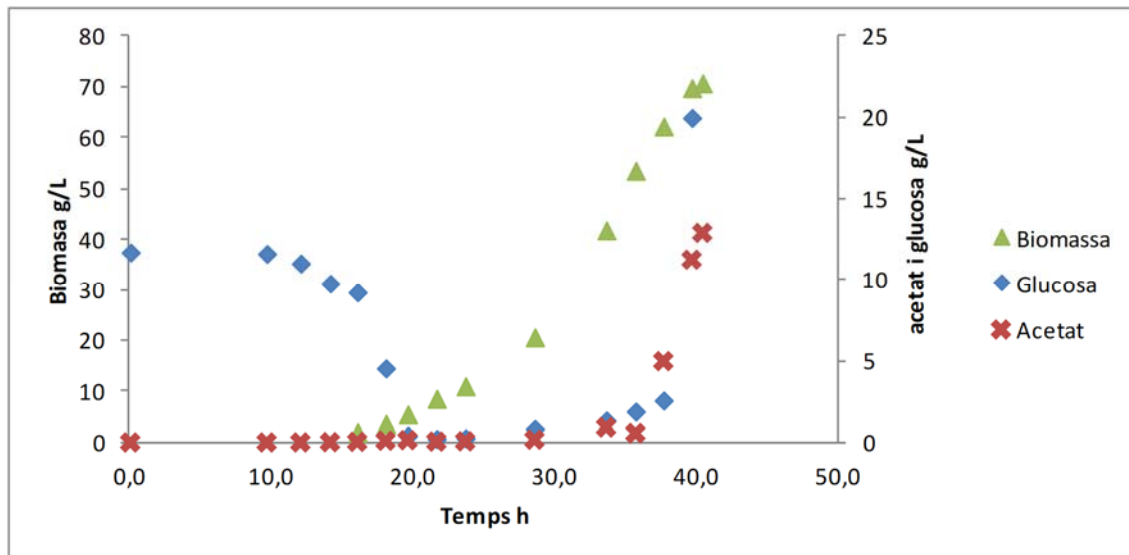
A partir dels resultats obtinguts en mode batch i les condicions obtingudes en la simulació, es van realitzar cultius d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode fed-batch seguint el procediment descrit a la secció 3.1.9.3. L'alimentació de glucosa es va realitzar per previsió i amb cabal exponencial, amb l'objectiu d'obtenir una velocitat específica de creixement de $0,2 \text{ h}^{-1}$.

La composició del medi de cultiu inicial que es va utilitzar en el reactor (medi Biotiqs coli) es la que figura a la Taula 20 i el medi d'alimentació (medi Biotiqs coli F) utilitzat es el que figura a la Taula 23 (columna de la glucosa).

A continuació, a la Gràfica 16 es mostren els resultats representatius d'un cultiu seguint aquesta metodologia.



Gràfica 16 Evolució de la DO₆₀₀ en el temps d'un cultiu d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode fed-batch.



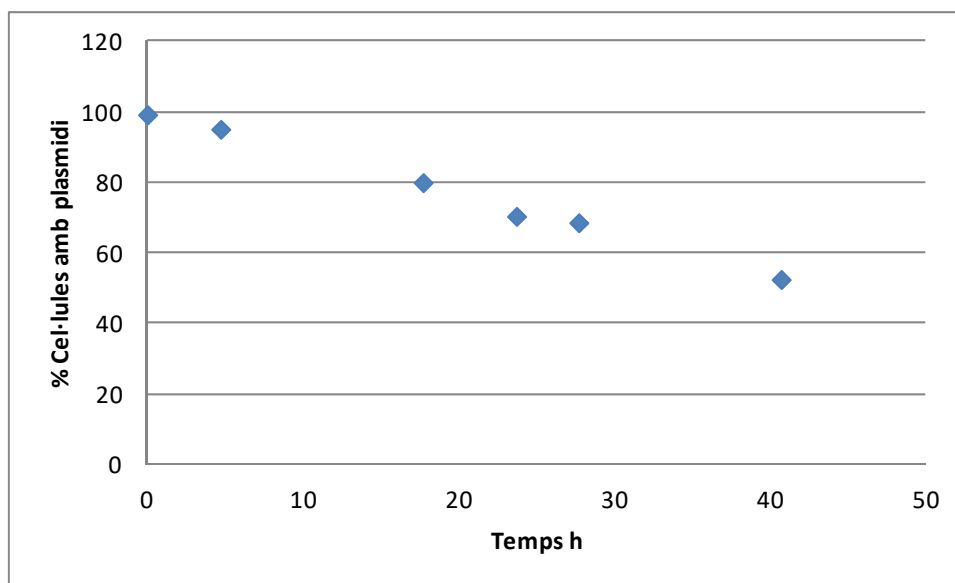
Gràfica 17 Evolució del consum de glucosa i producció de biomassa i acetat en un cultiu d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) en fed-batch.

Com es pot veure a la Gràfica 16, el cultiu progressa seguint el patró marcat fins aproximadament les 35 hores de cultiu. A partir d'aquest punt s'observa com la velocitat específica de creixement disminueix, al mateix temps, tal i com es pot apreciar a la Gràfica 17, augmenta la concentració d'acetat i s'acumula la glucosa. Això provoca que a partir de les 40 hores la concentració de biomassa del cultiu s'estanqui degut a la inhibició del creixement per l'alta concentració d'acetat (>10g/L) present en el medi. En base a aquests experiments es determina que mitjançant l'estratègia d'alimentació per previsió i l'equip utilitzat, es possible obtenir una biomassa d'entre 65 i 70 g/L en condicions controlades. Tal i com està àmpliament descrit a la bibliografia^{99,100}, per tal d'aconseguir arribar a densitats cel·lulars més elevades s'hauria de canviar l'estratègia d'alimentació per previsió per una amb retroalimentació, que s'adaptés a l'estat del cultiu en cada moment (variació de la concentració de nutrients, creació de zones amb diferent concentració d'oxigen, acumulació de font de carboni ...) o que eliminés l'acetat que s'acumula al medi.

4.1.2.4 *Estabilitat plasmídica*

Els inconvenients de la utilització de antibiòtic són la pèrdua de la pressió selectiva, com a resultat de la degradació dels antibiòtics, la inactivació, o l'excreció d'enzims desintoxicants periplàsmics (per exemple, β -lactamasa) en el

medi de cultiu, i la contaminació del producte o de la biomassa per part dels antibiòtics, que pot ser inacceptable des del punt de vista mèdic o reglamentari. A més a més, aquest mètode no és aplicable a escala industrial degut als costos i els problemes ambientals⁶⁷. Per tots aquests motius, es va decidir treballar sense antibiòtic selectiu, es va estimar necessari mesurar l'estabilitat plasmídica de les cèl·lules d'*E. coli* transformades amb el gen de la proteïna TGZ15, clonada en el plasmidi pEt28. Es van prendre mostres del cultiu al llarg del temps en experiments en mode fed-batch i es van analitzar segons el procediment 3.1.9.1. Seguidament a la Gràfica 18 es presenten els resultats obtinguts.



Gràfica 18 Estabilitat plasmídica d'un cultiu d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) en mode fed-batch al llarg del temps.

A la Gràfica 18 s'observa que la fracció de cèl·lules que conserven almenys un dels plasmidis, i per tant, poden expressar la proteïna TGZ15, va disminuint al llarg del temps. Això es degut a la inestabilitat plasmídica inherent a la utilització de plasmidis i a que no hi havia cap tipus de pressió selectiva en el medi de cultiu que obligues a les cèl·lules a conservar els plasmidis.

A partir de les 40h, aproximadament, la meitat de les cèl·lules presents en el cultiu havien perdut el plasmidi i per tant no eren útils des del punt de vista de producció. Aquest fet va provocar la necessitat d'establir quin havia de ser el moment òptim per iniciar la producció de la proteïna TGZ15. A la vista dels resultats de producció de biomassa (Gràfica 17) i l'estabilitat dels plasmidis, va

semblar adient realitzar la inducció entre les 35 i 40 hores de fermentació ja que a partir d'aquest punt la producció de biomassa s'estancava i la tendència de pèrdua de plasmidis es mantenia.

4.1.3 Expressió de la proteïna TGZ15 en matràs d'Erlenmeyer

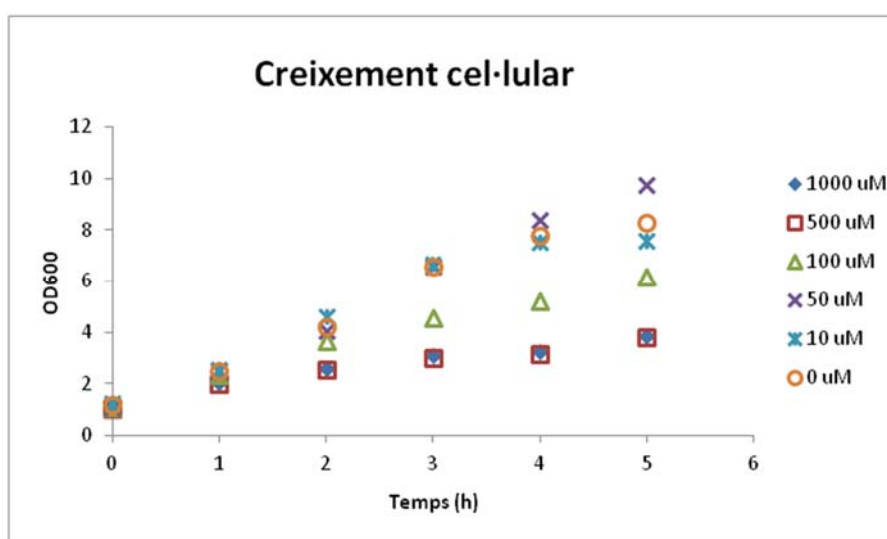
4.1.3.1 Inducció amb IPTG

Es conegut que la concentració d'inductor present en el medi regula l'expressió de la proteïna recombinant¹⁸², per tant, una concentració elevada pot afavorir una velocitat d'expressió més alta. En alguns casos, pot ser que aquesta alta velocitat d'expressió provoqui que la proteïna no tingui temps suficient per plegar-se correctament, i que s'acumuli en forma de cossos d'inclusió¹⁸².

Per tal de valorar l'efecte de la concentració d'inductor IPTG, es van realitzar una sèrie d'assajos en que es van utilitzar diverses concentracions d'inductor.

Les concentracions d'IPTG provades van ser de 10, 50, 100, 500 i 1000 μM (concentracions proposades al manual Novagen Pet System manual 10th edition pag 33).

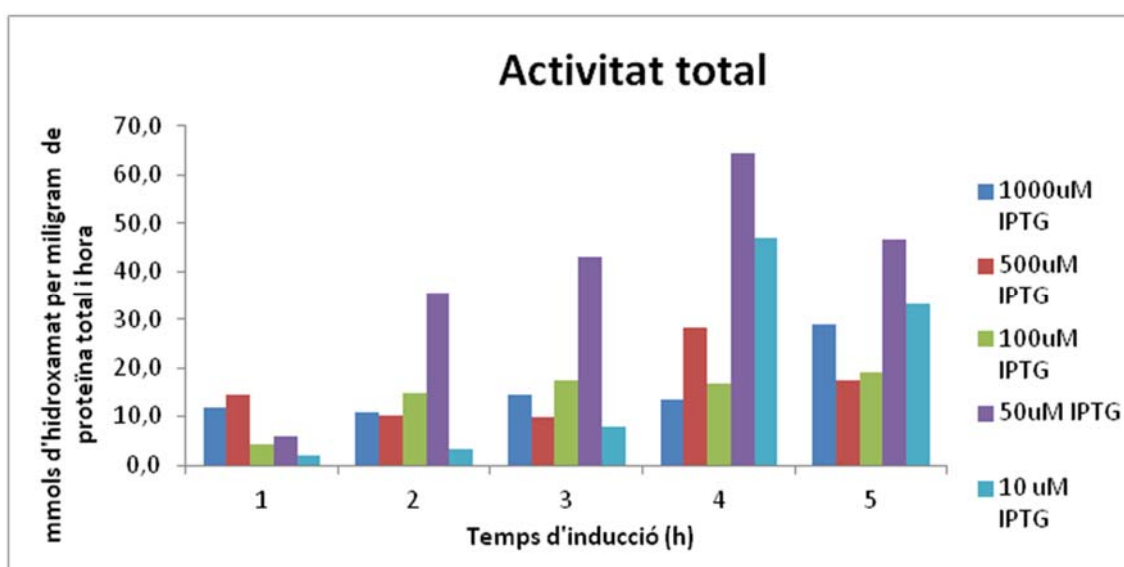
En aquest assaig es va provar tant l'efecte de la concentració d'IPTG sobre l'expressió de proteïna TGZ15 soluble e insoluble com el seu impacte en la velocitat de creixement cel·lular.



Gràfica 19 Evolució del creixement cel·lular d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) TGZ15 en el temps en funció de la concentració d'inductor.

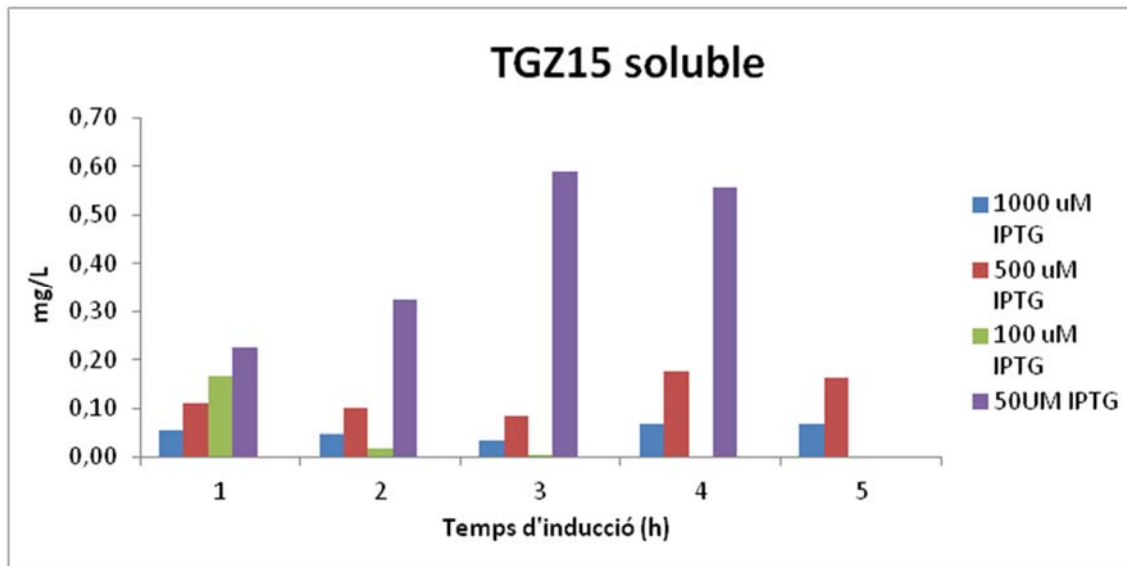
A la Gràfica 19 es pot veure com les concentracions d'IPTG superiors a 50 μM van afectar negativament el creixement del cultiu, provocant que la velocitat específica de creixement baixes a aproximadament a la meitat. Això va ser degut probablement a que la inducció amb IPTG provoca que la cèl·lula inverteixi molts recursos en l'expressió de la proteïna i no tingui prou energia disponible per a poder créixer amb normalitat. En publicacions recents s'ha demostrat que l'IPTG no és un inductor innocu i que exacerba la toxicitat del substrat haloalcali i causa danys apreciables per a l'hoste *E. coli* BL21 (DE3), que ja està sotmès a una càrrega metabòlica extra a causa del seu contingut de plasmidis que porten els gens de la ruta metabòlica sintètica¹⁸³.

Els resultats indiquen que la concentració màxima d'IPTG no inhibidora del creixement va ser de 110 $\mu\text{mol IPTG/g}$ biomassa seca. Aquest resultat es molt semblant a l'obtingut per J. Pinsach i col·laboradors¹⁸⁴ utilitzant *E. coli* M15 i el promotor T5, en que la concentració no inhibidora a la que van arribar es de 153 $\mu\text{mol IPTG/g}$ biomassa seca. També han obtingut resultats semblants Oluwafemi A. Olaofe i col·laboradors¹⁸⁵, que utilitzant *E. coli* BL21 (DE3) i el promotor T7 van arribar a una concentració d'IPTG no inhibidora de 200 $\mu\text{mol IPTG/g}$ biomassa seca.



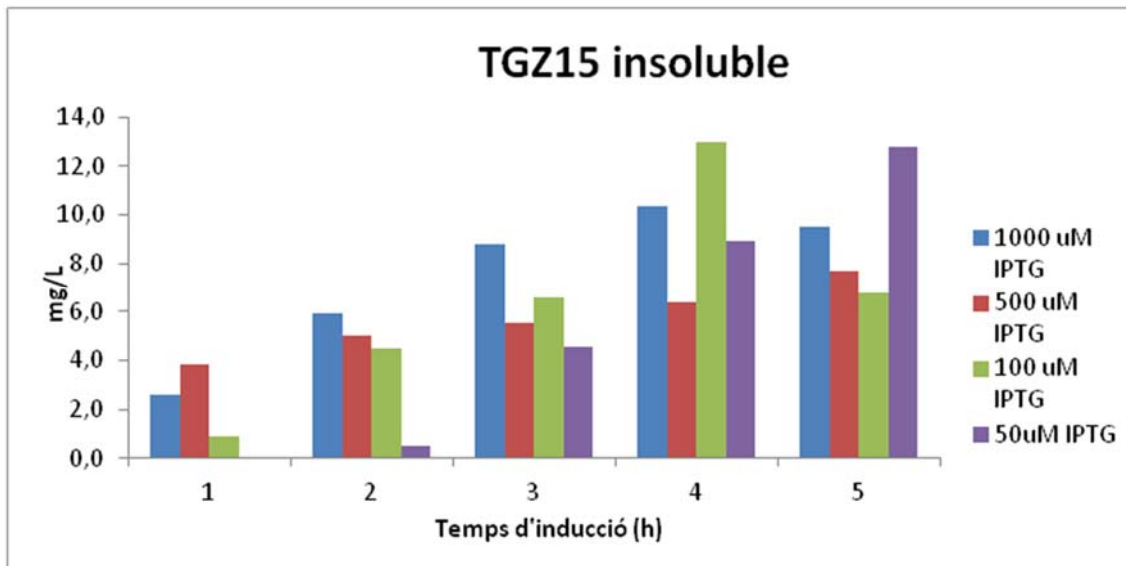
Gràfica 20 Evolució de l'activitat TGasa del cultiu segons el temps d'inducció i la concentració d'IPTG.

A la Gràfica 20 es pot veure que les mostres que presentaren més activitat van ser les induïdes amb una concentració d'IPTG de 50 μ M seguides de les que havien estat induïdes amb una concentració de 10 μ M. En ambdós casos, l'activitat va augmentar fins a les 4 hores d'inducció i després va baixar lleugerament. La resta de mostres van mostrar una activitat inicial superior però que va augmenta molt poc en les successives mostres.



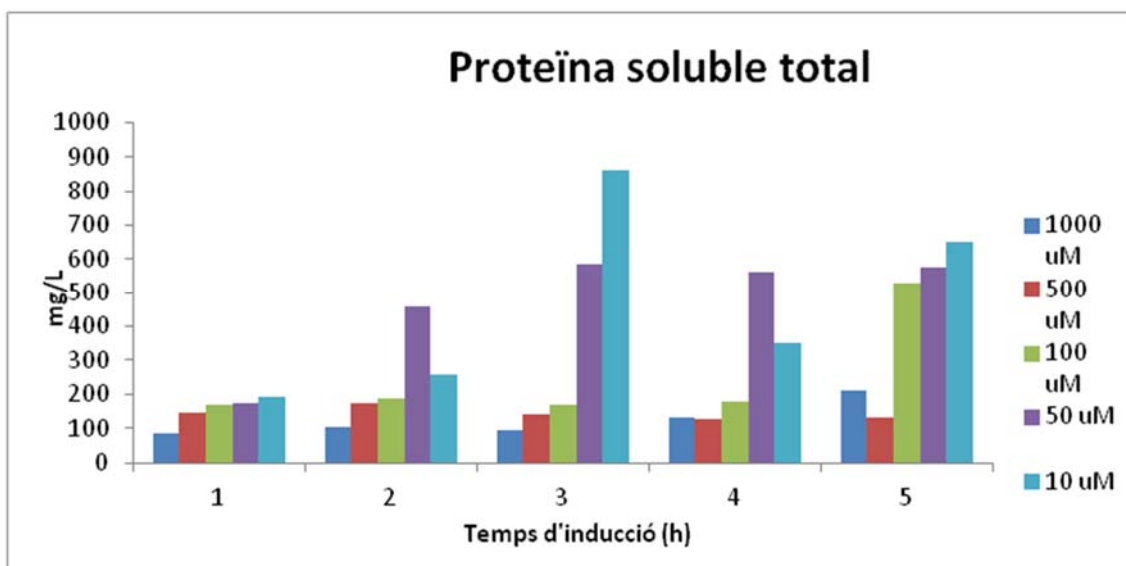
Gràfica 21 Evolució de la producció de TGZ15 soluble, mesurada per western blot, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.

A la Gràfica 21 es pot apreciar que hi va haver un increment de la producció de TGZ15 soluble en el temps per a totes les mostres, presentant-se el màxim de concentració de la proteïna entre les 3 i 5 hores. Les mostres en que es va detectar una concentració més gran de TGZ15 van ser les induïdes amb una concentració de 50 μ M seguides de les de 100 μ M. No va ser possible detectar TGZ15 soluble en els mostres induïdes amb IPTG 10 μ M.



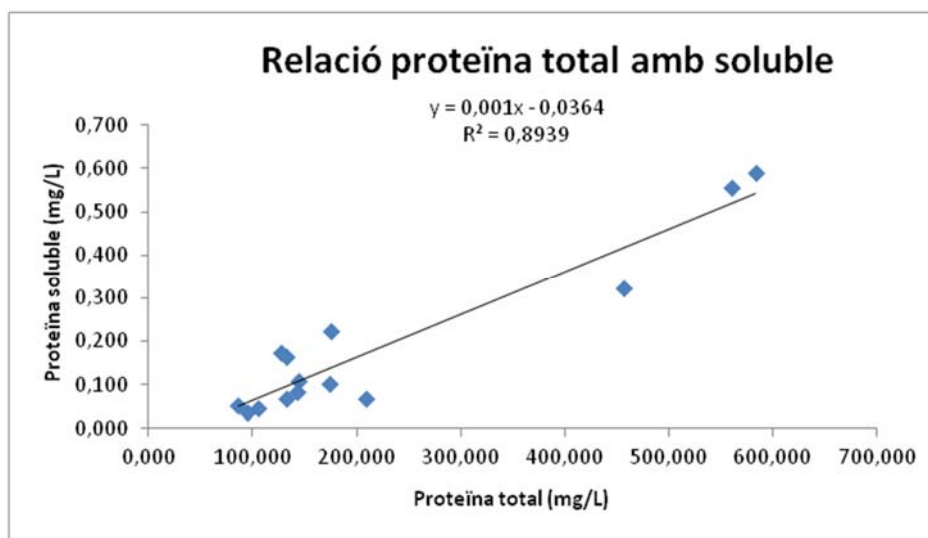
Gràfica 22 Evolució de la producció de TGZ15 insoluble mesurada per western blot, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.

La proteïna insoluble es va acumular en forma de cossos d'inclusió i com es pot veure a la Gràfica 22, aquests es van formar amb molta més rapidesa a les concentracions altes de IPTG provades. A les primers hores, l'expressió de TGZ15 va ser més alta a concentracions elevades de IPTG però amb el temps es va acabar acumulant més proteïna insoluble a les mostres induïdes amb IPTG a 50 i 100 μM . No es va poder detectar proteïna insoluble a les mostres induïdes amb IPTG 10 μM .



Gràfica 23 Evolució de la producció de proteïna total soluble mesurada pel mètode de Bradford, segons el temps d'inducció i la concentració de IPTG.

A la Gràfica 23 es pot veure que la quantitat de proteïna soluble total que es va obtenir en els cultius va ser més alta a les concentracions baixes d'IPTG. Això es correlaciona amb la quantitat de biomassa total que hi ha al cultiu ja que aquesta va ser més alta per a concentracions baixes d'IPTG.



Gràfica 24 Relació entre la proteïna soluble total i la TGZ15 soluble obtingudes en l'experiment d'inducció amb IPTG.

Com es pot veure a la Gràfica 24, la relació entre la proteïna soluble total que es va obtenir en aquest experiment i la TGZ15 soluble va ser lineal. Això mostra que com més proteïna es produeix més TGZ15 s'obté.

Els resultats d'aquest experiment van mostrar que la concentració d'IPTG de 50 μ M va afavorir tant la formació de TGZ15 soluble com de TGZ15 en forma de cossos d'inclusió a una concentració superior a la resta de condicions provades. A més a més, els lisats obtinguts de les mostres induïdes a aquesta concentració d'IPTG van presentar el major nivell d'activitat transglutaminasa. Les concentracions d'IPTG de 1000 i 500 μ M van provocar una disminució notable de la velocitat específica de creixement i la de biomassa total produïda. Amb aquestes concentracions es va obtenir una ràpida acumulació de proteïna insoluble en les primeres hores, però aquesta es va veure superada al final de l'experiment per la que es va obtenir utilitzant la concentracions de 50 i 100 μ M. Resultats molt similars van ser obtinguts per Oluwafemi A. Olaofe¹⁸⁵ i col·laboradors i J. Pinsach i col·laboradors¹⁸⁴. A la vista dels resultats es va

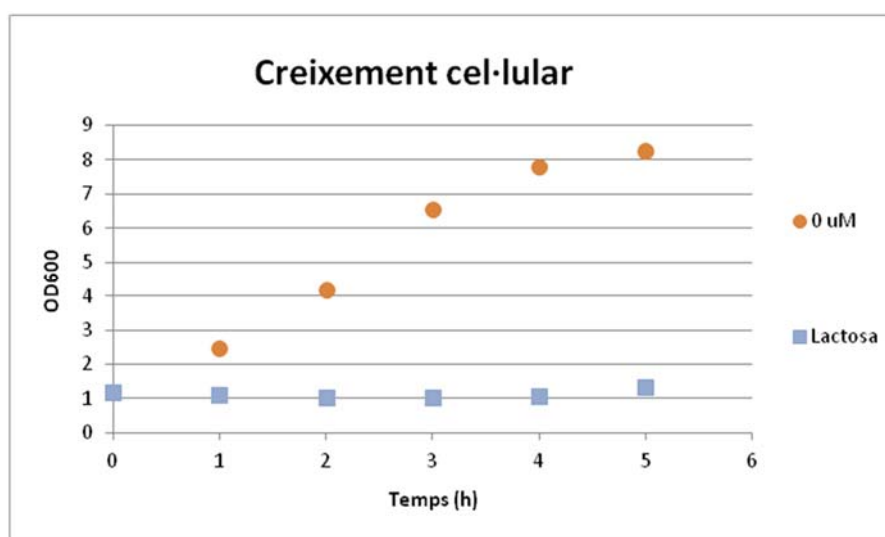
prendre la concentració d'IPTG 50 μM com a òptima per a posteriors experiments en matràs d'Erlenmeyer.

4.1.3.2 *Inducció de l'expressió de la proteïna TGZ15 amb lactosa*

Es va avaluar la possibilitat d'induir la producció de TGZ15 mitjançant l'addició de lactosa al medi. La lactosa a diferència de l'IPTG es un inductor metabolitzable, així que podria ser utilitzat també com a font de carboni durant la inducció^{186,187}.

Per a aquest experiment, es va realitzar un creixement cel·lular en matràs d'Erlenmeyer seguint el procediment descrit a l'apartat 3.1.4.2.

A continuació es mostren els resultats del creixement cel·lular juntament amb la comparació amb una mostra sense inductor i utilitzant glucosa com a font de carboni.



Gràfica 25 Evolució de la densitat cel·lular del cultiu d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) TGZ15 en el temps amb inducció amb lactosa i un control sense inducció.

A la Gràfica 25 s'aprecia que no hi va haver gairebé cap increment de biomassa en la mostra induïda amb lactosa, això demostra que la soca d'*Escherichia coli* utilitzada no es capaç de metabolitzar aquesta font de carboni.

No es va detectar TGZ15 soluble, insoluble o activitat transglutaminasa en les mostres induïdes amb lactosa. Això va ser degut a que al no poder metabolitzar la lactosa les cèl·lules no tenien cap font de carboni per créixer i per tant la proteïna recombinant només es va expressar a les cèl·lules presents en el

moment de la inducció. Conseqüentment la quantitat total de proteïna expressada va ser molt baixa i no s'arribà a detectar. Es va descartar per tant la lactosa com a inductor metabolitzable.

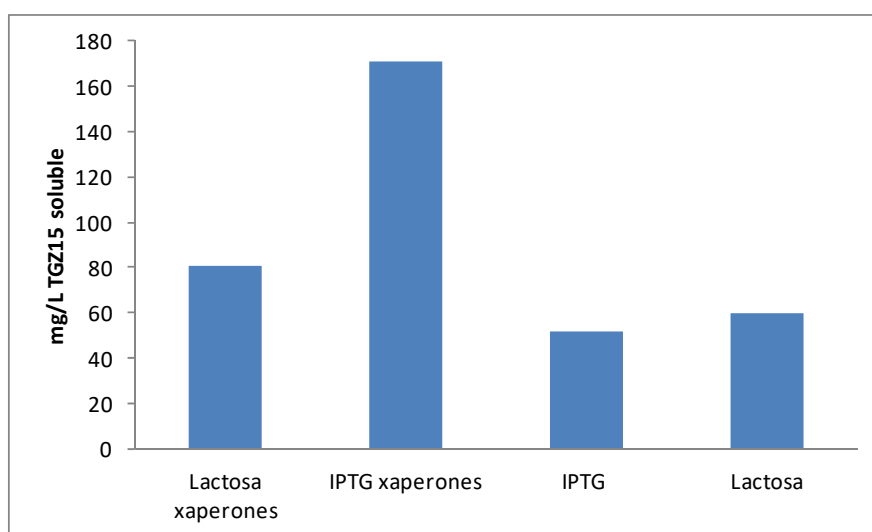
4.1.3.3 *Coexpressió amb xaperones*

La coexpressió de xaperones pot augmentar la quantitat de proteïna recombinant soluble ja que faciliten el procés de plegament d'aquesta^{91,93,188}.

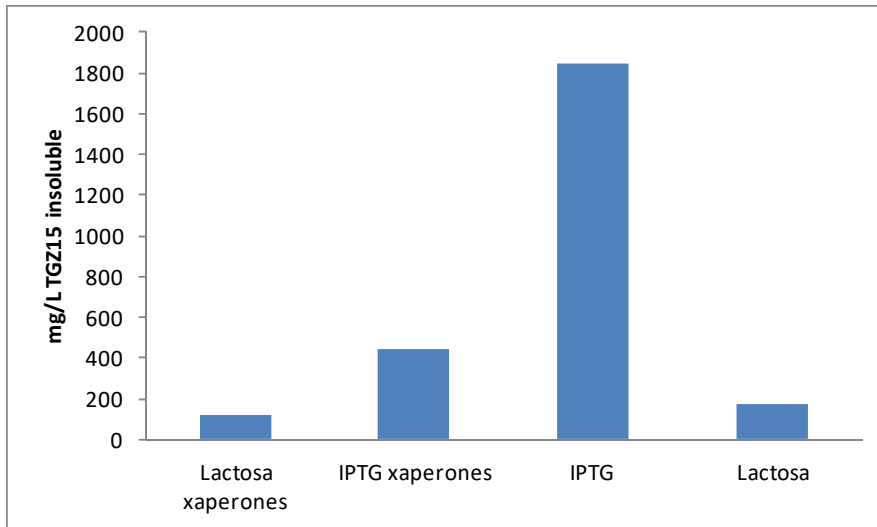
L'objectiu en aquest experiment era que la presència d'aquestes xaperones augmentés la capacitat de plegament i processat de la maquinària cel·lular i es pogués obtenir una major quantitat de proteïna TGZ15 soluble i activa en detriment dels cossos d'inclusió.

Es va realitzar un experiment d'expressió seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.5.3 per determinar la producció de TGZ15 quan es coexpressen xaperones. L'experiment es va realitzar comparant en paral·lel les cèl·lules que tenien només el plasmidi pET28-tgz15 i les que a més a més tenien el plasmidi pGro7. Es va provar també l'efecte d'utilitzar la lactosa com a inductor, afegint però també glucosa com a font de carboni.

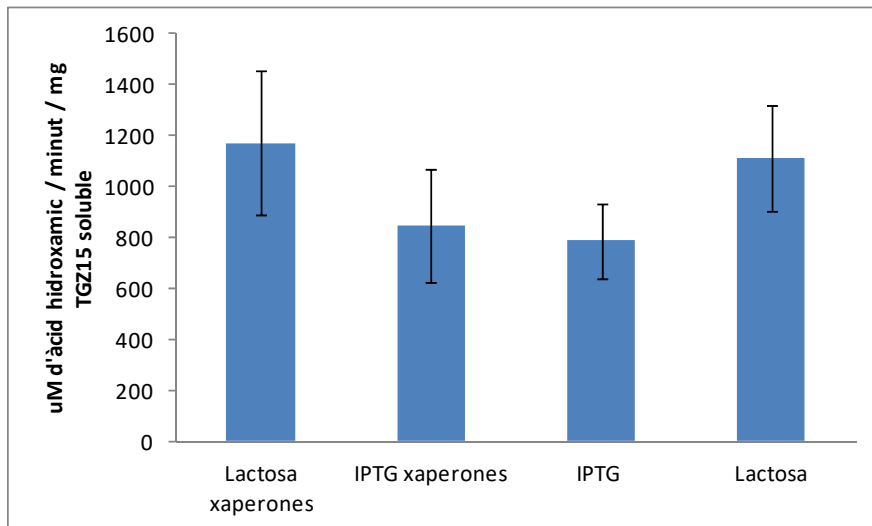
Un cop finalitzada la inducció es va analitzar la quantitat de proteïna produïda per western blot (protocol descrit a l'apartat 3.1.6.4). L'activitat TGasa es va mesurar utilitzant el mètode colorimètric de l'hidroxamat (protocol descrit a l'apartat 3.1.7.1).



Gràfica 26 Comparació de la producció de proteïna soluble TGZ15 amb o sense coexpressió de xaperones.



Gràfica 27 Comparació de la producció de proteïna TGZ15 insoluble amb coexpressió de xaperones.



Gràfica 28 Comparació de l'activitat TGasa de la proteïna soluble amb coexpressió de xaperones.

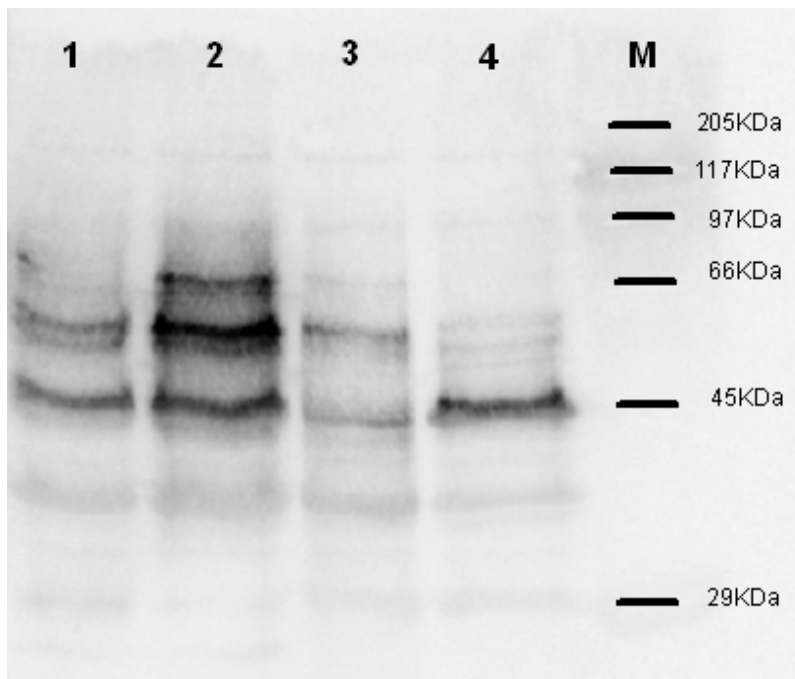


Figura 21 Western blot de la fracció soluble de proteïna obtinguda. 1, coexpressió de xaperones i lactosa; 2 coexpressió de xaperones i IPTG; 3 només IPTG; 4 només lactosa.

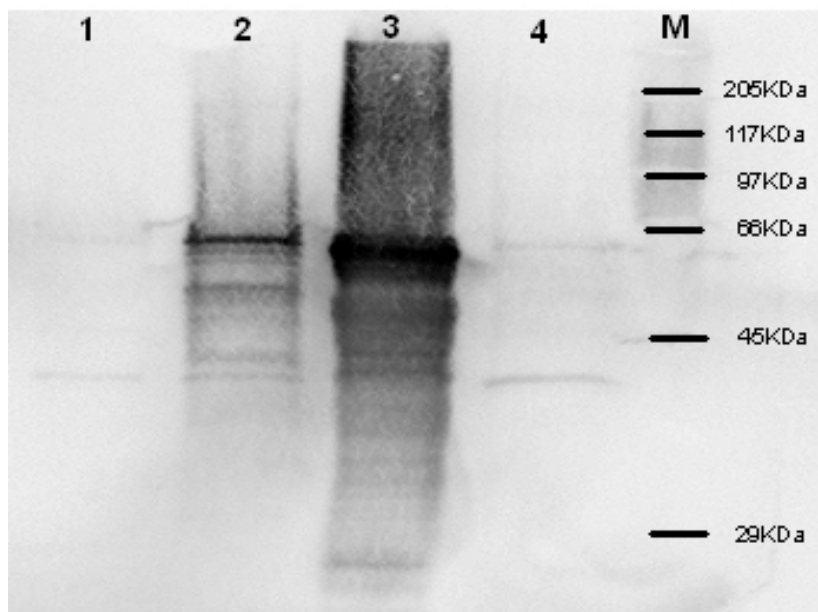


Figura 22 Western blot de la fracció insoluble de proteïna obtinguda. 1, coexpressió amb xaperones i lactosa; 2, coexpressió de xaperones i IPTG; 3, només IPTG; 4, només lactosa.

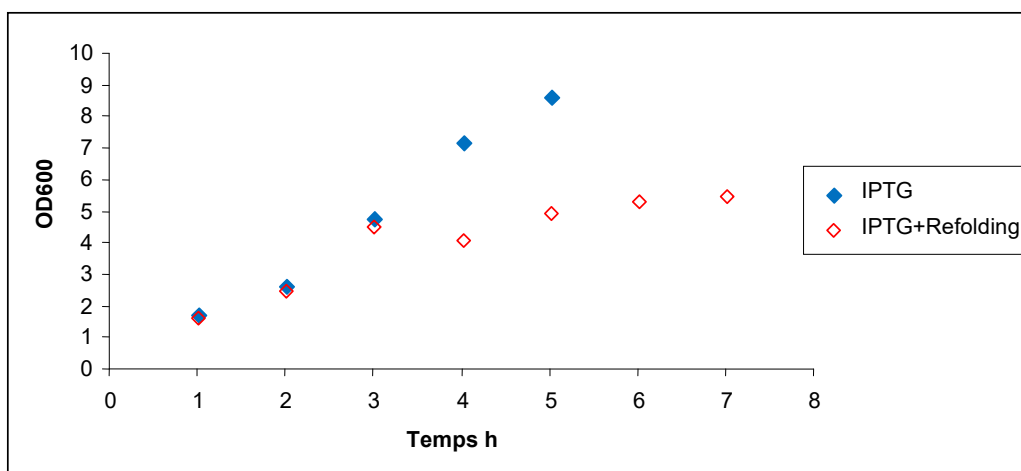
De la Gràfica 26, Gràfica 27, Gràfica 28, Figura 21 i Figura 22, es pot deduir que la coexpressió de les xaperones groES-groEL conjuntament amb TGZ15 va provocar un increment de la concentració de proteïna recombinant soluble i una disminució en la proteïna insoluble. Resultats semblant van ser obtinguts per K. Nishihara i col·laboradors⁹¹ en *E. coli* BL21 (DE3) i per H. Mirzahoseini i

colaboradors¹⁸⁹ en *E. coli* K-12. Per tant, es pot concloure que la coexpressió de xaperones va ajudar a obtenir un correcte plegament de la proteïna TGZ15.

4.1.3.4 *Replegament in vivo dels cossos d'inclusió*

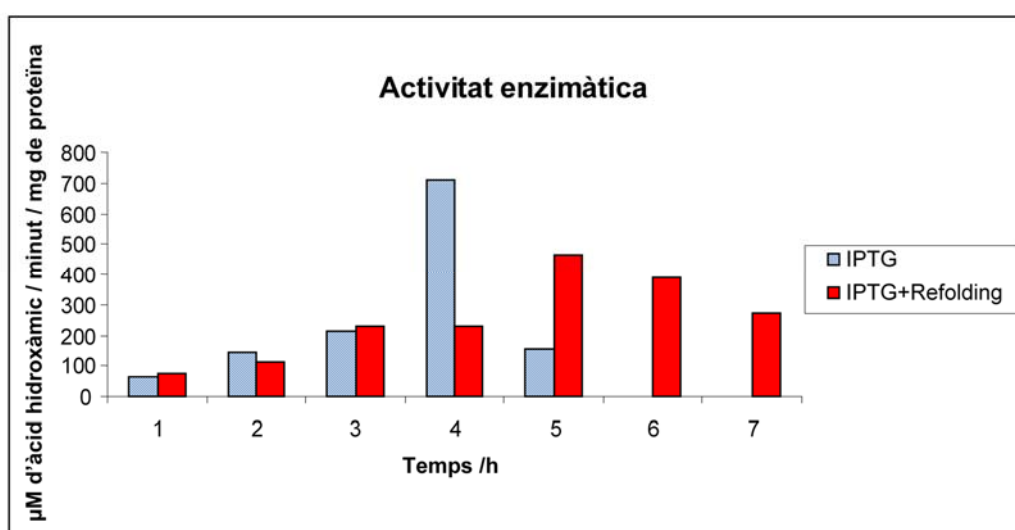
Com ja s'ha comentat a la introducció, la sobreexpressió de proteïnes recombinant en cèl·lules hoste pot provocar la pèrdua de la conformació i del plegament natiu. En l'apartat anterior es va millorar l'expressió de la fracció soluble de la proteïna mitjançant la coexpressió de xaperones. En aquest apartat es va pretendre aplicar a la fracció insoluble dels cossos d'inclusió la metodologia descrita per Villaverde et al.¹⁵⁹ basada en la teoria de que l'acumulació de proteïna mal plegada en forma de cossos d'inclusió, formant agregats indesitjats, es reversible. Aquesta teoria considera els cossos d'inclusió com a dipòsits de transició de plegament de polipèptids, donant com a resultat un balanç no equilibrat entre precipitació de proteïna *in vivo* i un replegament que pot ser activament desplaçat per l'aturada de la síntesi de la proteïna. Els agregats de cossos d'inclusió se solen donar quan la velocitat d'expressió és màxima (1 a 3 h), és per això que es descriu aquest període com una primera fase que consisteix en la coordinació del sistema per a l'expressió de proteïna recombinant i la segona fase es basa en la inhibició de la biosíntesi de proteïna amb cloramfenicol per permetre que el sistema de replegament dels agregats, o "refolding", i plegui les proteïnes amb la conformació *in vivo*.

Amb la intenció de provar l'eficàcia de l'esmentat procediment per augmentar la solubilitat de la proteïna recombinant TGZ15, es van realitzar dos experiments comparant la influència de les dues fases (precipitació i replegament) en el creixement cel·lular i en la producció i activitat de la proteïna TGZ15 recombinant segons el protocol 3.1.5.4. Al igual que en els experiments anteriors, es van utilitzar cèl·lules de *E. coli* BL21(DE3), transformades amb el plasmidi pEt28 que contenia clonat el gen *tgz15*.



Gràfica 29 Comparativa del creixement cel·lular durant la inducció i el replegament in vivo de la proteïna TGZ15.

A la Gràfica 29 es pot apreciar que en l'experiment en que es va seguir el procediment de replegament, va mostrar un canvi de pendent en el creixement. Es pot veure que, abans de realitzar el canvi de medi, és a dir en les tres primeres hores després de la inducció, tots dos experiments seguien la mateixa tendència en l'acumulació de biomassa. A la segona fase, en què es va canviar el medi en l'experiment de replegament, a partir de les 3 primeres hores després de la inducció es va observar com la densitat cel·lular era pràcticament constant. Aquest fenomen s'explica tenint en compte la teoria presentada¹⁵⁹, segons la qual l'organisme deixa de produir proteïna (no augmenta la seva biomassa) i es dedica a realitzar el replegament de la proteïna insoluble.



Gràfica 30 Comparativa l'activitat enzimàtica durant el replegament in vivo.

Pel que fa a l'activitat TGasa (determinada mitjançant el protocol 3.1.7.1), a la Gràfica 30 es pot apreciar que, en el cas de no realitzar el replegament *in vivo*, el màxim d'activitat (aproximadament 710 unitats d'activitat) es va presentar un cop transcorregudes 4 hores des de la inducció, i després l'activitat va disminuir significativament i fins a desaparèixer a les 6-7 h de l'inici de la inducció. Per altra banda, el valor d'activitat més alt que es va obtenir en l'experiment en què es va provocar el replegament, va ser d'aproximadament 460 unitats d'activitat després de 5 hores d'inducció, mantenint-se l'activitat de la proteïna fins a les 7h després de la inducció. Aquests resultats van mostrar que l'aplicació d'aquesta metodologia a la soca i proteïna del treball, no permetia obtenir un resultat millor al de la inducció tradicional amb IPTG.

4.1.3.5 *Anàlisi de la presència d'una banda de pes molecular inferior a l'esperat identificada com a TGZ15 per Western Blot*

L'anàlisi de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 per SDS-PAGE de tots els experiments fins al moment, va presentar sempre com a resultat dues bandes, una de 65 kDa i una de 56 kDa. El pes molecular esperat per a la proteïna expressada era de 65 kDa, incloent la regió poli-His, la seqüència associada al vector T7 prèvia a la proteïna TGZ15.

Taula 31 Seqüència N-Terminal de TGZ15p sobreexpressada en *E. coli*.

Lletres sense format: seqüència His-tag i del vector pET-28a (4,3KDa). Lletres subratllades: seqüència del T7-tag. Lletres en negreta: pèptid senyal a cloroplast de TGZp (5,2KDa). Lletres en negreta subratllades: Resultats de la cerca Mascort indicant pèptids coincidents de l'anàlisi MS/MS després de la digestió amb tripsina. TGZ15c, completa (65KDa). TGZ15p, truncada (56KDa).

TGZ15c	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH <u>MASMTGGQQM</u> GRDPNSARAH
TGZ15t	
TGZ15c	1 <u>MAHRGHLDGL TGQAPALMRH GSFAAGSLSS RSPLQSSTLE</u> 40
TGZ15t	1 <u>MAHRGHLDGL TGQAPALMRH GSFAAGSLSS RSPLQSSTLE</u> 40
TGZ15c	41 <u>MLENKLA</u> 47
TGZ15t	41 <u>MLENKLA</u> 47

La banda de 56 kDa pot ser el resultat de l'agregació entre monòmers de la forma de 65 kDa que produeixen una migració diferent i més ràpida en el gel SDS. Per tal d'esclarir aquest fet es van dur a terme experiments de reducció i alquilació

per veure si una de les dues cisteïnes de la seqüència de la proteïna^{46,190} era la responsable de possibles ponts disulfur que generessin aquests agregats. Els resultats després de la reducció i alquilació es poden veure a la Figura 23a, cada tractament per duplicat. La manca de diferències significatives entre ambdós tractaments va indicar que les cisteïnes no són responsables de l'aparició d'aquestes bandes de menor pes molecular.

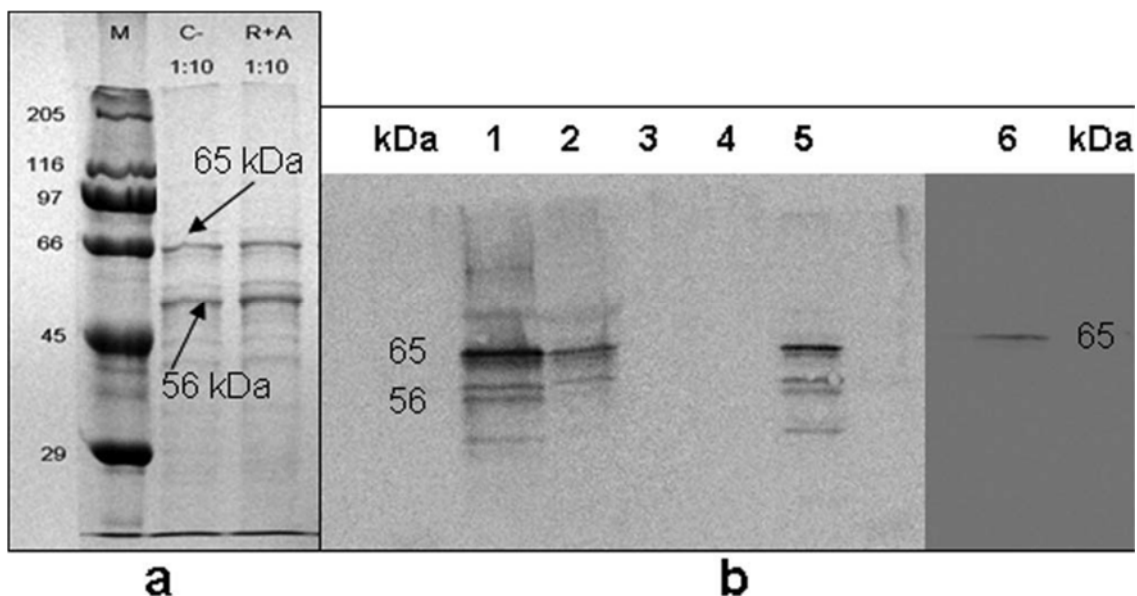


Figura 23 Anàlisi SDS-PAGE i Western Blot de les mostres tractades per reducció i alquilació. **a:** anàlisi SDS-PAGE de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 amb els tractaments d'alquilació i reducció, s'indiquen les bandes de 65 i 56 kDa. **b:** immunodetecció per Western Blot d'una fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 utilitzant l'anticòs AbTGZ15 (1:5000) (mostres 1 a 5) i l'anticòs AvT7.tag(Novagen) (1:10000) (mostra 6). 1, fracció de cossos d'inclusió en urea 8M; 2, fracció de cossos d'inclusió insoluble en B-PER durant la nit; 3 i 4, fraccions de rentats; 5 i 6 fracció de cossos d'inclusió soluble en B-PER durant la nit. C-, control negatiu; R, reducció; A, alquilació; R+A, alquilació i reducció M. Marcador de pes molecular.

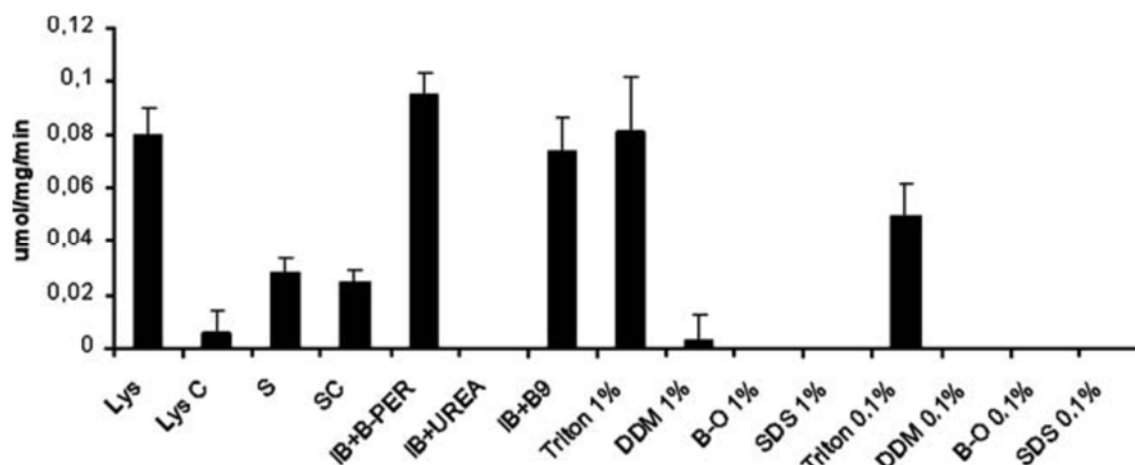
La immunodetecció de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15^{50,191} va donar com a resultat l'aparició de dues bandes del mateix pes molecular que les detectades en el anàlisi per SDS-PAGE (65 i 56 kDa) (Figura 23 mostres de 1 a 5), confirmant que aquelles bandes corresponien a la proteïna sobreexpressada. Tanmateix quan es va fer servir l'anticòs anti-T7.tag en la mateixa mostra, només va aparèixer la banda de 65 kDa (Figura 23, mostra 6), indicant que a la proteïna de la banda de 56 kDa li mancava almenys la seqüència d'aminoàcids corresponent a la seqüència T7-tag (Taula 31), i probablement el pèptid senyal a cloroplast per completar la pèrdua de massa molecular observada.

Un anàlisi per MALDI-TOFF de les dues bandes va confirmar que ambdues corresponien a proteïnes TGZ. La diferència en la digestió de la seqüència N-

terminal va indicar que, a l'igual que en altres proteïnes amb pèptid senyal sobreexpressades en *E. coli*, la seqüència de 56 kDa corresponia a una proteïna truncada (produïda per una digestió parcial d'una peptidasa d'*E. coli*) que havia perdut una part important del seu pèptid senyal (de l'aminoàcid 1 al 30). Aquestes observacions van confirmar els anàlisis per Western Blot.

4.1.3.6 *Obtenció de TGZ soluble mitjançant detergents no desnaturalitzants*

Per tal de determinar si era possible extreure proteïna activa dels cossos d'inclusió de TGZ15 sense necessitat d'un llarg i costós procés de replegament, es va realitzar un experiment comparatiu de mesura d'activitat utilitzant mostres amb diferents tractaments de replegament i mostres només resuspeses (Gràfica 31).



Gràfica 31 Activitat enzimàtica de diferents fraccions cel·lulars tractades amb detergents. Activitat TGasa (μmol de substrat / mg de proteïna total / min) mesurada amb el mètode colorimètric en diferents fraccions de cèl·lules d'*E. coli* que han sobreexpressat TGZ15, tampons de solubilització i detergents. Abreviacions: Lys, lisat total induït; Lys C, lisat total no induït; S part soluble induïda; SC, part soluble no induïda; IB+B-PER, part insoluble resolubilitzada en B-PER; IB+UREA, part insoluble resolubilitzada en urea 8M; IB+B9, part insoluble resolubilitzada amb tampó B9 i dialitzada; Triton, Triton X-100, DDM, n-dodecil- β -D-maltòsid; B-O, Octil β -D-glucopiranòsid; SDS, dodecilsulfato sòdic.

En el procediment de replegament, després de la centrifugació, la fracció de proteïna soluble es separava de la fracció insoluble dels cossos d'inclusió (que aparentment contenia proteïnes inactives) que es dissolia en urea i després se sotmetia al procés de replegament (protocol 3.1.5.1). Com es pot veure a la Gràfica 31, de manera inesperada, es va detectar la major activitat TGasa en la fracció de cossos d'inclusió resuspesos en tampó B-PER. L'activitat obtinguda

amb aquesta metodologia es comparable a la de la fracció de cossos d'inclusió TGZ15 replegada en tampó B9 (IB+ B9) i dialitzada front el tampó de recuperació. Les mostres control no induïdes, LysC (fracció total) o SC (fracció soluble) no són significativament diferents entre elles i van presentar només una activitat TGasa basal. La fracció resuspesa en urea (urea + cossos d'inclusió, IB) no va presentar cap activitat TGasa. Totes aquestes dades van indicar que les activitats TGasa mesurades a les mostres induïdes que contenen TGZ15 (cossos d'inclusió + B-PER i cossos d'inclusió + B9) corresponien a la de TGZ15. En un experiment addicional, el tampó B-PER comercial va ser substituït per detergents no desnaturalitzants (mes econòmics) per provar l'activitat de la fracció TGZ-IB solubilitzada. Els detergents utilitzats van ser: SDS, Trítion X - 100, N – dodecil- β -D - Maltòsid (DDM) i β -octil - glucopiranòsid (B-O), a una concentració de 0,1 i 1%, usant urea 8M com a control negatiu. Els resultats (Gràfica 31) indiquen que el Trítion X -100 1% es el millor detergent que solubilitza TGZ15 actiu a partir de la fracció de cossos d'inclusió, sent l'activitat de les fraccions solubilitzades similar a l'obtinguda amb B-PER (considerablement més car que els altres detergents).

Efecte de la temperatura en l'obtenció de proteïna soluble a partir cossos d'inclusió mitjançant detergents no desnaturalitzants

Es va estudiar l'efecte de la temperatura durant el cultiu e inducció de les cèl·lules hostes en l'obtenció de proteïna soluble dels cossos d'inclusió mitjançant detergents no desnaturalitzants.

La Figura 23 mostra els resultats dels experiments d'expressió en matràs realitzat a 25 i 37°C. Es pot veure clarament que, encara que es va obtenir més producció de proteïna insoluble en els mostres obtingudes a 37°C, un creixement i inducció a baixa temperatura (25°C) permet recuperar més proteïna soluble dels cossos d'inclusió.

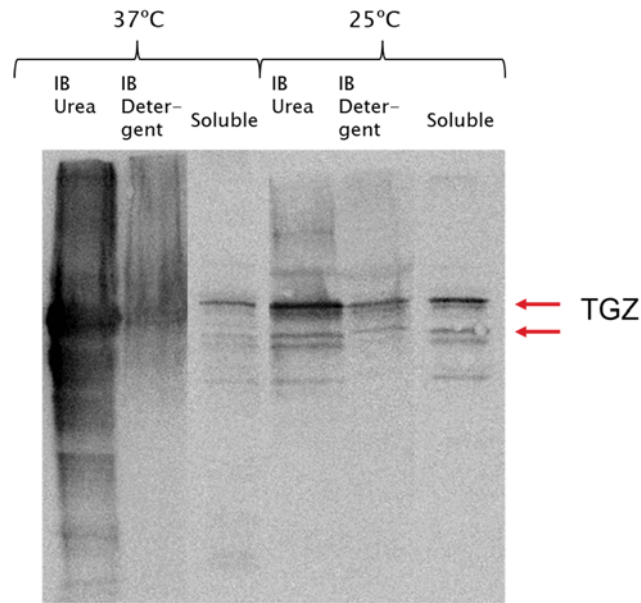
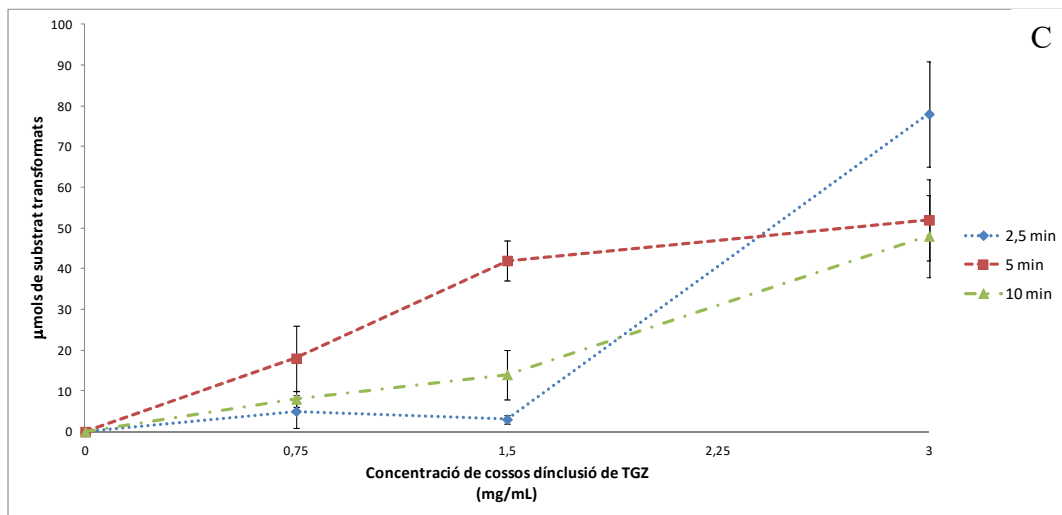
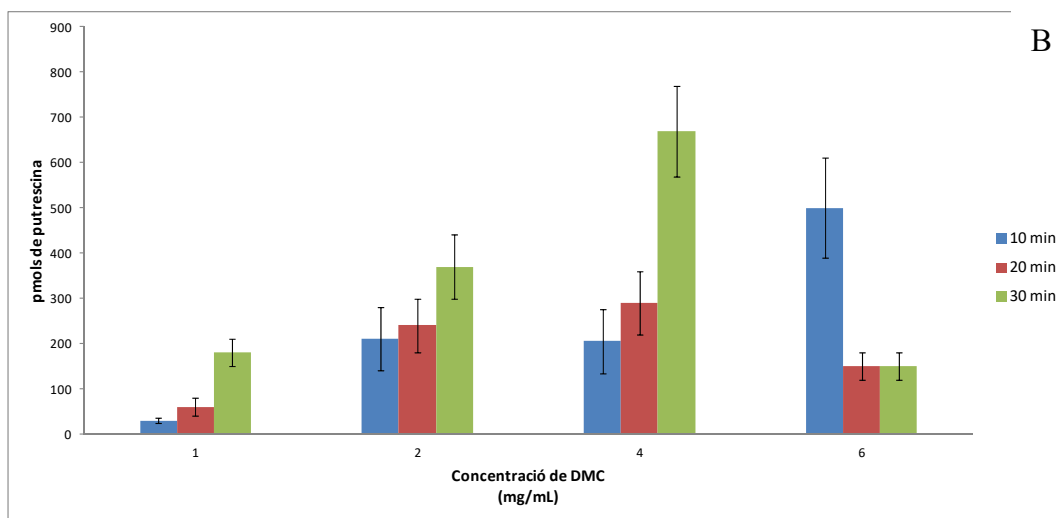
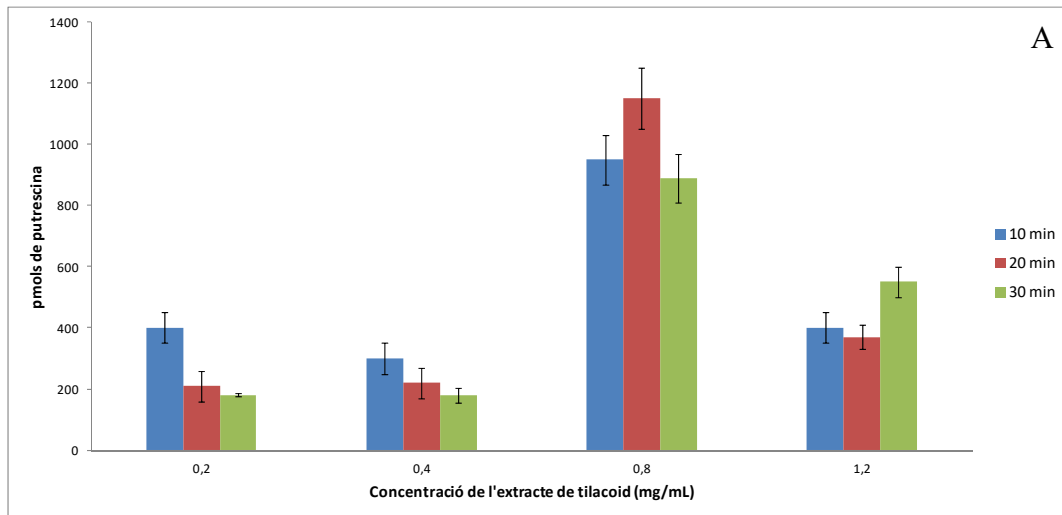


Figura 24 Obtenció de proteïna TGZ 15 soluble a partir de IBs obtinguts a diferents temperatures.

Caracterització de l'activitat de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats en Trítion

Per tal de caracteritzar l'activitat de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats amb Trítion 1% (protocol 3.1.4.3) es van dur a terme diversos experiments usant diferents substrats de TGZ15, concentracions i temps de reacció (Gràfica 32, Taula 32 i Taula 33). Les condicions de concentració de Ca^{2+} i pH van ser les seleccionades en els experiments de replegament. Els substrats assajats van ser: extracte de proteïnes de tilacoide de blat de moro (substrat original de la planta), DMC (utilitzat en molts experiments de referència) i CBZ-CLN-Gly-OH® (un substrat sintètic específic per a TGasa).



Gràfica 32 Activitat TGasa de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats amb Trítion 1% i glicerol 35% (pmols Put / mg proteïna · h), mesurada mitjançant el mètode radioactiu. A: utilitzant com a substrat 0,2, 0,4, 0,8, i 1,2 mg d'extracte de proteïna de tilacoida per mil·lilitre, després de 30, 60 i 90 minuts de temps de reacció de l'assaig. B: utilitzant com a substrat 1, 2, 4 i 6 mg de DMC per mil·lilitre, després de 10, 20 i 30 minuts de temps de reacció de l'assaig. C: velocitat de transformació del substrat (µmol de substrat transformat) de quatre concentracions diferents de fracció soluble de cossos d'inclusió de TGZ15 i tres temps de reacció (2,5, 5 i 10 minuts), utilitzant CBZ-Cln-Gly-OH 0,05M com a substrat (mètode colorimètric).

Taula 32 Activitat TGasa (μmol de substrat transformat) de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15. Els cossos d'inclusió han estat solubilitzats en Triton 1% i glicerol 35%, s'ha utilitzat com a substrat CBZ-Cln-Gly-OH 10, 20, 50 i 100mM mitjançant el mètode colorimètric, després de 10, 20 i 30 minuts de temps de reacció.

Substrat (mM)	10	30	50	100
10 min	0,201 \pm 0,06	0,312 \pm 0,08	0,776 \pm 0,02	0,302 \pm 0,07
20 min	0,225 \pm 0,07	0,367 \pm 0,07	1,094 \pm 0,08	0,287 \pm 0,07
30 min	0,491 \pm 0,002	0,150 \pm 0,05	0,119 \pm 0,03	0,150 \pm 0,03

Taula 33 Afinitat a substrat de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 resuspesos en Trítion mesurada per concentració saturant de substrat (pmols).

Substrat	Pmols
Tilacoide	25800
DMC	16000
CBZ-Gln-Gly-OH	124000

En el cas de l'extracte de proteïna de tilacoide, es va utilitzar la captació de putrescina tritiada radioactiva (protocol 3.1.7.2) per mesurar l'activitat TGasa. La major activitat va ser l'obtinguda amb 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteïna i un temps de reacció de 60 minuts (Gràfica 32a). Per sobre d'aquesta concentració de proteïna, l'activitat enzimàtica va disminuir per a tots els temps de reacció assajats, el que indica que, a aquesta concentració de substrat, tots els centres actius de l'enzim presents a la mescla de reacció estaven saturats.

Per als experiments on es va afegir DMC com a substrat, es va utilitzar el mateix mètode per mesurar l'activitat enzimàtica (Gràfica 32b). La concentració de substrat saturant va ser de 4 mg/mL en el temps de reacció més alt (30 min), però l'activitat màxima va ser significativament menor que en el cas d'extractes de tilacoïdes.

Com es descriu en Material i Mètodes (protocol 3.1.7.1), el substrat sintètic específic de TGasa CBZ-CLN-Gly-OH, ha estat descrit com a útil per mesurar l'activitat TGasa dels diferents tipus de mostres per un mètode colorimètric. En aquest experiment, l'activitat més alta va ser l'obtinguda amb la concentració de substrat 0,05 M. Per als tres temps de reacció assajats, l'activitat màxima en tots els casos es va produir passats 10 minuts (Taula 32).

Preferència de substrat de TGZ15 i velocitat de transformació

A partir dels resultats d'activitat, es va comparar l'afinitat de TGZ15 per a cada substrat, mesurada en termes de concentració de saturació del substrat (pmols) (Taula 33). Usant la mateixa metodologia per mesurar l'activitat TGasa, es pot deduir que l'extracte de proteïna de tilacoide va presentar una major afinitat per TGZ15 que per la DMC. En el cas del mètode de hidroxamat, l'afinitat de TGZ15 per al substrat sintètic específic de TGasa va ser comparable a altres casos referenciats a la literatura¹⁶⁰.

Prenent en consideració les facilitats i avantatges de la metodologia, es va realitzar un experiment per estudiar l'efecte de la concentració d'enzim en la velocitat de transformació de substrat (μ mol de substrat transformats) utilitzant com a substrat la concentració de saturació (0,05M) de CBZ-CLN-Gly-OH, tres concentracions de cossos d'inclusió de TGZ15 redissolts en Trítion i tres temps de reacció (Gràfica 32c). Degut a que s'havia observat en els experiments anteriors que el punt de màxima activitat es produïa al voltant de 10 minuts (Taula 33), es van provar temps de reacció de 2,5, 5,0 i 10 minuts.

Com era d'esperar, la velocitat de transformació de substrat va augmentar paral·lelament amb la concentració de TGZ15 en l'assaig enzimàtic. L'activitat més alta es va correspondre sempre a la concentració més alta de TGZ15 en els tres temps de reacció que es van provar.

Activitat "Cross- Linking"

Per tal d'analitzar la capacitat de TGZ15 per polimeritzar un proteïna substrat, tal com es descriu per altres TGases, es va realitzar un assaig enzimàtic de llarga durada (16 h) utilitzant DMC com a substrat de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats en Trítion (el procediment esta descrit a l'apartat 3.1.8.3). Després de la reacció van aparèixer bandes de caseïna agregada d'alt pes molecular, de 150 a més de 205kDa que es van visualitzar per SDS-PAGE de mostres sense la TDT al tampó de mostra (Figura 25a). No es descarta que la banda que apareix a 90kDa sigui un possible trímer. Com es pot veure a la Figura 25b, aquestes bandes no estaven presents en la fracció original de cossos d'inclusió de TGZ15 incubada sense caseïna. En les mostres tractades amb TDT

i en les mostres de control DMC les bandes d'alt pes molecular no estaven presents.

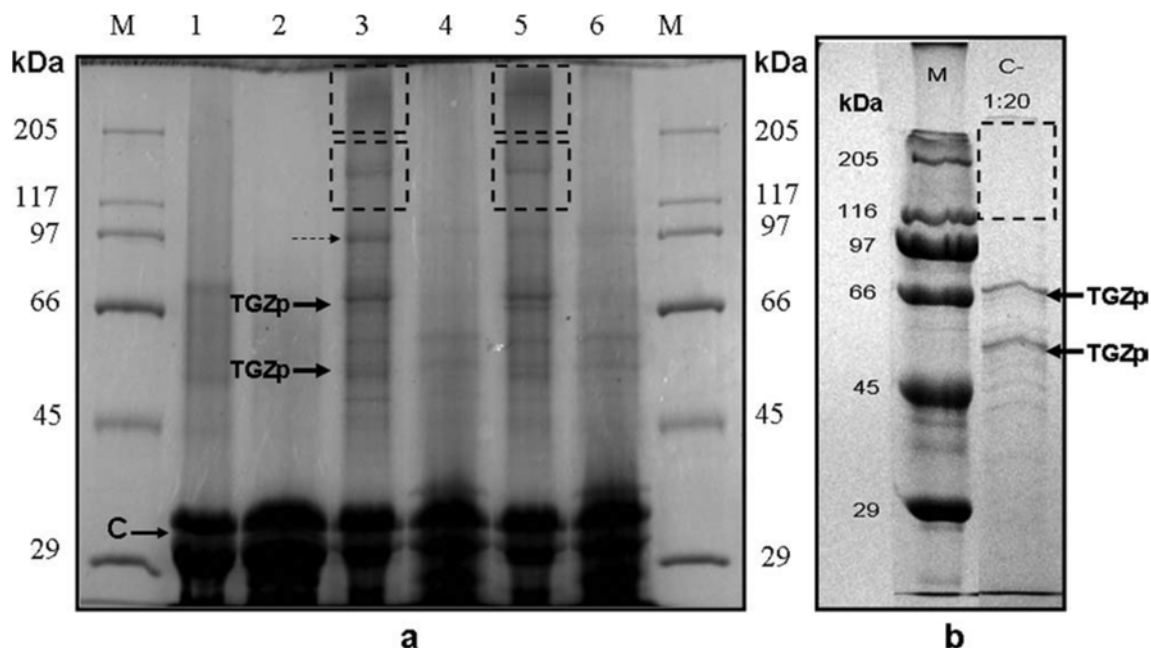
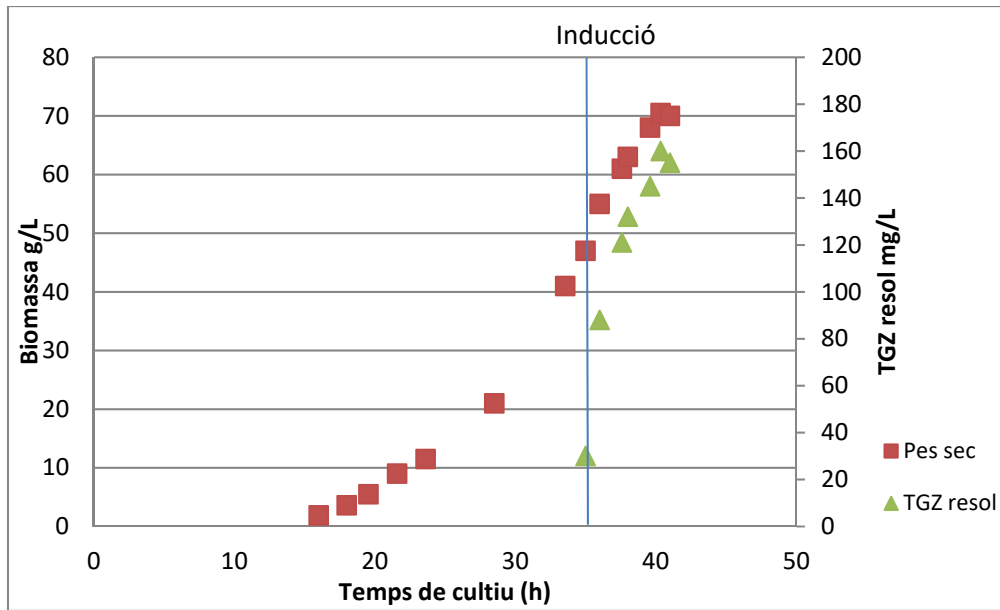


Figura 25 DMC reticulada per l'activitat TGasa de la fracció de cossos d'inclusió de TGZ15 solubilitzats amb Trítion. A SDS-PAGE de mostres incubades 16h mb 8mg/mL de DMC en la reacció. 1, mostra de DMV sense DTT en el tampó de mostra; 2, igual que 1 però amb DTT 10mM en el tampó de mostra; 3, fracció de TGZ15 incubada amb DMC a pH 6,5 i sense DTT en el tampó de mostra; 4, igual que 3 però amb DTT en el tampó de mostra; 5, fracció de TGZ15 incubada amb DMC a pH 8 i sense DTT en el tampó de mostra; 6, igual que 5 però amb DTT en el tampó de mostra. Els rectangles discontinus indiquen bandes d'alt pes molecular. La fletxa discontinua indica possibles trímers de DMC. C, bandes de monòmers de caseïna. B: SDS-PAGE de les mostres de cossos d'inclusió de TGZ15 inicials (C-) incubat sense DMC. El rectangle discontinu indica l'absència de bandes d'alt pes molecular. M, marcador de pes molecular. TGZp, bandes de TGZ15.

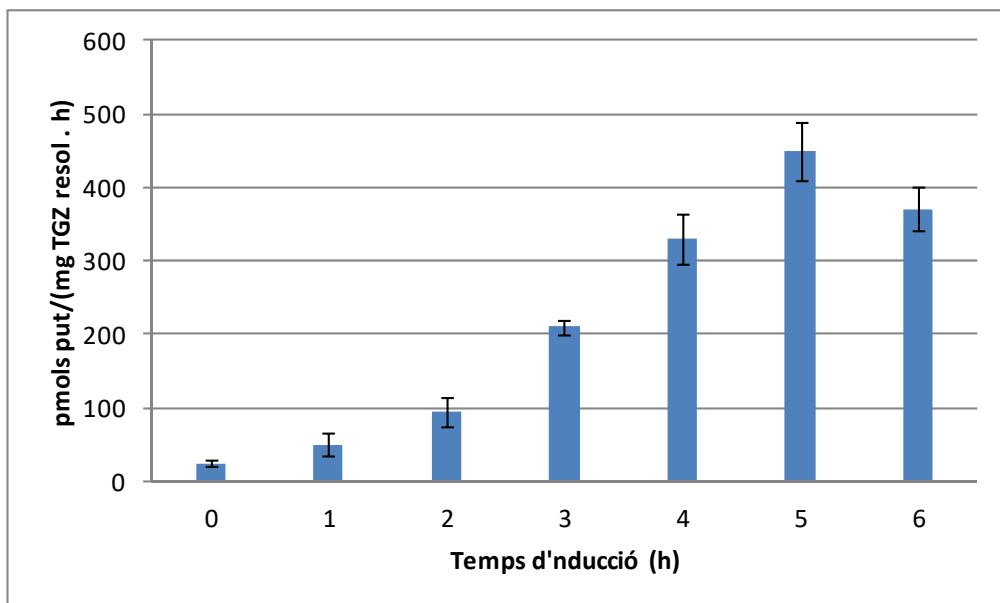
4.1.4 Expressió de la proteïna en bioreactor

A partir dels experiments realitzats en matràs (apartat 4.1.3) i les proves de creixement en reactor (apartat 4.1.2) es va determinar que el punt òptim per tal de dur a terme la inducció era el corresponent a una densitat cel·lular d'entre 40 i 50 g/L (que es donava aproximadament a les 35h de cultiu). Per tal de comprovar aquesta hipòtesis, es va realitzar un cultiu en bioreactor que es va induir a les 35h de cultiu amb 5mM d'IPTG (aproximadament 100µmol d'IPTG/g biomassa seca). A continuació es va seguir el cultiu durant 6h amb l'objectiu de que s'assolís un màxim de producció de TGZ activa. La TGZ es va quantificar utilitzant la metodologia d'obtenció de proteïna activa a partir de la resolubilització de cossos d'inclusió mitjançant detergents no desnaturalitzants (apartat 3.1.5.2).



Gràfica 33 Creixement d'*Escherichia coli* en fed-batch i posterior expressió de TGZ en bioreactor. La proteïna TGZ s'expressa com a mg/L de proteïna insoluble solubilitzada en Trítion 1%.

A la Gràfica 33 es pot veure com a partir de les 35 h de cultiu es comença a expressar TGZ15 fins que s'arriba a un màxim de concentració a 5 h d'inducció. Seguidament a partir d'aquest punt la concentració de la proteïna va començar a disminuir. Pel que fa la biomassa, aquesta no va deixar d'augmentar durant tot el cultiu fins a passades 5h d'inducció, moment en que el cultiu va arribar a fase estacionaria.



Gràfica 34 Evolució de l'activitat de la proteïna TGZ15 insoluble resolubilitzada en Trítion 1% durant la inducció.

A la gràfica 24 s'aprecia com l'activitat de la proteïna obtinguda va seguir una tendència ascendent durant la inducció i que el màxim d'activitat va coincidir amb el màxim de producció de TGZ15 que s'ha vist en la Gràfica 33. Per tant es va confirmar que el temps òptim d'inducció era de 5h.

4.1.5 Purificació de la TGZ expressada

4.1.5.1 Afinitat (heparina)

Com a mostra de partida es va utilitzar la fracció soluble de TGZ15 produïda mitjançant una fermentació amb coexpressió de xaperones com la presentada a l'apart 4.1.3.3. La fracció soluble es va obtenir per extracció mitjançant B-Per II (procediment descrit a l'apartat 3.1.4.3). El procediment de purificació esta descrit a l'apartat 3.1.10.1.

A la Figura 26 es pot veure el perfil del cromatograma que es va obtenir amb el FPLC.

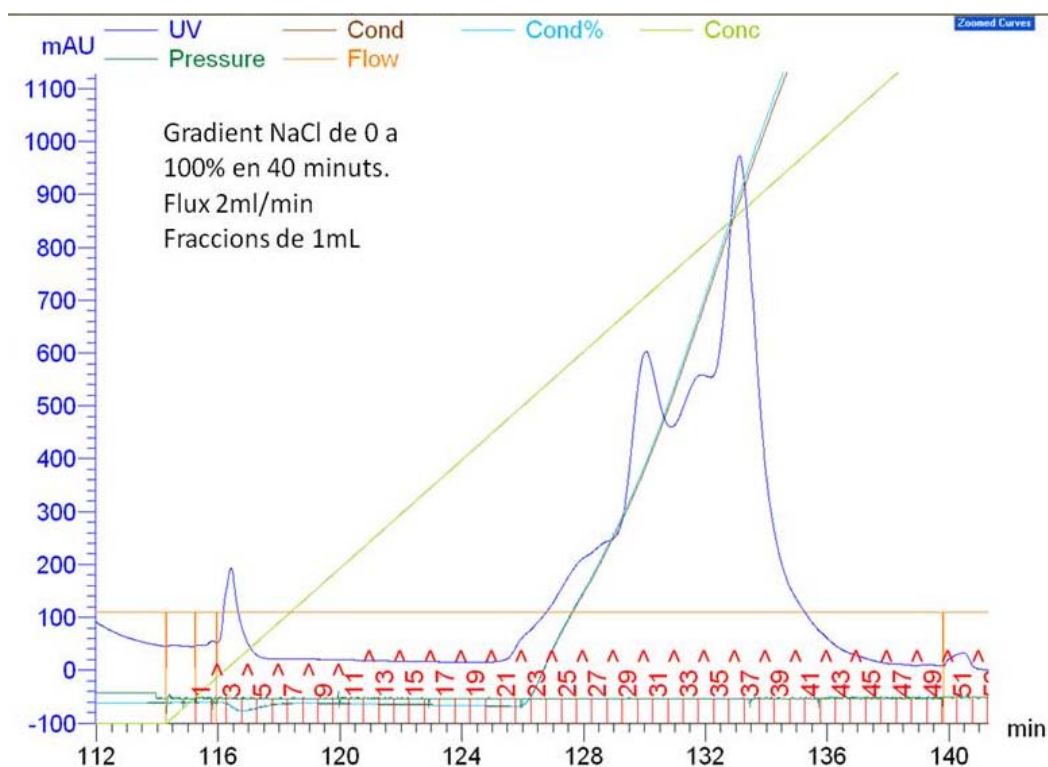
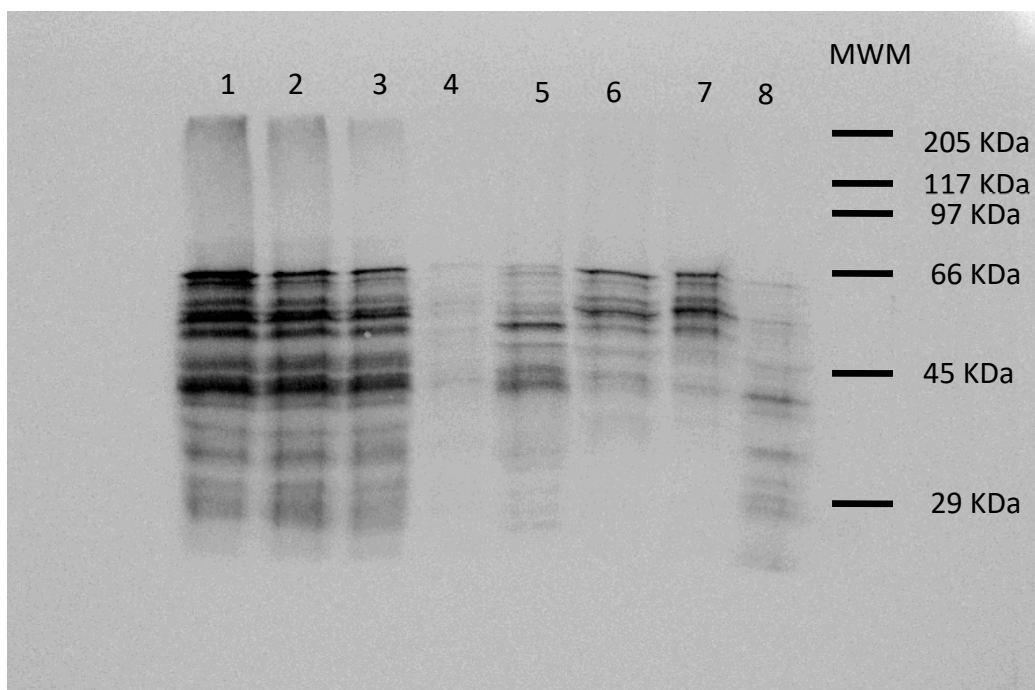


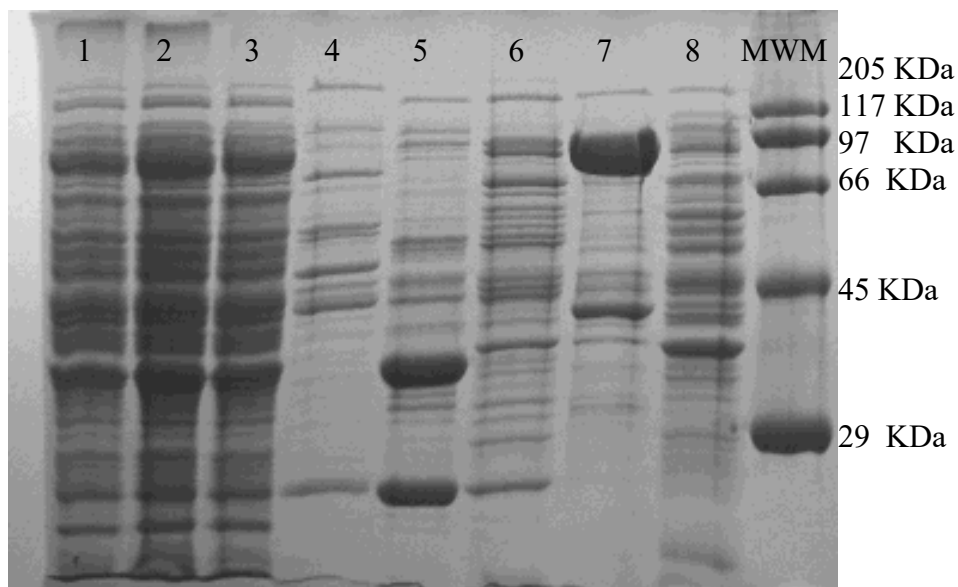
Figura 26 Perfil cromatogràfic de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.

Es van analitzar diverses fraccions de la purificació juntament amb el lisat original mitjançant western blot (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.4) i mitjançant SDS-PAGE (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.2). Concretament es va analitzar el lisat cru obtingut mitjançant B-Per II (mostra 1), el lisat filtrat (mostra 2), el lisat amb canvi de tampó (mostra 3), la fracció de purificació número 3 (mostra 4), la fracció de purificació número 30 (mostra 5), la fracció de purificació número 34 (mostra 6), la fracció de purificació número 37 (mostra 7) i la fracció de la mostra que no es va adherir a la columna (mostra 8). El resultat de l'anàlisi es pot veure a la Figura 27 i Figura 28.



1: lisat 2: lisat filtrat 3: lisat (binding buffer PD-10) 4: FPLC 3
 5: FPLC 30 6: FPLC 34 7: FPLC 37 8: FPLC flow through

Figura 27 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.



1:lisat 2:lisat filtrat 3: lisat (binding buffer PD-10) 4: FPLC 3
 5: FPLC 30 6: FPLC 34 7: FPLC 37 8: FPLC flow through

Figura 28 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la primera purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.

A la Figura 26 s'aprecia un gran solapament de pics que provoca que en les fraccions on es va detectar la proteïna TGZ15 per western blot (fraccions 30 a 37) hi hagués també presents multitud de proteïnes amb unions inespecífiques a la columna d'heparina (veure Figura 28).

Per tal de millorar la resolució de la separació, es va repetir la purificació en les mateixes condicions però baixant el flux a 1,5mL/min. D'aquesta forma es va passa a 100% de solució d'elució amb un gradient lineal de 80 minuts i es van recollir fraccions de 1,5mL.

A la Figura 29 es pot veure el perfil del cromatograma que es va obtenir en el FPLC per a la segona purificació amb columna d'heparina.

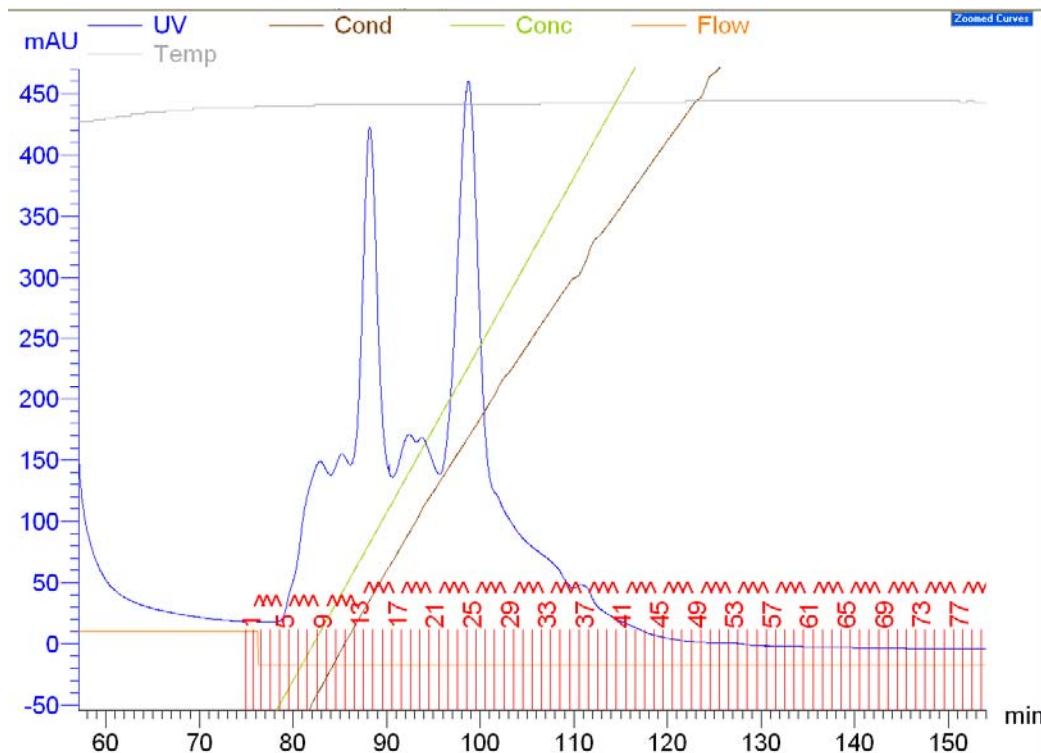
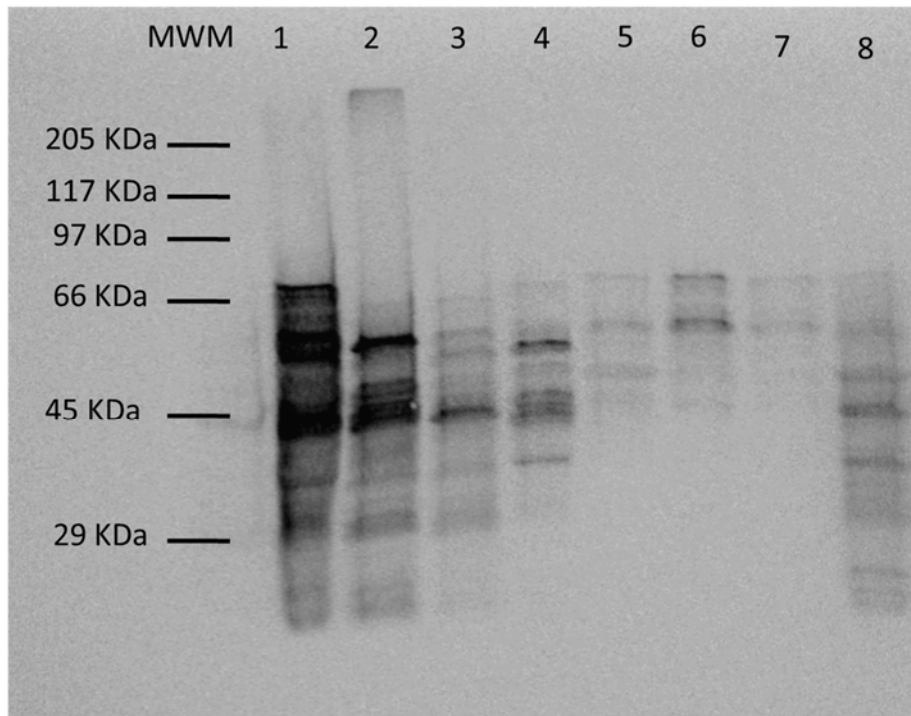


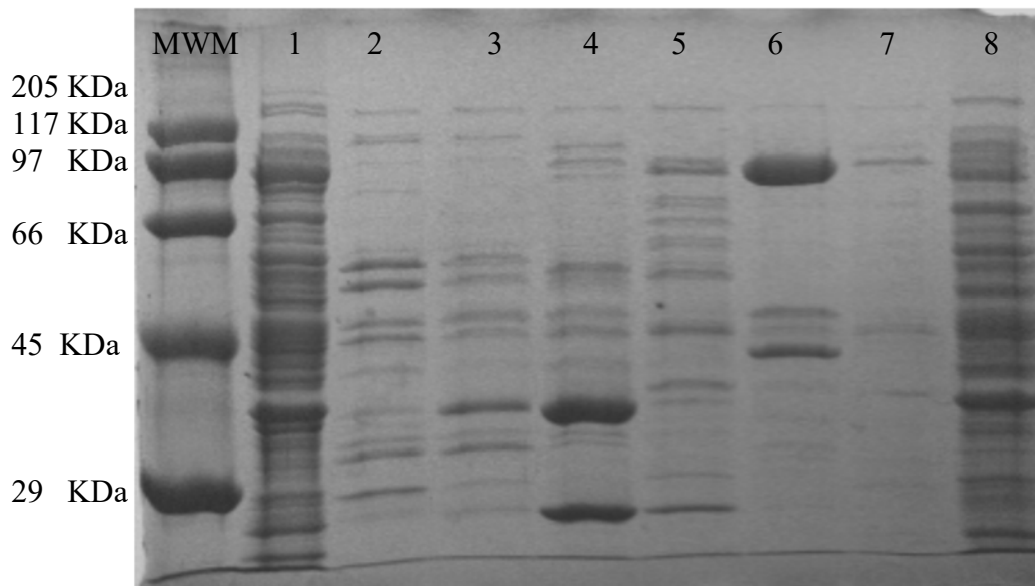
Figura 29 Perfil cromatogràfic de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.

A l'igual que en la purificació anterior, es van analitzar diverses fraccions de la purificació juntament amb el lisat original mitjançant western blot (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.4) i mitjançant SDS-PAGE (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.2). Concretament es van analitzar el lisat cru obtingut mitjançant B-Per II (mostra 1), la fracció de purificació número 9 (mostra 2), la fracció de purificació número 11 (mostra 3), la fracció de purificació número 14 (mostra 4), la fracció de purificació número 19 (mostra 5), la fracció de purificació número 24 (mostra 6), la fracció de purificació número 32 (mostra 7) i la fracció de la mostra que no es va adherir a la columna (mostra 8). El resultat de l'anàlisi es pot veure a la Figura 30 i Figura 31.



1: lisat 2: FPLC 9 3: FPLC 11 4: FPLC 14 5: FPLC 19
 6: FPLC 24 7: FPLC 32 8: FPLC flow through

Figura 30 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.



1:lisat 2: FPLC 9 3: FPLC11 4: FPLC 14 5: FPLC 19
 6: FPLC 24 7: FPLC 32 8: FPLC flow throuth

Figura 31 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la segona purificació de TGZ15 mitjançant columna d'heparina.

A la Figura 29 es pot veure que, amb els canvis introduïts en les condicions de separació al FPLC, van aconseguir resoldre molt millor els pics, tanmateix, com es pot veure a la Figura 30, aquestes noves condicions de purificació van provocar que la proteïna estigues molt més diluïda al llarg de les fraccions i no s'apreciés cap fracció amb una banda predominant de 66 KDa. El resultat de la anàlisi per SDS-PAGE va mostrar que les proteïnes amb unió inespecífica a la columna d'heparina seguien sent predominants a totes les fraccions motiu pel qual es va decidir de provar mètodes alternatius de purificació.

4.1.5.2 Afinitat (Níquel) i immunoprecipitació amb T7- Tag Affinity

Com a mostra de partida es va utilitzar la fracció soluble de TGZ15 produïda mitjançant una fermentació amb coexpressió de xaperones com la presentada a l'apart 4.1.3.3. La fracció soluble es va obtenir per extracció mitjançant B-Per II (procediment descrit a l'apartat 3.1.4.3).

El procediment de purificació per afinitat mitjançant columna de níquel està descrit a l'apartat 3.1.10.2 i el de purificació mitjançant anticossos T7 a l'apartat 3.1.10.3.

FPLC columna de níquel

A la Figura 26 es pot veure el perfil del cromatograma que s'obté en el FPLC.

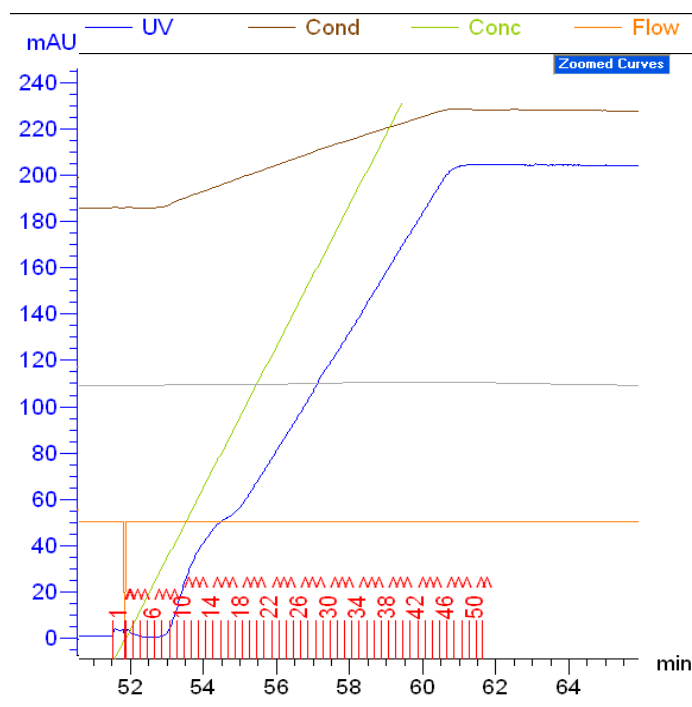


Figura 32 Perfil cromatogràfic de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.

Es van analitzar diverses fraccions de la purificació juntament amb el lisat original mitjançant western blot (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.4) i mitjançant SDS-PAGE (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.2). Concretament es va analitzar el lisat cru obtingut mitjançant B-Per II (mostra 1), la fracció de la mostra que no es va adherir a la columna (mostra 2), la fracció de purificació número 12 (mostra 3), la fracció de purificació número 15 (mostra 4), la fracció de purificació número 18 (mostra 5), la fracció de purificació número 22 (mostra 6), la fracció de purificació número 26 (mostra 7) i la fracció de purificació número 29 (mostra 8). El resultat de l'anàlisi es pot veure a la Figura 33 i Figura 34.

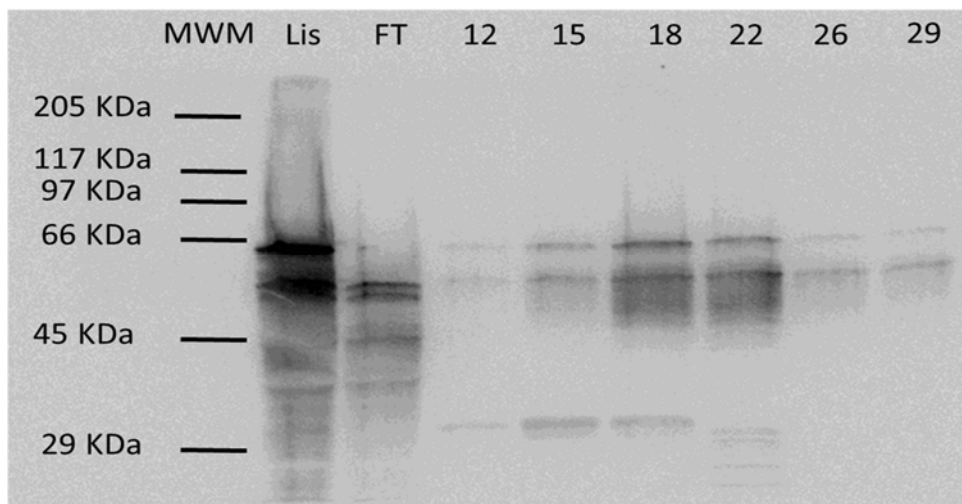


Figura 33 Resultat de l'anàlisi per western blot de les mostres seleccionades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.

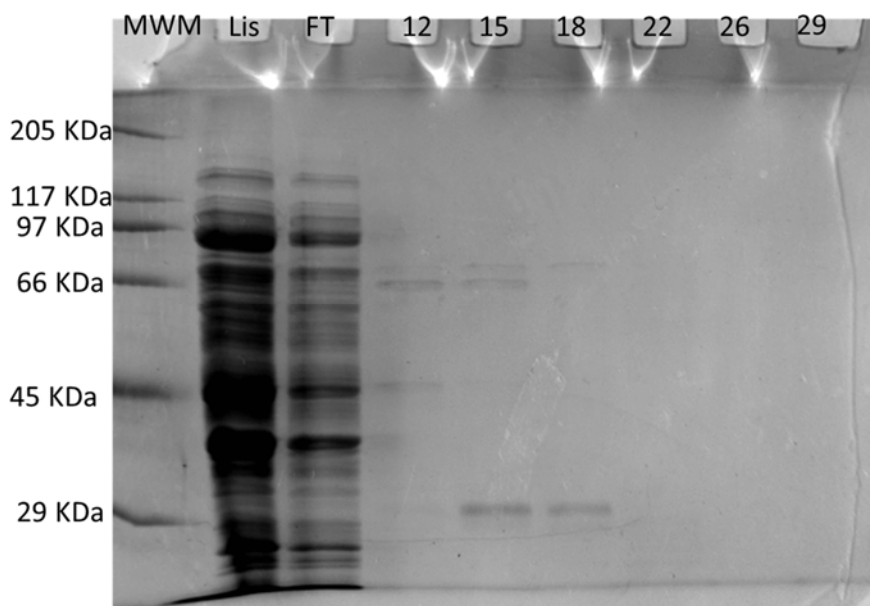


Figura 34 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les mostres seleccionades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna de níquel.

A la Figura 33 es pot veure que es detecta la proteïna amb una intensitat raonable en varies de les fraccions analitzades i al mateix temps, a la Figura 34 s'aprecia que aquestes fraccions contenen molt poques proteïnes amb unió no específica a la columna de níquel. Per tal de seguir purificant la mostra, es va decidir ajuntar les fraccions 14 a 31 i tractar-les amb una columna d'anticossos.

Immunoprecipitació T7-Tag affinity

Es van ajuntar les mostres des de la 14 fins a la 31 de la purificació amb columna de níquel i es va concentrar la solució resultant amb un Amicon fins a un volum final de un mil·lilitre. Aquesta mostra es va tractar amb el kit de purificació T7-Tag affinity segons està descrit a l'apartat 3.1.10.3. D'aquesta purificació en van resultar cinc fraccions (1 a 5) i la fracció que no es va adherir a la columna (FT) que es van analitzar per western blot i SDS-PAGE. També es van incloure a l'anàlisi el lisat cru (Lis) i la fracció concentrada de la purificació amb columna de níquel (Ni conc).

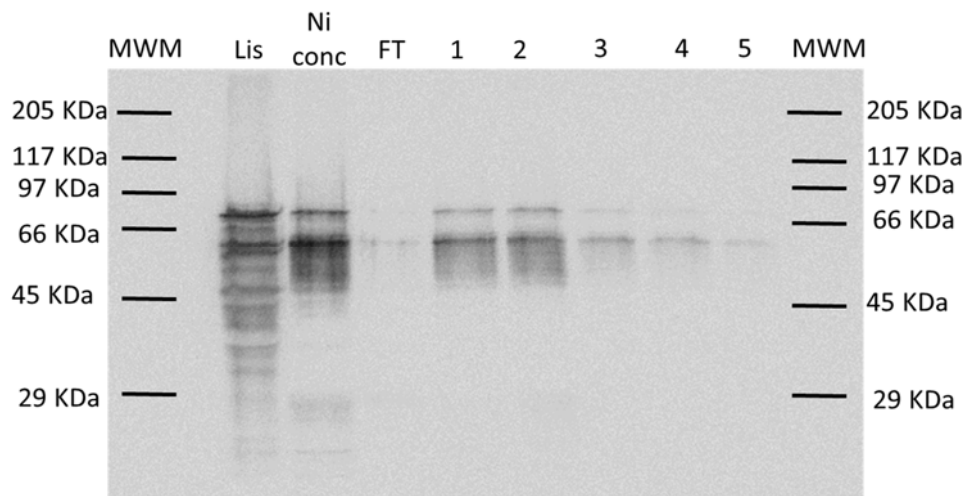


Figura 35 Resultat de l'anàlisi per western blot de les fraccions de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos.

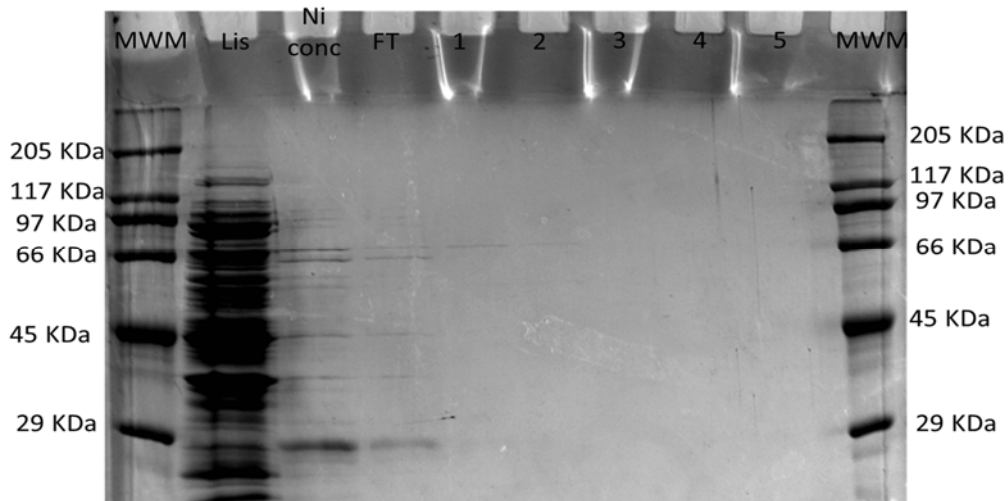


Figura 36 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE de les fraccions de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos.

A la Figura 48, corresponent al resultat de l'anàlisi per western blot, es pot veure que gairebé no hi ha senyal a la fracció de proteïnes que no s'han adherit a la columna (FT). En canvi, a les mostres de les diferents elucions, es va detectar proteïna TGZ a totes. El senyal va anar disminuint a mesura que es realitzaven elucions fins a gairebé no ser detectable a partir de la cinquena elució. A la Figura 36 es pot observar que no es detecten bandes d'altres proteïnes en les fraccions corresponents a les elucions amb el que la purificació va ser satisfactòria.

Per tal de comprovar que les bandes que es van detectar mitjançant western blot corresponien a la proteïna TGZ15, es va concentrar les 5 elucions de la columna d'anticossos fins a un volum de 600µL utilitzant un Amicon i es va analitzar el concentrat per Western Blot i SDS-PAGE. També es va incloure a l'anàlisi la fracció concentrada de la purificació amb la columna de níquel i el lisat cru original.

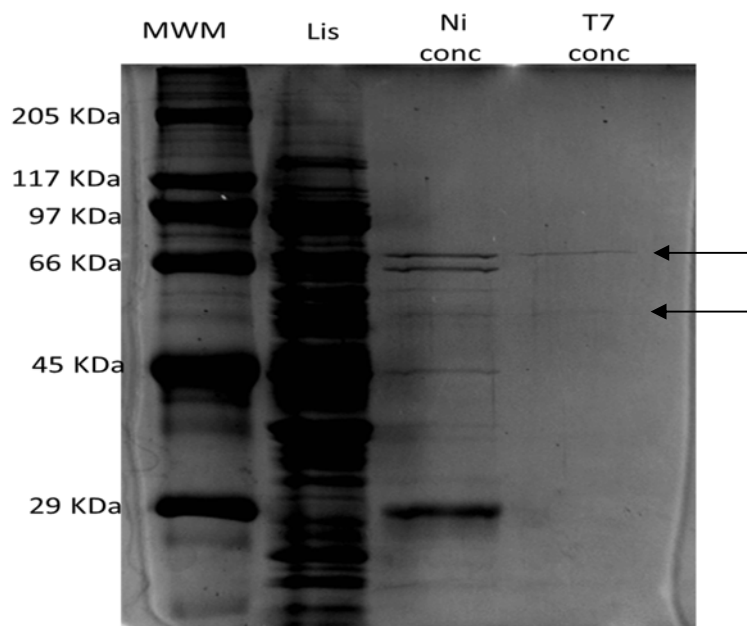


Figura 37 Resultat de l'anàlisi per SDS-PAGE les fraccions concentrades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos i la purificació mitjançant columna de níquel.

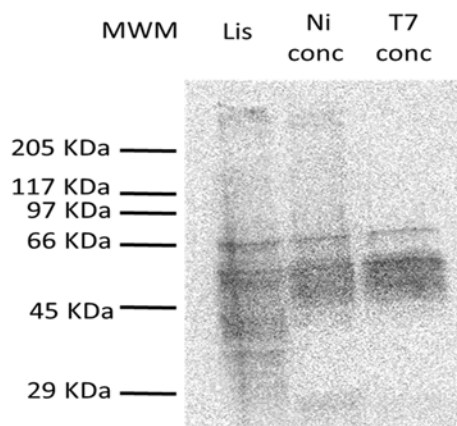


Figura 38 Resultat de l'anàlisi per western blot de les fraccions concentrades de la purificació de TGZ15 mitjançant columna d'anticossos i la purificació mitjançant columna de níquel.

A la Figura 38 es pot veure que a totes les fraccions es va detectar TGZ15 amb un patró similar. A la Figura 37 es pot apreciar el progrés de la purificació des del lisat cru, passant per la purificació amb columna de níquel fins arribar a la purificació final amb columna d'anticossos. En aquesta última fracció es pot veure que ja no es van detectar proteïnes apart de la TGZ15. Per tal de reconfirmar que la proteïna estava totalment purificada es van retallar les dues bandes marcades amb una fletxa i es van enviar a identificar al servei de

Proteòmica del Parc Científic de la Universitat de Barcelona, seguint la metodologia que es descriu a l'apartat 3.1.8.1.

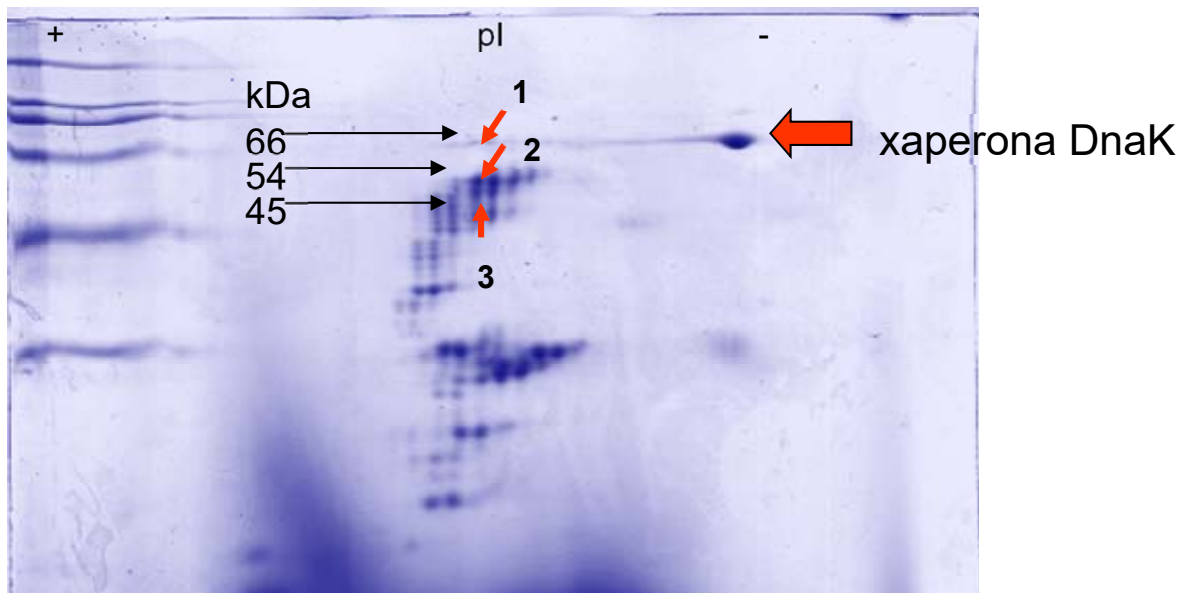
Els resultats dels anàlisis van mostrar que la banda superior (~66 KDa) va ser identificada com a una xaperona d'*Escherichia coli* (molecular chaperone DnaK *Escherichia coli* 0157:H7 EDL933) i que la banda inferior (~54 KDa) es va identificar com a la transglutaminasa de *Zea mays*, la proteïna d'interès (TGZ15). A la vista dels resultats es va decidir fer una electroforesi en 2D per tal de comprovar si la banda de 66 KDa, a més a més de la xaperona, tal i com indiquen els anàlisis de western blot, també contenia la proteïna TGZ15 emmascarada.

4.1.5.3 *Electroforesi 2D i identificació(PMF / MALDI-MS-MSMS)*

Per tal de separar la xaperona DnaK de la TGZ15, es va realitzar una electroforesi en dues dimensions.

Es va partir de la proteïna purificada per columna de níquel i columna d'anticossos obtinguda a l'apartat 4.1.5.2. Aquesta mostra es va analitzar per electroforesi en 2 dimensions tal i com es descriu a l'apartat 3.1.6.5. Un cop obtingut el resultat de l'electroforesi en dues dimensions, es va realitzar un western blot del mateix i es van identificar els punts en que es va obtenir senyal (1, 2 i 3). També es va identificar el punt majoritari ja que es creia que corresponia a la xaperona DnaK. La identificació es va fer al servei de Proteòmica del Parc Científic de la Universitat de Barcelona seguint la metodologia que es presenta a l'apartat 3.1.8.1.

El resultat de l'anàlisi es pot veure a la Figura 39.



1= TGZ15 completa (amb cua His en N-terminal). Detectada per AbT7 i AbTGZ15. Poc abundant.
 2= TGZ15 possible digestió proteasa de part del pèptid senyal. Només detecta TGZ15. Abundant.
 3= TGZ15 truncada. Només es detecta TGZ15. Possible degradació parcial. Present ja abans de purificar.

Figura 39 Resultat de l'anàlisi per electroforesi en dues dimensions de la mostra de TGZ15 purificada mitjançant columna de níquel i columna d'anticossos.

Els resultats de l'anàlisi i identificació del primer punt, de 66 KDa, van confirmar que en la purificació es va obtenir proteïna TGZ15 completa però que aquesta està associada a la proteïna DnaK. Aquesta última a més a més, es molt més abundant i emmascara a la primera. Pel que fa als altres dos punts, es van identificar com a fraccions truncades de la proteïna.

El segon punt, de 54 KDa, va ser detectat per l'anticòs AbTGZ però no l'AbT7. Això sembla indicar que hi ha hagut una digestió del pèptid senyal per part d'una proteasa. Aquesta fracció es la més abundant.

El tercer punt, d'aproximadament 45KDa, també va ser detectat per l'anticòs AbTGZ15 però no per l'AbT7. S'identifica com una degradació parcial de la proteïna TGZ15.

4.2 Expressió en *Pichia pastoris*

4.2.1 Transformació i selecció de clons

Seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.2.1.1, es va obtenir el plasmidi pPic9 amb una concentració de 207,9ng/μL.

Per tal de comprovar la presència del gen *tgz15* en el plasmidi purificat es va fer una reacció de amplificació per PCR utilitzant els encebadors d'una seqüència interna del gen descrits al apartat 3.2.6.3 de materials i mètodes. La mida esperada de la amplificació es de 340pb. El resultat de la reacció de PCR va ser el següent (Figura 40):

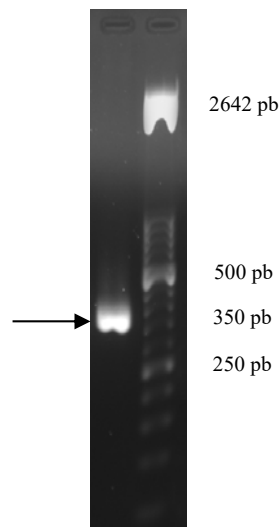


Figura 40 Resultat de l'amplificació del plasmidi pPIC9 + *tgz15* en gel d'agarosa al 2% amb bromur d'etidi.

A la Figura 40, com a resultat de l'amplificació del gen per PCR, es va obtenir una banda amb la mida esperada de 340 pb, confirmant que el gen *tgz15* estava present en el plasmidi.

La correcta linealització del plasmidi es va demostrar utilitzant un gel d'agarosa (protocols 3.1.2.2 i 3.1.2.3). A la Figura 41 es mostra el resultat de la linealització juntament amb una mostra amb el plasmidi sense digerir.

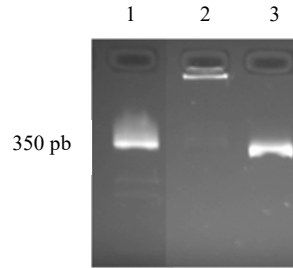


Figura 41 Gel d'agarosa al 2% del plasmidi linealitzat.
Al primer carril hi figura el marcador de pes molecular, al segon carril el plasmidi sense digerir (pPic-) i al tercer carril el plasmidi digerit amb l'enzim de restricció Sac1 (pPic+).

Es pot veure clarament com al segon carril on hi ha el plasmidi sense digerir, la mostra gairebé no va migrar del punt inicial, mentre que tercer carril, on hi ha la mostra digerida, es veu una única banda indicant que el plasmidi es va digerir correctament i no hi va haver cap tall en la zona de codificació de la TGZ15 que pogués interrompre la seqüència.

Un cop transformats i seleccionats per fenotip Mut⁺ (descriu a la introducció i a l'apartat 3.2.1.7) es van obtenir 10 clons candidats a ser utilitzats en l'expressió de TGZ15.

L'elecció preferent del fenotip Mut⁺ es deguda a que el seu cultiu en reactor es més senzill. L'addició de metanol a un cultiu amb fenotip Mut^s requereix d'un seguiment i control continu de la concentració i addició de metanol, ja que en l'operació fed-batch es molt fàcil superar el límit de toxicitat i matar a les cèl·lules. En canvi, tali com s'ha explicat en la introducció i es detalla al manual del fabricant¹⁶⁵, en els cultius amb cèl·lules Mut⁺, al metabolitzar aquests més ràpidament el metanol, es suficient amb estimar el consum que tindran les cèl·lules per no superar la concentració tòxica de metanol, fent molt més senzill el seguiment i control del procés.

Per tal de comprovar la qualitat del DNA obtingut per a cada clon, es va realitzar un gel d'agarosa del DNA genòmic tal i com es mostra a la Figura 41.

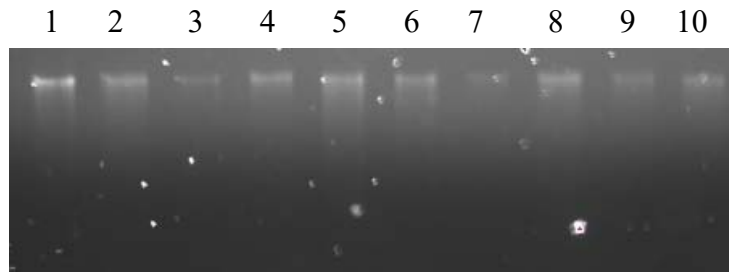


Figura 42 Gel d'agarosa al 1% on s'aprecia que no hi ha degradació en el DNA genòmic. Cada una de les bandes correspon a un dels clons seleccionats.

A la Figura 43 s'observa la comprovació per PCR de la presència del gen en cadascun dels clons (procediment descrit a l'apartat 3.1.2.2).



Figura 43 Gel d'agarosa al 1% on es comprova la correcta transformació de tots els clons.

La comprovació de la correcta i completa inserció del gen *tgz15*, realitzada mitjançant el procediment descrit a l'apartat 3.2.1.7, es mostra a la Figura 44.

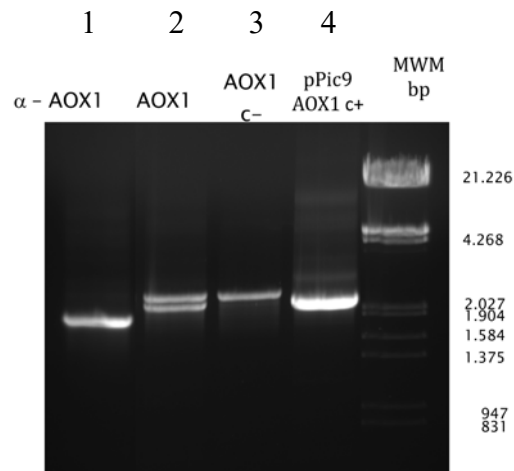


Figura 44 Bandes obtingudes en la reacció de PCR per a cada parella d'encebadors.

En el primer carril hi figura el producte de PCR utilitzant el DNA extret d'un dels clons amb el parell d'encebadors factor alfa com a envers i AOX1 com a revers. Es veu com s'amplifica una banda de 1820 pb que corresponent al pes del gen *tgz15* més el del factor alfa.

Al segon carril hi ha el producte de PCR obtingut utilitzant l'encebador AOX1 anvers i revers. Es pot veure com s'obtenen dues bandes. La banda superior de 2200 pb correspon al gen endogen AOX1 del llevat mentre que la inferior, de 2117 pb, correspon al pes esperat per al gen *tgz15* amb aquests encebadors. En el tercer carril hi ha el producte de PCR obtingut utilitzant l'encebador AOX1 anvers i revers sobre una mostra de DNA extreta de la soca GS115 sense transformar, es a dir representa un control negatiu. Tal i com era d'esperar es va obtenir una única banda de 2200bp corresponent al gen endogen AOX1. Al quart carril hi figura el producte de PCR obtingut utilitzant l'encebador AOX1 anvers i revers sobre una mostra del plasmidi pPic9 amb el gen *tgz15* inserit. Aquesta mostra representa el control positiu i es va obtenir la banda de 2117 pb esperada. Els resultats experimentals per tant, van coincidir amb els esperats.

Finalment la purificació i seqüenciació de la banda de 2117 pb del carril 2 segons el protocol descrit a l'apartat 3.2.1.5 va confirmar la correcta inserció del gen (la seqüència completa de *tgz15* es descriu a l'annex 6). Es va repetir el mateix procediment per a cadascun dels 10 clons obtenint-se el mateix resultat en tots els casos i per tant conclouent tots els clons havien estat correctament transformats.

Selecció de clons productors segons l'expressió de TGZ15

L'expressió en matrassos d'Erlenmeyer dels 10 clons amb fenotip Mut+, com està descrit a l'apartat 2.2.6, i posterior anàlisi de les mostres per SDS-PAGE, va permetre seleccionar els clons que presentaven una major producció de TGZ15. Els clons que van presentar més expressió van ser els clons 2, 4, 5, 7 i 8.

A la Figura 45 es pot veure el resultat de la tinció per Coomassie en gels SDS-PAGE de les mostres analitzades a diferents temps per a l'expressió del clon 8.

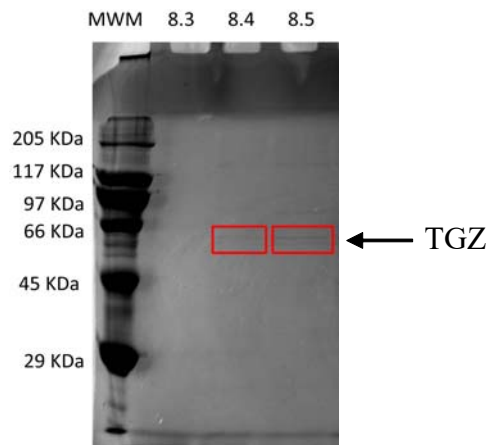


Figura 45 Resultat obtingut en una SDS-PAGE seguida de tinció de Coomassie d'una de les mostres del cultiu on s'aprecien bandes a l'alçada esperada.

L'anàlisi per western blot de les mostres amb una major banda per tinció de Coomassie va donar com a resultat que la mostra amb més expressió va ser la corresponent al clon 8 mostra 5 (Figura 46).

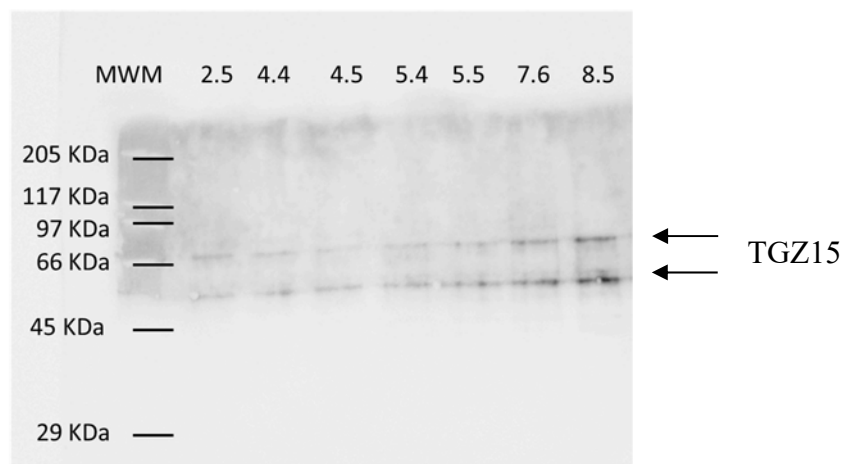


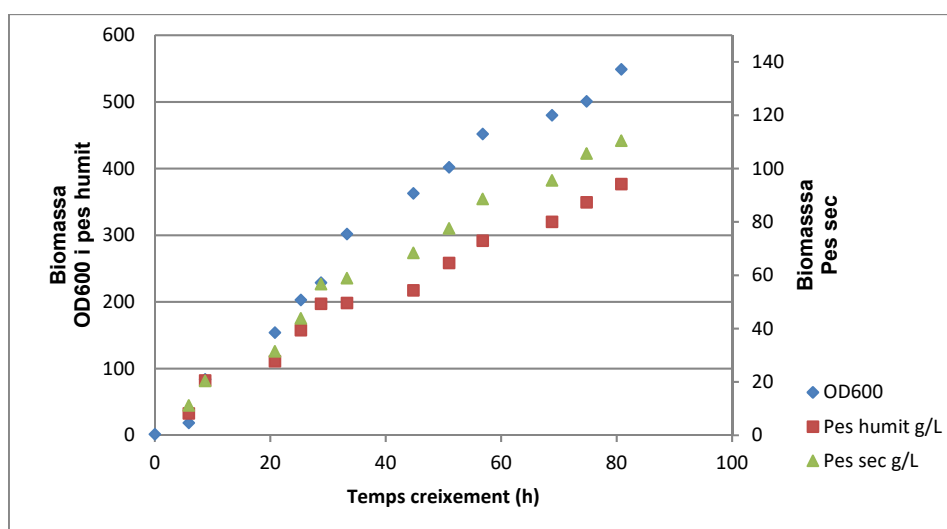
Figura 46 Identificació mitjançant Western Blot de TGZ15 expressada en una selecció de mostres.

Al igual que en el cas de l'expressió en *Escherichia coli*, en aquest cas també s'observen dues bandes que reaccionen amb l'anticòs abTGZ15. Tal i com ja s'ha indicat a l'apartat 4.1.3.6, una possible explicació de l'existència de dues bandes es que la banda de menor pes molecular correspon a una degradació parcial de la proteïna TGZ15.

4.2.2 Expressió de TGZ15 en un cultiu de *Pichia pastoris* a alta densitat en bioreactor

Un cop seleccionat el clon en que es va detectar una major expressió de la proteïna (clon 8), es va passar a escalar la producció a bioreactor de 7 L. El cultiu es realitza seguint el procediment descrit a l'apartat 3.2.4.2

A la Gràfica 35 es mostra l'evolució del creixement de *Pichia pastoris* en el bioreactor. El creixement inicial va ser exponencial durant la fase batch, seguidament es va observar un augment lineal de la concentració de biomassa durant tota la resta del procés de creixement microbià i expressió de la proteïna. No es va observar cap inhibició del creixement per acumulació del producte (TGZ15) durant tota la fase de creixement.

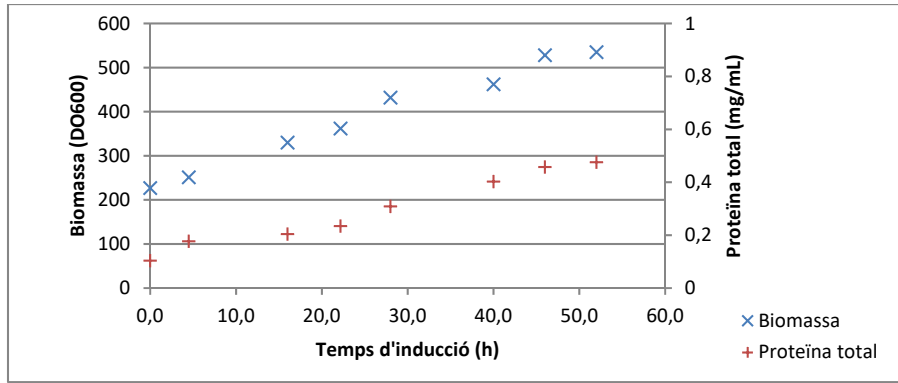


Gràfica 35 Evolució de la concentració de biomassa amb el temps.

4.2.3 Quantificació de la producció i activitat de la proteïna

Les mostres analitzades a diferents tems d'expressió (0, 4,5, 16, 22, 28, 40, 46 i 52 hores d'inducció) va demostrar que la concentració de la proteïna soluble total excretada al medi de cultiu s'incrementa conforma avança el temps d'inducció. L'evolució de la concentració de biomassa i l'acumulació de proteïna extracel·lular es poden veure a la Gràfica 36.

La concentració de proteïna soluble total que s'acumula durant el procés d'inducció va ser proporcional a la concentració de biomassa.



Gràfica 36 Evolució de la concentració de biomassa i proteïna excretada amb el temps.

Els assajos de SDS-PAGE i Western blot (protocols descrits als apartats 3.1.6.2 i 3.1.6.4) de les mostres de medi de cultiu, van mostrar la presència de TGZ15 així com una tendència a augmentar la quantitat de la mateixa en el temps, presentat un màxim de concentració entre les 28 i 46 hores d'inducció (Figura 47 i Figura 48).

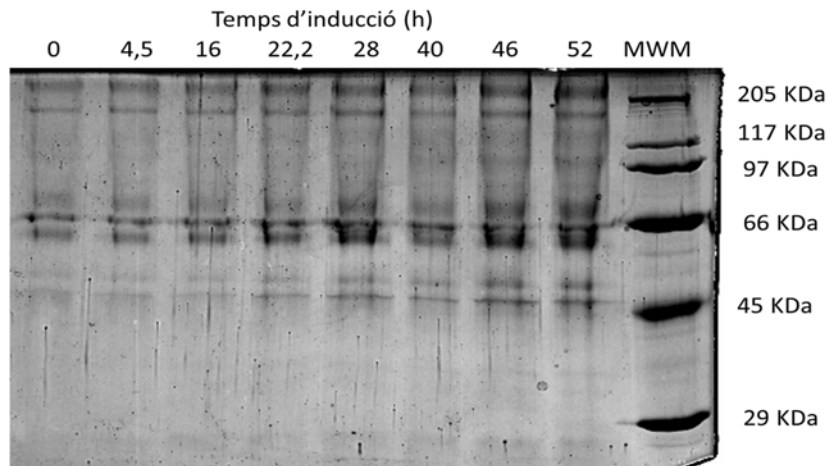


Figura 47 Electroforesi SDS-PAGE i tinció amb blau de Coomassie de la proteïna produïda al llarg del temps.

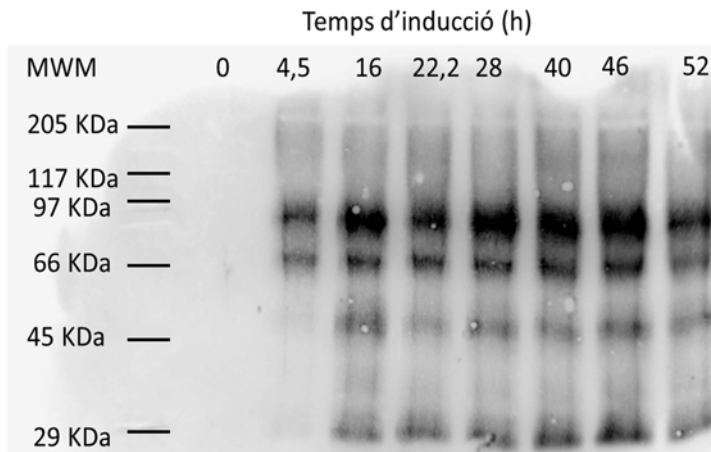


Figura 48 Immunodetecció per Western blot de TGZ15 expressada al llarg del temps.

A la Figura 48 es pot veure com, a més a més d'observar les bandes de TGZ15 esperades a 66KDa y 45KDa, apareix una banda a 90KDa. Per tal de comprovar si es tracta efectivament de TGZ15 o d'una reacció inespecífica de l'anticòs es va realitzar a la mostra persa a les 28h d'inducció un anàlisi per electroforesi en 2D (dues dimensions) ja que aquest permet separar proteïnes del mateix pes molecular.

En l'anàlisi electroforètic en 2D (procediment descrit a l'apartat 3.1.6.5) revelat per Coomassie i el seu corresponent anàlisi per Western blot (Figura 49 i Figura 50 respectivament) no es va detectar cap punt intens a l'alçada de 90 KDa, sent la única senyal majoritària la de 66KDa.

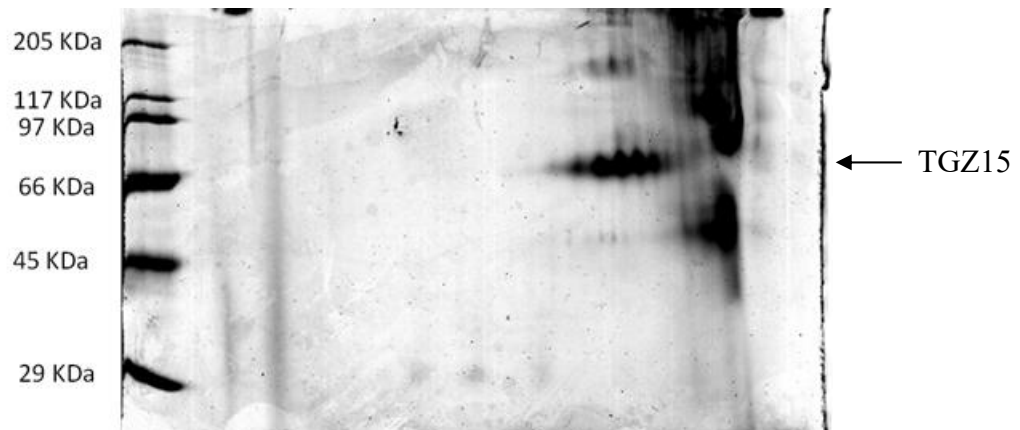


Figura 49 Electroforesi bidimensional amb blau de Coomassie de la proteïna produïda a les 28 hores d'inducció.

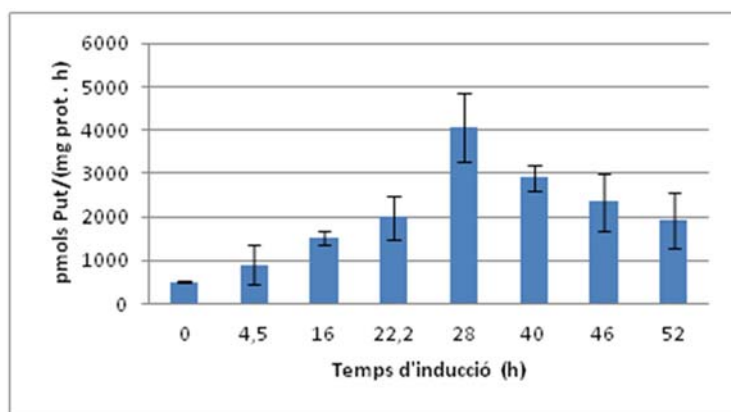


Figura 50 Western blot de l'electroforesi bidimensional de la proteïna produïda a les 28 hores d'inducció.

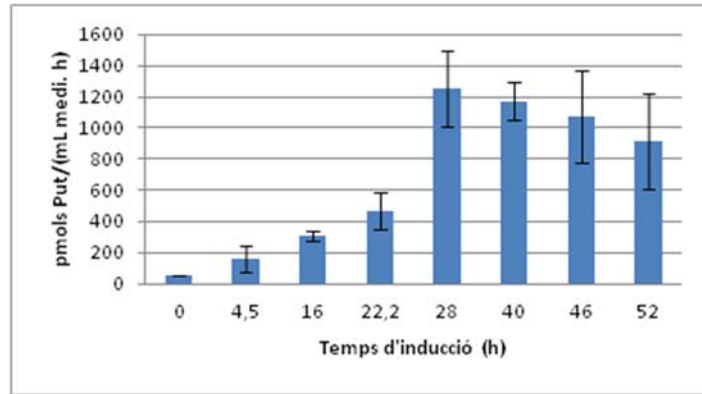
Determinació de l'activitat TGasa

L'assaig colorimètric d'activitat (protocol 3.1.7.1) de que es disposa per mesurar l'activitat transglutaminasa no va poder ser aplicat a les mostres obtingudes, ja que aquestes presenten una coloració verdosa que interfereix la mesura espectrofotomètrica. Degut a aquest problema, es va utilitzar el mètode radioactiu de mesura d'activitat transglutaminasa (protocol 3.1.7.2).

Els resultats de l'assaig realitzat a les mostres col·lectades durant el creixement en bioreactor, van mostrar que l'activitat transglutaminasa en el medi de cultiu augmentava a partir de l'addició de metanol al medi, arribant a un màxim a les 28 hores d'inducció. Aquest màxim es va donar tant des del punt de vista de l'activitat total present en el medi de cultiu com per a l'activitat de la proteïna respecte a la proteïna total en el medi (Gràfica 37 i Gràfica 38). A partir d'aquest punt, l'activitat específica de la proteïna va començar a decreixer ràpidament, mentre que l'activitat total per unitat de volum va decreixer més lentament. Una possible explicació a aquest fet es que la proteïna TGZ15 es continuava excretant i per tant acumulant-se en el medi de cultiu.



Gràfica 37 Activitat TG de varies mostres respecte als mil·ligrams de proteïna total.



Gràfica 38 Activitat TGasa de les mostres per ml de medi.

Degut a que *Pichia pastoris* es un organisme considerat GRAS i les aplicacions previstes per a la TGZ15 son eminentment alimentaries, no es considera necessari purificar la proteïna per a la seva utilització en els seus substrats més comuns.

Durant el procés de redacció d'aquest document, han estat publicats dos treballs que confirmen la utilització de *P. pastoris* com a hoste viable per a la producció de TGZ⁴⁴ així com al seu potencial us en la indústria alimentaria¹⁹². Els resultats respecte a l'activitat enzimàtica obtinguda no han pogut ser comparats ja que s'utilitza el mètode colorimètric de l'hidroxiamat, mètode que, com s'ha indicat anteriorment, no ha estat possible aplicar en aquest treball degut a l'aparició interferències.

4.2.4 Expressió del gen *tgz15* mesurada per RT-qPCR

Es planteja la quantificació de l'expressió del gen *tgz15* a través de RT-qPCR que permetrà determinar si l'expressió de la proteïna heteròloga presenta limitacions a nivell d'expressió gènica o transcripcional. Per aquest propòsit es van utilitzar les mostres obtingudes a l'experiment d'expressió en bioreactor (apartat 4.2.2) a les 0, 4, 5, 16, 22, 28, 40, 46 i 52 hores d'inducció.

Els nivells d'expressió gènica es poden mesurar de manera relativa o absoluta. En aquesta tesi es va seguir el mètode de quantificació relativa ja que aquesta no requereix d'estàndards de concentració determinada i la referència pot ser qualsevol transcrit de seqüència coneguda.

La quantificació relativa es basa en els nivells d'expressió del gen d'interès en relació a un gen de referència i en la majoria de casos es adient per a determinar els canvis en els nivells d'expressió gènica.

Després de buscar a la bibliografia entre tots els possible candidats a ser utilitzats con a gens de referència que permetessin validar la quantificació de l'expressió del gen *tgz15*, es van seleccionar els gens ACT1 i GAP seguint diversos criteris entre els que destaquen la mida de la seqüència a amplificar, la disponibilitat en el laboratori i que el % d'identitat amb la seqüència d'interès (*tgz15*) fos baixa.

Per a la validació d'aquests gens de referència es van utilitzar mostres obtingudes en matràs d'Erlenmeyer mitjançant el protocol descrit a l'apartat 3.2.3 utilitzant el clon 8 amb 2,5 dies d'inducció.

A la Figura 51 es mostra el resultat de l'amplificació dels gens de referència en un gel d'agarosa. Es va obtenir una única banda d'amplificació per els dos gens avaluats i les bandes obtingudes es corresponen a la mida esperada pel disseny dels encebadors, 98pb per a GAP i 181pb per a ACT1.

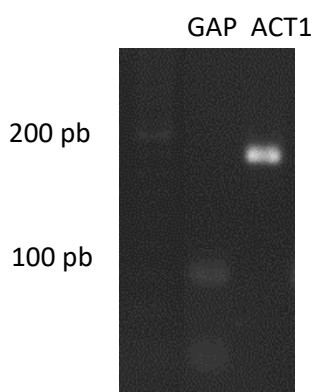


Figura 51. Bandes d'amplificació en gel d'agarosa dels gens de referència utilitzats, GAP i ACT1.

Després de provar ambdós gens de referència, es va determinar que el que millor s'adaptava a les condicions experimentals era el gen ACT1 ja que s'obtenia un senyal més intens i un pes molecular més distant al del fragment d'amplificació de *tgz15* (81pb).

Un cop determinat el gen de referència es va procedir a realitzar la determinació d'expressió sobre les mostres de *tgz15* als diferents temps d'inducció.

Les corbes d'amplificació obtingudes (Figura 52) mostren un únic pic, cosa que confirma l'especificitat dels encebadors dissenyats i valida els gens de referència utilitzats així com el protocol d'amplificació.

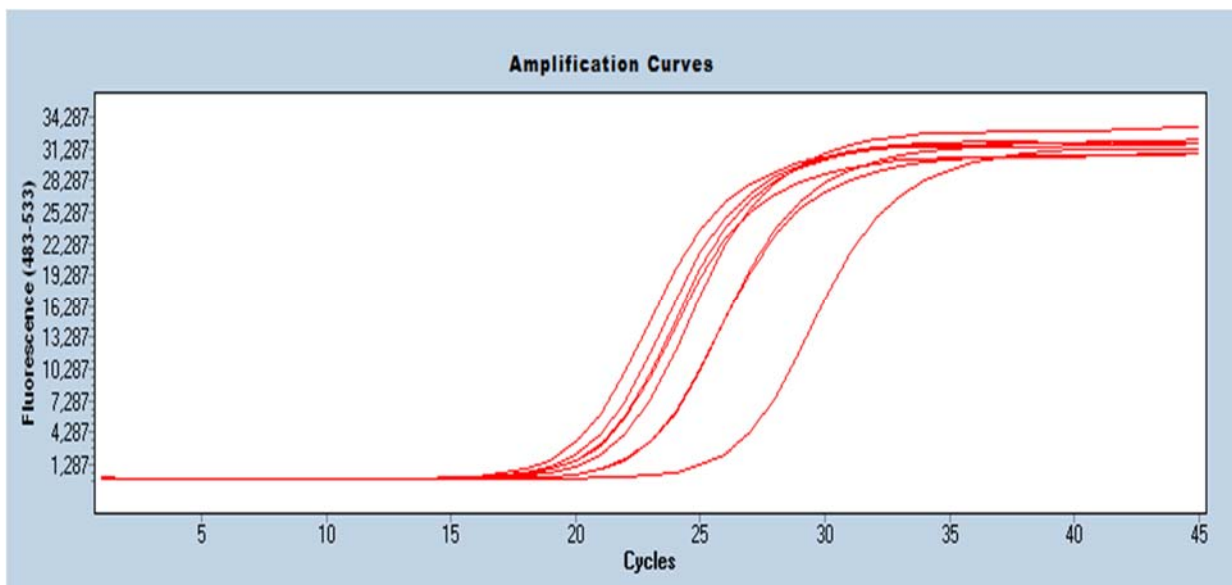
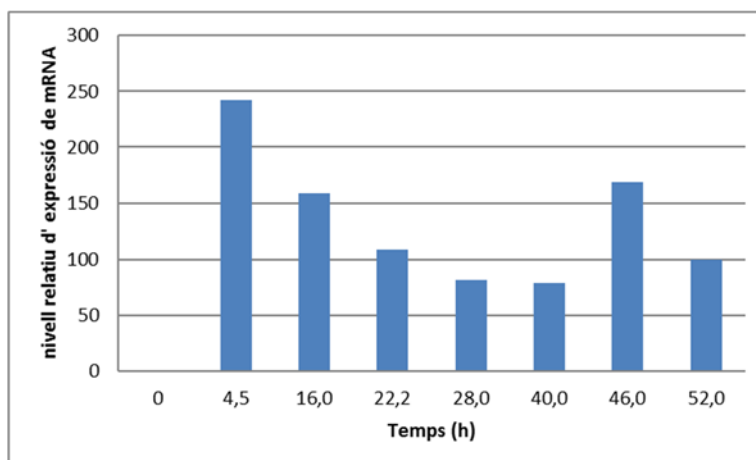


Figura 52 Corbes d'amplificació obtingudes per a les mostres d'expressió de *tgz15* a diferents temps d'inducció

A partir dels valors CT corresponents per a cada una de les mostres, es va calcular l'expressió gènica relativa. Per tal de calcular aquesta relació existeixen dos models tipus de models matemàtics. Els primers no tenen en compte la correcció per eficiència i els altres si que la tenen en compte¹⁷¹. El criteri per a utilitzar un o altre es si el gen d'interès i el de referència tenen una eficiència semblant o no. Si l'eficiència es diferent, aquesta s'haurà de tenir en compte en el model.

Els resultats van mostrar altes taxes d'eficiència. Les dades en brut del programa PCR LightCycler 1.5.0 es van utilitzar en l'anàlisi. Es van analitzar les corbes d'amplificació utilitzant el segon mètode màxim de la derivada^{168,171}. Els punts d'encreuament (Cp, punt en el qual la fluorescència puja apreciablement per sobre de la fluorescència de fons) van ser determinats per a cada corba. L'especificitat dels productes qPCR van ser verificats pels perfils de corbes de fusió. No es van detectar dímers d'encebadors i el producte de l'amplificació va ser únic i específic.

A la Gràfica 39 es mostra l'expressió del gen *tgz15* durant diferents temps d'inducció en el cultiu en bioreactor.



Gràfica 39 Expressió del gen *tgz* durant diferents temps d'inducció en reactor.

S'observa que el màxim d'expressió gènica es troba a les 4,5 h d'haver començat la inducció, això es degut a que com a resposta a l'addició de metanol al medi s'activa el gen AOX1 i per tant es produeix una gran quantitat de mRNA per tal d'adaptar la maquinaria metabòlica de la cèl·lula a la nova font de carboni. Degut a que el gen AOX1 s'utilitza com a promotor de l'expressió del gen *tgz15*, es genera també una gran quantitat de mRNA de *tgz15*. La mesura de l'expressió del gen baixa durant les següents hores, probablement degut a que el mRNA s'utilitza durant el procés de traducció a proteïna TGZ15. La concentració del mRNA segueix baixant fins arribar a un mínim a les 40h, que coincideix amb el període de temps (28-40h d'inducció) en que hi ha el màxim de concentració de l'enzim en el medi de cultiu (veure resultats d'expressió de la proteïna a la Gràfica 36 i anàlisi per Western Blot a la Figura 48 de apartat 4.2.3.). A partir d'aquest hi ha una pujada en la concentració del mRNA, probablement degut a que la cèl·lula segueix metabolitzant metanol i torna a expressar el gen AOX1. Finalment el nivell d'expressió relativa torna a baixar degut a que el mRNA es segueix consumint en el procés de traducció a proteïna.

A la vista dels resultats, es pot afirmar que no s'observen limitacions de l'expressió de la proteïna degudes a l'expressió gènica o transcripcional.

4.3 Comparació entre els sistemes d'expressió heteròloga d'*Escherichia coli* i *Pichia pastoris*

Durant les passades dècades, s'ha utilitzat majoritàriament el bacteri *E. coli* com a hoste cel·lular per a l'expressió de proteïnes. Tanmateix, l'amplíssima aplicació d'aquest sistema amb proteïnes derivades de genomes eucariotes, que necessiten modificacions post traduccional, ha sigut problemàtica ja que aquest microorganisme li manca la maquinaria cel·lular necessària per a dur-les a terme. L'èxit en l'expressió de proteïnes recombinants en *E. coli* depèn per tant de les característiques funcionals, i per tant, de la estructura primària, secundària i terciària de la proteïna d'interès¹²⁰. Això provoca una gran quantitat de proteïnes no puguin ser expressades en *E. coli* a nivell de maduració postraduccional i han hagut de ser expressades en el llevat metilotròfic *P. pastoris*¹⁹³ entre d'altres. Per tot lo dit anteriorment, el sistema d'expressió de *P. pastoris* ofereix avantatges significatives per a l'expressió de moltes proteïnes heteròlogues d'origen eucariota. Els llevats com *P. pastoris* tenen alguns dels avantatges propis d'*E. coli*, com ara temps de replicació curts i una manipulació àmpliament coneguda i senzilla del genoma. A més a més, té els avantatges de ser un organisme eucariota incloent un millor replegament i realització de modificacions postraduccional de les proteïnes¹⁹⁴.

En aquest treball, on s'han utilitzat ambdós sistemes d'expressió, s'han pogut constatar varis dels avantatges i inconvenients descrits:

- Pel que fa a tècniques de biologia molecular, es disposa d'eines suficients en ambdós sistemes d'expressió i el nivell de complexitat es similar. Tot i això, en els sistemes d'expressió concrets amb que s'ha treballat, la transformació obtinguda mitjançant plasmidis en *E. coli* pot ser inestable, sent necessari obtenir nous transformats periòdicament. En canvi, en el cas de *P.pastoris*, al produir-se una recombinació genètica integrada a l'ADN genòmic, es forma un clon genèticament molt més estable.

- Tal i com es pot veure als apartats 4.1.4 i 4.2.2, ambdós sistemes d'expressió permeten arribar a altes densitats cel·lulars i el medi de cultiu necessari es senzill i econòmic en el dos casos.
- Ambdós sistemes d'expressió permeten separar la fase de creixement de la d'expressió mitjançant un inductor. La transcripció de la proteïna heteròloga en ambdós sistemes, està fortament regulada i controlada per un mecanisme de repressió/derepressió.
- La fase de creixement del cultiu d'*E. coli* i de *P. pastoris* es relativament senzilla encara que en el primer cas s'ha de controlar l'adició de substrat per tal de mantenir la velocitat específica de creixement per sota de la crítica i evitar la formació d'acetat (que s'ha comprovat al laboratori que es un factor limitant important de la densitat cel·lular màxima que es pot obtenir).
- Pel que fa als inductors, l'IPTG es un inductor no metabolitzable, que per tant no es imprescindible afegir-lo contínuament, però si que requereix de la presència d'una font de carboni. El metanol per la seva banda, es un inductor metabolitzable que s'ha d'afegir contínuament. El procés requereix per tant, de l'adició controlada de dues fonts de carboni que han de ser intercanviades en un moment precís. Aquest fet augmenta la complexitat del sistema de control²⁰⁶. El seguiment de la concentració de metanol durant el procés d'inducció de *P. pastoris* pot ser difícil degut a la poca fiabilitat dels sensors en línia i la complexitat del seguiment mitjançant mesures externes¹⁹⁵. L'anterior s'ha comprovat al laboratori on una dosificació inadequada de metanol provoca la mort del cultiu per toxicitat. El metanol es un compost inflamable i per tant no es desitjable emmagatzemar-lo en grans quantitats¹⁹⁵. L'IPTG presenta un desavantatge econòmic degut al seu elevat cost.
- Pel que fa la seguretat per a us alimentari, pot ser que les proteïnes produïdes en *E. coli* continguin endotoxines com a impuresa i no és un sistema d'expressió GRAS (generaly recognised as safe) amb el que serà

necessari un control rigorós de la presència de determinats components de l'hoste en el producte final. *P. pastoris* per la seva banda, es un microorganisme GRAS i per tant, pot ser utilitzat en la indústria alimentaria sense problema.

- S'ha pogut comprovar que, tal i com s'ha descrit en treballs anteriors¹³⁹, la major part de la proteïna recombinant produïda en *E. coli* s'ha expressat intercel·lularment en forma de cossos d'inclusió. S'ha comprovat la possibilitat d'obtenir proteïna activa d'aquests cossos d'inclusió mitjançant el replegament, encara que el rendiment obtingut ha sigut baix i el procediment es lent i tediós^{63,196}. Tanmateix s'ha demostrat que es possible obtenir proteïna soluble i activa d'aquets cossos d'inclusió sense haver de realitzar el procediment de replegament sent una alternativa atractiva al procediment tradicional. En el cas de la proteïna expressada en *P. Pastoris*, aquesta s'allibera al medi de cultiu en forma soluble degut a les característiques del sistema d'expressió.
- L'obtenció de quantitats significatives de proteïna soluble i activa per a la seva purificació i caracterització ha estat només possible en el cas de *E. coli* ja que el nivell d'expressió en *P. pastoris* no ho ha permès. Tot i això, cal destacar per la proteïna expressada en *P. pastoris* no requereix d'un alt grau de purificació per haver estat expressada en un organisme GRAS.
- L'activitat específica observada en les fraccions solubles de la proteïna ha estat molt superior en el cas de *P.pastoris*, el que representa un avantatge en el cas d'us industrial.

5 Conclusions

S'ha aconseguit millorar el sistema de producció de TGZ15. L'increment de rendiment aconseguit, ha permès profunditzar en la caracterització bioquímica d'aquest enzim.

Disseny del medi de cultiu:

- S'ha comprovat l'aplicabilitat de la metodologia de Taguchi al disseny d'un medi de cultiu, arribant a formular un medi per al cultiu d'*E. coli*.
- Les fonts de carboni i de fòsfor més convenients per a les condicions provades són la glucosa i l'ortofosfat. Els factors que més influencia tenen en la formació de biomassa són les concentracions de ferro, de magnesi, de nitrogen i els elements traça.
- S'ha establert la concentració més adequada per als diversos components del medi de cultiu i s'ha comprovat que la presència d'antiespumant no afecta negativament el creixement del microorganisme.
- Les interaccions entre els factors estudiants han resultat no ser importants per a la formulació del medi.

Expressió en *Escherichia coli*

- S'han obtingut cèl·lules transformants d'*E. coli* BL21 (DE3) que contenen el plasmidi pet-28 amb el gen *tgz15* clonat. S'ha comprovat que la seqüència insertada en el plasmidi esta completa.
- Les condicions de cultiu e inducció d'*Escherichia coli* s'han optimitzat per tal de maximitzar la producció de TGZ15.
- La proteïna TGZ15 ha estat expressada en forma activa en cultius en matràs d' Erlenmeyer tant en la fracció soluble con insoluble (en forma de cossos d'inclusió).
- S'ha quadruplicat la producció de proteïna TGZ15 soluble mitjançant la coexpressió de xaperones, mantenint l' activitat específica de la proteïna.

- S'ha desenvolupat un sistema d'obtenció de TGZ15 soluble i activa a partir de cossos d'inclusió de TGZ15 utilitzant detergents no desnaturalitzants i sense la necessitat de realitzar operacions de replegament.
- La producció de TGZ15 ha estat escalada a bioreactor de 7L, augmentant la concentració cel·lular 20 vegades respecte a la producció en matràs i sense perjudicar el rendiment.
- S'ha ajustat i caracteritzat un model matemàtic per la simulació del creixement d'*Escherichia coli*.
- S'ha purificat la proteïna TGZ15 fins als nivells desitjats per a la seva caracterització.
- S'ha dut a terme un procés complet de caracterització de la proteïna TGZ15.

Expressió en *Pichia pastoris*

- S'han obtingut cèl·lules de *Pichia pastoris* transformants que contenen el plasmidi Ppic9 amb el gen *tgz15* clonat.
- S'ha seleccionat el clon més productiu y s'ha escalat la producció a bioreactor de 7L satisfactòriament.
- La comparativa entre ambdós sistemes d'expressió ha demostrat que, per tal d'obtenir alts rendiments de proteïna amb un grau de puresa que permeti caracteritzar-la, *E. coli* es la millor opció. Pel que fa a la producció destinada al sector industrial, el sistema de *P. pastoris* presenta avantatges significatius com ara una major activitat enzimàtica específica i ser un organisme GRAS.

6 Annexos

6.1 Annex 1. Preparació dels medis de cultiu utilitzats

Tots els medis de cultiu es preparen en medi aquós.

6.1.1 Medis utilitzats en el cultiu d'*Escherichia coli*

LB

Extracte de llevat	5g/L
Triptona	10g/L
NaCl	10g/L

S'ajusta el pH a 7,5 amb NaOH 1M

SOB

Extracte de llevat	5g/L
Triptona	20g/L
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl ₂	10mM
MgSO ₄	10mM

S'ajusta el pH a 7 amb NaOH 1M.

BIOTIQS Coli

KH ₂ PO ₄	6,70g/L
NH ₄ Cl	3,40g/L
Àcid cítric	8,00g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,70g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,70g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,35g/L
Dissolució traces (TE)	67mL/L

S'ajusta el pH a 7 amb NaOH sòlid.

Dissolució traces (TE)

CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,04g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,27g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05g/L
NaB ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,08g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,04g/L
ZnCl ₂	0,21g/L

Ajustar el pH a 2 amb HCl 10N.

Alimentació fed batch BIOTIQS Coli

Dissolució d'elements Traça BIOTIQS Coli TE	66,89 ml
Afegir aigua desionitzada fins a un volum aproximat de	300mL
MgSO ₄ ·6H ₂ O	20 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,670 g
Àcid Cítric	8 g
Ajustar a pH 6.8 amb NaOH 10N	
Glucosa (afegir poc a poc i escalfar a entre 50 i 60°C)	700 g/L

Antibiòtics utilitzats en el cultiu d'*Escherichia coli*

- Kanamicina

Preparar a 30mg/ml en aigua desionitzada. Esterilitzar per filtració. Guardar a -20°C. Utilitzar a 30µg/mL.

- Cloramfenicol

Preparar a 34 mg/mL en etanol. Esterilitzar per filtració. Guardar a -20°C. Utilitzar a 34µg/mL.

6.1.2 Medis utilitzats en el cultiu de *Pichia pastoris*

Solució mare 10X YNB (13,4% base nitrogenada de llevat amb sulfat d'amoni sense aminoàcids)

Dissoldre 134 g de base nitrogenada de llevat (YNB) amb sulfat amònic i sense amino àcids en 1000 ml d'aigua i esterilitzar per filtració . Pot ser necessari escalfar la solució per dissoldre completament els reactius.

Emmagatzemar a 4°C. Alternativament , fer servir 34 g de YNB sense sulfat amònic i sense aminoàcids i 100 g de sulfat d'amoni . La vida útil d'aquesta solució és d'un any .

500X B (0,02% Biotina)

Dissoldre 20 mg de biotina en 100 ml d'aigua i esterilitzar per filtració . Emmagatzemar a 4°C. La vida útil d'aquesta solució és d'aproximadament un any .

100X H (0,4% Histidina)

Dissoldre 400mg de L- histidina en 100ml d'aigua . Escalfar la dissolució , si cal , a no més de 50°C per tal de dissoldre tota la histidina . Esterilitzar per filtració i emmagatzemar a 4°C. La vida útil dels aquesta solució és d'aproximadament un any .

D 10X (20% de dextrosa)

Dissoldre 200 g de D- glucosa en 1.000 ml d'aigua . Esterilitzar a l'autoclau durant 15 minuts o esterilitzar per filtració . Guardar a temperatura ambient . La vida útil d'aquesta solució és d'aproximadament un any .

M 10X (5% metanol)

Afegir 5 ml de metanol i enrasar a 100 ml amb aigua . Esterilitzar per filtració i emmagatzemar a 4°C. La vida útil d'aquesta solució és d'aproximadament dos mesos .

GY 10X (10% de glicerol)

Afegir 100ml de glicerol i enrasar a 1000mL amb aigua . Esterilitzar ja sigui per filtració o a l'autoclau .

Guardar a temperatura ambient. La vida útil d'aquesta solució és superior a un any.

100X AA (0,5% de cada aminoàcid)

Dissoldre 500mg de cadascun del següents aminoàcids: àcid L- glutàmic , L- metionina , L- lisina , L- leucina , i L- isoleucina en 100ml d'aigua . Esterilitzar per filtració i emmagatzemar a 4°C. La vida útil d'aquest solució és d'aproximadament un any .

Tampó fosfat de potassi 1M

Barrejar 132ml de K_2HPO_4 1M amb 868 ml de KH_2PO_4 1M i confirmar que el pH sigui $6,0 \pm 0,1$ (si el pH ha de ser ajustat , utilitzar àcid fosfòric o KOH) . Esterilitzar a l'autoclau i emmagatzemar a temperatura ambient . La vida útil d'aquesta solució és superior a un any .

Medi complex amb glicerol tamponat (BMGY) i medi complex amb metanol tamponat (BMMY)

Composició per litre:

1% extracte de llevat

2% peptona

100 mM fosfat de potassi, pH 6,0

1,34% YNB

4 x 10⁻⁵% biotina

1% glicerol o 0,5% metanol

Preparació:

1. Dissoldre 10 g d'extracte de llevat i 20 g de peptona en 700 ml d'aigua desionitzada.

2. Autoclavar 20 minuts en cicle líquid.

3. Deixar refredar a temperatura ambient, afegir els següents components i barrejar bé:

- 100 ml de fosfat potàssic 1 M a pH 6.0

- 100 ml de 10X YNB

- 2 ml 500X B

- 100 ml de 10X GY

4. Per la preparació de BMMY, afegir 100ml de 10X M en comptes de glicerol.

5. Guardar el medi a 4°C. La caducitat d'aquest medi es d'aproximadament dos mesos.

Medi d'extracte de llevat, peptona i glucosa (YPD)

Composició per litre:

1% extracte de llevat

2% peptona

2% glucosa

Preparació:

1. Dissoldre 10 g d'extracte de llevat i 20 g de peptona en 900 ml d'aigua desionitzada (si es volen preparar plaques petri de medi sòlid afegir 20g d'agar).

2. Autoclavar 20 minuts en cicle líquid.

3. Afegir 100 ml de 10X D.

Guardar el medi líquid a temperatura ambient i el medi sòlid a 4°C. La caducitat del medi son varis mesos.

Medi mínim amb metanol (MM) i medi mínim amb metanol i histidina (MMH)

Composició per litre:

1,34% YNB

4 x 10⁻⁵% biotina

0,5% metanol

Preparació

1. Autoclavar 800 ml d'aigua 20 minuts en cicle humit

2. Deixar refredar l'aigua a 60°C i afegir:

100 ml de dissolució YNB 10X

2 ml de dissolució B 500X

100 ml de dissolució M 10X

3. Si es vol fer medi MMH, afegir 10 ml de dissolució H 100X stock. Barrejar i guardar a 4°C.

4. si es vol preparar medi sòlid, afegir 15 g d'agar a l'aigua de pas 1 i seguir de la mateixa manera. Després de barrejar els components preparar les plaques de medi sòlid immediatament. La caducitat dels medis MM i MMH a 4°C es de varis mesos.

Medi mínim amb glucosa (MD) i medi mínim amb glucosa i histidina (MDH)

1,34% YNB

4 x 10⁻⁵% biotina

2% glucosa

Preparació:

1. Autoclavar 800 ml d'aigua 20 minuts en cicle humit

2. Deixar refredar l'aigua a 60°C i afegir:

100 ml de dissolució YNB 10X

2 ml de dissolució B 500X

100 ml de dissolució D 10X

3. Si es vol fer medi MMH, afegir 10 ml de dissolució H 100X stock. Barrejar i guardar a 4°C.

4. si es vol preparar medi sòlid, afegir 15 g d'agar a l'aigua de pas 1 i seguir de la mateixa manera. Després de barrejar els components preparar les plaques de medi sòlid immediatament. La caducitat dels medis MD i MDH a 4°C es de varis mesos.

Medi RDB

Preparació:

1. Dissoldre 186 g de sorbitol en 700 ml d'aigua i afegir 20 g d'agar.
2. Autoclavar 20 minuts en cicle líquid.
3. Deixar refredar l'aigua a 60°C (mantenir a aquesta temperatura per al següent pas).
4. Escalfar a uns 45°C les següents dissolucions:
 - 100 ml of 10X D
 - 100 ml of 10X YNB
 - 2 ml of 500X B
 - 10 ml of 100X AA
 - 88 ml d'aigua estèrilAfegir a la dissolució de sorbitol i barrejar.
5. Abocar el medi a les plaques petri immediatament i deixar-los solidificar. La caducitat de les plaques a 4°C es de varis mesos.

Medi de sals basals per a Bioreactor

Composició per litre:

Àcid fosfòric 85%	26,7 ml
Sulfat de calci	0,93 g
Sulfat de potassi	18,2 g
Sulfat e magnesi heptà hidratat	14,9 g
Hidròxid de potassi	4,13 g
Glicerol	40,0 g
Aigua desionitzada	fins a un volum d'un litre

PTM1 (elements traça per a bioreactor)

Sulfat de coure pentà hidratat	6,0 g
Iodur sòdic	0,08 g
Sulfat de manganès mono hidratat	3,0 g
Molibdat sòdic di hidratat	0,2 g
Àcid Bòric	0,02 g
Clorur de Cobalt	0,5 g
Clorur de Zinc	20,0 g
Sulfat de ferro heptà hidratat	65,0 g
Biotina	0,2 g
Àcid Sulfúric	5,0 ml
Aigua desionitzada	fins a un volum d'un litre

Es possible que es formi un precipitat tèrbol després de barrejar tots els reactius.

Esterilitzar el medi per filtració i guardar a temperatura ambient.

6.2 Annex 2. Codi Matlab per a la creació de la superfície de resposta i optimització dels components del medi de cultiu

```
%Programa principal
```

```
function principal
```

```
clc  
clear
```

```
p= menu ('Seleccionar ajust','Densitat òptica','Velocitat especifica de creixement','Ràtio densitat-  
velocitat'); %selecció de l'ajust
```

```
switch p
```

```
case 1 % OD
```

```
coef=[2.546666667 0.011375 0.023625 -0.016125 -0.046958333 0.005697917  
0.004447917 0.024447917 -0.053052083 -0.0041875 0.0004375 0.0066875 0.0208125 -  
0.0154375 0.0016875];
```

```
case 2 % mu
```

```
coef = [0.645 -0.00175 0.000916667 -0.001141667 -0.008225 -0.002779167 -  
0.004891667 0.003470833 0.002595833 -0.00315 -0.004525 0.00035 -0.0023125 -  
0.0025875 -0.0025875];
```

```
case 3 % ratio
```

```
coef = [1.642593333 0.002852288 0.017550379 -0.013325796 -0.050485546 -  
0.003321301 -0.009471926 0.024722449 -0.027467551 -0.010800444 -0.011266806  
0.005195069 0.007700431 -0.016928944 -0.005475306];
```

```
end
```

```
a=[-2:0.1:2];
```

```
b=[-2:0.1:2];
```

```
[A B]=meshgrid(a,b);
```

```
C=0;
```

```
D=0;
```

```
Z=biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
subplot(2,3,1)
```

```
mesh(A,B,Z)
```

```
xlabel('Fe')
```

```
ylabel('Mg')
```

```
zlabel('resposta')
```

```
a=[-2:0.1:2];
```

```
c=[-2:0.1:2];
```

```
[A C]=meshgrid(a,c);
```

```
B=0;
```

```
D=0;
```

```
Z=biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
subplot(2,3,2)
```

```
mesh(A,C,Z)
```

```
xlabel('Fe')
```

```
ylabel('Traces')
```

```
zlabel('resposta')
```

```
a=[-2:0.1:2];
```

```
d=[-2:0.1:2];  
  
[A D]=meshgrid(a,d);  
B=0;  
C=0;  
Z=biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
subplot(2,3,3)  
mesh(A,D,Z)  
xlabel('Fe')  
ylabel('NH4')  
zlabel('resposta')
```

```
b=[-2:0.1:2];  
c=[-2:0.1:2];
```

```
[B C]=meshgrid(b,c);  
A=0;  
D=0;  
Z=biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
subplot(2,3,4)  
mesh(B,C,Z)  
xlabel('Mg')  
ylabel('Traces')  
zlabel('resposta')
```

```
b=[-2:0.1:2];  
d=[-2:0.1:2];
```

```
[B D]=meshgrid(b,d);  
A=0;  
C=0;  
Z=biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
subplot(2,3,5)  
mesh(B,D,Z)  
xlabel('Mg')  
ylabel('NH4')  
zlabel('resposta')
```

%optimització dels paràmetres-----

```
x0=[0,0,0,0];  
t=1;
```

```
while t ~= 0  
    optim=fminsearch(@optimitzar,x0,[],coef);  
    t=optim-x0;  
    x0=optim;  
end
```

```
A=optim(1)  
B=optim(2)
```

```
C=optim(3)
D=optim(4)
Z=biomassa(A,B,C,D,coef)
```

```
end
```

```
%Funcions-----
```

```
function Z=biomassa(A,B,C,D,coef)
```

```
Z= coef(1) + coef(2)*A + coef(3)*B + coef(4)*C + coef(5)*D + coef(6)*A.^2 + coef(7)*B.^2 +
coef(8)*C.^2 + coef(9)*D.^2 + coef(10)*A.*B + coef(11)*A.*C + coef(12)*A.*D + coef(13)*B.*C
+ coef(14)*B.*D + coef(15)*C.*D;
```

```
end
```

```
function H=optimizar(x,coef)
```

```
A=x(1);
```

```
B=x(2);
```

```
C=x(3);
```

```
D=x(4);
```

```
if (x(1)<-2)|| (x(1)> 2) || (x(2)<-2)|| (x(2)> 2)|| (x(3)<-2)|| (x(3)> 2) || (x(4)<-2)|| (x(4)> 2)
    H=100000;
```

```
else
```

```
    H= -1* biomassa(A,B,C,D,coef);
```

```
end
```

```
end
```

6.3 Annex 3. Codi de control Bioxpert XP per al reactor Applikon

A continuació es detalla la programació duta a terme amb el programa Bioxpert XP d'Applikon per tal de realitzar alimentacions de forma exponencial en el cultiu d'*Escherichia coli*.

El programa consta de tres subrutines:

- Subrutina Batch: l'objectiu d'aquesta subrutina es detectar el final de la fase batch i donar inici a la fase fed-batch. Per donar per finalitzada la fase batch s'ha de complir que el temps de fermentació sigui superior a les 15,5h o que equivalen a 55.000s (temps mínim que s'ha observat que triga el cultiu a consumir la glucosa present al medi de cultiu) i que l'oxigen dissolt pugi fins al 90% de saturació. Aquesta pujada es produirà quan el cultiu hagi esgotat la font de carboni i per tant no consumeixi oxigen per metabolitzar-la.

Codi subrutina Batch:

```
10 REM CREATED ON 29/09/2008
20 Tbatch=PROCESSTIME
22 inici=0
25 If Tbatch>55000 and dO2>90 THEN
26   inici=1
27 ENDIF
30 END
```

- Subrutina ExpFeed: aquesta rutina calcula la quantitat de dissolució de glucosa a afegir per tal d'aconseguir la velocitat específica de creixement desitjada. La sortida de la subrutina es una variable que conte el temps que ha d'estar engegada la bomba d'addició.

Codi subrutina ExpFeed:

```
10 REM CREATED ON 25/09/2008
20 REM Alimentació FedBatch exponencial
30
40 TFedBatch=PROCESSTIME- TBatch
50 VFeed=X0*V0/s*(1/(Yxs/100)+ms/mu)*(EXP(mu/3600*TFedBatch)-
EXP(mu/3600*(TFedBatch-300)))
60 TFeed=VFeed*Tajust
70 END
```

- Subrutina periodecontrol: aquesta subrutina controla la bomba d'addició de glucosa. Manté la bomba engegada el temps que li indica.

Codi subrutina PeriodeControl

```
10 REM CREATED ON 29/09/2008
20 IF TFeed>0 THEN
30 TFeed=TFeed - 1
40 Pump3Status=1
50 ELSE
60 Pump3Status = 0
70 ENDIF
80 END
```

A continuació des de la Figura 53 a la Figura 57 es descriuen les variables i constants utilitzades en les subrutines i els períodes d'execució de les mateixes.

Recipe Manager - Jordi					
	Name	Eng. Unit	Ctrl	Scale (min/max)	Comment
All					
Onlines	inici		No	0.00 / 1.00	
Offlines	Pump3Status		Yes	0.00 / 1.00	Estat de la Bomba d'alimentació (3) ON(1)/OFF(2)
Constants	Tbatch	s	No	0.00 / 3000.00	Temps que dura la fase batch
Formulas	Temps	s	No	0.00 / 6000.00	Variable Auxiliar
Profiles	TFedBatch	s	No	0.00 / 450000.00	Temps acumulat des de l'inici del Fed-Batch
Setpoints	TFeed	s	No	0.00 / 600.00	Temps de control de l'alimentació
Phases	VFeed	ml	No	0.00 / 100.00	Volum a afegir en l'alimentació
Alarms					
Assigned					

Figura 53 Variables de control del procés.

Recipe Manager - Jordi					
	Name	Eng. Unit	Value	Scale (min/m...	Comment
All					
Onlines	ms	h-1	0.04	0.00 / 1.00	manteniment
Offlines	mu	1/h	0.15	0.00 / 1.00	velocitat específica de creixement
Constants	s	g/L	700.00	0.00 / 1000.00	Concentració de substància en l'alimentació
Formulas	Tajust	s/L	13501.00	0.00 / 5000.00	Ajust temps vs bomba
Profiles	V0	l	3.00	0.00 / 6000.00	volum inicial de reactor en el Fed-Batch
Setpoints	X0	g/L	5.00	0.00 / 250.00	biomassa inicial en el fed-Batch
Phases	Yxs	%	50.00	0.00 / 100.00	Rendiment substància biomassa
Alarms					
Assigned					

Figura 54 Constants utilitzades en les subrutines.

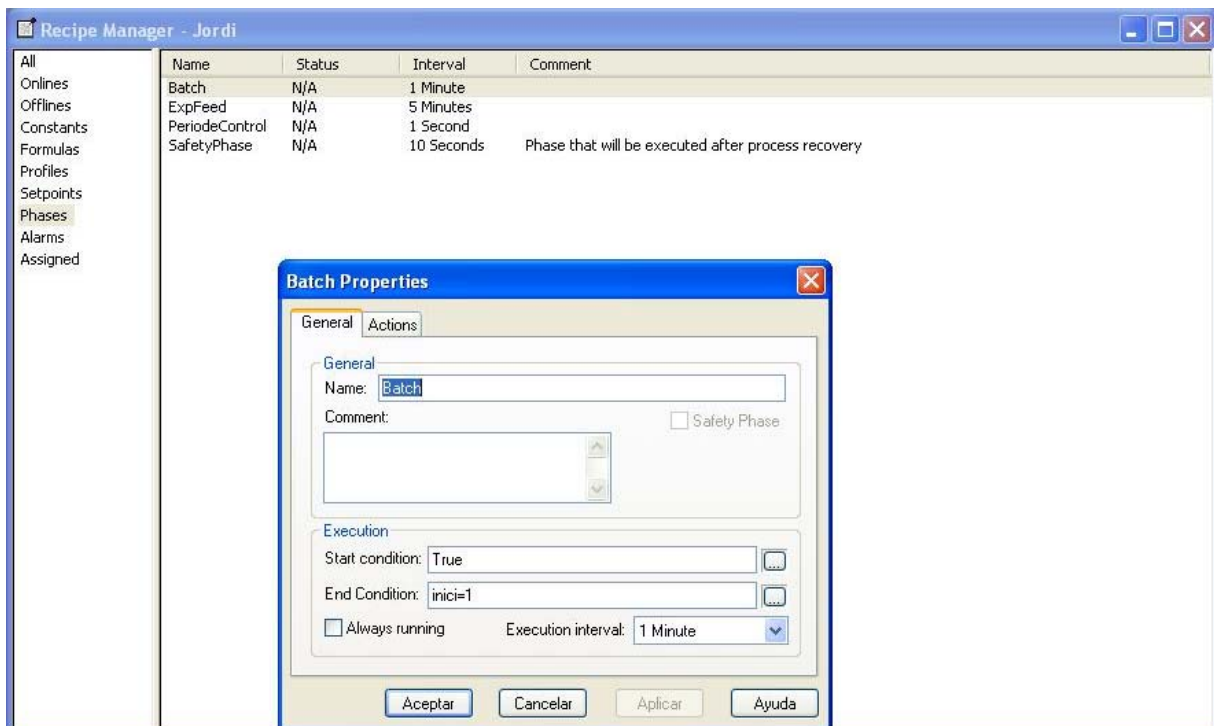


Figura 55 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina Batch.

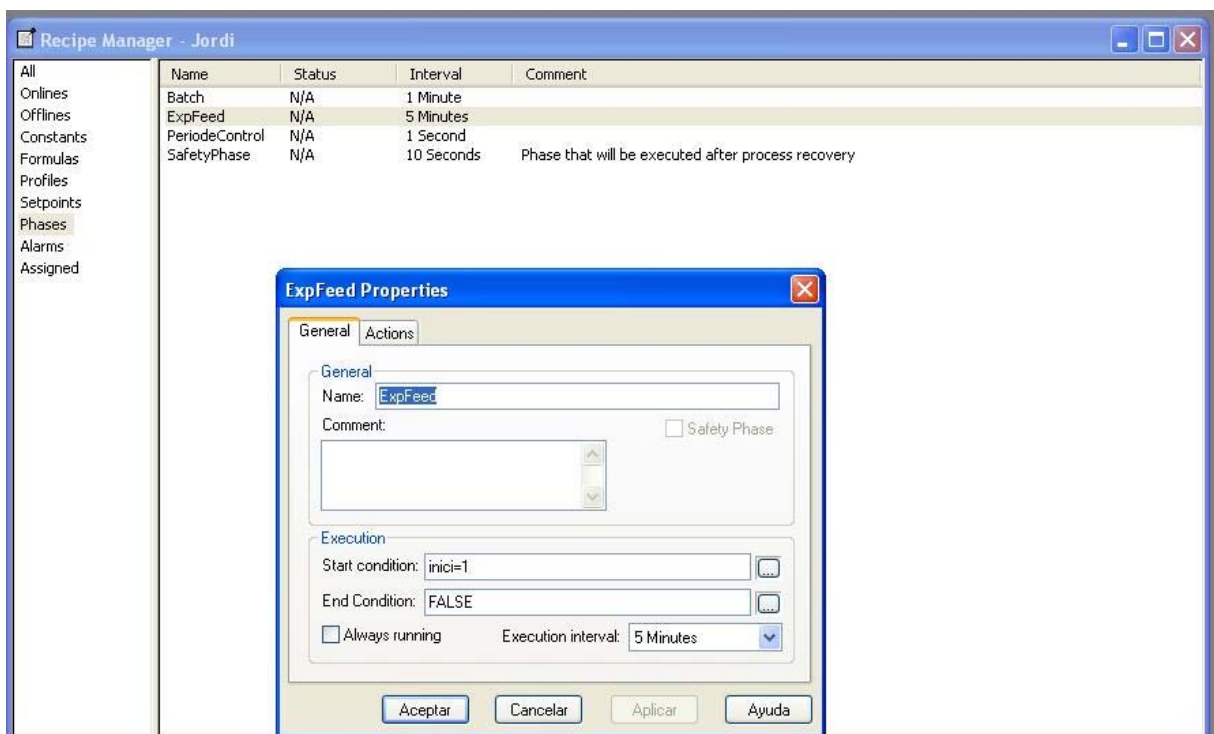


Figura 56 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina ExpFeed.

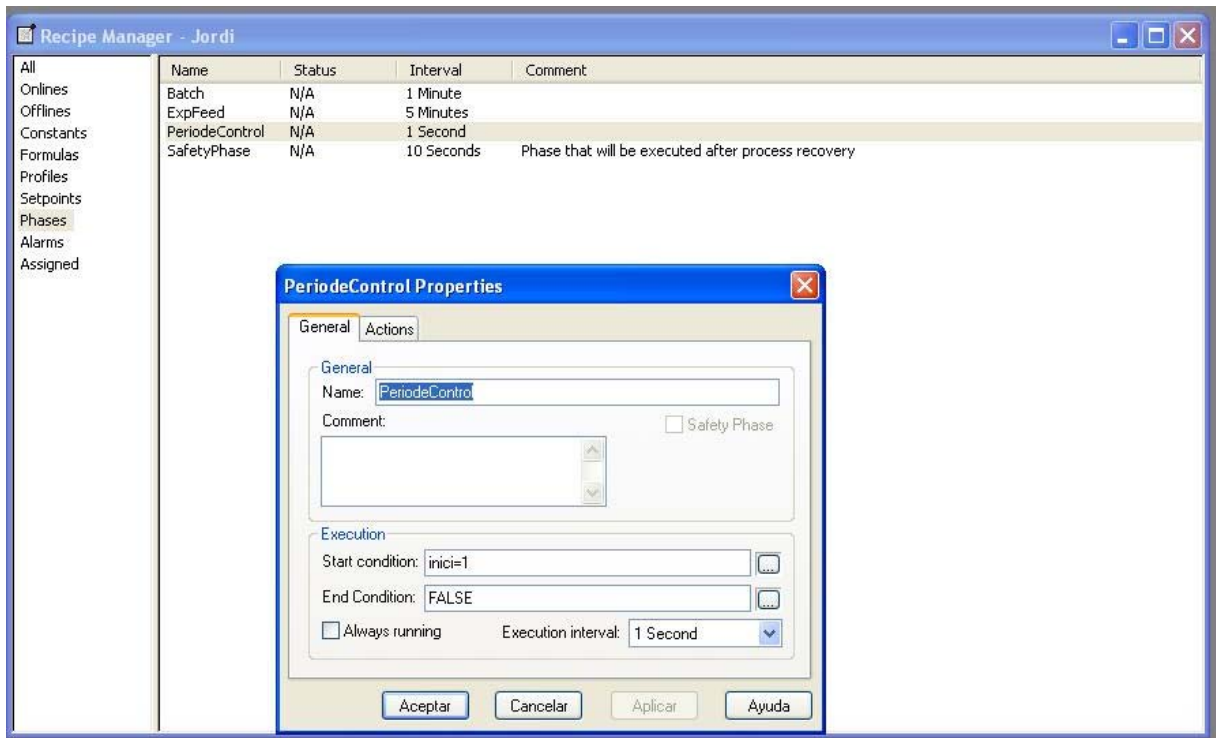


Figura 57 Condicions d'inici i final i interval d'execució de la subrutina PeriodeControl.

6.4 Annex 4. Seqüència del gen *tgz15* obtinguda

Primers utilitzats en la seqüenciació

5' AOX1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

3' AOX1 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

α Factor 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

Seqüències obtingudes per al plasmidi pPic amb el gen *tgz15* clonat

Ppic9

seq ppicaox (aox5)

CGTATTACGACTTTTACGACAACCTTGATaAGAtCAAAAACAACCTAATTATTCGAAGGATCCAA
ACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCTCCGCATTAGCTGC
TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAA
CGGGTTATTGTTTATAAACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTC
TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCATGCAAACCTACAGAAGTGGAAAAGCT
TATCACGGAGAATCAGCGGTTAGCATCAAGCCATGTGGTCTTGAGGCAGGACATTGTTGAT
ACGGAGAAAAGAGATGCAAATGATCCGCACCCACCTAGGTGAAGTTCAGACAGAGACTGAT
TTGCAGATTAGAGATTTGTTGGAGAGAATCAGATTAATGGAGGTAGATATACATAGTGGTAA
TGAGTGAACAAGGAGCTTCACCAAATGCATATGGAGGCAAAGAGACTTATTACTGAAAGG
CAGATGCTAACCCCTTGAGATAGAGGATGTGACTAAAGAATTACAGAACTCTCTGCCTCTG
GGGATAATAAAAAGCCTTCTGAATTTGCTTTCTGAGCTAGATAGGCTACGGAAAAGAGCATCA
TAATTTACGATCTCAGTTTGAATTTGAGAAAAAATACAAACGTCAAGCAAGTTGAGCAGATG
CGGACAATGGAAAATGAACTTGATAACCATGACCAAACAAGCTGAGAAGT

seq ppicaox (aox3)

CGTAGATCAGCAGaCCGGTCTTCTCGTAAGTGCCCAACTGAACTGAGGAACAGTCATGTC
TAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCCCATATTTGTCTGCTCAACAAATGTGCATGGCAAACA
TCCATCTGGTTTACATCCCAGATTTTATCTCTGGGCTCCTCTGGTTTGGTCATATGTGCTGG
GGGATATGGTGCTGCCGGTGGTGGTGAGGAGGAGGCTTGGCGCTGCATTTGCAGTG
CCACTGCTCCGCTGAACCTGCCAGTAGGATATCCAGCACTACCAACTGCCCCATACTGG
CCTCCTGCGCGTTCGTAGCTGCACCGCTGCTTGTGGCTGCGGAGGTGCAGCATAGGAA
TAGTTGGGCACTGCACTTTGCGCGTTGCCTGCAACTGGATAGCCAGAGTAACCTGCATATG
CATAAGCCGTGCCAGCATCATAAGCATAGTTGTATGCTCCAGCCTGAGCACCCTGCTGATA
TGCCCCATCCTGGGCTCCCTGCTGATATGCCCCATCCTGGGCTCCCTGCTGATATGCCCC
AGCCTGGGCCCCCTGCTGATATGCCCCAGACTGGGCCCCCTGCTGATATGCCCCAGCCT
GGGCTCCCTGCTGATATGCCCCAGCCTGAGCACCCTGCTGATATGCCCCAGCCTGGGCTC
CCTGCTGATATGCCCCAGCCTGGGCTCCCTGCTGATATGCCCCAGCCTGAGCCCCCTGCT
GATATGCCCCATCCTGGCCCCCTGCTGATATGCCCCAGCCTGGGCTCCCTGCTGATATG
CCCCAGCCTGgGCTCCCTGCTGATATACCCCAGCCTGAGCACCCTGCTGATATGCCCCAG
CCTGGGCTCCCTGCTGATTATGCA

seq ppicaox (aox3) Complementaria i reversa

GGAGCCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGGG
GCCAGGATGGGGCATATCAGCAGGGGGCTCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCAG
GCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGGTGCTCAGGCTGG
GGCATATCAGCAGGGAGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGGGCCAGTCTGGGGCAT
ATCAGCAGGGGGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCAGGATGGGGCATATCAG
CAGGGAGCCAGGATGGGGCATATCAGCAGGGGTGCTCAGGCTGGAGCATACTACTATGC
TTATGATGCTGGCACGGCTTATGCATATGCAGGTTACTCTGGCTATCCAGTTGCAGGCAAC
GCGCAAAGTGCAGTGCCCAACTATTCCTATGCTGCACCTCCGCAGCCAACAAGCAGCGGT
GCAGCTACGAACGCCGAGGAGGCCAGTATGGGGCAGTTGGTAGTGCTGGATATCCTACT
GGGCAAGTTCAGCCGAGCAGTGGCACTGCAAATGCAGCGCAAGCACCTCCTCCTCCACCA
CCACCGGCAGCACCATATCCCCCAGCACATATGACCAAACCAGAGGAGCCAGAGATAA

AATCTGGGATGTAAACCAGATGGATGTTTGCCATGCACATTTGTTGAGCAGACAAATATGG
 GCGGCCGCGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACG
 AGAAGACCGGTCTGCTGATCTACGTGCATAATCAGCAGGGAGGCCAGGCTGGGGCATAT
 CAGCAGGGTGCTCAGGCTGGGGTATATCAGCAG

Resultats del seqüenciació

Comparació de les seqüència obtinguda amb la seqüència teòrica utilitzant l'eina
 CLUSTALW de Biology Workbench.

Alineació dels dos fragments amb la proteïna TGZ15 (sense peptid senyal).

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   CGTATTACGACTTTTACGACAACCTTGATAAGATCAAAAACAATAATTAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   TCGAAGGATCCAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCAGTTTTAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   TCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGA
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   AGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTCCAACAGCACAAATAACG
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAGAAGAA
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCATGCA
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----ATGCTGGAGAACAAGCTTG--CCATGCA
                                *  **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   AACTACAGAAGTGGAAAAGCTTATCACGGAGAATCAGCGGTTAGCATCAA
TGZ15_sense_peptid_senyal      AACTACAGAAGTGGAAAAGCTTATCACGGAGAATCAGCGGTTAGCATCAA
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GCCATGTGGTCTTGAGGCAGGACATTGTTGATACGGAGAAAGAGATGCAA
TGZ15_sense_peptid_senyal      GCCATGTGGTCTTGAGGCAGGACATTGTTGATACGGAGAAAGAGATGCAA
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   ATGATCCGCACCCACCTAGGTGAAGTTCAGACAGAGACTGATTTGCAGAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      ATGATCCGCACCCACCTAGGTGAAGTTCAGACAGAGACTGATTTGCAGAT
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   TAGAGATTTGTTGGAGAGAATCAGATTAATGGAGGTAGATATACATAGTG
TGZ15_sense_peptid_senyal      TAGAGATTTGTTGGAGAGAATCAGATTAATGGAGGTAGATATACATAGTG
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GTAATGTAGTGAACAAGGAGCTTCACCAAATGCATATGGAGGCAAAGAGA
TGZ15_sense_peptid_senyal      GTAATGTAGTGAACAAGGAGCTTCACCAAATGCATATGGAGGCAAAGAGA
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   CTTATTACTGAAAGGCAGATGCTAACCCCTTGAGATAGAGGATGTGACTAA
TGZ15_sense_peptid_senyal      CTTATTACTGAAAGGCAGATGCTAACCCCTTGAGATAGAGGATGTGACTAA
                                *****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   AGAATTACAGAAACTCTCTGCCTCTGGGGATAATAAAAGCCTTCCTGAAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      AGAATTACAGAAACTCTCTGCCTCTGGGGACAATAAAAGCCTTCCTGAAT
                                *****

```

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse TGCTTTCTGAGCTAGATAGGCTACGGAAAGAGCATCATAATTTACGATCT
TGZ15_sense_peptid_senyal TGCTTTCTGAGCTAGATAGGCTACGGAAAGAGCATCATAATTTACGATCT

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CAGTTTGAATTTGAGAAAAATACAAACGTCAAGCAAGTTGAGCAGATGC
TGZ15_sense_peptid_senyal CAGTTTGAATTTGAGAAAA-TACAAACGTCAAGCAAGTTGAGCAGATGC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse GGACAATGGAAAATGAACTTGATAACCATGACCAAACAAGCTGAGAAGT-
TGZ15_sense_peptid_senyal GGACAATGGAAA-TGAACTTGATAACCATGACCAAACAAGCTGAGAAGTT

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse -----
TGZ15_sense_peptid_senyal ACGTGTTGATGTGGCAAATGCTGAAAGACGGGCACAAGCAGCTGCGGCTC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse -----
TGZ15_sense_peptid_senyal AAGCAGCAGCACATGCAGCTGGTGCACAGGTGACAGCTTCGCAGCCTGGA

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse -----
TGZ15_sense_peptid_senyal CAGCTCAAGCTACCACGGTTTCAGCAGCAGCAGCCACAGACTCATATGCA

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse -----
TGZ15_sense_peptid_senyal GGTGCATATACCAGCTACCCCTGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGG

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse -----GGAGCCCAGG
TGZ15_sense_peptid_senyal GGCATATCAGCAGGGTGCTCAGGCTGGGGTATATCAGCAGGGAGCCCAGG

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGGGGC
TGZ15_sense_peptid_senyal CTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGGGGC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CAGGATGGGGCATATCAGCAGGGGGCTCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGG
TGZ15_sense_peptid_senyal CAGGATGGGGCATATCAGCAGGGGGCTCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGG

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse AGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATATCAGC
TGZ15_sense_peptid_senyal AGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATATCAGC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse AGGGTGCTCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATAT
TGZ15_sense_peptid_senyal AGGGTGCTCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGCTGGGGCATAT

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CAGCAGGGGGCCAGTCTGGGGCATATCAGCAGGGGGCCAGGCTGGGGC
TGZ15_sense_peptid_senyal CAGCAGGGGGCCAGTCTGGGGCATATCAGCAGGGGGCCAGGCTGGGGC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse ATATCAGCAGGGAGCCCAGGATGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGATG
TGZ15_sense_peptid_senyal ATATCAGCAGGGAGCCCAGGATGGGGCATATCAGCAGGGAGCCCAGGATG

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse GGGCATATCAGCAGGGTGCTCAGGCTGGAGCATACAACATGCTTATGAT
TGZ15_sense_peptid_senyal GGGCATATCAGCAGGGTGCTCAGGCTGGAGCATACAACATGCTTATGAT

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse GCTGGCACGGCTTATGCATATGCAGGTTACTCTGGCTATCCAGTTGCAGG
TGZ15_sense_peptid_senyal GCTGGCACGGCTTATGCATATGCAGGTTACTCTGGCTATCCAGTTGCAGG

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CAACGCGCAAAGTGCAGTGCCCAACTATTCTATGCTGCACCTCCGCAGC
TGZ15_sense_peptid_senyal CTACGCGCAAAGTGCAGTGCCCAACTATTCTATGCTGCACCTCCGCAGC

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse CAACAAGCAGCGGTGCAGCTACGAACGCCGAGGAGCCAGTATGGGGCA
TGZ15_sense_peptid_senyal CAACAAGCAGCGGTGCAGCTACGAACGCCGAGGAGCCAGTATGGGGCA

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse GTTGGTAGTGCTGGATATCCTACTGGGCAAGTTCAGCCGAGCAGTGGCAC
TGZ15_sense_peptid_senyal GTTGGTAGTGCTGGATATCCTACTGGGCAAGTTCAGCCGAGCAGTGGCAC

```

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   TGCAAATGCAGCGCAAGCACCTCCTCCTCCACCACCACCGGCAGCACCAT
TGZ15_sense_peptid_senyal      TGCAAATGCAGCGCAAGCACCTCCTCCTCCACCACCACCGGCAGCACCAT
*****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   ATCCCCCAGCACATATGACCAAACCAGAGGAGCCCAGAGATAAAATCTG
TGZ15_sense_peptid_senyal      ATCCCCCAGCACATATGACCAAACCAGAGGAGCCCAGAGATAAAATCTG
*****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GGATGTAACCAGATGGATGTTTGCCATGCACATTTGTTGAGCAGACAAA
TGZ15_sense_peptid_senyal      GGATGTAACCAGATGGATGTTTGCCATGCACATTTGTTGAGCAGACAAA
*****

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   TATGGGCGGCCGCAATTAATTCGCCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTC
TGZ15_sense_peptid_senyal      TATGGTGAATCTGGGATGTAAAACCAGATGGCTGTCTGTGCCTCCATCC
***** * * * * *

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   AAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTGCTGATCTACBTGCATAATCA
TGZ15_sense_peptid_senyal      -----CATTGACTAGGGCGTATTTACCAATAT-TGTGCCT--CCA
***** * * * * *

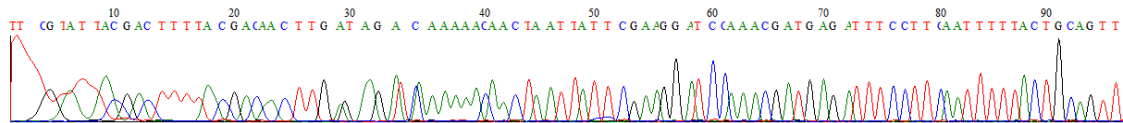
ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   GCAGGGAGGCCAGGCTGGGGCATATCAGCAGGGTGC-TCAGGCTGGGGT
TGZ15_sense_peptid_senyal      GT-GCAATTTCTTCTGTGTTATATATACCACCATTGTTGAGCAAAAAA
* * * * * * * * * *

ppic_TGZ15_5'_3'comp_reverse   ATATCAGCAG---
TGZ15_sense_peptid_senyal      AAAAAAAAAAAAAA
* * * *

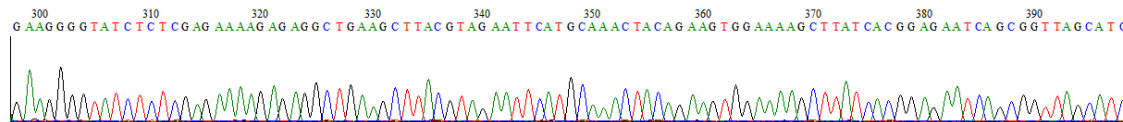
```

Imatges cromatograma

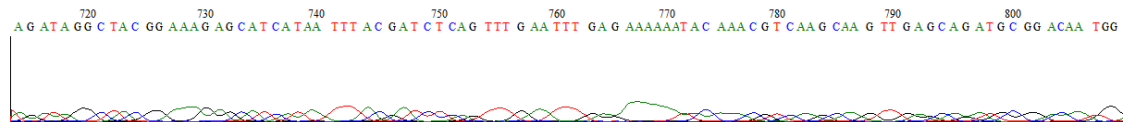
Inici



Intermig

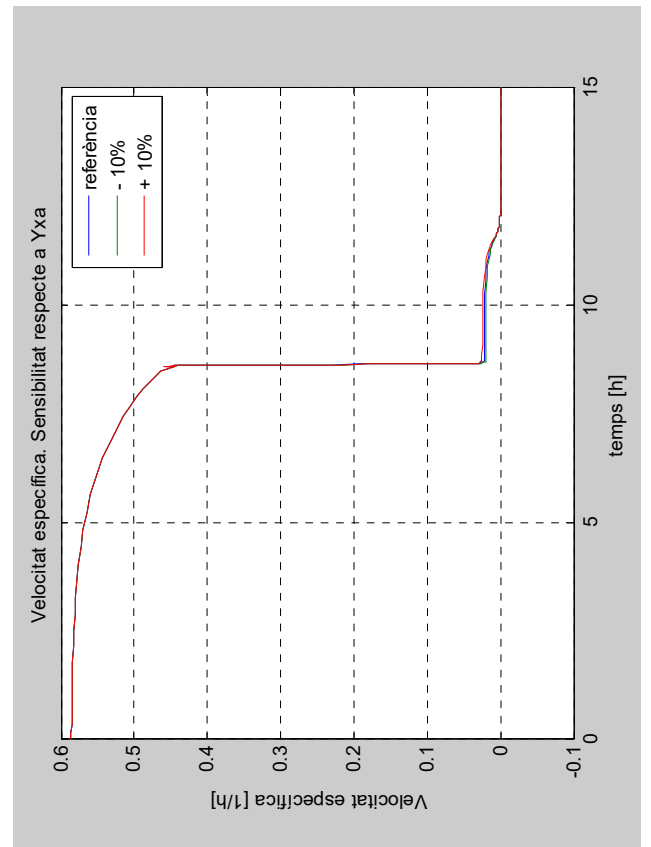
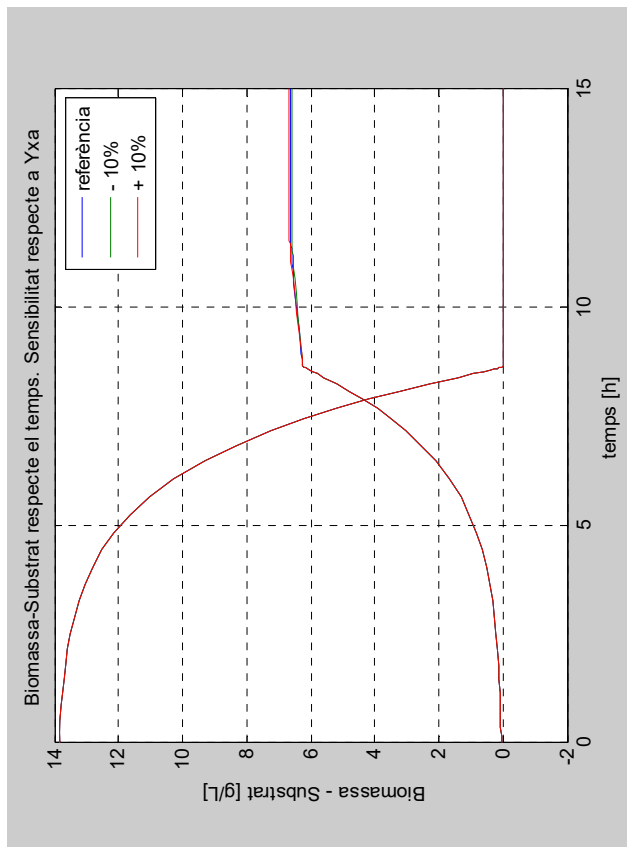
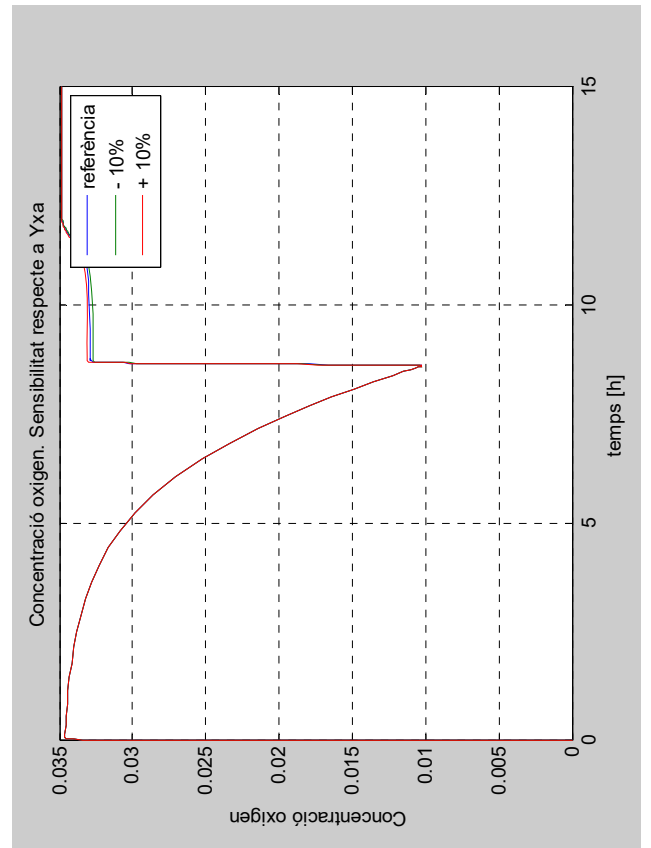
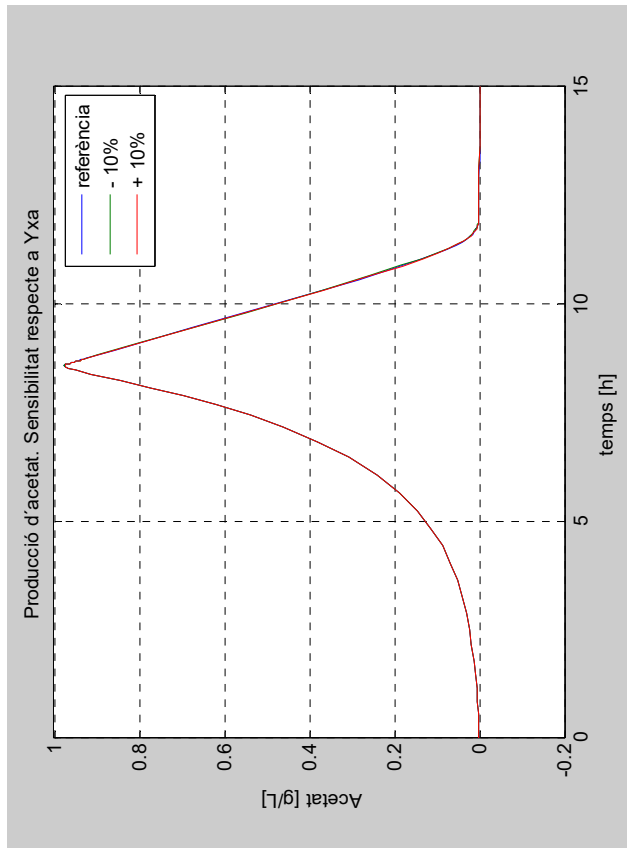


Final

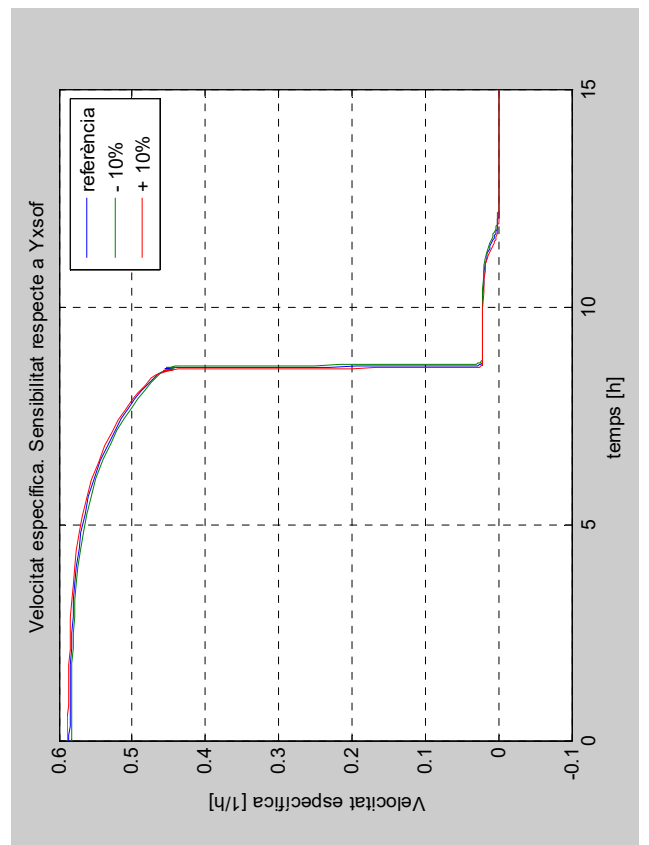
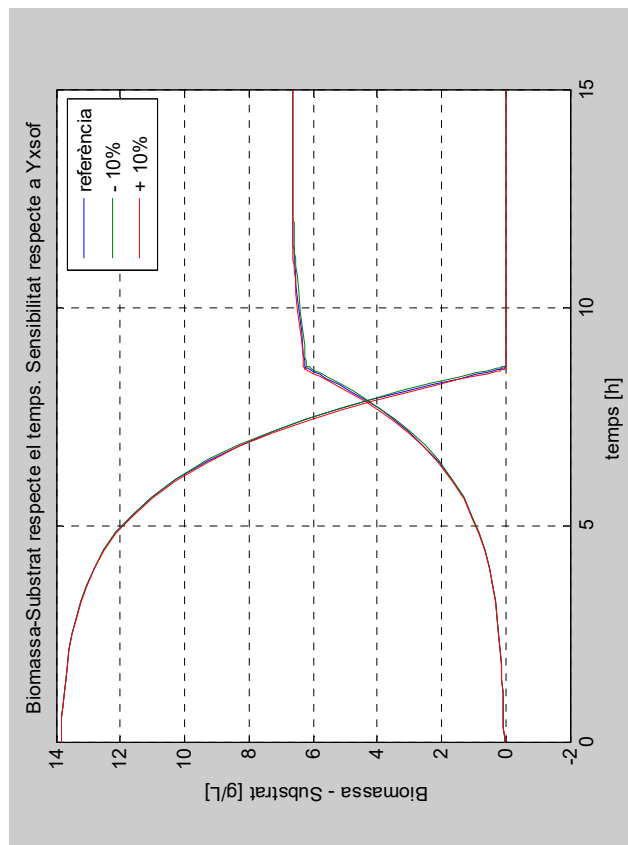
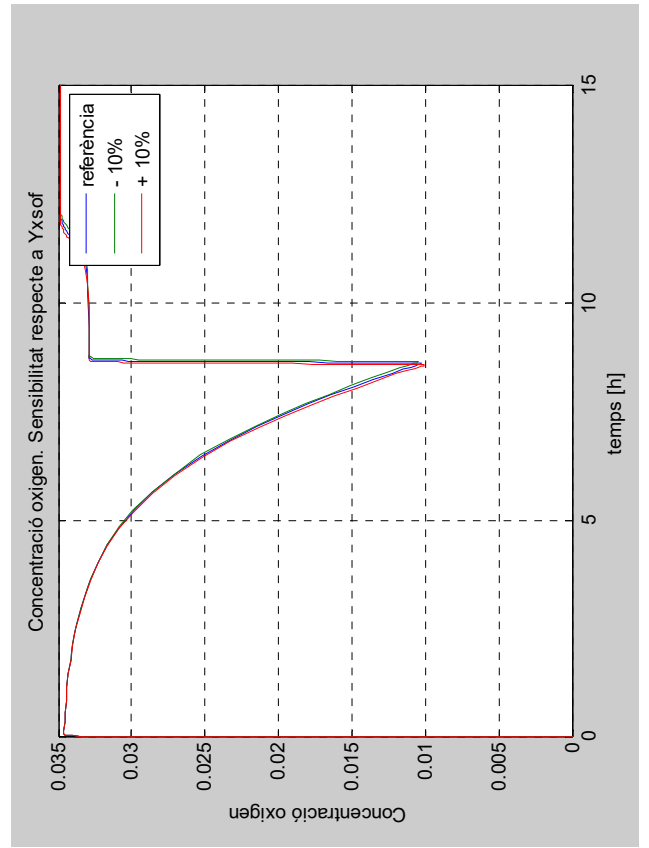
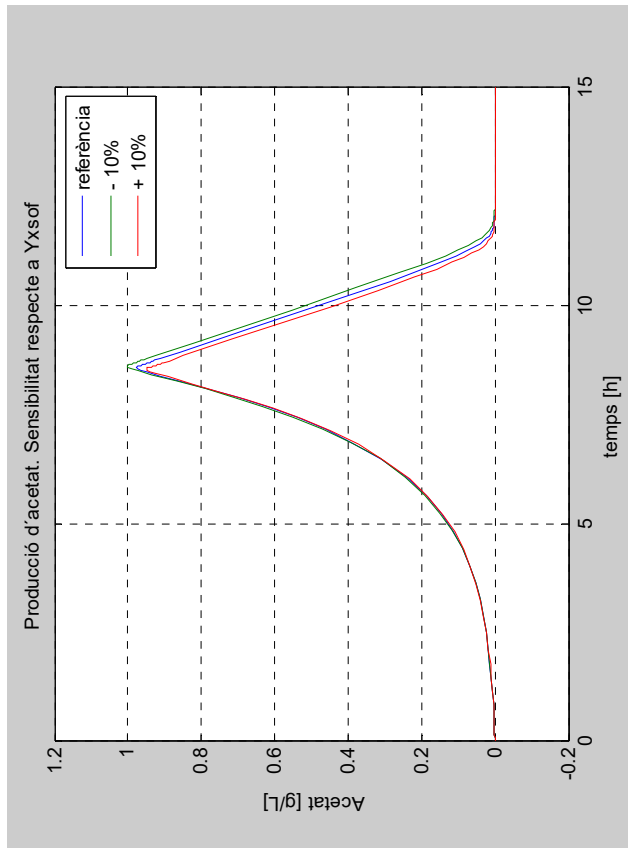


6.5 Annex 5. Gràfiques de la determinació de sensibilitat del model matemàtic

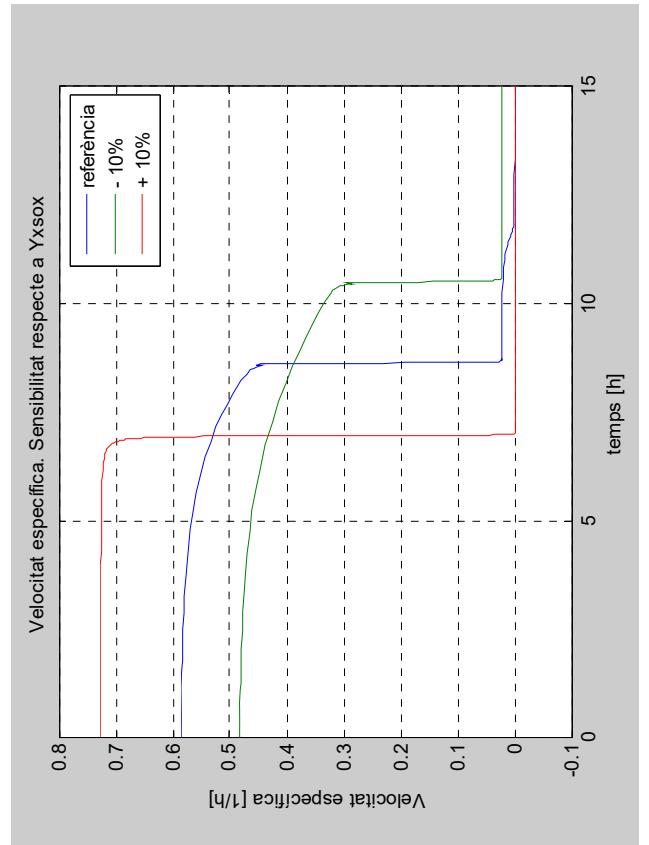
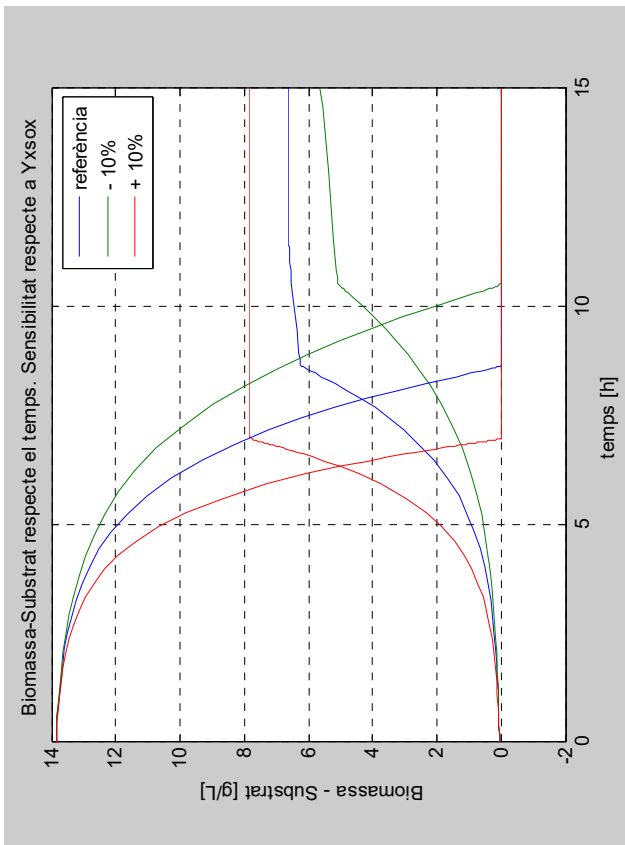
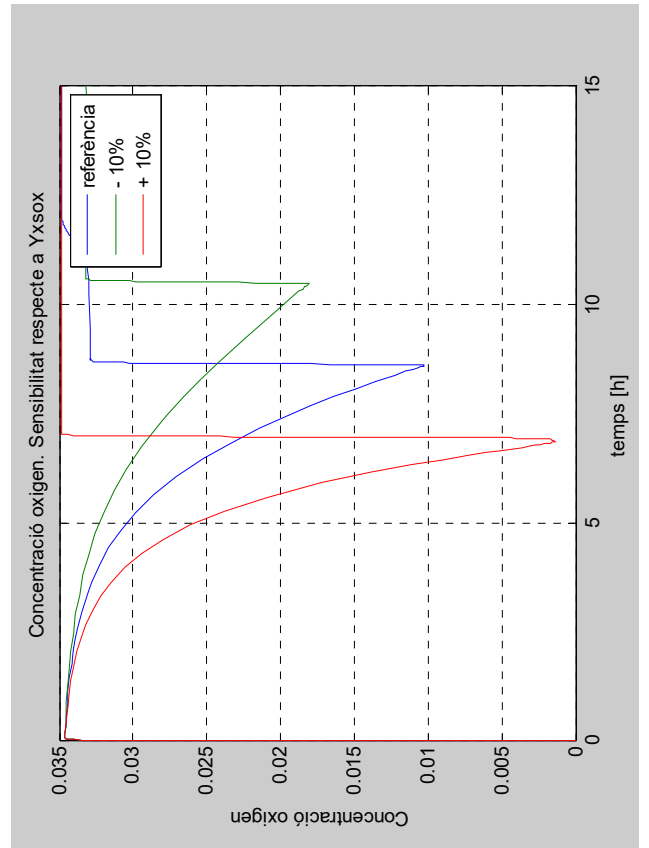
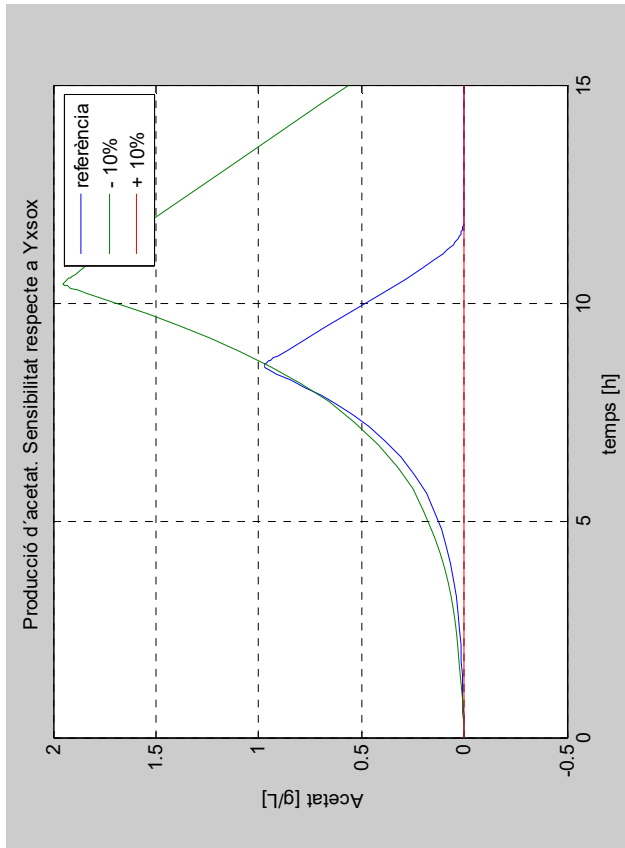
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Y_{xa}



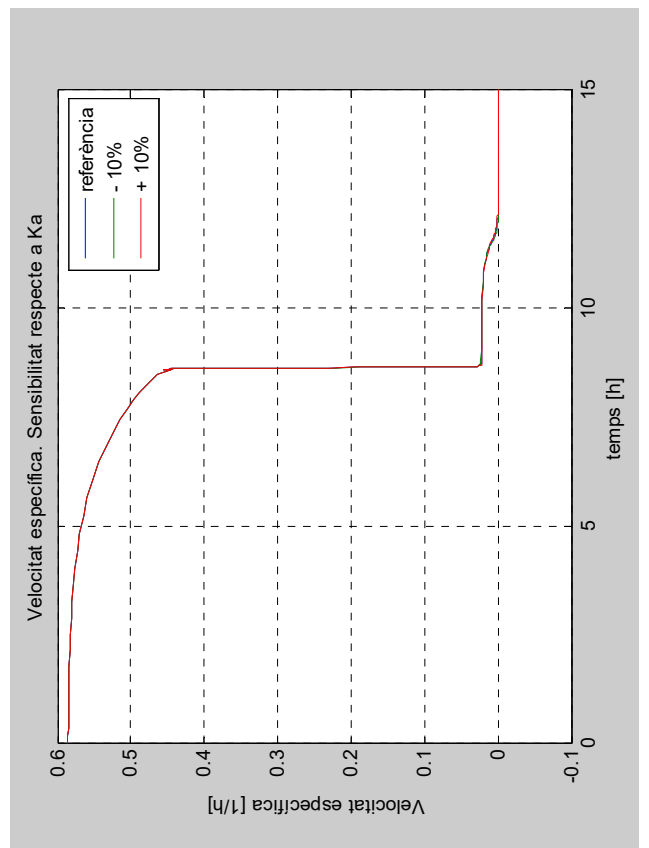
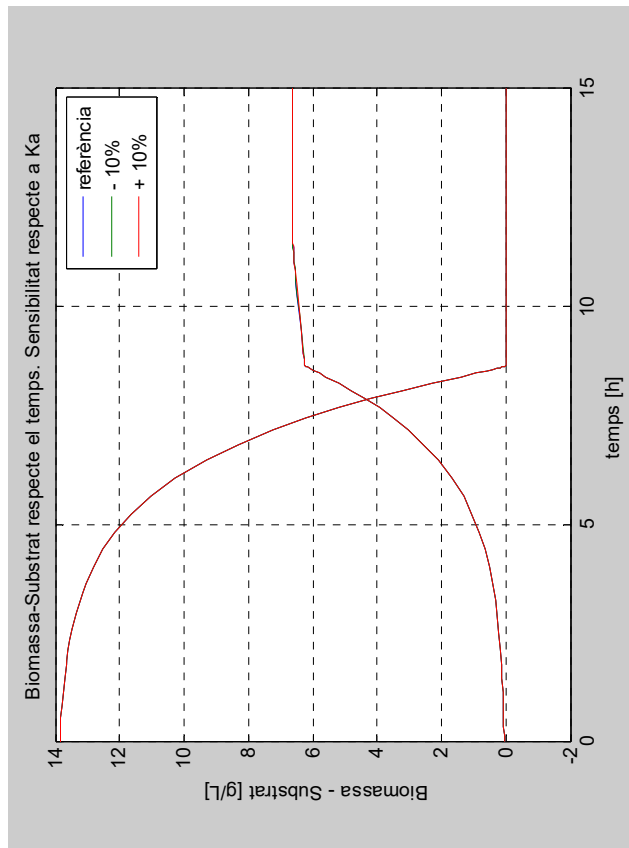
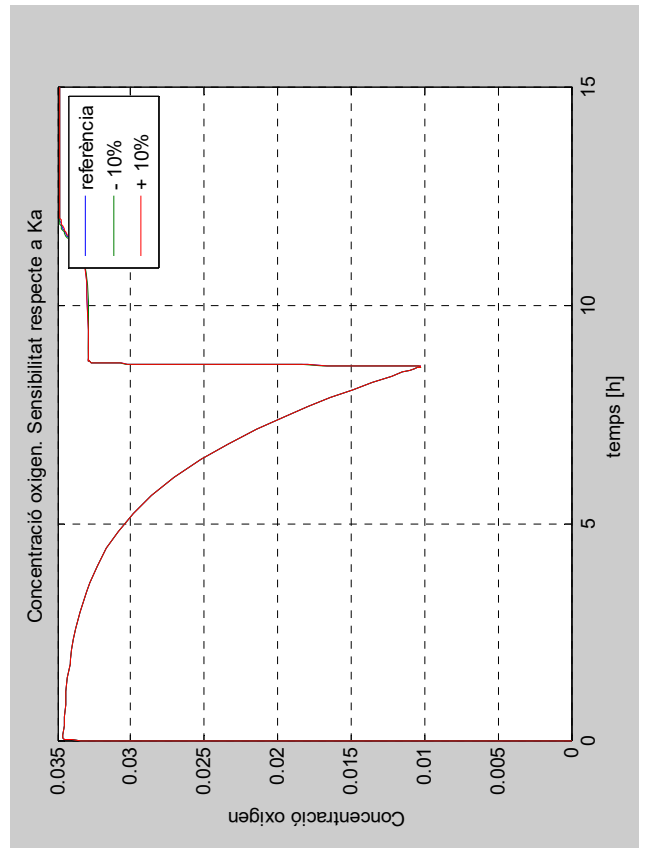
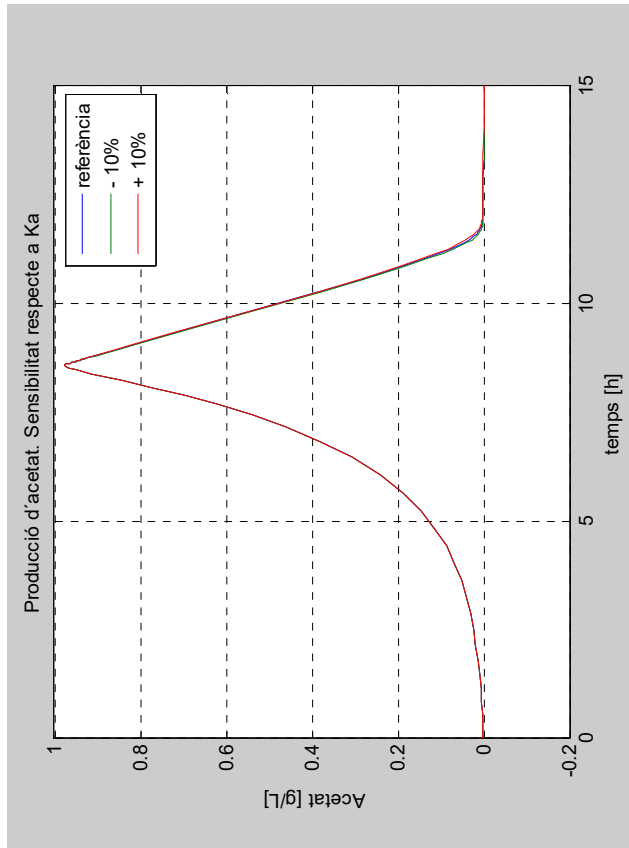
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Y_{xsof}



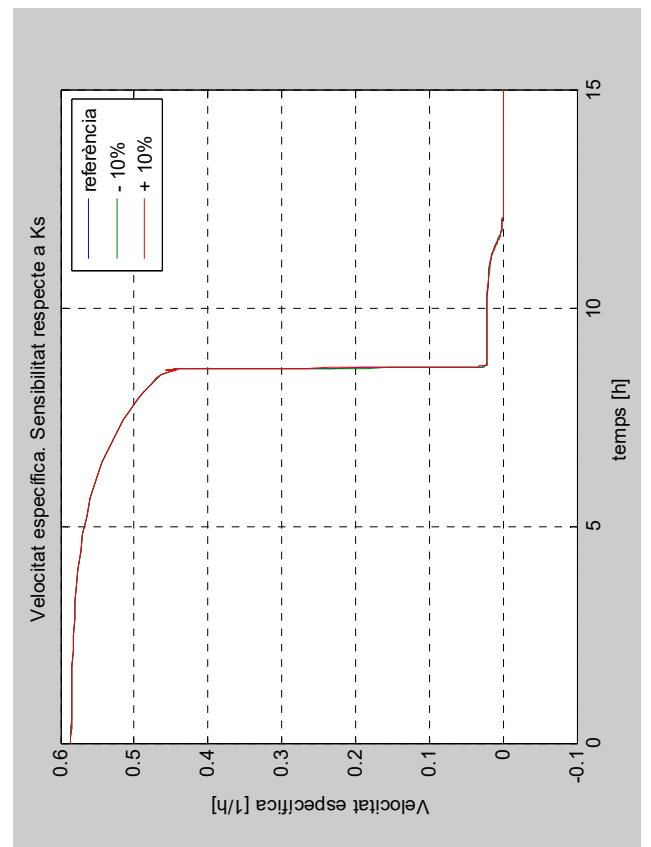
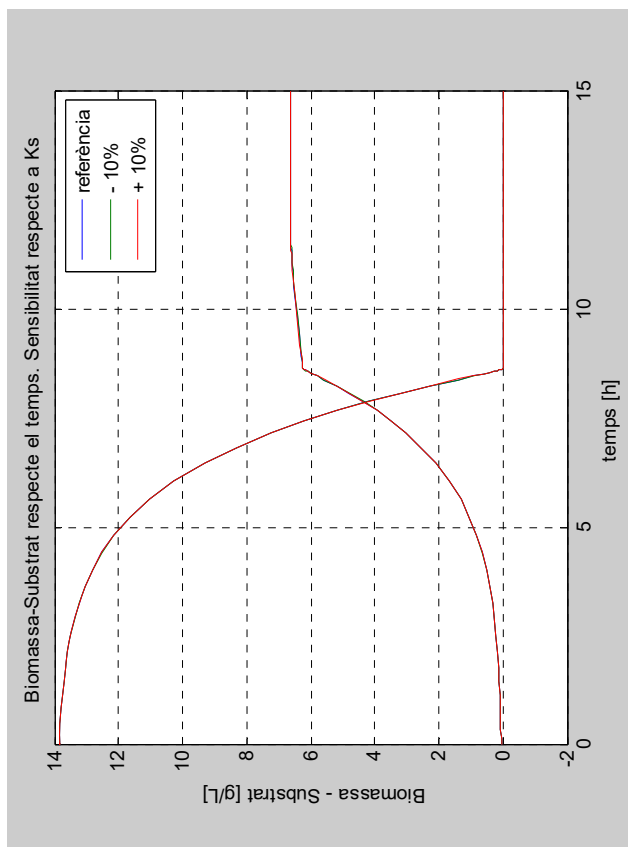
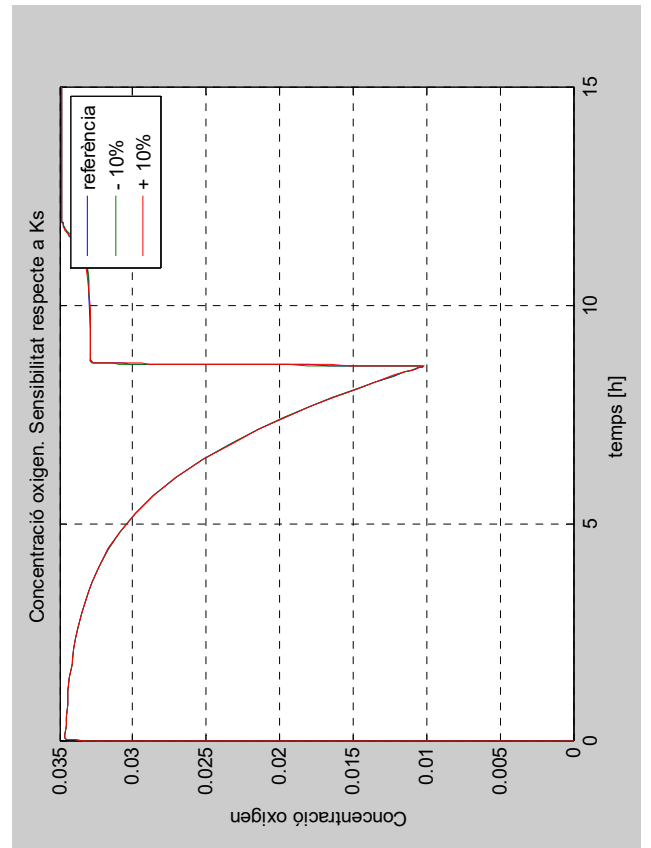
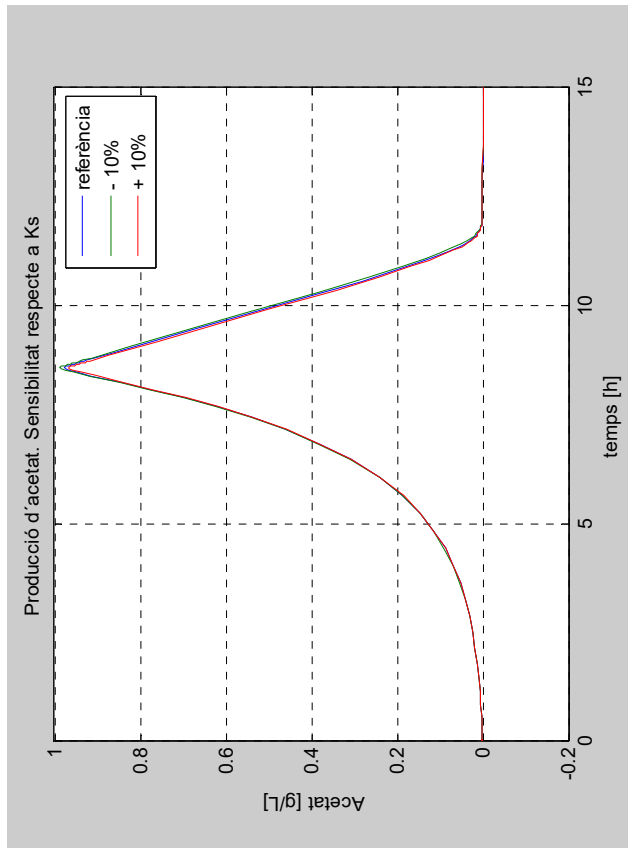
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Y_{xsox}



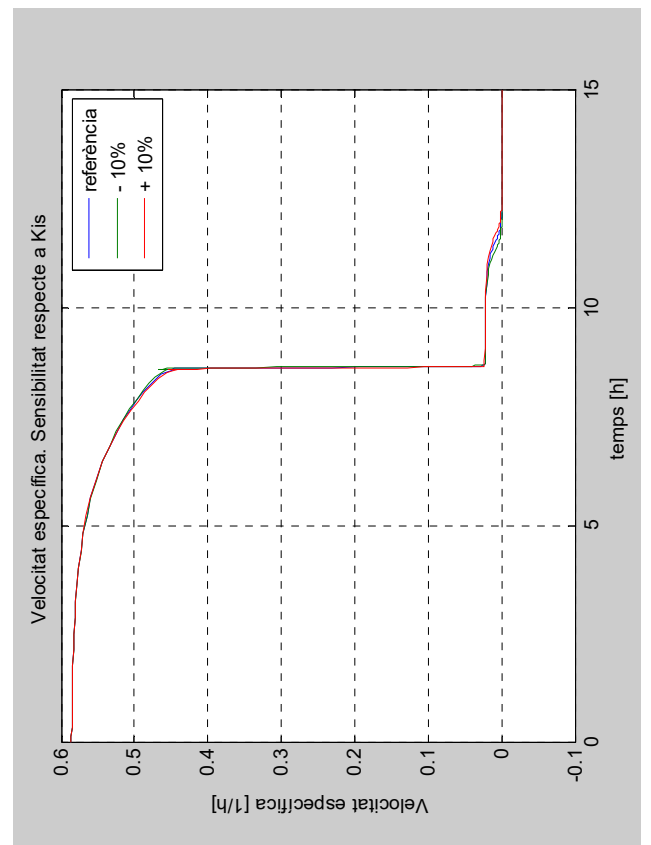
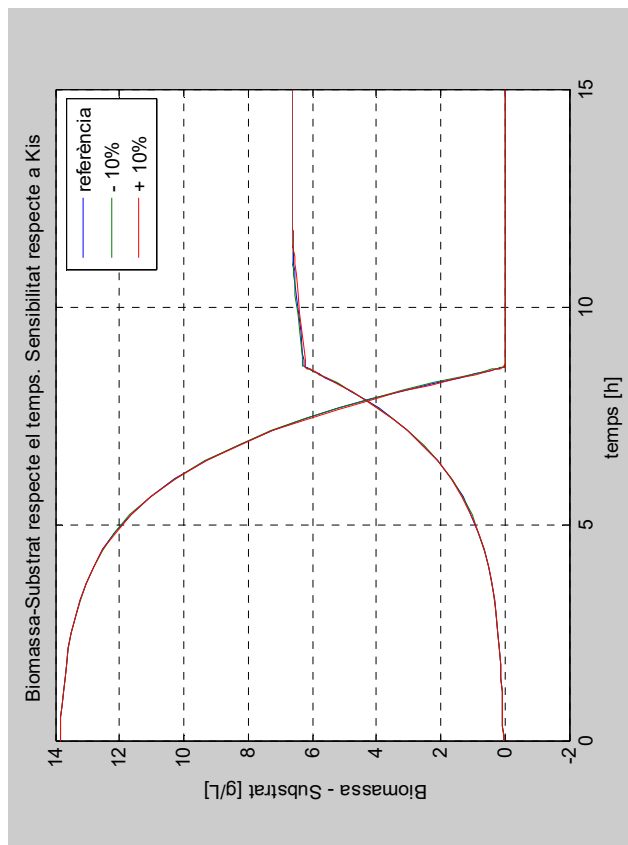
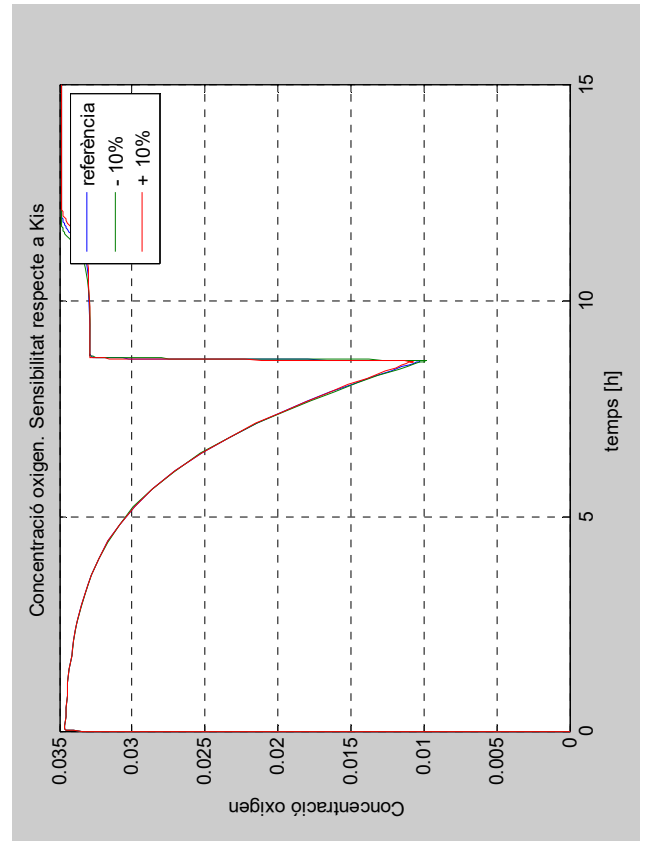
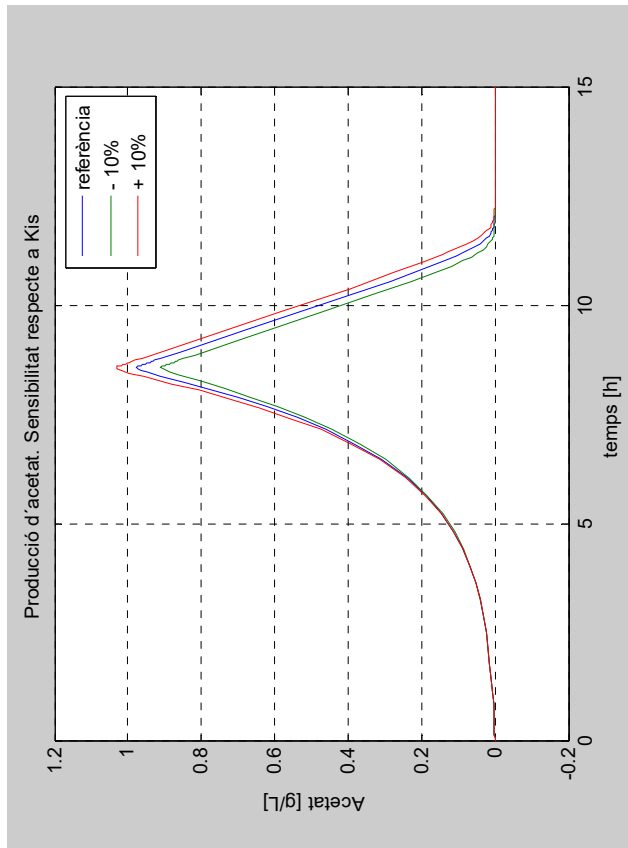
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Ka



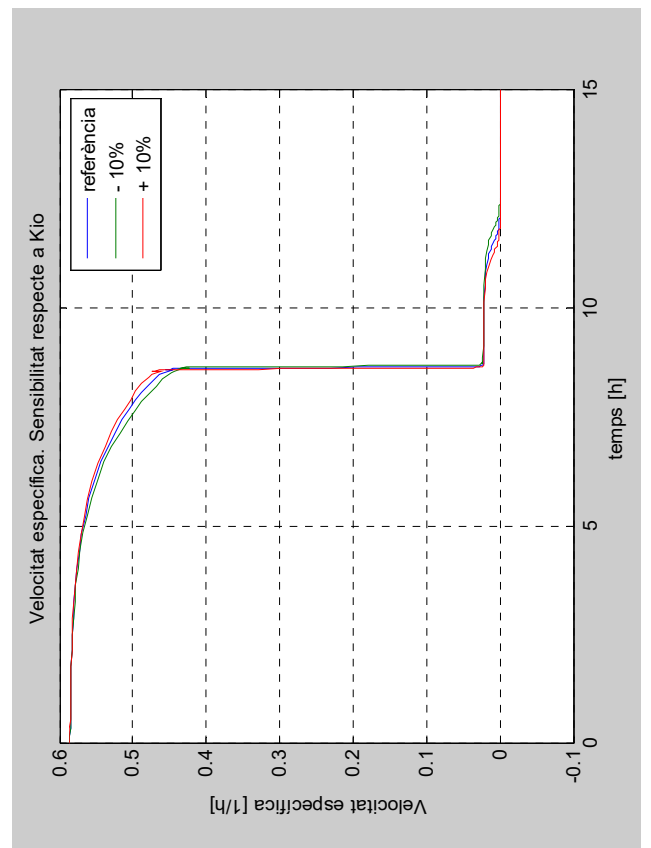
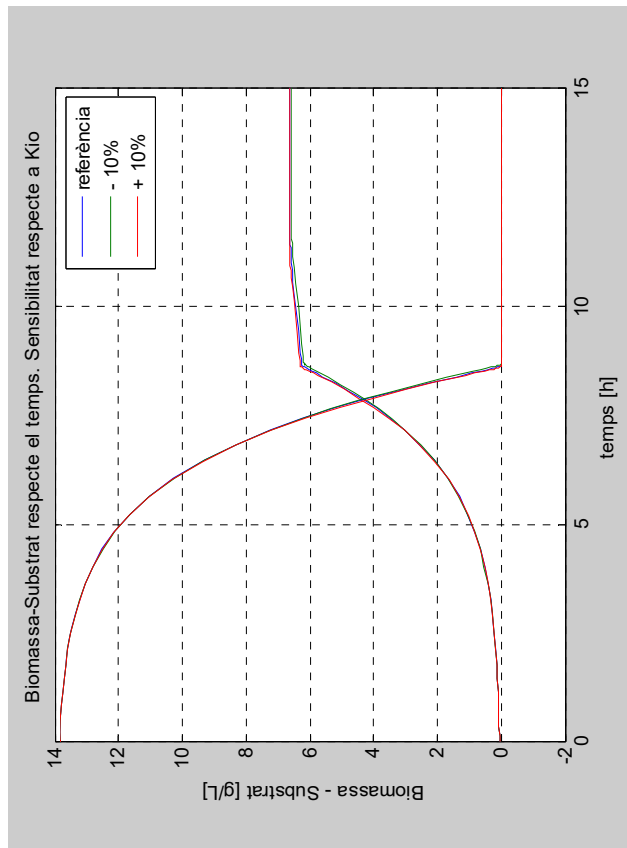
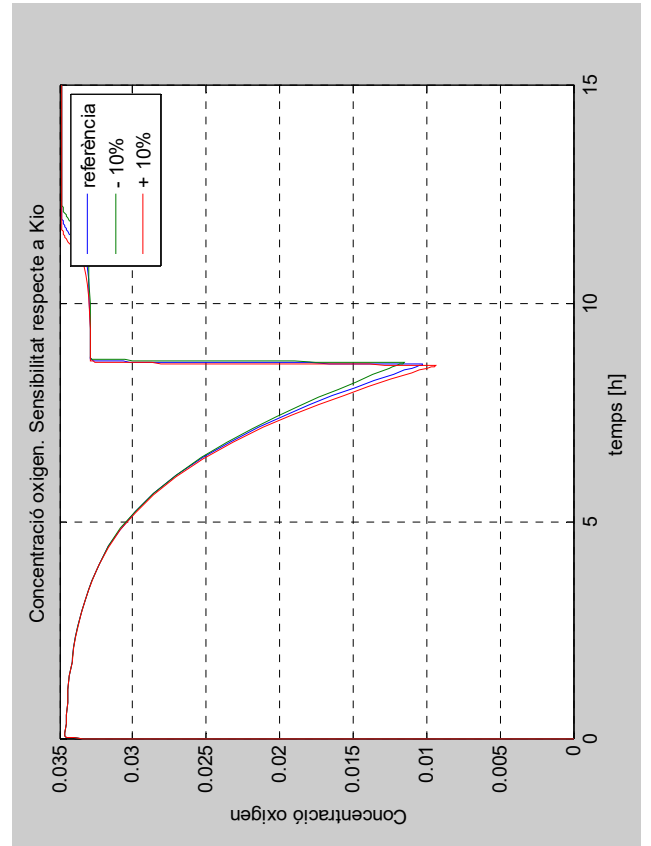
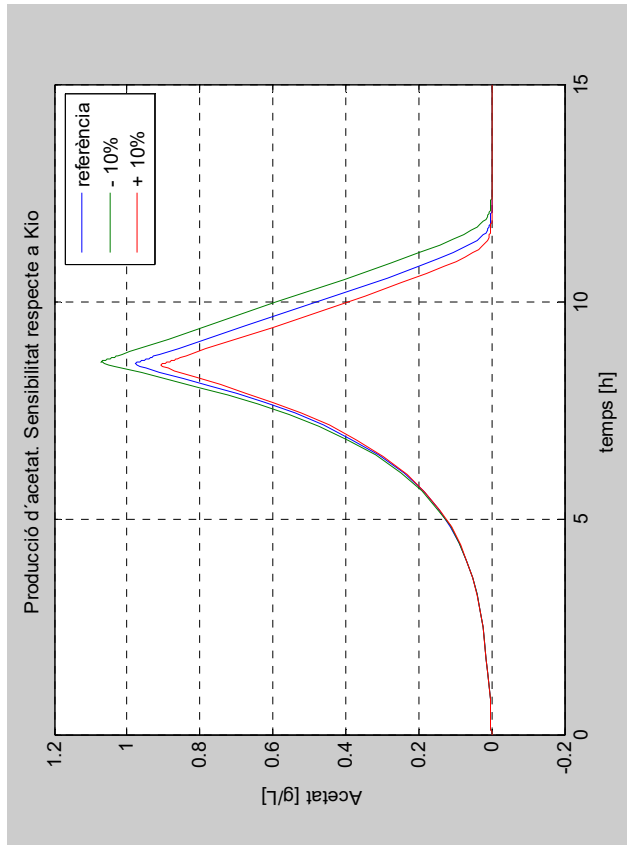
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Ks



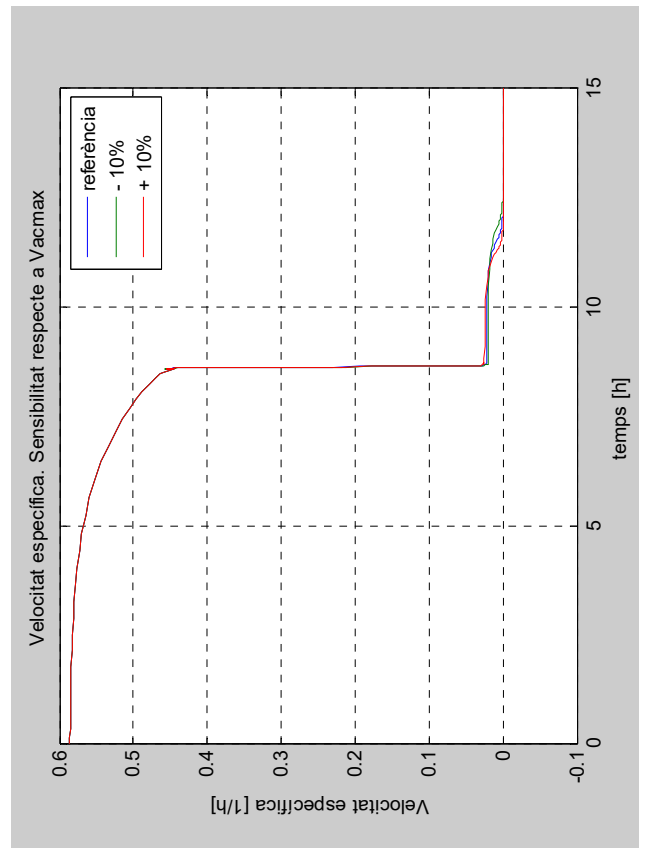
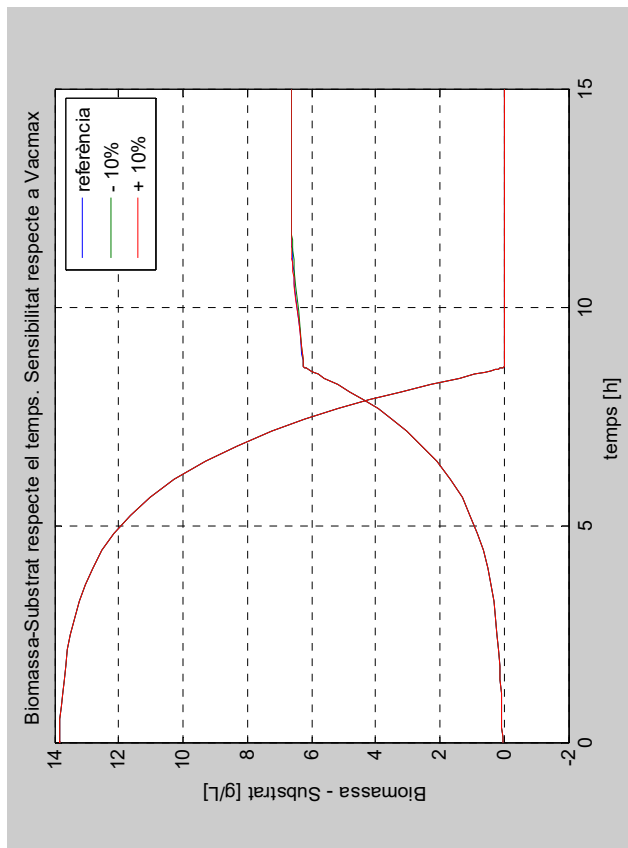
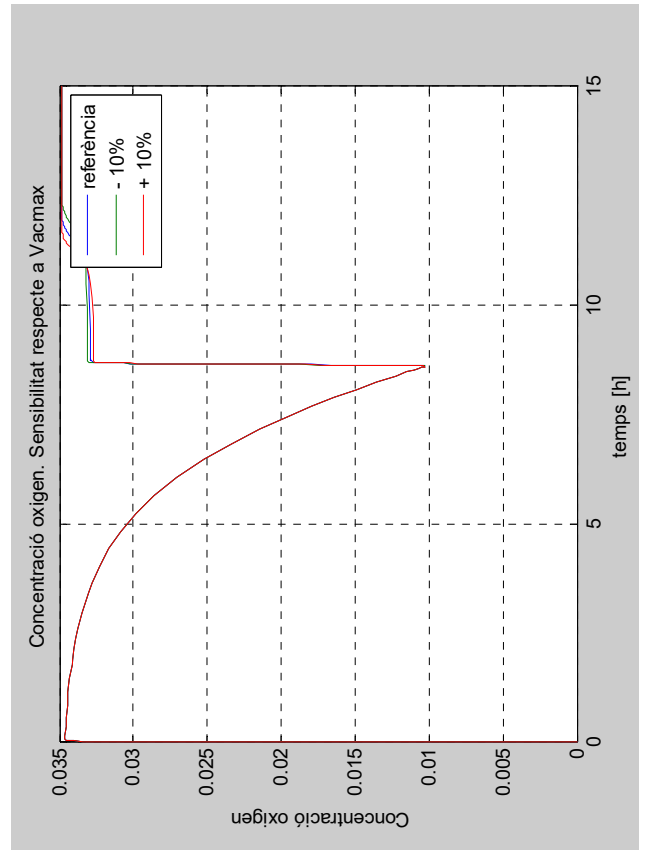
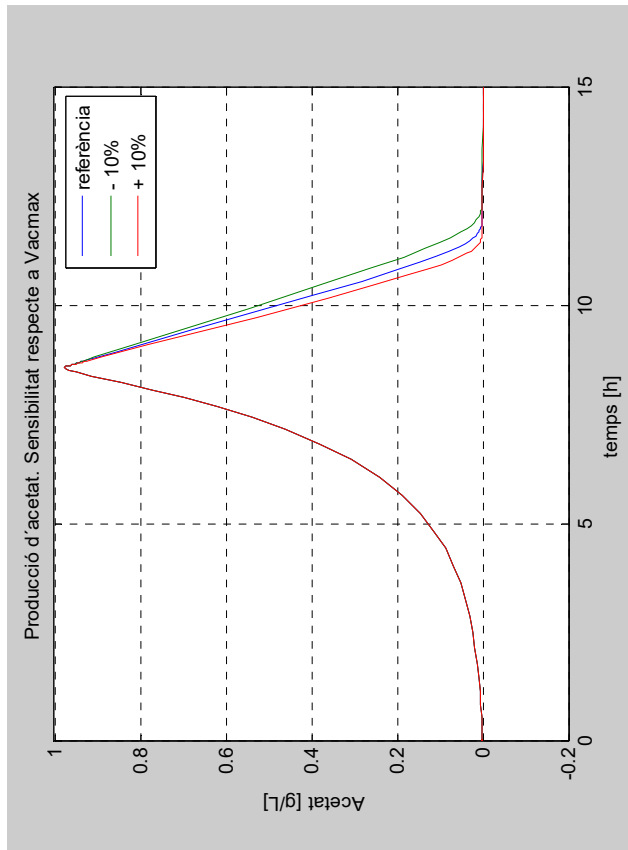
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Kis



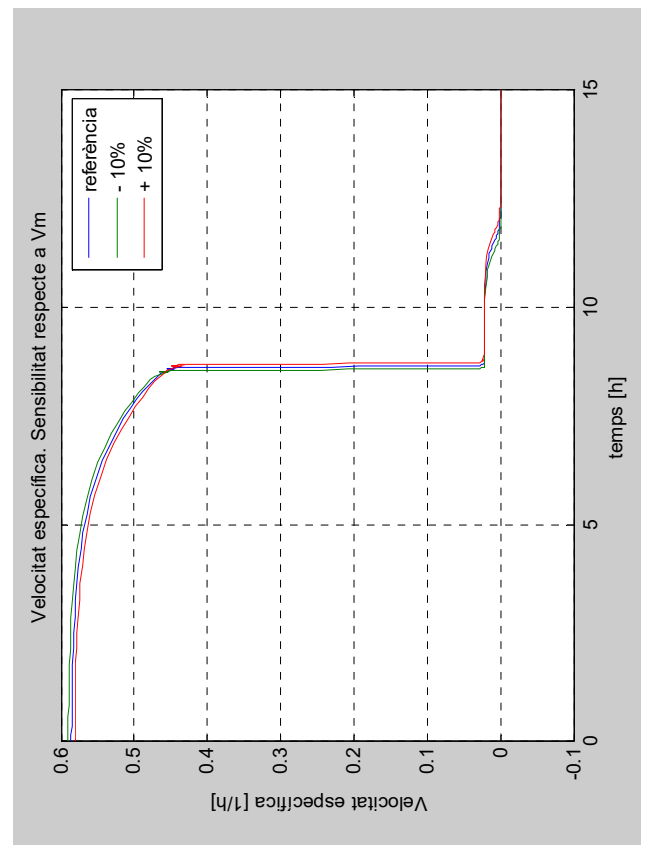
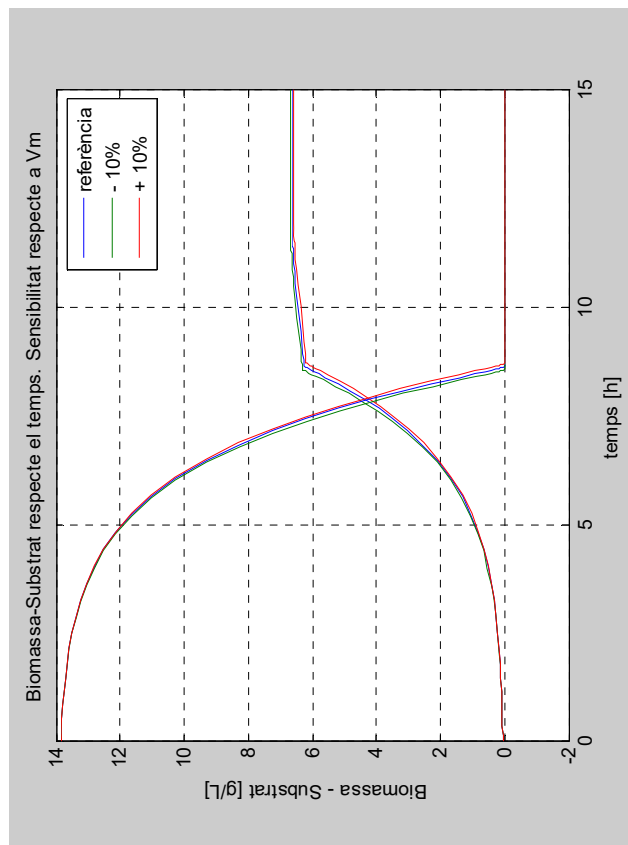
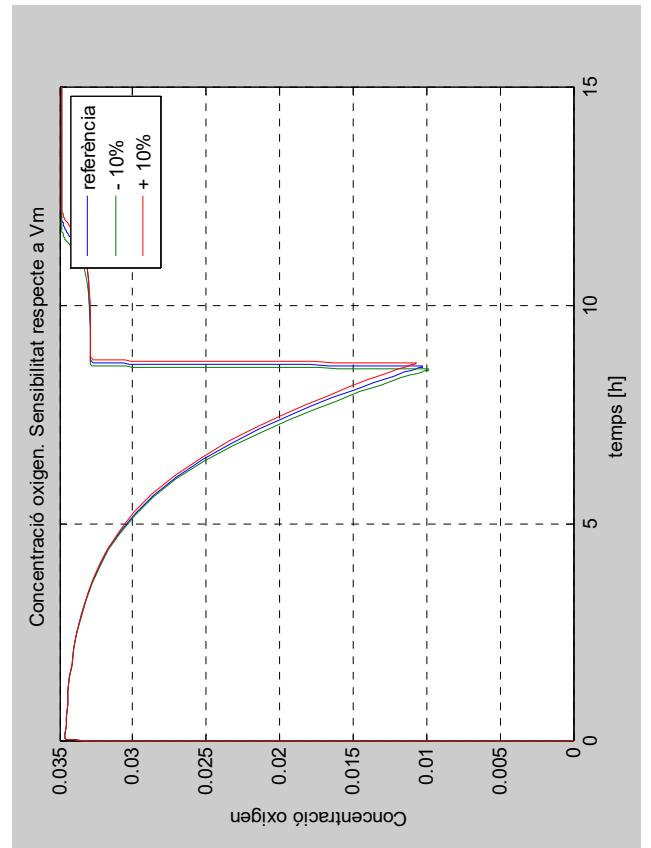
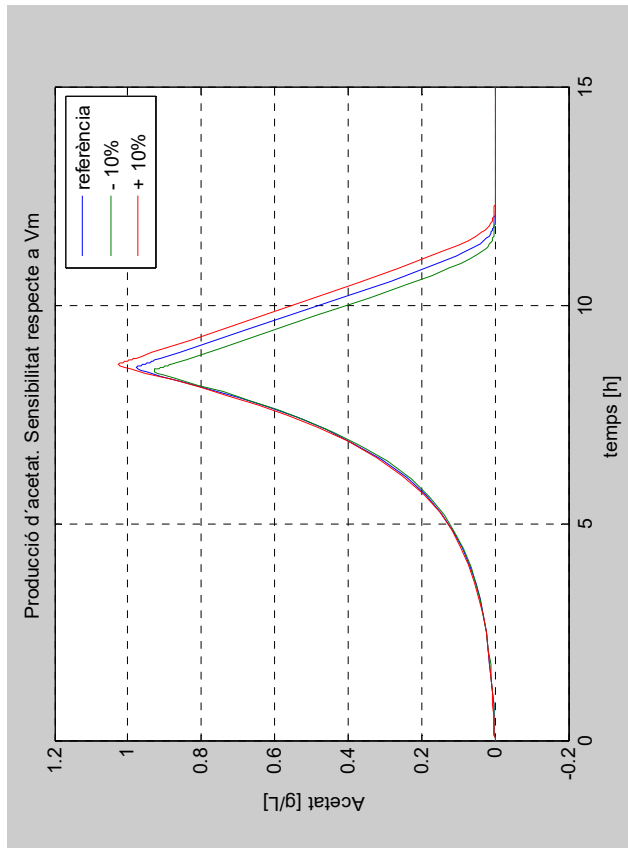
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Kio



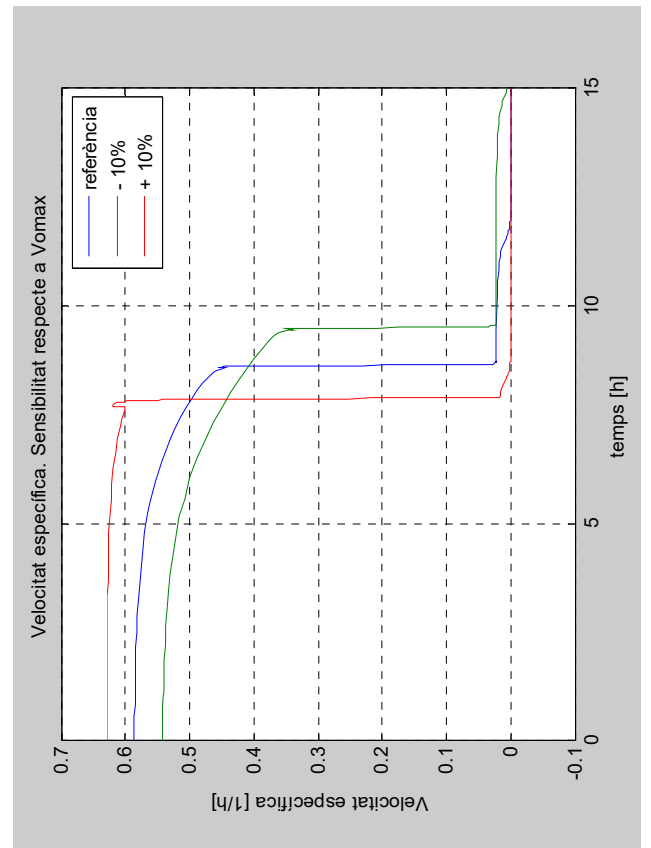
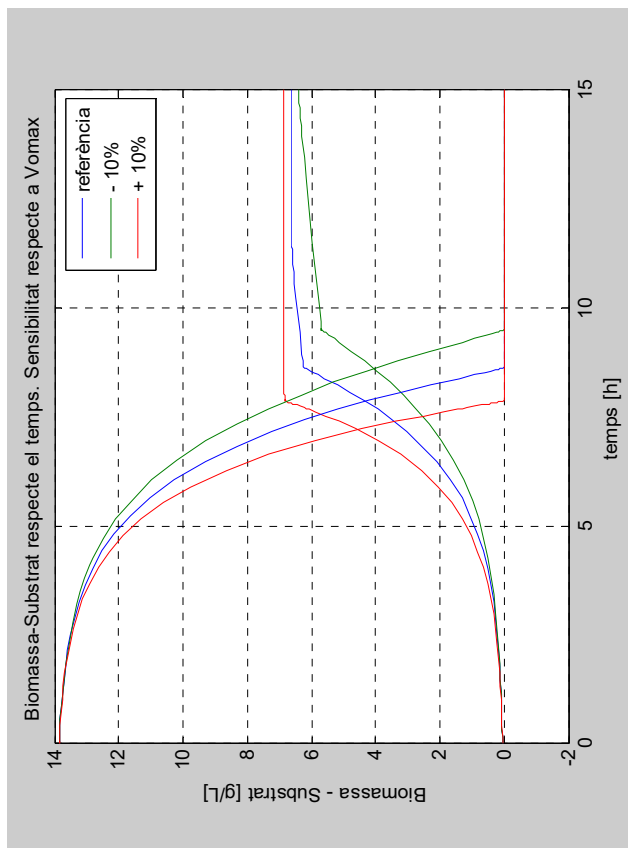
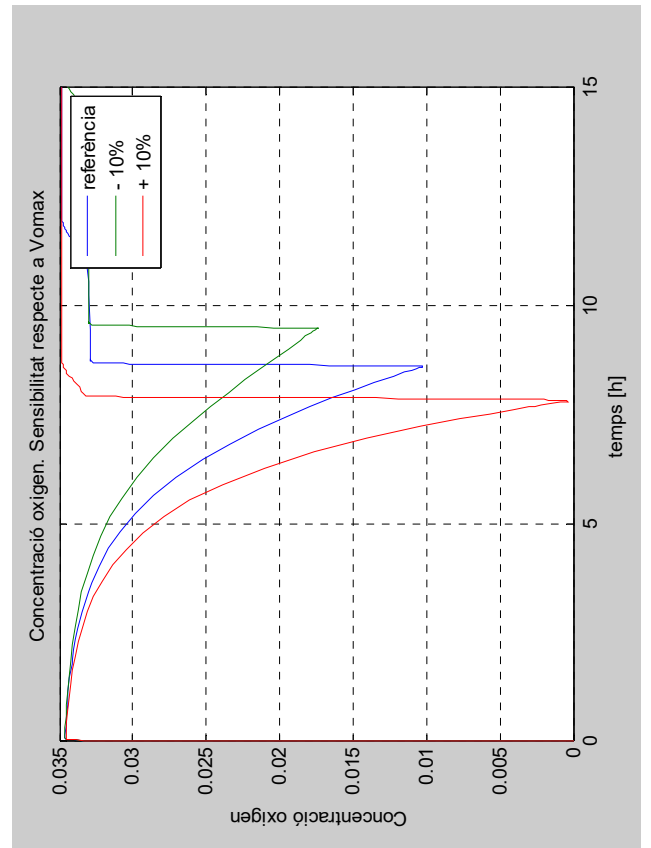
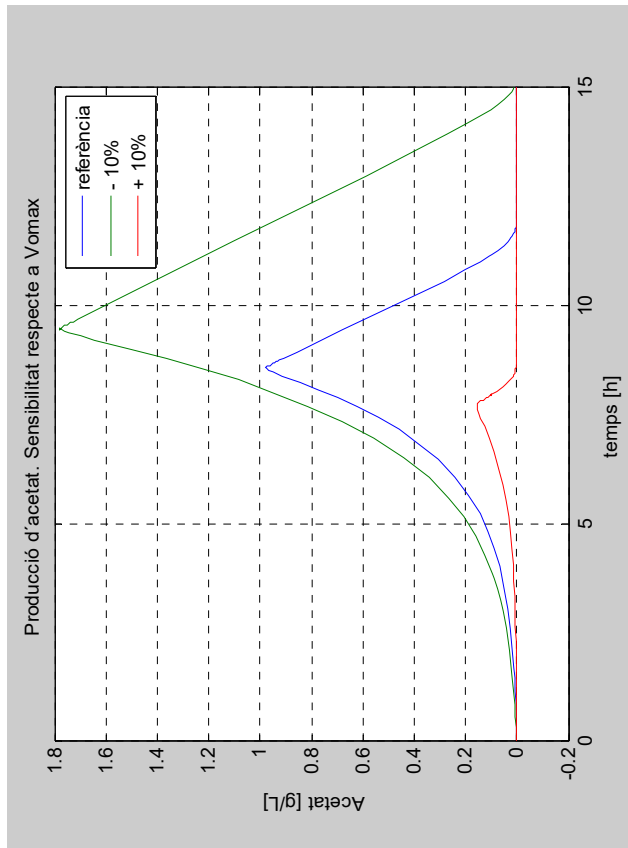
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Vacmax



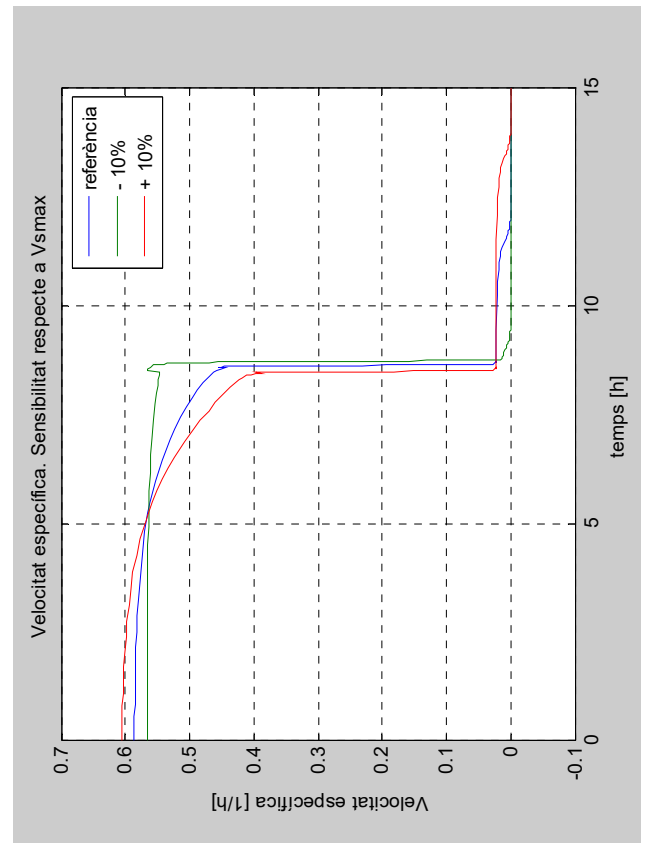
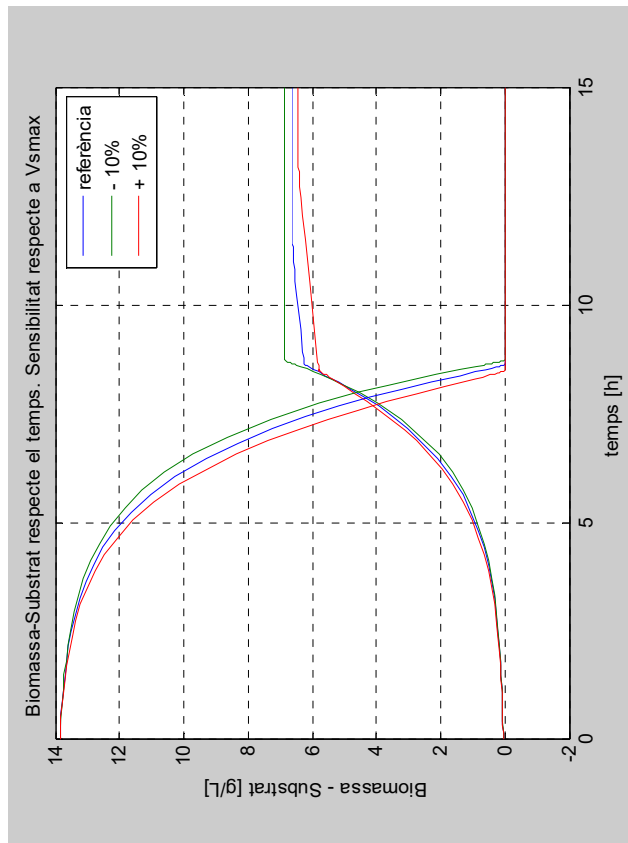
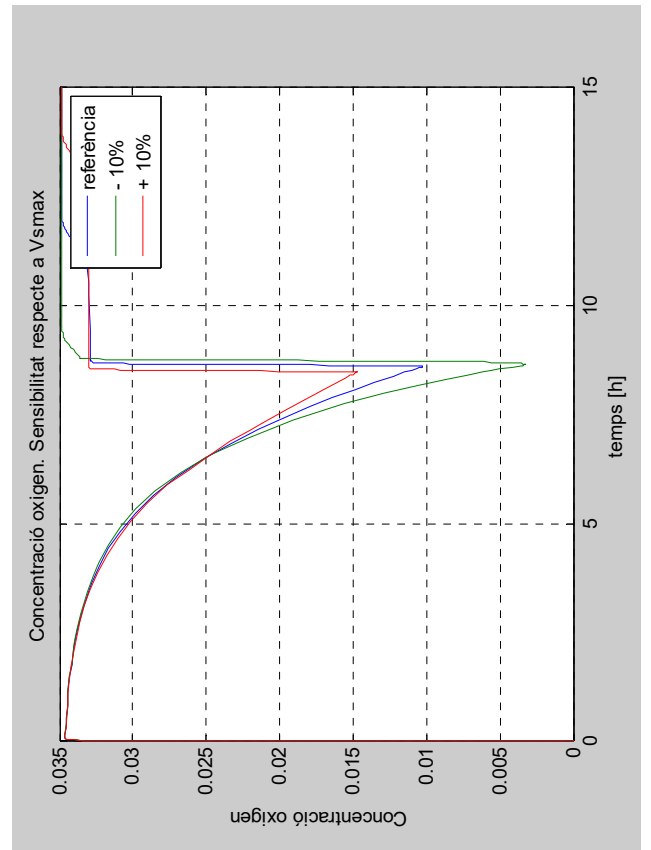
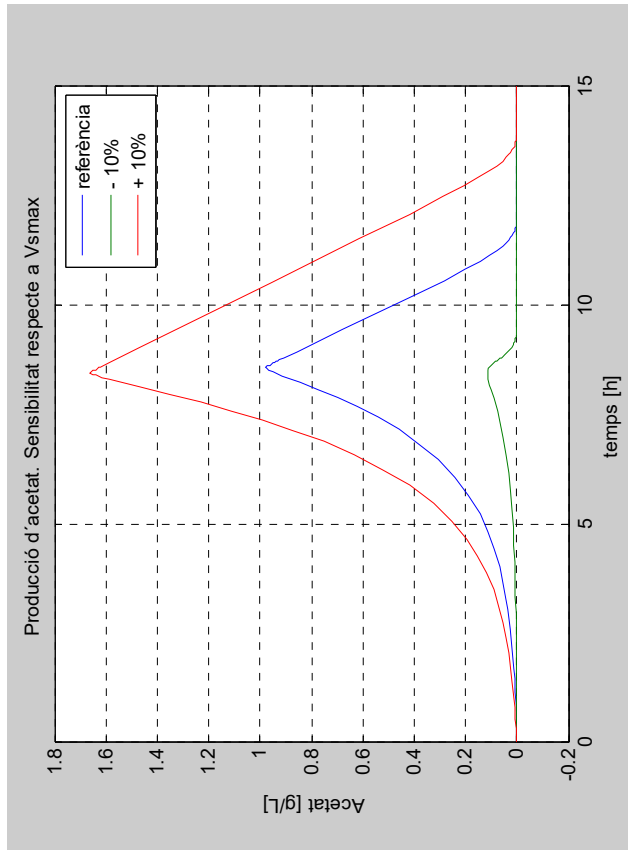
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Vm



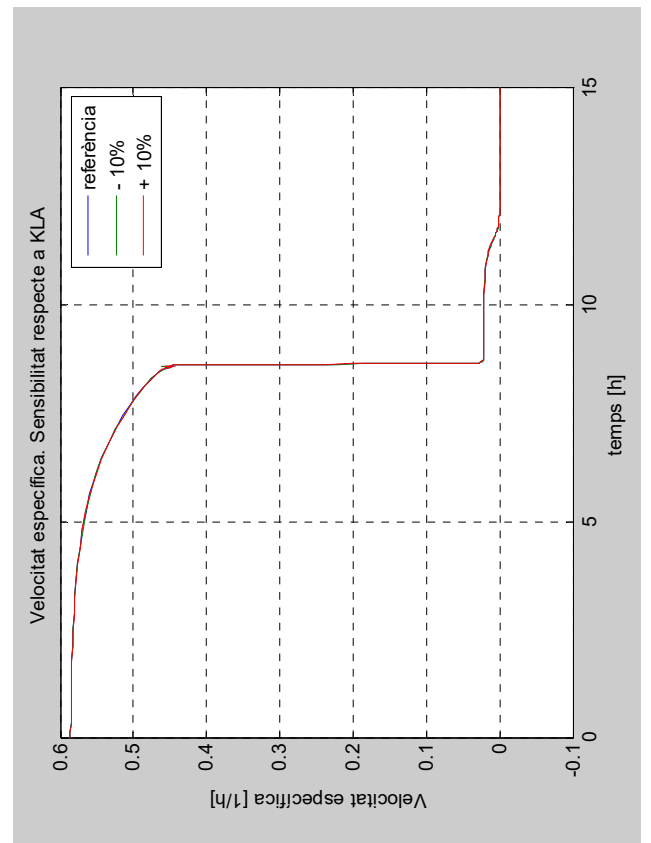
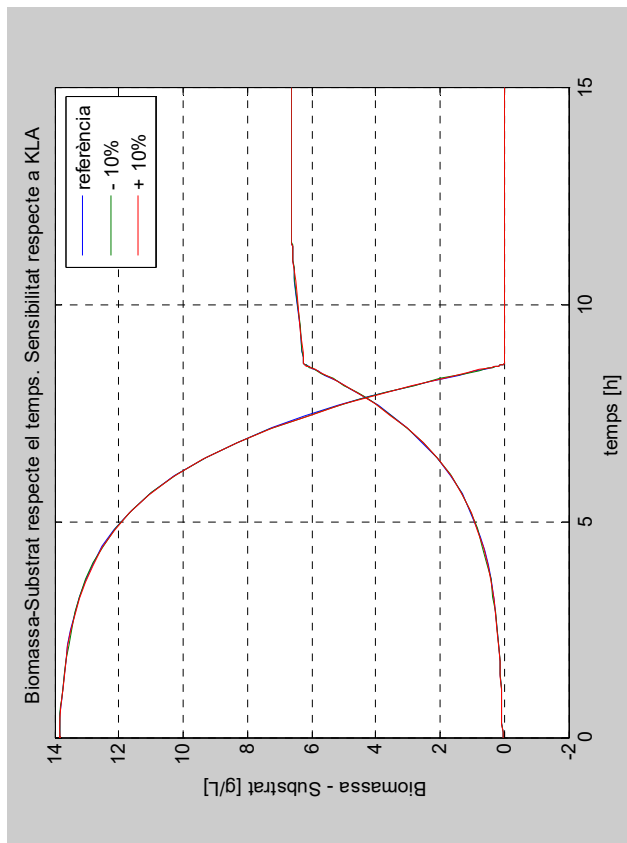
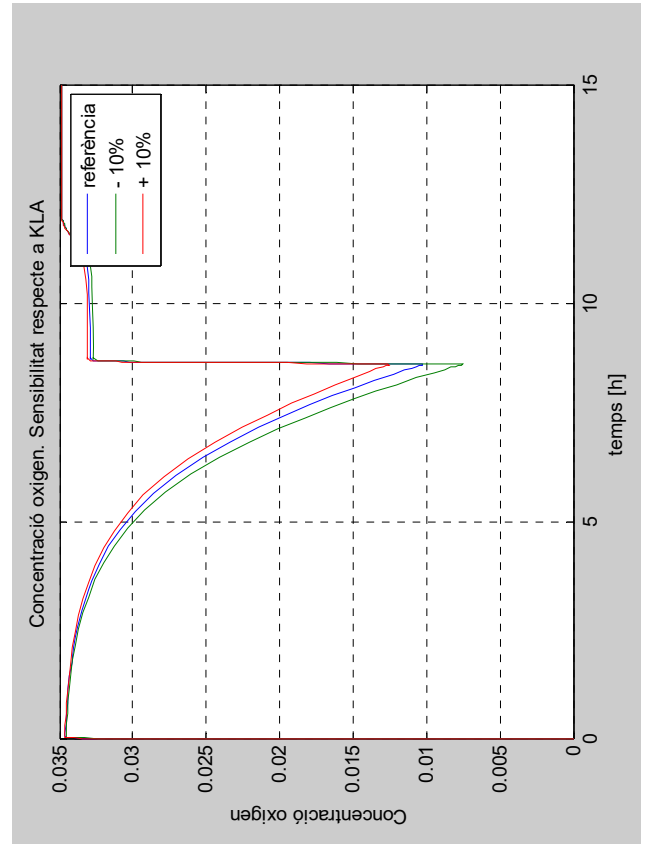
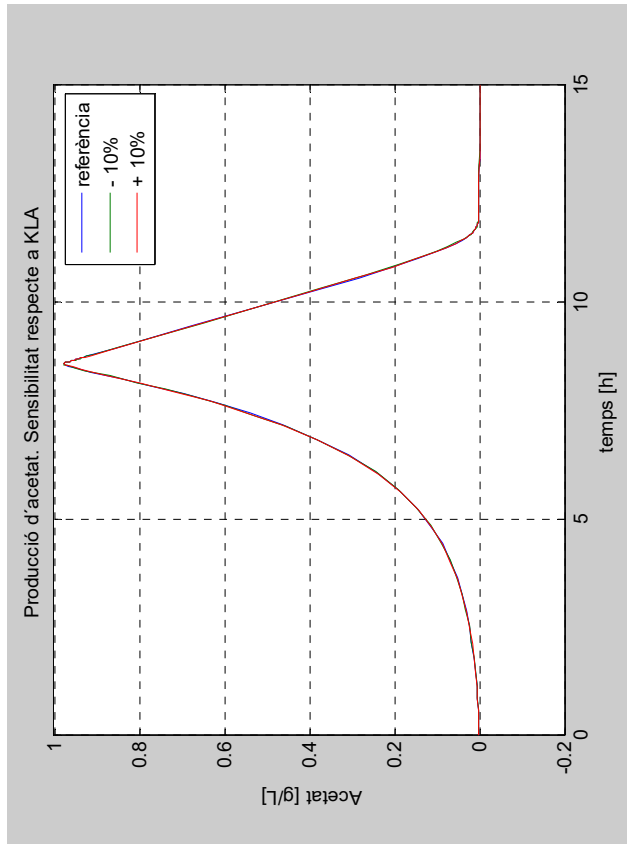
Sensibilitat del model respecte del paràmetre Vomax



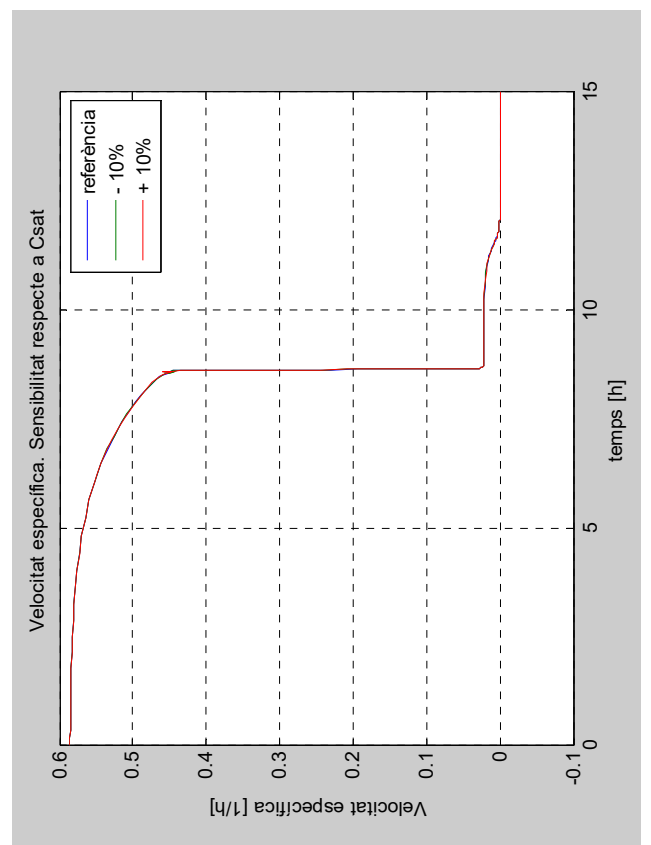
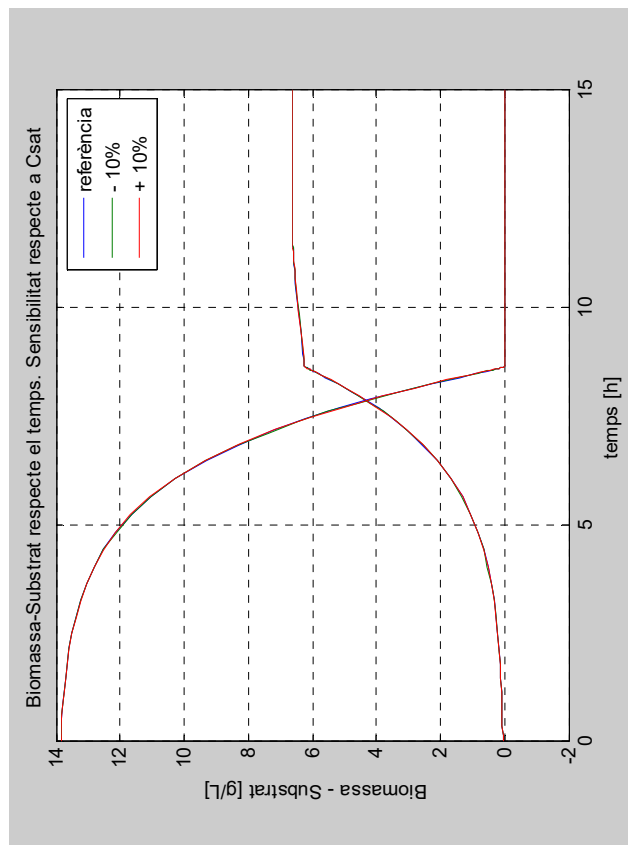
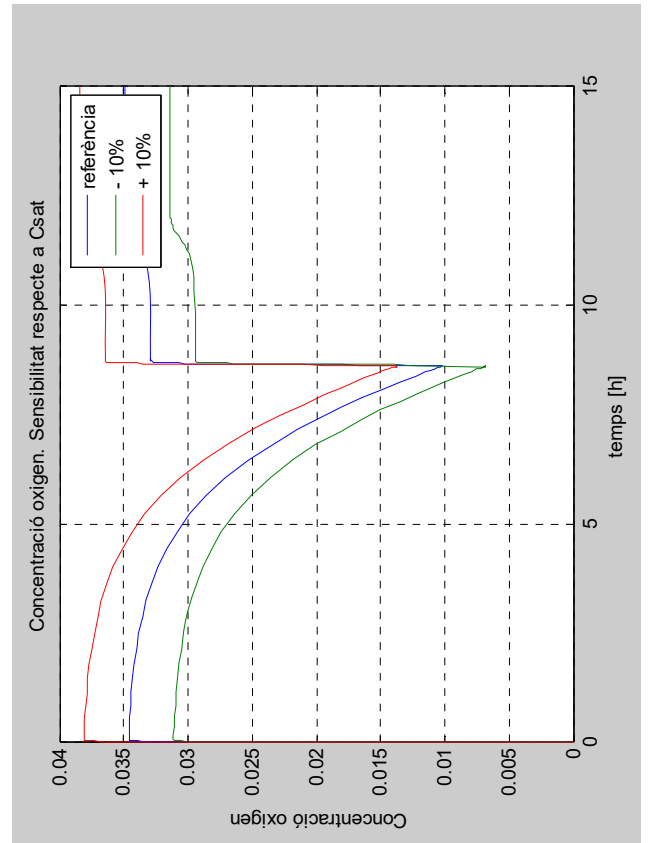
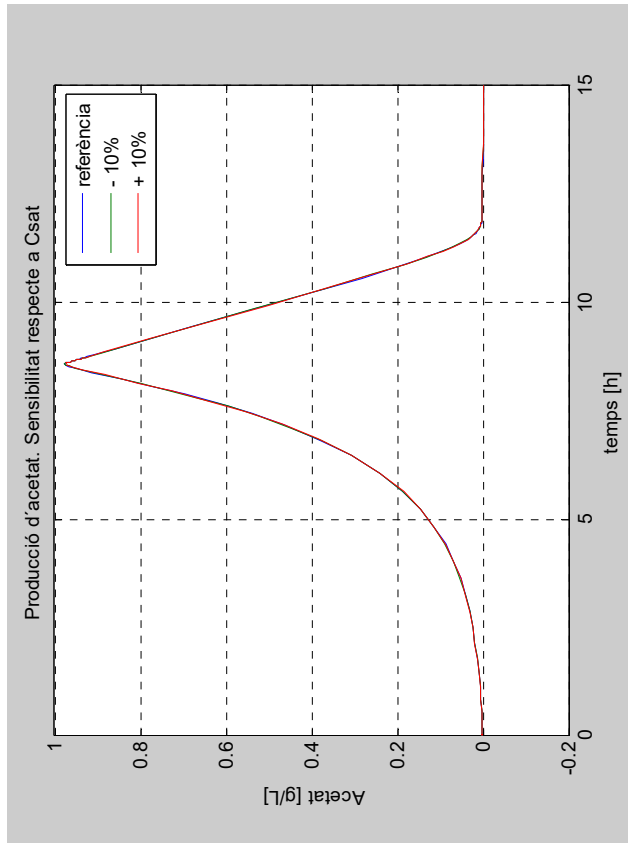
Sensibilitat del model respecte del paràmetre V_{smax}



Sensibilitat del model respecte del paràmetre k_{La}



Sensibilitat del model respecte del paràmetre C_{sat}



6.6 Annex 6. Codi i subrutines del programa de simulació desenvolupat

Codi del program principal i formulari (Visual Basic)

```
Imports MathWorks.MATLAB.NET.Arrays
Imports MathWorks.MATLAB.NET.Utility

Public Class frmFinalJJ
    Private Matlab As Object

    Private Sub cmdCalcular_Click(ByVal sender As System.Object, ByVal e As System.EventArgs) Handles cmdCalcular.Click
        'Primer comprovem que tots els valors introduïts son numerics i els transformem ja en doubles.
        'Depenen del model seleccionat pel usuari, cridem l'arxiu corresponent del Matlab i alhora
        'es representen les grafiques de les variables que ens ha seleccionat l'usuari.

        Dim ApplicationPath As String = My.Application.Info.DirectoryPath
        ApplicationPath = Strings.Left(ApplicationPath, Len(ApplicationPath) - 10)

        If optSimulacio.Checked Then
            If VerificarSimulacio() Then
                Matlab = CreateObject("Matlab.Application")
                Simulacio(ApplicationPath)
            End If
        Else
            If Not VerificarDadesComunes() Or Not VerificarDadesAntic() Or Not VerificarDadesSensibilitat() Then
                MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
                Exit Sub
            End If
            Matlab = CreateObject("Matlab.Application")
            Sensibilitat(ApplicationPath)
        End If
    End Sub

    Private Sub Simulacio(ByVal ApplicationPath As String)
        Dim Yas, Yoa, Yos, Yxa, Yxsof, Yxsox, Yeox, Yesx, Yxs, Ka, Ks, Kio, Kis, Ca, Cs, Cx, Vacmax, Vm, Vomax, Vsmax, Vesd, Veod, KLA, Csat, S0, X0, A0, V0, F, Sfeed, Fsample, MuCte As Double
        Dim cadena As String
        Dim variable(), titulo() As String
        Dim controles As CheckBox
        Dim i As Integer

        Yas = CDb1(txtYas.Text)
        Yoa = CDb1(txtYoa.Text)
        Yos = CDb1(txtYos.Text)
        Yxa = CDb1(txtYxa.Text)
        Yxsof = CDb1(txtYxsof.Text)
        Yxsox = CDb1(txtYxsox.Text)
        Ka = CDb1(txtKa.Text)
        Ks = CDb1(txtKs.Text)
        Ca = CDb1(txtCa.Text)
```

```

Cs = CDb1(txtCs.Text)
Cx = CDb1(txtCx.Text)
Vacmax = CDb1(txtVacmax.Text)
Vm = CDb1(txtVm.Text)
Vomax = CDb1(txtVomax.Text)
Vsmax = CDb1(txtVsmax.Text)
KLA = CDb1(txtKLA.Text)
Csat = CDb1(txtCsat.Text)
S0 = CDb1(txtS0.Text)
X0 = CDb1(txtX0.Text)
A0 = CDb1(txtA0.Text)
If chkModelAntic.Checked Then
    Kis = CDb1(txtKis.Text)
    Kio = CDb1(txtKio.Text)
End If
If chkModelNou.Checked Then
    Yesx = CDb1(txtYesx.Text)
    Yeox = CDb1(txtYeox.Text)
    Vesd = CDb1(txtVesd.Text)
    Veod = CDb1(txtVeod.Text)
End If
If optFedBatch.Checked Then
    V0 = CDb1(txtV0.Text)
    Sfeed = CDb1(txtSfeed.Text)
    Fsample = CDb1(txtFSample.Text)
End If
If chkModelNou.Checked AndAlso optFedBatch.Checked Then
    F = CDb1(txtF.Text)
End If
If chkModelAntic.Checked AndAlso optFedBatch.Checked Then
    Yxs = CDb1(txtYxs.Text)
    MuCte = CDb1(txtMuCte.Text)
End If

EtiquetasGraficas(variable, titulo)
Matlab.execute("cd " & ApplicationPath & "\Resultats")
If chkModelAntic.Checked Then
    If optBatch.Checked Then
        cadena = "[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3]=AnticOriginal(" &
Str(Yas) _
        & "," & Str(Yoa) & "," & Str(Yos) & "," &
Str(Yxa) _
        & "," & Str(Yxsof) & "," & Str(Yxsox) & "," &
Str(Ka) _
        & "," & Str(Ks) & "," & Str(Kio) & "," &
Str(Kis) _
        & "," & Str(Ca) & "," & Str(Cs) & "," &
Str(Cx) & "," _
        & Str(Vacmax) & "," & Str(Vm) & "," &
Str(Vomax) _
        & "," & Str(Vsmax) & "," & Str(KLA) & "," &
Str(Csat) _
        & "," & Str(S0) & "," & Str(X0) & "," &
Str(A0) & ",[0 15])"
    Else
        cadena = "[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3]=AnticFed(" & Str(Yas) &
", " & Str(Yoa) & ", " & Str(Yos) & ", " & Str(Yxa) _
        & ", " & Str(Yxsof) & ", " & Str(Yxsox) & ", " &
Str(Yxs) & ", " & Str(Ka) & ", " & Str(Ks) & ", " & Str(Kio) & ", " &
Str(Kis) _

```

```

        & "," & Str(Ca) & "," & Str(Cs) & "," &
Str(Cx) & "," & Str(Vacmax) & "," & Str(Vm) & "," & Str(Vomax) _
        & "," & Str(Vsmax) & "," & Str(KLA) & "," &
Str(Csat) & "," & Str(S0) & "," & Str(X0) & "," & Str(A0) & _
        "," & Str(V0) & "," _
        & Str(Sfeed) & "," & Str(Fsample) & "," &
Str(MuCte) & _
        ", 15, 3.75, [0 20])"
End If
Matlab.execute(cadena)
For Each controles In fraGrafiques.Controls
    If controles.Checked Then
        i = CInt(controles.Tag)
        Matlab.execute("figure(" & Str(i) & ")")
        If i = 5 Then
            Matlab.execute("plot(t,y(:,1),t,y(:,2))")
        ElseIf i = 6 Then
            Matlab.execute("plot(t,Mu1,t,Mu2,t,Mu3)")
        Else
            Matlab.execute("plot(t,y(:, " & Str(i) & "))")
        End If
        Matlab.execute("grid")
        Matlab.execute("xlabel('temps [h]')")
        Matlab.execute("ylabel(' " & variable(i - 1) &
"')")
        Matlab.execute("title(' " & titulo(i - 1) & "')")
    End If
Next controles
End If

If chkModelNou.Checked Then
    If optBatch.Checked Then
        cadena = "[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3]=NouOriginal(" &
Str(Yas) & "," & Str(Yoa) & "," & Str(Yos) & "," & Str(Yxa) _
        & "," & Str(Yxsof) & "," & Str(Yxsox) & "," &
Str(Yesx) & "," & Str(Yeox) & "," & Str(Ka) & "," & Str(Ks) _
        & "," & Str(Ca) & "," & Str(Cs) & "," &
Str(Cx) & "," & Str(Vacmax) & "," & Str(Vm) & "," & Str(Vomax) _
        & "," & Str(Vsmax) & "," & Str(Vesd) & "," &
Str(Veod) & "," & Str(KLA) & "," & Str(Csat) & "," & Str(S0) _
        & "," & Str(X0) & "," & Str(A0) & ", [0 15])"
    Else
        cadena = "[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3]=NouFed(" & Str(Yas) &
", " & Str(Yoa) & ", " & Str(Yos) & ", " & Str(Yxa) _
        & ", " & Str(Yxsof) & ", " & Str(Yxsox) & ", " &
Str(Yesx) & ", " & Str(Yeox) & ", " & Str(Ka) & ", " & Str(Ks) _
        & ", " & Str(Ca) & ", " & Str(Cs) & ", " &
Str(Cx) & ", " & Str(Vacmax) & ", " & Str(Vm) & ", " & Str(Vomax) _
        & ", " & Str(Vsmax) & ", " & Str(Vesd) & ", " &
Str(Veod) & ", " & Str(KLA) & ", " & Str(Csat) & ", " & Str(S0) _
        & ", " & Str(X0) & ", " & Str(A0) & ", " &
Str(V0) & ", " & Str(F) & ", " & Str(Sfeed) & ", " & Str(Fsample) & ", [0
20])"
    End If
    Matlab.execute(cadena)
    For Each controles In fraGrafiques.Controls
        If controles.Checked Then
            i = CInt(controles.Tag)
            Matlab.execute("figure(" & Str(i + 6) & ")")
            If i = 5 Then
                Matlab.execute("plot(t,y(:,1),t,y(:,2))")
            End If
        End If
    Next controles
End If

```



```

        ElseIf i = 6 Then
            Matlab.execute("plot(t,Mu1,t,Mu2,t,Mu3)")
        Else
            Matlab.execute("plot(t,y(:, " & Str(i) & "))")
        End If
        Matlab.execute("grid")
        Matlab.execute("xlabel('temps [h]')")
        Matlab.execute("ylabel(' " & variable(i - 1) &
"')")

        Matlab.execute("title(' " & titulo(i - 1) & "')")
    End If
Next controles
End If
End Sub

Private Sub Sensibilitat(ByVal ApplicationPath As String)
    Dim Yas, Yoa, Yos, Yxa, Yxsof, Yxsox, Ka, Ks, Kio, Kis, Ca,
Cs, Cx, Vacmax, Vm, Vomax, Vsmax, KLA, Csat, S0, X0, A0, Sensibilitat
As Double
    Dim cadena As String
    Dim variable(), titulo() As String
    Dim controles As CheckBox

    Matlab.execute("cd ' " & ApplicationPath & "\Resultats'")
    Yas = CDb1(txtYas.Text)
    cadena = "Yas=" & Str(Yas) & ";" & vbCrLf
    Yoa = CDb1(txtYoa.Text)
    cadena &= "Yoa=" & Str(Yoa) & ";" & vbCrLf
    Yos = CDb1(txtYos.Text)
    cadena &= "Yos=" & Str(Yos) & ";" & vbCrLf
    Yxa = CDb1(txtYxa.Text)
    cadena &= "Yxa=" & Str(Yxa) & ";" & vbCrLf
    Yxsof = CDb1(txtYxsof.Text)
    cadena &= "Yxsof=" & Str(Yxsof) & ";" & vbCrLf
    Yxsox = CDb1(txtYxsox.Text)
    cadena = cadena & "Yxsox=" & Str(Yxsox) & ";" & vbCrLf
    Ka = CDb1(txtKa.Text)
    cadena = cadena & "Ka=" & Str(Ka) & ";" & vbCrLf
    Ks = CDb1(txtKs.Text)
    cadena = cadena & "Ks=" & Str(Ks) & ";" & vbCrLf
    Kis = CDb1(txtKis.Text)
    cadena = cadena & "Kis=" & Str(Kis) & ";" & vbCrLf
    Kio = CDb1(txtKio.Text)
    cadena = cadena & "Kio=" & Str(Kio) & ";" & vbCrLf
    Ca = CDb1(txtCa.Text)
    cadena = cadena & "Ca=" & Str(Ca) & ";" & vbCrLf
    Cs = CDb1(txtCs.Text)
    cadena = cadena & "Cs=" & Str(Cs) & ";" & vbCrLf
    Cx = CDb1(txtCx.Text)
    cadena = cadena & "Cx=" & Str(Cx) & ";" & vbCrLf
    Vacmax = CDb1(txtVacmax.Text)
    cadena = cadena & "Vacmax=" & Str(Vacmax) & ";" & vbCrLf
    Vm = CDb1(txtVm.Text)
    cadena = cadena & "Vm=" & Str(Vm) & ";" & vbCrLf
    Vomax = CDb1(txtVomax.Text)
    cadena = cadena & "Vomax=" & Str(Vomax) & ";" & vbCrLf
    Vsmax = CDb1(txtVsmax.Text)
    cadena = cadena & "Vsmax=" & Str(Vsmax) & ";" & vbCrLf
    KLA = CDb1(txtKLA.Text)
    cadena = cadena & "KLA=" & Str(KLA) & ";" & vbCrLf
    Csat = CDb1(txtCsat.Text)

```

```

cadena = cadena & "Csat=" & Str(Csat) & ";" & vbCrLf
S0 = CDb1(txtS0.Text)
cadena = cadena & "S0=" & Str(S0) & ";" & vbCrLf
X0 = CDb1(txtX0.Text)
cadena = cadena & "X0=" & Str(X0) & ";" & vbCrLf
A0 = CDb1(txtA0.Text)
cadena = cadena & "A0=" & Str(A0) & ";" & vbCrLf
Sensibilitat = CDb1(txtSensibilitat.Text)
cadena = cadena & "Sensibilitat=" & Str(Sensibilitat) & ";" &
vbCrLf

'TO DO: Escollir desde formulari
cadena = cadena & "t=[0 15];"
Matlab.execute(cadena)

cadena = "Min=1-Sensibilitat/100;" & vbCrLf
cadena = cadena & "Max=1+Sensibilitat/100;" & vbCrLf
cadena = cadena & "Y0=[X0,S0,A0,0];" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[t1,y1]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,
Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[Mu1,Mu4,Mu5,Mu6,Vs1,Vap1,Va1,Vo1,Vsof1,Vsox1]=MuFinal(y1(:,3),y1(:,
2),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,V
acmax);"
Matlab.execute(cadena)
cadena = cboParametre.Text & "=" & cboParametre.Text & "*Min;"
& vbCrLf
cadena = cadena & "Y0=[X0,S0,A0,0];" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[t2,y2]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,
Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[Mu2,Mu4,Mu5,Mu6,Vs2,Vap2,Vac2,Vo2,Vsof2,Vsox2]=MuFinal(y2(:,3),y2(:,
2),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,V
acmax);"
Matlab.execute(cadena)
cadena = cboParametre.Text & "=" & cboParametre.Text &
"*Max/Min;" & vbCrLf
cadena = cadena & "Y0=[X0,S0,A0,0];" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[t3,y3]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,
Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);" & vbCrLf
cadena = cadena &
"[Mu3,Mu4,Mu5,Mu6,Vs3,Vap3,Vac3,Vo3,Vsof3,Vsox3]=MuFinal(y3(:,3),y3(:,
2),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,V
acmax);"
Matlab.execute(cadena)

EtiquetasGraficas(variable, titulo)
For Each controles In fraGrafiques.Controls
    GrafiquesControls(controles, variable, titulo,
Sensibilitat)
Next controles
For Each controles In fraGrafiquesSensibilitat.Controls
    GrafiquesControls(controles, variable, titulo,
Sensibilitat)
Next controles
End Sub

```

```

Private Sub GrafiquesControls(ByVal controles As CheckBox, ByRef
variable() As String, _
ByRef titulo() As String, ByVal sensibilitat As Double)
Dim i As Integer
If controles.Checked Then
i = CInt(controles.Tag)
Matlab.execute("figure(" & Str(i) & ")")
If i = 5 Then

Matlab.execute("plot(t1,y1(:,1),t2,y2(:,1),t3,y3(:,1))" & vbCrLf & _
"line(t1,y1(:,2),'Color','b')" & vbCrLf &
"line(t2,y2(:,2),'Color',[0 0.5 0])" & _
vbCrLf & "line(t3,y3(:,2),'Color','r')")
ElseIf i = 6 Then
Matlab.execute("plot(t1,Mu1,t2,Mu2,t3,Mu3)")
ElseIf i = 7 Then
Matlab.execute("plot(t1,Vac1,t2,Vac2,t3,Vac3)")
ElseIf i = 8 Then
Matlab.execute("plot(t1,Vsox1,t2,Vsox2,t3,Vsox3)")
ElseIf i = 9 Then
Matlab.execute("plot(t1,Vsof1,t2,Vsof2,t3,Vsof3)")
ElseIf i = 10 Then
Matlab.execute("plot(t1,Vap1,t2,Vap2,t3,Vap3)")
ElseIf i = 11 Then
Matlab.execute("plot(t1,Vo1,t2,Vo2,t3,Vo3)")
Else
Matlab.execute("plot(t1,y1(:, " & Str(i) & "),t2,y2(:, "
& Str(i) & "),t3,y3(:, " & Str(i) & "))")
End If
Matlab.execute("grid")
Matlab.execute("xlabel('temps [h]')")
Matlab.execute("ylabel(' " & variable(i - 1) & "')")
Matlab.execute("title(' " & titulo(i - 1) & ". Sensibilitat
respecte a " & cboParametre.Text & "')")
Matlab.execute("legend('referència','-' &
Str(sensibilitat) & "%','+' & Str(sensibilitat) & "%')")
End If
End Sub

Private Sub cmdSalir_Click(ByVal sender As System.Object, ByVal e
As System.EventArgs) Handles cmdSortir.Click
Matlab = Nothing
Me.Close()
End Sub

Private Sub EtiquetasGraficas(ByRef variable() As String, ByRef
titulo() As String)
'Tenim dos vectors amb els noms de les variables i els títols
de les grafiques
ReDim variable(0 To 10), titulo(0 To 10)

variable(0) = "Biomassa [g/L]"
variable(1) = "Substrat [g/L]"
variable(2) = "Acetat [g/L]"
variable(3) = "Concentració oxigen"
variable(4) = "Biomassa - Substrat [g/L]"
variable(5) = "Velocitat específica [1/h]"
variable(6) = "Vac [g/g·h]"
variable(7) = "Vsox [g/g·h]"
variable(8) = "Vsof [g/g·h]"
variable(9) = "Vap [g/g·h]"

```

```

variable(10) = "Vo [g/g·h]"

titulo(0) = "Producció de biomassa respecte el temps"
titulo(1) = "Consum de substrat respecte el temps"
titulo(2) = "Producció d'acetat"
titulo(3) = "Concentració oxigen"
titulo(4) = "Biomassa-Substrat respecte el temps"
titulo(5) = "Velocitat específica"
titulo(6) = "Vac respecte el temps"
titulo(7) = "Vsox respecte el temps"
titulo(8) = "Vsof respecte el temps"
titulo(9) = "Vap respecte el temps"
titulo(10) = "Vo respecte el temps"
End Sub

Private Sub frmFinalJJ_Load(ByVal sender As System.Object, ByVal e
As System.EventArgs) Handles MyBase.Load
    'Inicialment fem que els valors predeterminats siguin els
següents, així asegurem que estan ben escrits
    txtSensibilitat.Text = 10.0
    CarregarParametresSensibilitat()
End Sub

Private Sub optBatch_CheckedChanged(ByVal sender As System.Object,
ByVal e As System.EventArgs) Handles optBatch.CheckedChanged
    If optBatch.Checked Then
        InicialitzacioParametres()
        InicialitzacioBatch()
    Else
        InicialitzacioParametres()
        InicialitzacioFebBatch()
    End If
    fraVariablesFedBatch.Visible = optFedBatch.Checked
    FedBatchOptions()
End Sub

Private Sub chkModelNou_CheckedChanged(ByVal sender As
System.Object, ByVal e As System.EventArgs) Handles
chkModelNou.CheckedChanged
    pnlModelNou1.Visible = chkModelNou.Checked
    pnlModelNou2.Visible = chkModelNou.Checked
    FedBatchOptions()
End Sub

Private Sub chkModelAntic_CheckedChanged(ByVal sender As
System.Object, ByVal e As System.EventArgs) Handles
chkModelAntic.CheckedChanged
    pnlModelAntic1.Visible = chkModelAntic.Checked
    FedBatchOptions()
End Sub

Private Function VerificarSimulacio() As Boolean
    If Not chkModelAntic.Checked AndAlso Not chkModelNou.Checked
Then
        MsgBox("S'ha de seleccionar algun model per simular el
procés")
        Return False
    End If
    If Not VerificarDadesComunes() Then
        MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
        Return False
    End If
End Function

```

```

End If
If chkModelAntic.Checked AndAlso Not VerificarDadesAntic()
Then
    MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
    Return False
End If
If chkModelNou.Checked AndAlso Not VerificarDadesNou() Then
    MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
    Return False
End If
If optFedBatch.Checked AndAlso Not VerificarDadesFedBatch()
Then
    MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
    Return False
End If
If chkModelNou.Checked AndAlso optFedBatch.Checked AndAlso Not
VerificarDadesNouFedBatch() Then
    MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
    Return False
End If
If chkModelAntic.Checked AndAlso optFedBatch.Checked AndAlso
Not VerificarDadesAnticFedBatch() Then
    MsgBox("El valor d'alguna variable no és correcte")
    Return False
End If
Return True
End Function

```

```

Private Function VerificarDadesComunes() As Boolean
Return IsNumeric(txtYas.Text) AndAlso IsNumeric(txtYoa.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtYos.Text) AndAlso IsNumeric(txtYxa.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtYxsof.Text) AndAlso
IsNumeric(txtYxsox.Text) AndAlso _
    IsNumeric(txtKa.Text) AndAlso IsNumeric(txtKs.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtCa.Text) AndAlso IsNumeric(txtCs.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtCx.Text) AndAlso
IsNumeric(txtVacmax.Text) AndAlso _
    IsNumeric(txtVm.Text) AndAlso IsNumeric(txtVomax.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtVsmax.Text) AndAlso
IsNumeric(txtKLA.Text) AndAlso _
    IsNumeric(txtCsat.Text) AndAlso IsNumeric(txtS0.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtX0.Text) AndAlso IsNumeric(txtA0.Text)
End Function

```

```

Private Function VerificarDadesAntic() As Boolean
Return IsNumeric(txtKis.Text) AndAlso IsNumeric(txtKio.Text)
End Function

```

```

Private Function VerificarDadesNou() As Boolean
Return IsNumeric(txtYesx.Text) AndAlso IsNumeric(txtYeox.Text)
AndAlso _
    IsNumeric(txtVesd.Text) AndAlso
IsNumeric(txtVeod.Text)
End Function

```

```

Private Function VerificarDadesFedBatch() As Boolean
    Return IsNumeric(txtFSample.Text) AndAlso _
        IsNumeric(txtV0.Text) AndAlso IsNumeric(txtSfeed.Text)
End Function

Private Function VerificarDadesNouFedBatch() As Boolean
    Return IsNumeric(txtF.Text)
End Function

Private Function VerificarDadesAnticFedBatch() As Boolean
    Return IsNumeric(txtYxs.Text) AndAlso IsNumeric(txtMuCte.Text)
End Function

Private Function VerificarDadesSensibilitat() As Boolean
    Return IsNumeric(txtSensibilitat.Text)
End Function

Private Sub InicialitzacioParametres()
    txtYas.Text = 0.667    '[g/g]
    txtYoa.Text = 1.067    '[g/g]
    txtYos.Text = 1.067    '[g/g]
    txtYxa.Text = 0.4      '[g/g]
    txtYxsof.Text = 0.15   '[g/g]
    txtYxsox.Text = 0.51   '[g/g]
    txtYesx.Text = 0.51    '[g/g]
    txtYeox.Text = 0.23    '[g/g]
    'Constants de saturacio i inhibicio
    txtKa.Text = 0.05      '[g/L]
    txtKs.Text = 0.05      '[g/L]
    txtKis.Text = 5        '[g/L]
    txtKio.Text = 4        '[g/L]
    'Concentracio en mols per gram de substrat
    txtCa.Text = 0.0333    '[mol C/g]
    txtCs.Text = 0.0333    '[mol C/g]
    txtCx.Text = 0.04      '[mol C/g]
    'velocitat especifica
    txtVm.Text = 0.04      '[g/g·h]    manteniment
    txtVesd.Text = 0.9     '[g/g·h]
    txtVeod.Text = 0.35    '[g/g·h]
    'transport d'oxigen
    txtKLA.Text = 100
    txtCsat.Text = 0.03488
    'Concentracio de sustrat inicial
    txtX0.Text = 0.05      '[g/L]
    txtA0.Text = 0         '[g/L]
End Sub

Private Sub InicialitzacioBatch()
    txtVacmax.Text = 0.06   '[g/g·h]    consum maxim d'acetat
    txtVomax.Text = 0.4992  '[g/g·h]    consum maxim d'oxigen
    txtVsmax.Text = 1.3     '[g/g·h]    consum maxim de sustrat
    txtS0.Text = 13.86      '[g/L]
End Sub

Private Sub InicialitzacioFebBatch()
    txtVacmax.Text = 0.2     '[g/g·h]    consum maxim d'acetat
    txtVomax.Text = 0.4288  '[g/g·h]    consum maxim d'oxigen
    txtVsmax.Text = 1.25    '[g/g·h]    consum maxim de sustrat
    txtS0.Text = 7.47       '[g/L]
    txtF.Text = 0.188       '[L/h]
    txtSfeed.Text = 520     '[g/L]
    txtV0.Text = 1.0        '[L]
End Sub

```

```

        txtFSSample.Text = 0.015 '[L/h]
        txtMuCte.Text = 0.3 '[l/h]
        txtYxs.Text = 0.5 '[g/g]
    End Sub

    Private Sub optSimulacio_CheckedChanged(ByVal sender As
System.Object, ByVal e As System.EventArgs) Handles
optSimulacio.CheckedChanged
        fraSensibilitat.Visible = Not optSimulacio.Checked
        If optSimulacio.Checked Then
            cmdCalcular.Text = "Simulació"
        Else
            cmdCalcular.Text = "Estudi sensibilitat"
            optBatch.Checked = True
            chkModelAntic.Checked = True
            chkModelNou.Checked = False
            If Len(cboParametre.Text) = 0 Then
                cboParametre.Text = cboParametre.Items(0)
            End If
        End If
        fraOpcionsModels.Enabled = optSimulacio.Checked
        fraBatchFedBatch.Enabled = optSimulacio.Checked
        fraGrafiquesSensibilitat.Visible = Not optSimulacio.Checked
    End Sub

    Private Sub CarregarParametresSensibilitat()
        cboParametre.Items.Add("Yas")
        cboParametre.Items.Add("Yoa")
        cboParametre.Items.Add("Yos")
        cboParametre.Items.Add("Yxa")
        cboParametre.Items.Add("Yxsof")
        cboParametre.Items.Add("Yxsox")
        cboParametre.Items.Add("Ka")
        cboParametre.Items.Add("Ks")
        cboParametre.Items.Add("Kio")
        cboParametre.Items.Add("Kis")
        cboParametre.Items.Add("Cx")
        cboParametre.Items.Add("Vacmax")
        cboParametre.Items.Add("Vm")
        cboParametre.Items.Add("Vomax")
        cboParametre.Items.Add("Vsmax")
        cboParametre.Items.Add("KLA")
        cboParametre.Items.Add("Csat")
        cboParametre.Items.Add("S0")
        cboParametre.Items.Add("X0")
        cboParametre.Items.Add("A0")
    End Sub

    Private Sub FedBatchOptions()
        txtF.Visible = chkModelNou.Checked
        lblF.Visible = chkModelNou.Checked
        lblUnF.Visible = chkModelNou.Checked
        txtSfeed.Visible = chkModelAntic.Checked
        lblSfeed.Visible = chkModelAntic.Checked
        lblUnSfeed.Visible = chkModelAntic.Checked
        txtMuCte.Visible = chkModelAntic.Checked
        lblMuCte.Visible = chkModelAntic.Checked
        lblUnMucte.Visible = chkModelAntic.Checked
    End Sub
End Class

```

Codi de les subfuncions (Matlab)

function

```
[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vo,OUR]=AnticOriginal(Yas,Yoa,Yos,Yxa,Yxsof,Yxsox,
Ka,Ks,Kio,Kis,Ca,Cs,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,Vsmax,KLA,Csat,S0,X0,A0,ti)
    %Permet definir de forma arbitrària el temps total de simulació
    Y0=[X0,S0,A0,0];
```

```
[t,y]=ode23s(@reaccionsAntic,ti,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,
Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);
```

```
[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuFinal(y(:,3),y(:,2),Ks,Ka,Kio,
Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax);
    OUR=Vo.*y(:,1);
```

function

```
dy=reaccionsAntic(t,y,Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,
Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA)
```

```
% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen, x=5 creixement
```

```
[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuFinal(y(3),y(2),Ks,Ka,Kio,Kis,
Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax);
```

```
    dy=[Mu*y(1); %Creixement
        -Vs*y(1).*(y(2)>=0); %Consum de
substrat
        (Vap-Vac)*y(1).*(y(3)>=0); %Acetat
        (KLA*(Csat-y(4))-Vo*y(1)).*(y(4)>=0)]; %Consum
d'oxigen
```

function [Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=...

```
MuFinal(A,S,Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,...
```

```
Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax)
```

```
% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen
```

```
Vscap=Vsmax;
```

```
Vocap=Vomax./(1+A/Kio);
```

```
%tota la glucosa va a via oxidativa
```

```
Vs=Vscap.*S./((S+Ks).*(1+A/Kis));
```

```
[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuComu(A,...
```

```
Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vs,...
```

```
Vocap,Vacmax);
```

function

```
[t,y,Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vo,OUR]=AnticFed(Yas,Yoa,Yos,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yxs,
Ka,Ks,Kio,Kis,Ca,Cs,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,Vsmax,KLA,Csat,S0,X0,A0,V0,Sfeed,
Fsample,MuCte,t0,X02,ti)
    Y0=[X0,S0,A0,0,V0];
```

```
[t,y]=ode23s(@reaccionsAnticFed,ti,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,
Yxsof,Yxsox,Yxs,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA,Sfeed,Fsample,
MuCte,t0,V0,X02);
```



```
[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuFinal(y(:,3), y(:,2), Ks, Ka, Kio, Kis, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Cx, Cs, Ca, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax);
OUR=Vo/32.*y(:,1)*1000;
```

```
function dy=reaccionsAnticFed(t, y, Ks, Ka, Kio, Kis, Yos, Yoa, Yas, ...
    Yxa, Yxsof, Yxsox, Yxs, Cx, Cs, Ca, Csat, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax, ...
    KLA, Sfeed, Fsample, MuCte, t0, V0, X02)
```

```
% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen,
% x5=volum
[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuFinal(y(3), y(2)...
    , Ks, Ka, Kio, Kis, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Cx, Cs, Ca, ...
    Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax);
```

```
%Calculem el cabal exponencial d'alimentació en fed-batch
F=Cabal(t, MuCte, Yxs, Sfeed, t0, X02, V0);
```

```
%Creixement
dy=[ (-F/y(5)+Mu)*y(1);
    %Consum de substrat
    (F/y(5)*(Sfeed-y(2))-Vs*y(1)).*(y(2)>=0);
    %Acetat
    (-F/y(5)*y(3)+(Vap-Vac)*y(1)).*(y(3)>=0);
    %Consum d'oxigen
    (KLA*(Csat-y(4))-Vo*y(1)).*(y(4)>=0);
    %Volum
    F-Fsample];
```

```
function df=Cabal(t, MuCte, Yxs, Sfeed, t0, X, V)
df=MuCte/Yxs*(X*V/Sfeed)*exp(MuCte*(t-t0));
```

```
function
[t1, y1, Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vo, OUR]=NouOriginal(Yas, Yoa, Yos, Yxa, Yxsof, Yxsox,
    Yesx, Yeox, Ka, Ks, Ca, Cs, Cx, Vacmax, Vm, Vomax, Vsmax, Vesd, Veod, KLA, Csat, S0, X0, A0, t)
```

```
% Ara busquem els valors inicials de rs i ro
Mumax=(Vsmax-Vm)*Yxsox;
rs0=Yesx*Mumax/(Vesd+Mumax);
ro0=Yeox*Mumax/(Veod+Mumax);
```

```
Y0=[X0, S0, A0, 0, rs0, ro0];
```

```
[t1, y1]=ode23s(@reaccionsNou, t, Y0, [], Ks, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox,
    Yesx, Yeox, Cx, Cs, Ca, Csat, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax, Vesd, Veod, KLA);
```

```
[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuFinalNou(y1(:,3), y1(:,2), y1(:,5), y1(:,6), Ks, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Yesx, Yeox, Cx, Cs, Ca, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax, Vesd, Veod);
OUR=Vo.*y1(:,1);
```

```
function
dy=reaccionsNou(t, y, Ks, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Yesx, Yeox, Cx, Cs, Ca, Csat, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax, Vesd, Veod, KLA)
```

```

    % model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen, x=5
creixement

[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuFinalNou(y(3), y(2), y(5), y(6)
), Ks, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Yesx, Yeox, Cx, Cs, Ca, Vm, Vsmax, Vomax,
Vacmax, Vesd, Veod);

    dy=[Mu*y(1);                                     %Creixement
        -Vs*y(1).*(y(2)>=0);                          %Consum de
substrat
        (Vap-Vac)*y(1).*(y(3)>=0);                    %Acetat
        (KLA*(Csat-y(4))-(Vo)*y(1)).*(y(4)>=0);      %Consum
d'oxigen
        Yesx*Mu-y(5)*(Vesd+Mu);                       %Noves
equacions
        Yeox*Mu-y(6)*(Veod+Mu)

function
[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuFinalNou(A, S, rs, ro, Ks, Ka, Yo
s, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Yesx, Yeox, Cx, Cs, Ca, Vm, Vsmax, Vomax, Vacmax, Ves
d, Veod)
    % model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen, x5=rs,
x6=ro
    Mumax=(Vsmax-Vm)*Yxsox;
    rs0=Yesx*Mumax/(Vesd+Mumax);
    ro0=Yeox*Mumax/(Veod+Mumax);

    Vscap=Vsmax*rs/rs0;
    Vocap=Vomax*ro/ro0;

    %tota la glucosa va a via oxidativa
    Vs=Vscap.*S./(S+Ks);

[Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=MuComu(A, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Y
xsof, Yxsox, Cx, Cs, Ca, Vm, Vs, Vocap, Vacmax);

function [Mu, Mu1, Mu2, Mu3, Vs, Vap, Vac, Vo, Vsof, Vsox]=...
    MuComu(A, Ka, Yos, Yoa, Yas, Yxa, Yxsof, Yxsox, Cx, Cs, ...
    Ca, Vm, Vs, Vocap, Vacmax)

    Vsox=Vs;
    Vm=Vsox.*(Vm>Vsox)+Vm*(Vm<=Vsox);

    Vsoxan=(Vsox-Vm)*Yxsox*Cx/Cs;
    Vsoxen=Vsox-Vsoxan;
    Vos=Vsoxen*Yos;

    %no hi ha overflow així doncs:
    %Vsof=0;Vsofan=0;Vsofen=0;
    %Vap=0;Vac=0;Vacan=0;Vacen=0;

    %Es mira si el consum d'oxigen es superior al màxim
    %Consum d'oxigen per creixement és el limitant
    AuxOx= Vos>Vocap;
    Vos=Vocap.*(AuxOx)+Vos.*(~AuxOx);
    Vsoxen=(Vos/Yos). *AuxOx+Vsoxen.*~AuxOx;
    Vsox=(Cs*Vsoxen-Vm*Yxsox*Cx)/(Cs-Yxsox*Cx). *AuxOx+Vsox.*~AuxOx;
    Vsoxan=(Vsox-Vsoxen). *AuxOx+Vsoxan.*~AuxOx;

```

```

%el manteniment és el limitant
AuxVm=AuxOx.*(Vm>Vsox);
NotAuxVm=AuxOx.*(Vm<=Vsox);
Vsoxan=Vsoxan.*AuxOx.*(Vm<=Vsox);
Vm=Vsox.*AuxVm+Vm.*NotAuxVm;
%tot va a manteniment és a dir energia
Vsoxen=Vm.*AuxVm+Vsoxen.*NotAuxVm;

%ara està a la via overflow
Vsof=(Vs-Vsox).*(AuxOx);
Vsofan=(Vsof*Yxsof*Cx/Cs).*(AuxOx);
Vsofen=(Vsof-Vsofan).*(AuxOx);
Vap=(Vsofen*Yas).*(AuxOx);

%Consum d'acetat
Vac=Vacmax*A./(A+Ka);
Vacan=Vac*Yxa*Cx/Ca;
Vacen=Vac-Vacan;

%Ara anirà part del acetat a respiracio(energia)
%Es torna a calcular Vac i Vacan
AuxAc=Vacen>(Vocap-Vos)/Yoa;
Vacen=Vacen.*(~AuxAc)+((Vocap-Vos)/Yoa).*AuxAc;
Vac=Vac.*(~AuxAc)+(Vacen/(1-Yxa*Cx/Ca)).*AuxAc;
Vacan=Vacan.*(~AuxAc)+(Vac-Vacen).*AuxAc;

Vs=Vsox+Vsof;
Vo=Vos+Vacen*Yoa;

%velocitat especifica de creixement
Mu1=(Vsox-Vm)*Yxsox.*((Vsox-Vm)>=0);
Mu2=Vsof*Yxsof;
Mu3=Vac*Yxa;
Mu=Mu1+Mu2+Mu3;

function
[t1,y1,Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vo]=NouFed(Yas,Yoa,Yos,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yesx,Yeox,
,Ka,Ks,Ca,Cs,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,Vsmax,Vesd,Veod,KLA,Csat,S0,X0,A0,V0,F,
,Sfeed,Fsample,t)
% Ara busquem els valors inicials de rs i ro
Mumax=(Vsmax-Vm)*Yxsox;
rs0=Yesx*Mumax/(Vesd+Mumax);
ro0=Yeox*Mumax/(Veod+Mumax);

Y0=[X0,S0,A0,0,rs0,ro0,V0];

[t1,y1]=ode23s(@reaccionsNouFed,t,Y0,[],Ks,Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yesx,Yeox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,Vesd,Veod,KLA,F,Sfeed,Fsample);

[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo,Vsof,Vsox]=MuFinalNou(y1(:,3),y1(:,2),y1(:,5),y1(:,6),Ks,Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yesx,Yeox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,Vesd,Veod);

function
dy=reaccionsNouFed(t,y,Ks,Ka,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yesx,Yeox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,Vesd,Veod,KLA,F,Sfeed,Fsample)

```

```

% model: x1=biomassa, x2=glucosa, x3=acetat, x4=oxigen, x5=rs, x6=ro,
x7=volum

[Mu,Mu1,Mu2,Mu3,Vs,Vap,Vac,Vo]=MuFinalNou(y(3),y(2),y(5),y(6),Ks,Ka,Yo
s,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Yesx,Yeox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,Ves
d,Veod);

dy=[ (-F/y(7)+Mu)*y(1); %Creixement
      (-F/y(7)*(y(2)-Sfeed)-Vs*y(1)).*(y(2)>=0); %Consum de
substrat
      (-F/y(7)*y(3)+(Vap-Vac)*y(1)).*(y(3)>=0); %Acetat
      (KLA*(Csat-y(4))-Vo*y(1)).*(y(4)>=0); %Consum
d'oxigen
      Yesx*Mu-y(5)*(Vesd+Mu); %Noves
equacions
      Yeox*Mu-y(6)*(Veod+Mu);
      F-Fsample]; %Volum

function
[t1,t2,t3,y1,y2,y3,Mu1,Mu2,Mu3,Vap1,Vac1,Vo1,Vsof1,Vsox1,Vap2,Vac2,Vo2
,Vsof2,Vsox2,Vap3,Vac3,Vo3,Vsof3,Vsox3]=EstudiSensibilitat(Sensibilita
t,Yas,Yoa,Yos,Yxa,Yxsof,Yxsox,Ka,Ks,Kio,Kis,Ca,Cs,Cx,Vacmax,Vm,Vomax,V
smax,KLA,Csat,S0,X0,A0,t)
Min=1-Sensibilitat/100;
Max=1+Sensibilitat/100;
Y0=[X0,S0,A0,0];

[t1,y1]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Y
xsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);

[Mu1,Mu4,Mu5,Mu6,Vs1,Vap1,Vac1,Vo1,Vsof1,Vsox1]=MuFinal(y1(:,3),y1(:,2
),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Va
cmax);

Yxsox=Yxsox*Min;
Y0=[X0,S0,A0,0];

[t2,y2]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Y
xsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);

[Mu2,Mu4,Mu5,Mu6,Vs2,Vap2,Vac2,Vo2,Vsof2,Vsox2]=MuFinal(y2(:,3),y2(:,2
),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Va
cmax);

Yxsox=Yxsox*Max/Min;
Y0=[X0,S0,A0,0];

[t3,y3]=ode23s(@reaccionsAntic,t,Y0,[],Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Y
xsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Csat,Vm,Vsmax,Vomax,Vacmax,KLA);

[Mu3,Mu4,Mu5,Mu6,Vs3,Vap3,Vac3,Vo3,Vsof3,Vsox3]=MuFinal(y3(:,3),y3(:,2
),Ks,Ka,Kio,Kis,Yos,Yoa,Yas,Yxa,Yxsof,Yxsox,Cx,Cs,Ca,Vm,Vsmax,Vomax,Va
cmax);

```


7 Bibliografia

1. Clarke, D. D., Mycek, M. J., Neidle, A. & Waelsch, H. The incorporation of amines into protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 338–354 (1959).
2. Mehta, K. & Eckert, R. Transglutaminases: Family Of Enzymes With Diverse Functions. *Prog. Exp. Tumor Res.* **38**, 1–254 (2005).
3. Folk, J. E. Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 517–31 (1980).
4. Chen, J. S. & Mehta, K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 817–36 (1999).
5. Lantto, R. Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase : Effects in meat protein systems. (2007). doi:978-951-38-7023-2
6. Facchiano, A. & Facchiano, F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids* **36**, 599–614 (2009).
7. Schrode, J. & Folk, J. E. Transglutaminase-catalyzed cross-linking through diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **253**, 4837–40 (1978).
8. Neidle, A., Clarke, D. D., Mycek, M. J. & Waelsch, H. Enzymic exchange of protein amide groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 227–9 (1958).
9. Lorand, L. Fibrinolytic: the fibrin-stabilizing factor system of blood plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **202**, 6–30 (1972).
10. Villalobos, E. Estudio de transglutaminasas vegetales en maiz. (2007).
11. Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–56 (2003).
12. Klöck, C. & Khosla, C. Regulation of the activities of the mammalian transglutaminase family of enzymes. *Protein Sci.* **21**, 1781–91 (2012).
13. Fésüs, L. & Laki, K. Two antigenic sites of tissue transglutaminase. *Biochemistry* **16**, 4061–6 (1977).
14. Murthy, S. N., Lomasney, J. W., Mak, E. C. & Lorand, L. Interactions of G(h)/transglutaminase with phospholipase Cdelta1 and with GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11815–9 (1999).
15. Bregoli, A. M., Del Duca, S., Bergamini, C. & Serafini-Fracassini, D. Proceedings of the fourth international conference of transglutaminase and protein crosslinking reactions. in 24 and 68 (1994).
16. Ahvazi, B., Kim, H. C., Kee, S.-H., Nemes, Z. & Steinert, P. M. Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J.* **21**, 2055–67 (2002).
17. Folk, J. E. & Chung, S. I. Transglutaminases. *Methods Enzymol.* **113**, 358–75 (1985).
18. Icekson, I. & Apelbaum, A. Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* **84**, 972–4 (1987).
19. Yasueda, H., Nakanishi, K., Kumazawa, Y., Nagase, K., Motoki, M. &

- Matsui, H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **232**, 411–9 (1995).
20. Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. & Motoki, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms [supposed to belong to the genus *Streptoverticillium*]. *Agric. Biol. Chem.* **v. 53(10)**, (1989).
 21. Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S. & Beninati, S. Plant transglutaminases. *Phytochemistry* **40**, 355–65 (1995).
 22. Ioannidis, N. E., Ortigosa, S. M., Veramendi, J., Pintó-Marijuan, M., Fleck, I., Carvajal, P., Kotzabasis, K., Santos, M. & Torné, J. M. Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1215–22 (2009).
 23. Ioannidis, N. E., Lopera, O., Santos, M., Torné, J. M. & Kotzabasis, K. Role of plastid transglutaminase in LHCII polyamination and thylakoid electron and proton flow. *PLoS One* **7**, e41979 (2012).
 24. Ortigosa, S. M., Díaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Pintó-Marijuan, M., Fleck, I., Veramendi, J., Santos, M., Hernandez, J. A. & Torné, J. M. Oxidative stress induced in tobacco leaves by chloroplast over-expression of maize plastidial transglutaminase. *Planta* **232**, 593–605 (2010).
 25. Kobayashi, K., Hashiguchi, K., Yokozeki, K. & Yamanaka, S. Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1109–14 (1998).
 26. Mikkola, H., Muszbek, L., Haramura, G., Hämäläinen, E., Jalanko, A. & Palotie, A. Molecular mechanisms of mutations in factor XIII A-subunit deficiency: in vitro expression in COS-cells demonstrates intracellular degradation of the mutant proteins. *Thromb. Haemost.* **77**, 1068–72 (1997).
 27. Egelrud, T. & Vahlquist, A. [Hope for new therapies of severe genetic skin diseases]. *Lakartidningen* **97**, 4722–6 (2000).
 28. Lorand, L. Neurodegenerative diseases and transglutaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14310–3 (1996).
 29. Schuppan, D., Dieterich, W., Ehnis, T., Baure, M., Donner, P., Volta, U. & Riecken, E. O. Identification of the Autoantigen of Celiac Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **859**, 121–126 (1998).
 30. Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.* **89**, 991–1023 (2009).
 31. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536–40 (1995).
 32. Chandrashekar, R., Tsuji, N., Morales, T., Ozols, V. & Mehta, K. An ERp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 531–6 (1998).

33. Casadio, R., Polverini, E., Mariani, P., Spinozzi, F., Carsughi, F., Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Matteucci, G. & Bergamini, C. M. The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions. *Eur. J. Biochem.* **262**, 672–9 (1999).
34. Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E. & Teller, D. C. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7296–300 (1994).
35. Greenberg, C., Birckbichler, P. & Rice, R. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* **5**, 3071–3077 (1991).
36. Ichinose, A., Bottenus, R. E. & Davie, E. W. Structure of transglutaminases. *J. Biol. Chem.* **265**, 13411–4 (1990).
37. Hettasch, J. M. & Greenberg, C. S. Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 28309–13 (1994).
38. Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S. & D’Orazi, D. First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plants. *Plant Physiol.* **87**, 757–61 (1988).
39. Margosiak, S. A., Dharma, A., Bruce-Carver, M. R., Gonzales, A. P., Louie, D. & Kuehn, G. D. Identification of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase as a Substrate for Transglutaminase in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiol.* **92**, 88–96 (1990).
40. Duca, S., Tidu, V., Bassi, R., Esposito, C. & Serafini-Fracassini, D. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* **193**, (1994).
41. Lilley, G., Skill, J., Griffin, M. & Bonner, P. Detection of Ca²⁺-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.* **117**, 1115–23 (1998).
42. Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Asunción Santos, M., Serafini-Fracassini, D. & Torné, J. M. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplasts. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 899–909 (1999).
43. Carvajal, P., Gibert, J., Campos, N., Lopera, O., Barberà, E., Torné, J. M. & Santos, M. Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding. *Biotechnol. Prog.* **27**, 232–40 (2011).
44. Li, H., Zhang, L., Cui, Y., Luo, X., Xue, C. & Wang, S. Expression of soluble recombinant transglutaminase from *Zea mays* in *Pichia pastoris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 939–47 (2013).
45. Serafini-Fracassini, D. & Del Duca, S. Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. *Ann. Bot.* **102**, 145–52 (2008).
46. Villalobos, E., Santos, M., Talavera, D., Rodríguez-Falcón, M. & Torné, J.

- M. Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. *Gene* **336**, 93–104 (2004).
47. Bernet, E., Claparols, I., Asunción Santos, M. & Torné, J. M. Role of putrescine metabolic pathways in the differentiation process of maize meristematic callus. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 759–766 (1998).
 48. Villalobos, E., Torné, J. M., Rigau, J., Ollés, I., Claparols, I. & Santos, M. Immunogold localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. *Protoplasma* **216**, 155–63 (2001).
 49. Campos, A., Carvajal-Vallejos, P. K., Villalobos, E., Franco, C. F., Almeida, A. M., Coelho, A. V., Torné, J. M. & Santos, M. Characterisation of *Zea mays* L. plastidial transglutaminase: interactions with thylakoid membrane proteins. *Plant Biol.* **12**, 708–716 (2010).
 50. Carvajal-Vallejos, P. K., Campos, A., Fuentes-Prior, P., Villalobos, E., Almeida, A. M., Barberà, E., Torné, J. M. & Santos, M. Purification and in vitro refolding of maize chloroplast transglutaminase over-expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1255–62 (2007).
 51. Ioannidis, N. E., Torné, J. M., Kotzabasis, K. & Santos, M. *Transglutaminase is involved in the remodelling of tobacco thylakoids*. In: *Advances in Photosynthesis*. (InTech, Open Access Publisher., 2011). doi:10.5772/1385
 52. Campos, N., Villalobos, E. & Fontanet, P. A peptide of 17 aminoacids from the N-terminal region of maize plastidial transglutaminase is essential for chloroplast targeting. *Am. J. Mol. Biol.* **2**, 245–257 (2012).
 53. Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.* **17**, 221–246 (2001).
 54. Santos, M. & Torne, J. M. Recent Patents on Transglutaminase Production and Applications: A Brief Review. *Recent Pat. Biotechnol.* **3**, 9 (2009).
 55. de Barros Soares, L. H., Assmann, F. & Záchia Ayub, M. A. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 295–9 (2003).
 56. Kumazawa, Y., Sano, K., Seguro, K., Yasueda, H., Nio, N. & Motoki, M. Purification and Characterization of Transglutaminase from Japanese Oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 604–610 (1997).
 57. Chang, J., Ichikawa, H., Noda, N., Goto, S., Osatomi, K. & Nozaki, Y. Effect of high-pressure treatment and transglutaminase on the gel-forming ability of salt-ground myofibrillar proteins from carp [*Cyprinus carpio*]. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* **v. 64(4)** p, (1998).
 58. Jiang, S.-T., Leu, S.-Z. & Tsai, G.-J. Cross-Linking of Mackerel Surimi Actomyosin by Microbial Transglutaminase and Ultraviolet Irradiation †. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5278–5282 (1998).
 59. Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A. & Giosafatto, C. V. L. Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan-based edible films: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 223–38 (2011).

60. Villar-Piqué, A., Sabaté, R., Lopera, O., Gibert, J., Torne, J. M., Santos, M. & Ventura, S. Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants. *PLoS One* **5**, e13625 (2010).
61. Bishop, P. D., Teller, D. C., Smith, R. A., Lasser, G. W., Gilbert, T. & Seale, R. L. Expression, purification, and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **29**, 1861–9 (1990).
62. Tannock, G. W. *Normal Microflora: An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*. (Springer, 1995).
63. Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512–538 (1996).
64. Shuler, M. L. & Kargı, F. *Bioprocess engineering: basic concepts*. (1992).
65. Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411–21 (1999).
66. Summers, D. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* **29**, 1137–45 (1998).
67. Friehs, K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **86**, 47–82 (2004).
68. Leipold, R. J., Krewson, C. E. & Dhurjati, P. Mathematical model of temperature-sensitive plasmid replication. *Plasmid* **32**, 131–67 (1994).
69. Kiewiet, R., Kok, J., Seegers, J. F., Venema, G. & Bron, S. The Mode of Replication Is a Major Factor in Segregational Plasmid Instability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 358–64 (1993).
70. Gupta, J. C. & Mukherjee, K. J. Stable maintenance of plasmid in continuous culture of yeast under non-selective conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 317–23 (2001).
71. Ollis, D. F., Ellwood, D. C. & Robinson, A. Industrial Fermentations with (Unstable) Recombinant Cultures [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **297**, 617–629 (1982).
72. Imanaka, T. & Aiba, S. A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **369**, 1–14 (1981).
73. Williams, S. G., Cranenburgh, R. M., Weiss, A. M., Wrighton, C. J., Sherratt, D. J. & Hanak, J. A. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2120–4 (1998).
74. Olson, P., Zhang, Y., Olsen, D. & Owens, A. High-level expression of eukaryotic polypeptides from bacterial chromosomes. *Protein Expr. Purif.* **14**, 160–166 (1998).
75. Wróbel, B. & Wegrzyn, G. Amplification of pSC101 replicons in *Escherichia coli* during amino acid limitation. *J. Biotechnol.* **58**, 205–8 (1997).
76. Horn, U., Krug, M. & Sawistowski, J. Effect of high density cultivation on plasmid copy number in recombinant *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Lett.* **12**, 191–196 (1990).
77. Angelov, I. & Ivanov, I. Amplification of bacterial plasmids without blocking

- protein biosynthesis. *Plasmid* **22**, 160–2 (1989).
78. Clewell, D. B. Nature of Col E 1 Plasmid Nature of Col E1 Plasmid Replication in *Escherichia coli* in the Presence of Chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**, 667 (1972).
 79. Anthony Mason, C. & Bailey, J. Effects of plasmid presence on growth and enzyme activity of *Escherichia coli* DH5 α ? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 54–60 (1989).
 80. Lee, J. H. & Lee, K. J. Effect of growth rate and cultivation environments on cloned gene stability and the cloned gene product formation in *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* **33**, 195–204 (1994).
 81. Kramer, W., Mattanovitch, D. & Elmecker, G. Regulable expression systems for the optimisation of recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Prog. Biotechnol* **9**, 827–830 (1994).
 82. Seeger, A., Schneppe, B., McCarthy, J. E. G., Deckwer, W.-D. & Rinas, U. Comparison of temperature- and isopropyl- β -d-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 947–953 (1995).
 83. Siegele, D. A. & Hu, J. C. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8168–72 (1997).
 84. Goldstein, M. A. & Doi, R. H. Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **1**, 105–28 (1995).
 85. Zahn, K. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* **178**, 2926–33 (1996).
 86. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399–408 (2004).
 87. Georgiou, G. & Valax, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 190–197 (1996).
 88. Richardson, A., Landry, S. J. & Georgopoulos, C. The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 138–43 (1998).
 89. Bukau, B. & Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351–66 (1998).
 90. Thomas, J. G., Ayling, A. & Baneyx, F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197–238 (1997).
 91. Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694–9 (1998).
 92. Castanié, M. P., Bergès, H., Oreglia, J., Prère, M. F. & Fayet, O. A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **254**, 150–2 (1997).

93. Thomas, J. G. & Baneyx, F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 11141–7 (1996).
94. Zhang, Y., Olsen, D. R., Nguyen, K. B., Olson, P. S., Rhodes, E. T. & Mascarenhas, D. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **12**, 159–65 (1998).
95. Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**, 15661–7 (1997).
96. Shiloach, J. & Fass, R. Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* **23**, 345–57 (2005).
97. Riesenber, D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 380–4 (1991).
98. Fuchs, C., Köster, D., Wiebusch, S., Mahr, K., Eisbrenner, G. & Märkl, H. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **93**, 243–51 (2002).
99. Nakano, K., Rischke, M., Sato, S. & Märkl, H. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 597–601 (1997).
100. Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A. & Deckwer, W. D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **39**, 59–65 (1995).
101. Pan, J. G., Rhee, J. S. & Lebeault, J. M. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **9**, 89–94 (1987).
102. Suzuki, T., Yamane, T. & Shimizu, S. Phenomenological Background and Some Preliminary Trials of Automated Substrate Supply in pH-Stat Modal Fed-Batch Culture Using a Setpoint of High Limit. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 292–297 (1990).
103. OGATA, K. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. ...* **33**, (1969).
104. Wegner, G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**, 279–283 (1990).
105. Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66 (2000).
106. Veenhuis, M., Van Dijken, J. P. & Harder, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **24**, 1–82 (1983).
107. Egli, T., Dijken, J. P., Veenhuis, M., Harder, W. & Fiechter, A. Methanol metabolism in yeasts: Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* **124–124**, 115–121 (1980).
108. COUDERC, R. & BARATTI, J. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2279–2289 (1980).

109. Roggenkamp, R., Janowicz, Z., Stanikowski, B. & Hollenberg, C. P. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 489–93 (1984).
110. Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A. & Gingeras, T. R. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3859–76 (1987).
111. Cregg, J. M. & Higgins, D. R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot.* **73**, 891–897 (1995).
112. Waterham, H. R., de Vries, Y., Russel, K. A., Xie, W., Veenhuis, M. & Cregg, J. M. The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2527–36 (1996).
113. Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T. W. & Cregg, J. M. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**, 93–102 (1998).
114. Liu, H., Tan, X., Russell, K. A., Veenhuis, M. & Cregg, J. M. PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J. Biol. Chem.* **270**, 10940–51 (1995).
115. Sears, I. B., O'Connor, J., Rossanese, O. W. & Glick, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**, 783–90 (1998).
116. Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J. & Thill, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**, 167–77
117. Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A. & Birkenberger, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55–62 (1997).
118. Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423–488 (1992).
119. Thiry, M. & Cingolani, D. Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends Biotechnol.* **20**, 103–5 (2002).
120. Daly, R. & Hearn, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18**, 119–138
121. Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K. & Romanos, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N. Y.)* **9**, 455–60 (1991).
122. Gellissen, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 741–750 (2000).
123. Romanos, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene

- expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 527–533 (1995).
124. Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., D'Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S. & Hew, C. L. Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. ...* **21**, 438–45 (2001).
 125. Raemaekers, R. J., de Muro, L., Gatehouse, J. A. & Fordham-Skelton, A. P. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* **265**, 394–403 (1999).
 126. Curless, C., Baclaski, J. & Sachdev, R. Phosphate glass as a phosphate source in high cell density *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol. Prog.* **12**, 22–5 (1996).
 127. Aristidou, A. A., San, K. Y. & Bennett, G. N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnol. Prog.* **15**, 140–5 (1999).
 128. Macaloney, G., Draper, I., Preston, J., Anderson, K. B., Rollins, M. J., Thompson, B. G., Hall, J. W. & Mcneil, B. At-Line Control and Fault Analysis In an Industrial High Cell Density *Escherichia Coli* Fermentation, Using NIR Spectroscopy. *Food Bioprod. Process.* **74**, 212–220 (1996).
 129. Whiffin, V. S., Cooney, M. J. & Cord-Ruwisch, R. Online detection of feed demand in high cell density cultures of *Escherichia coli* by measurement of changes in dissolved oxygen transients in complex media. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 422–33 (2004).
 130. Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**, 736–47 (1974).
 131. Lau, J., Tran, C., Licari, P. & Galazzo, J. Development of a high cell-density fed-batch bioprocess for the heterologous production of 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **110**, 95–103 (2004).
 132. Riesenber, D. & Guthke, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 422–30 (1999).
 133. Xu, H. An Algorithm for Constructing Orthogonal and Nearly Orthogonal Arrays with Mixed Levels and Small Runs Hongquan Xu. *Technometrics* **44**, 356–368 (2002).
 134. Park, S. H. *Robust Design and Analysis for Quality Engineering*. (Springer, 1996).
 135. Box, G. E. P. & Draper, N. R. *Empirical model-building and response surface*. (John Wiley & Sons, Inc., 1986).
 136. Box, G. E. P. & Hunter, J. S. Multi-Factor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. *Ann. Math. Stat.* **28**, 195–241 (1957).
 137. Winsberg, E. Simulations, Models and Theories: Complex Physical Systems and their Representations. *Philos. Sci.* 442–454 (2001).
 138. Winsberg, E. Simulated Experiments: Methodology for a Virtual World. *Philos. Sci.* 105–125 (2003).

139. Carvajal Vallejos, P. K. Zea Mays L. Transglutaminase Expression in Escherichia coli. (2006).
140. Grossman, T. & Kawasaki, E. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**, 95–103 (1998).
141. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30 (1986).
142. Morris B, N. R. Use of glucose to control basal expression in the pET System. *In Novations* **13**, 8–10 (2001).
143. Carvajal, P., Villalobos, E., Campos, A., Torne, J. M., Barbera, E. & Santos, M. Zea mays L. transglutaminase expression in Escherichia coli. *Microb. Cell Fact.* **5**, 1–2 (2006).
144. Kawai, M., Takehana, S. & Takagi, H. High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from Streptovercillium in Escherichia coli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 830–5 (1997).
145. QIAGEN Plasmid Mini Kit. at <<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiagen-plasmid-mini-kit>>
146. Sambrook, J. & Russell, D. W. Preparation and Transformation of Competent E. coli Using Calcium Chloride. *CSH Protoc.* **2006**, pdb.prot3932- (2006).
147. Planas, I. Disseny de Taguchi: Desenvolupament d'una aplicació per a l'assignació del domini experimental. Treball final de carrera. IQS. Universitat Ramon Llull. (2005).
148. Herbert, D., Phipps, P. J. & Tempest, D. W. The chemostat: design and instrumentation. *Lab. Pract.* **14**, 1150–61 (1965).
149. Bauer, S. & Shiloach, J. Maximal exponential growth rate and yield of E. coli obtainable in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 933–41 (1974).
150. Shiloach, J. & Bauer, S. High-yield growth of E. coli at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **XVII**, 227–239 (1975).
151. Bauer, S. & Ziv, E. Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 81–94 (1976).
152. Lee, S. Y. High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* **14**, 98–105 (1996).
153. Nikerel, İ. E., Öner, E., Kirdar, B. & Yildirim, R. Optimization of medium composition for biomass production of recombinant Escherichia coli cells using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* **32**, 1–6 (2006).
154. Draper, N. & Lin, D. Small response-surface designs. *Technometrics* **32**, 187–194 (1990).
155. Draper, N. R. Center Points in Second—Order Response Surface Designs.

- Technometrics* **24**, 127–133 (1982).
156. Draper, N. & Lin, D. K. J. in *Handb. Stat.* (Ghosg, S. & Rao, C. R.) 232–375 (North Holland, 1996).
 157. Box, G. E. P., Hunter, W. G. & Hunter, J. S. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building.* (Wiley, 1978).
 158. *Standard Methods for the examination of water and wastewater.* (Amer Public Health Assn, 1999).
 159. Carrió, M. M. & Villaverde, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* **489**, 29–33 (2001).
 160. Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Walesch, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J. Biol. Chem.* **187**, 111–25 (1950).
 161. Pandey, A., Andersen, J. S. & Mann, M. Use of mass spectrometry to study signaling pathways. *Sci. STKE* **2000**, p11 (2000).
 162. Weber, A. E. & San, K.-Y. A comparison of two plating techniques to estimate plasmid stability of a prolonged chemostat culture. *Biotechnol. Tech.* **3**, 397–400 (1989).
 163. Xu, B., Jahic, M. & Enfors, S. O. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **15**, 81–90 (1999).
 164. Lin, H. Y., Mathiszik, B., Xu, B., Enfors, S. O. & Neubauer, P. Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 347–57 (2001).
 165. Invitrogen. Pichia Expression Kit A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01. (2010). at <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf>
 166. Invitrogen. Pichia Fermentation Process Guidelines. at <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf>
 167. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**, 1026–1030 (1993).
 168. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994 (1996).
 169. Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995–1001 (1996).
 170. Campos, N., Castañón, N., Urreta, I., Santos, M. & Torné, J. M. Rice transglutaminase gene: Identification, protein expression, functionality, light dependence and specific cell location. *Plant Sci.* **205–206**, 97–110 (2013).
 171. Pfaffl, M. *Quantification strategies in real-time PCR.* AZ Quant. PCR (International University Line, 2004).
 172. Zhu, T., Guo, M., Sun, C., Qian, J., Zhuang, Y., Chu, J. & Zhang, S. A

- systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. *Biotechnol. Lett.* **31**, 679–84 (2009).
173. Zhu, T., Guo, M., Zhuang, Y., Chu, J. & Zhang, S. Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1127–35 (2011).
 174. Rojas, M., Casado, M., Portugal, J. & Piña, B. Selective inhibition of yeast regulons by daunorubicin: a transcriptome-wide analysis. *BMC Genomics* **9**, 358 (2008).
 175. Lin-Cereghino, G. P., Godfrey, L., de la Cruz, B. J., Johnson, S., Khuongsathiene, S., Tolstorukov, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S. & Cregg, J. M. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 883–97 (2006).
 176. Routledge, S. J. Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210014 (2012).
 177. Wang, J. & Wan, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 235–244 (2008).
 178. Shestopaloff, Y. K. Predicting Growth and Finding Biomass Production Using the General Growth Mechanism. *Biophys. Rev. Lett.* **7**, 1–19 (2012).
 179. Singer, S. & Nelder, J. Nelder-Mead algorithm. *Scholarpedia* **4**, 2928 (2009).
 180. Lim, H. C. & Shin, H. S. Fed-Batch Cultures Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors. *Fed-Batch Cult. Princ. Appl. Semi-Batch Bioreact.* 471 (2013). doi:10.1017/CBO9781139018777
 181. Tribe, L. A., Briens, C. L. & Margaritis, A. Determination of the volumetric mass transfer coefficient (kLa) using the dynamic 'gas out-gas in' method: Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 388–392 (1995).
 182. Donovan, R. S., Robinson, C. W. & Glick, B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 145–54 (1996).
 183. Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z. & Damborsky, J. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microb. Cell Fact.* **14**, 201 (2015).
 184. Pinsach, J., de Mas, C. & López-Santín, J. Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: Application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochem. Eng. J.* **41**, 181–187 (2008).
 185. Olaofe, O. a., Burton, S. G., Cowan, D. a. & Harrison, S. T. L. Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* **52**, 19–24 (2010).

186. Kotik, M., Kocanová, M., Maresová, H. & Kyslík, P. High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Protein Expr. Purif.* **36**, 61–9 (2004).
187. Saraswat, V., Lee, J., Kim, D. & Park, Y. Synthesis of recombinant human interleukin-2 via controlled feed of lactose-complex media in fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnol. Lett.* **21**, 261–265 (2000).
188. Cole, P. A. Chaperone-assisted protein expression. *Structure* **15**, 239–242 (1996).
189. Mirzahoseini, H. & Alibolandi, M. Stability of recombinant proteins in *Escherichia coli*: the effect of co-expression of five different chaperone sets. *J. Sci. Islam. Repub. Iran* **20**, 305–310 (2010).
190. Torné Cubiró, J., Santos Lozano, M., Talavera Baro, D., villalobos Amador, E. & Rigau Lloveras, J. Maize nucleotide sequence coding for a protein with transglutaminase activity and use thereof. (2003).
191. Carvajal Vallejos, P. K. Zea mays L. Transglutaminase expression in *Escherichia coli*. (2006).
192. Li, H., Zhang, L., Cui, Y., Luo, X., Xue, C., Wang, S., Jiao, Y., Zhang, S., Liu, W., Fan, R., Du, M., Yi, H. & Han, X. Characterization of recombinant Zea mays transglutaminase expressed in *Pichia pastoris* and its impact on full and non-fat yoghurts. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 1225–1230 (2014).
193. Monsalve, R. I., Lu, G. & King, T. P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr. Purif.* **16**, 410–416 (1999).
194. Brondyk, W. H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* **463**, 131–47 (2009).
195. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–70 (2005).
196. Marston, F. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1–12 (1986).

Aquesta Tesi Doctoral ha estat defensada el dia ____ d _____ de 201__
al Centre _____
de la Universitat Ramon Llull, davant el Tribunal format pels Doctors i Doctores
sotassignants, havent obtingut la qualificació:

President/a

Vocal

Vocal *

Vocal *

Secretari/ària

Doctorand/a

(*): *Només en el cas de tenir un tribunal de 5 membres*