



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Optimización de variables de control y
sistemas de expresión de un bioproceso para
la producción de recombinámeros de tipo
elastina**

Autor:

Maestro Cuadrado, Sergio

Tutores:

**Alonso Rodrigo, Matilde
Herrero Gutiérrez, Marcos
Departamento de Química
Analítica**

Valladolid, julio de 2019.

1. RESUMEN	1
2 OBJETIVOS	3
3 INTRODUCCIÓN A LOS BIOMATERIALES	5
3.1 Definición y evolución de los biomateriales	5
3.2 Biomateriales y la sociedad	7
3.3 Medicina regenerativa	8
3.4 Los polímeros en medicina	9
3.5 Polímeros de tipo elastina	12
3.5.1 Síntesis de los polímeros recombinantes de tipo elastina.....	13
3.5.2 Características fisicoquímicas de los polímeros tipo elastina.....	13
3.5.3 Biocompatibilidad de los polímeros tipo elastina.....	14
3.5.4 Diseño y estructura del polímero (EI-Silk)2.....	15
4 MATERIALES	17
4.1 Reactivos químicos	17
4.2 Medios de cultivo.....	17
4.3 Soluciones de aplicación general en el laboratorio	18
4.4 Equipos de laboratorio.....	18
5 REACTOR	21
5.1 Características básicas	21
5.2 Control	22
6 PROCEDIMIENTO DE BIOPRODUCCIÓN	24
6.1 Preparación de la placa de cultivo LB-Agar	24
6.2 Cultivo en placa.....	24
6.3 Screening.....	25
6.4 Preparación de inóculo	25
6.5 Bioproducción en fermentador	26
6.6 Lavado de células y purificación	26
7 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN	29
7.1 Técnica de electroforesis	29
7.1.1 Introducción	29
7.1.2 Factores que afectan a la electroforesis	30
7.2 Equipo electroforético.	32

Índice

7.3 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).....	33
7.3.1 Introducción	33
7.3.2 Preparación del soporte.....	33
7.3.3 Aplicación de la muestra	33
7.3.4 Localización de los componentes separados: tinción.....	34
7.3.5 Descripción del equipo de imagen y del programa de tratamiento.	35
7.4 Normalización de muestras.	35
8 PLANIFICACIÓN DE EXPERIMENTOS	37
8.1 Selección de variables.....	37
8.2 Procedimiento de realización de ensayos.	37
9 RESULTADOS	39
9.1 Análisis y evolución de la población bacteriana (cantidad de biomasa)	39
9.2 Análisis de la expresión de producción.....	47
9.3 Rendimiento.....	56
10 COSTE DE BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO	59
10.1 Introducción.....	59
10.2 Coste de reactivos.....	59
10.3 Costes de amortización.....	60
10.4 Coste de material.....	62
10.5 Costes totales.....	64
11 CONCLUSIONES.....	65
12 BIBLIOGRAFIA.....	67
I Anexo 1 Electroforesis	71

1 RESUMEN

Este trabajo consiste en un estudio para la optimización de la bioproducción de proteínas recombinantes de tipo elastina. Para este cometido se han realizado ensayos en un fermentador de 0,5L con 2 cepas de Escherichia Coli productoras diferentes estudiando la respuesta de éstas ante la adición de oxígeno.

El polímero producido fue la construcción (EISilk)2 que presenta un rendimiento muy bajo en las condiciones de trabajo habituales obteniéndose con la nueva cepa SE1 un rendimiento de hasta un 402,8% con respecto a las condiciones anteriores de producción con la cepa BL21 y sin oxígeno añadido.

Con esta mejora se realizó una evaluación económica obteniendo que con las nuevas condiciones los costes de producción se reducían un 71,9% con respecto a las condiciones iniciales.

Palabras clave: Optimización, bioproducción, recombinámeros, proceso biotecnológico, tipo elastina.

2 OBJETIVOS

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es optimizar la bioproducción de proteínas recombinantes de tipo elastina o ELRs (por sus siglas en inglés), de gran potencial para aplicaciones biomédicas y en sectores tecnológicos. La bioproducción de esta proteína en el laboratorio del grupo BIOFORGE se lleva a cabo empleando cultivos de cepas bacterianas *E. coli* genéticamente modificadas en un biorreactor de 15 litros.

Para el proceso de optimización se eligió trabajar, en particular, con la construcción (EISilk)2 que presenta un rendimiento muy bajo de 250 mg/L en las condiciones de trabajo habituales y con una nueva cepa bacteriana comercial SE1, que posee una mejorada estabilidad plasmídica. Este sistema permite una adición directa de oxígeno puro (anteriormente no viable con la cepa BL21) que incrementará notoriamente la biomasa y previsiblemente el rendimiento de la proteína.

Todas las pruebas se han llevado a cabo en un biorreactor de 0,5L con la finalidad de reducir costes, materiales y tiempo de procesado posterior.

Para la consecución de este objetivo se han realizado distintos cultivos con distintas cantidades de oxígeno, expresadas en función de la concentración en condiciones previas a la bioproducción, 0, 25 y 50%.

3 INTRODUCCIÓN A LOS BIOMATERIALES

3.1 Definición y evolución de los biomateriales

Las más recientes definiciones describen los biomateriales como sustancias, que no son nutrientes o fármacos, y que están incluidos en sistemas terapéuticos o diagnósticos ¹. La medicina y la cirugía recurren de manera creciente a materiales ajenos al organismo con la finalidad de encontrar un remedio, definitivo o temporal, al déficit de una función fisiológica. Los biomateriales no son exclusivamente los dispositivos destinados a ser implantados en el cuerpo humano, sino también los que están en contacto con las mucosas o con la sangre, incluyendo los sistemas que permiten la liberación controlada de fármacos.

Tales materiales poseen la capacidad de sustituir total o parcialmente las funciones de un organismo vivo y por lo tanto deben cumplir el requisito fundamental de la biocompatibilidad, es decir no interactuar de forma perjudicial con el organismo. El grado de biocompatibilidad de un material es función de su forma, estructura, composición química y de sus propiedades físicas, mecánicas, químicas y eléctricas. Además, el grado de biocompatibilidad depende de la localización en el organismo y del tipo de aplicación. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su duración, es decir la capacidad de mantener sus prestaciones exactamente durante el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo.

Los polímeros sintéticos, polimetilmetacrilato, acetato de celulosa o Dacron, han podido ser empleados, sin necesidad de ser substancialmente rediseñados, para usos médicos en tubos de diálisis, injertos vasculares, corazones artificiales, prótesis complejas, etc ². A pesar de que estos materiales ofrecían muchas ventajas para los usuarios y permitían avances en novedosos tratamientos médicos, no resolvieron el importante problema de la interacción célula-polímero que conduce a la reacción de rechazo como cuerpo extraño, comprometiendo significativamente la biocompatibilidad, provocando, por ejemplo: inflamación, la movilización aséptica ³, la formación de los “biofilms” bacterianos ⁴, o la encapsulación del implante.

Por otro lado, desde el inicio de su síntesis química, surgieron los primeros problemas de tratamiento de los residuos que se generaban. Dado que habitualmente estos materiales no son biodegradables, su eliminación conlleva la acumulación y la contaminación de los espacios naturales con un gran impacto ambiental.

Una de las posibles soluciones a estos problemas es la síntesis de polímeros biodegradables obtenidos de fuentes renovables. La posibilidad de biosintetizar polímeros totalmente biodegradables ha despertado un enorme interés social e industrial. Varios polímeros biodegradables han sido ya desarrollados, pero su elevado coste de producción constituye el cuello de botella a su comercialización. No

3. Introducción a los biomateriales

obstante, su producción a partir de monómeros conseguidos mediante fuentes renovables se ha vuelto en los últimos años la tarea más importante de algunas compañías químicas. Los monómeros que componen estos materiales poliméricos pueden ser preparados tanto química como biológicamente. En los seres vivos, existen muchos polímeros de distinta naturaleza y complejidad como el ADN, ARN, proteínas y polisacáridos que juegan un papel esencial en sus funciones vitales. Muchos metabolitos naturales como el ácido láctico, los ácidos dicarboxílico, fumárico y succínico, los aminoácidos y algunos alcoholes poseen grupos funcionales apropiados para la polimerización y pueden ser utilizados como bloques de construcción en la síntesis química de polímeros.

En la última década los procesos fermentativos implicados en la producción de bio-polímeros han sido perfeccionados mediante profundos estudios que incluyen la modificación por ingeniería genética de los microorganismos productores. De hecho, varios metabolitos útiles en la síntesis de polímeros pueden ser producidos mediante múltiples vías metabólicas dependiendo del microorganismo empleado. Además, se pueden utilizar microorganismos cuyo metabolismo ha sido modificado genéticamente para producir de forma precisa y barata monómeros complejos que son empleados por la industria química en la síntesis de polímeros.

La moderna ciencia de los biomateriales se caracteriza por una intensa búsqueda de materiales que puedan mejorar parámetros específicos o que posean nuevas propiedades para perfeccionar determinadas prestaciones. Por otro lado, entre los científicos que trabajan en esta área, está creciendo el interés por los nuevos descubrimientos sobre la interacción con la matriz extracelular, los procesos de señalización, el desarrollo celular, etc. La integración de estos nuevos conocimientos en el diseño de los más avanzados biomateriales está añadiendo las funcionalidades que permiten conseguir interacciones específicas con la superficie celular. Hoy en día, por tanto, muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo sanitario ^{5,6}. Algunos ejemplos son:

- Prótesis dentales y maxilofaciales.
- Prótesis de tendones y ligamentos.
- Prótesis ortopédicas.
- Prótesis para discos intervertebrales

Con la finalidad de obtener materiales más complejos que incorporen funcionalidades específicas de los tejidos biológicos, en los años noventa se intentó encapsular los materiales con proteínas naturales estructurales o de adhesión de la matriz extracelular, como fibronectina, colágeno o laminina ⁷, pero su uso en aplicaciones médicas generó importantes inconvenientes como respuestas autoinmunes y aumento de los riesgos de infección. Además, las proteínas naturales utilizadas sufrían proteólisis acelerada por los procesos inflamatorios y tenían que ser continuamente renovadas, imposibilitando su aplicación a largo plazo ⁸.

Algunas de las otras funcionalidades estudiadas en este tipo de tejidos es la interacción que estos presentan con las células. De esta forma se pueden definir tres tipos de interacciones:

- Materiales no adhesivos o inertes “nonfouling” cuyas superficies muy hidrofóbicas no permiten a las células interactuar con la superficie durante un determinado periodo de tiempo (ej. PEG, el cual es muy utilizado en angioplastia y oftalmología).
- Otros materiales consiguen una adhesión pasiva, es decir, la superficie de contacto proporciona interacciones fisicoquímicas que aportan adsorción entre el material y la célula. Este tipo de interacción es reversible y las células adheridas pueden ser desprendidas prácticamente intactas (ej. soportes para formar láminas celulares).
- En la adhesión activa, en cambio, las células que pueblan la superficie espontáneamente activan los procesos de adhesión y propagación celular inducidos por el receptor. En estos casos se ponen en marcha modificaciones estructurales morfológicas y fenotípicas de la célula que imposibilitan su desprendimiento espontáneo sin que se observe un importante cambio superficial y morfológico ⁹.

3.2 Biomateriales y la sociedad

El creciente interés en los biomateriales se debe principalmente a dos factores: el elevado porcentaje de la población que está directamente afectada, más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis; y el hecho de que la esperanza de vida haya aumentado de forma considerable. Durante el último siglo la expectativa de vida en España ha pasado de ser de 58 a 78 años, y las causas de los decesos, que décadas atrás se debían, predominantemente, a enfermedades infecciosas (gripe, pulmonía, tuberculosis) hoy en día están relacionadas, fundamentalmente, con patologías provocadas por el estilo de vida (enfermedades cardiocirculatorias, cáncer, etc.).

Según los demógrafos de Naciones Unidas, dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años que niños de menos de 15. La longevidad masiva tiene implicaciones específicas relacionadas con el mantenimiento, durante el máximo tiempo posible, de la calidad de vida esperada. En este sentido, la medicina tiene y tendrá que considerar las nuevas exigencias sociales de mejora de la calidad de vida. Por ello, los implantes biomédicos tendrán mayor importancia y relevancia, y deberán evolucionar y garantizar prestaciones superiores a las actuales.

Los propósitos que la ciencia de biomateriales tendrá que alcanzar están relacionados con la ulterior mejoría de su biocompatibilidad, la identificación de las propiedades de “sigilo” (“stealth properties”), o sea, las características que dotan al

3. Introducción a los biomateriales

material de las capacidades para pasar desapercibido e íntegro hasta ver cumplido su objetivo, y la creación de nuevos biomateriales cuyas propiedades puedan ser controladas y modificadas según las necesidades, los llamados “materiales inteligentes”^{9, 10}. Estos últimos son materiales que pueden adaptarse autónomamente a determinadas condiciones ambientales.

Entre ellos se encuentran los geles que responden a estímulos físico-químicos como cambios de temperatura o de pH y que pueden ser muy interesantes en la obtención de matrices para la liberación controlada de medicamentos, los polímeros fotosensibles, los polímeros superconductores usados en la fabricación de "microchips", fibras, filamentos o los geles súper-absorbentes expansibles que retienen agua y aumentan su tamaño hasta en 500 veces su volumen original¹². Por último, la aportación de la emergente nanotecnología será también determinante.

Por otro lado, incluso desde el punto de vista meramente económico, los beneficios y los costes que se generan en la industria relacionada con la ciencia de los biomateriales y de los dispositivos médicos son muy elevados. El valor mundial del mercado de los dispositivos médicos alcanzó en el año 2000 los 160.000 millones de euros, donde Europa con el 25% de las facturaciones ocupa el segundo lugar después de los Estados Unidos. En cuanto al mercado español, el quinto de Europa, presenta un balance importaciones/exportaciones desfavorable, tendencia común a muchos otros países europeos excepto para Alemania, Reino Unido e Irlanda⁸.

3.3 Medicina regenerativa

Una de las líneas de investigación en biomateriales es la denominada “medicina regenerativa”. Esta disciplina prevé una aplicación distinta del biomaterial, no sólo vinculada a la obtención de dispositivos médicos o de tejidos u órganos artificiales para trasplantes, sino también dedicada al crecimiento de tejidos u órganos que se originan a partir de células del mismo paciente.

El objetivo final de este tipo de estrategia es “personalizar” cada tratamiento terapéutico hasta llegar a la automatización del procedimiento de producción del tejido y, en el futuro, del órgano. La medicina regenerativa se beneficia del conjunto de complejas técnicas, denominado “ingeniería de tejidos”, utilizadas para seleccionar las células del paciente y desarrollarlas *in vitro*. Para desarrollar todas las posibles aplicaciones de la medicina regenerativa se deberían conocer y controlar varios aspectos de esta metodología, como:

- Las propiedades de los diferentes tipos de células y de los materiales de soporte.
- Las interacciones entre las células y la superficie de los materiales, en concreto la adhesión y el crecimiento de las células sobre la superficie e interior de los materiales para obtener un desarrollo tridimensional.

- La promoción de la adhesión, crecimiento y diferenciación de las células a través del uso de señales moleculares específicas.
- Las interacciones entre los materiales de soporte y el ambiente biológico (biocompatibilidad, biodegradación etc.).

El desafío actual consiste en combinar adecuadamente las células recogidas del paciente con el material idóneo sobre el cual hacer que crezcan para desarrollar tejidos y órganos *in vitro*. Se vuelve entonces de crucial importancia comprender los mecanismos que controlan las complejas interacciones tanto entre las células y el material de soporte como entre el tejido modificado y el ambiente biológico ⁸.

3.4 Los polímeros en medicina

Como ya se ha mencionado, en la actualidad se emplean numerosos polímeros en dispositivos médicos. Los campos en los cuales han encontrado mayor aplicación abarcan diversos sectores: en angiología para el control del flujo sanguíneo u otros fluidos (catéteres, cánulas, endoprótesis vasculares extensibles (stents), drenajes, etc.); en ortopedia en las superficies articulares de las prótesis; en oftalmología como lentes de contacto e intraoculares; y también en membranas de administración de fármacos, revestimientos de sensores o dispositivos electrónicos implantados, regeneración de tejidos, rellenos de cavidades, válvulas cardíacas, prótesis vasculares, órganos bioartificiales (dispositivos médicos en los cuales se combinan materiales sintéticos y células o tejidos vivos), etc. (Tabla 3.1).

3. Introducción a los biomateriales

Tabla 3.1. Materiales poliméricos empleados en el campo médico y sus principales aplicaciones.

Polímero	Siglas	Principales Aplicaciones
Ácido poliGlicólico	PGA	Suturas y placas biodegradables, placas y clavos intramedulares
Ácido poliLáctico	PLA	Placas y clavos intramedulares, ligamentos, placas de fracturas biodegradables, liberación controlada de fármacos
Copolímeros Butadieno-Estireno	BS	Dispositivos de un solo uso, embalajes
Copolímeros Estireno-Acrilonitrilo	SAN	Componentes de hemodiálisis, aspiradores de sangre.
Poliacrilonitrilo	PAN	Membranas de hemodiálisis
Policarbonato	PC	Membranas de oxigenadores y hemodiálisis
PoliHidroxietilmetacrilato	PHEMA	Lentes de contacto, ligamentos artificiales
Polietileno	PE, LDPE	Films, embalajes, catéteres, tubos de conexión, liberación controlada de fármacos
Polietileno (>2000000)	UHMWPE	Superficies articulares, fibras para composites, placas ortopédicas, revestimientos
PoliTereftalato de etileno	PET	Prótesis vasculares, anillos de sutura, suturas,
PoliMetilMetacrilato	PMMA	Cemento óseo, membranas de hemodiálisis, lentes de contacto e intraoculares, material dentario
PoliPropileno	PP	Embalajes estériles, jeringas, conectores, Membranas de oxigenadores, hilos de sutura, asas de soporte
PoliSulfona		Membranas de oxigenadores y hemodiálisis
Politetrafluoroetileno	PTFE	Prótesis vascular, componentes de válvulas, revestimientos, ligamentos artificiales
Poliuretano	PURs	Catéteres, cánulas, tubos endotraqueales, prótesis valvulares membranas de hemodiálisis, liberación controlada de fármacos, dispositivos de asistencia cardiaca, bolsas ventriculares, revestimientos hemocompatibles, prótesis vascular
Polietilenglicol	PEG	Angioplastia y oftalmología
Cloruro de polivinilideno	PVC	Bolsas para la sangre, tubos endotraqueales, guantes, catéteres, dispositivos de un solo uso.
Siliconas		Catéteres, drenajes, membranas, piel artificial, implantes de cirugía plástica, prótesis vasculares y traqueales, revestimientos, infusorios, componentes de válvulas

Las principales ventajas que presentan estos polímeros respecto a otras clases de biomateriales son: su mayor biocompatibilidad, la posibilidad de modificar ampliamente su composición y propiedades mecánicas, el bajo coeficiente de fricción, la capacidad de ser fácilmente procesados y trabajados incluso en formas y/o estructuras complejas, la posibilidad de modificación de su superficie químico-físicamente, y la posibilidad de inmovilizar células o biomoléculas en su interior o en su superficie.

Las principales desventajas que presentan son la presencia de sustancias indeseadas que puedan ser liberadas en el organismo (monómeros, catalizadores, aditivos, etc.), la facilidad para absorber agua y biomoléculas desde el ambiente circundante (también en las aplicaciones que no lo requieren), sus propiedades mecánicas y, en algunos casos, la dificultad de esterilización.

Las características finales del dispositivo médico dependen tanto de la estructura molecular intrínseca del polímero, como de los procesos químico-físicos a los cuales se le somete y, a diferencia de otros tipos de materiales no poliméricos, esta estructura puede ser ampliamente manipulada interviniendo sobre las condiciones operativas de la reacción de polimerización para intentar disminuir los inconvenientes que puedan presentar u optimizar las propiedades requeridas.

Además de los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, se han utilizado para estos dispositivos polímeros naturales como colágeno, celulosa, y polímeros modificados químicamente. La zona superficial del material polimérico implantado, con su estructura, composición y características, determinará la respuesta biológica del huésped puesto que está en contacto directo con los fluidos y tejidos corporales.

Estas características del material son, de hecho, las responsables de la transmisión de los impulsos, de la adhesión, de la fricción, de la abrasión, de la permeabilidad a gases y líquidos, de la compatibilidad con el ambiente orgánico corrosivo que les rodea, etc. En la situación ideal, el material y el tejido tendrían que interactuar para maximizar la incorporación del material en el tejido y así garantizar la estabilidad del dispositivo.

Para mejorar las interacciones específicas se han estudiado métodos alternativos de modificación superficial de los polímeros utilizados en dispositivos médicos, como por ejemplo la inserción de sitios de inmovilización de células o biomoléculas, o la modificación de la capacidad de adsorción, bien para impedir la adsorción de determinadas moléculas como para facilitar la interacción de antiinflamatorios o factores de crecimiento que induzcan mecanismos de reparación del tejido.

3.5 Polímeros de tipo elastina

Uno de los más importantes componentes estructurales y funcionales de la matriz extracelular es la elastina, la proteína elastomérica más estudiada y ampliamente distribuida. La elastina es una proteína fibrosa polimérica autoensamblable y muy insoluble¹³. Forma el componente amorfo y más copioso de las fibras elásticas, y es particularmente abundante en el pulmón, piel, vasos sanguíneos y cartílago, donde más se requiere sus propiedades elásticas (Tabla 3.2). Además, la matriz elástica, siendo predominantemente de naturaleza entrópica, tiene una durabilidad extraordinaria. A mayores, la elastina natural tiene una vida media en el organismo de 70 años soportando billones de ciclos de extensión-relajación.

Tabla 3.2. Porcentaje de colágeno y elastina en tejidos.

Tejido	Colágeno	Elastina
Aorta	12-24	28-32
Hígado	3,9	0,15-0,30
Ligamentum nuchae	17	74,8
Piel	71,9	0,6-2,1
Pulmones	10	3-7
Tendón de Aquiles	86	4,4

Todas las propiedades anteriormente enumeradas han despertado un notable interés en los posibles usos de la elastina como material para gran variedad de aplicaciones, tanto médicas como no médicas.

Las aplicaciones médicas que se están desarrollando, incluyen:

- Uso de matrices elastoméricas como barreras para la prevención de las adherencias entre tejidos que aparecen en cirugía u otros traumas.
- Desarrollo de matrices adecuadas para el crecimiento y proliferación celular diseñadas para la ingeniería de tejidos.
- Dosificación de fármacos en el interior del organismo usando todos los medios para controlar la temperatura de transición, además pudiendo controlar¹⁴.

En las aplicaciones no médicas que se están desarrollando, el concepto de liberación de sustancias desde reservorios realizados con estos materiales se expande a la dosificación controlada de pesticidas. En el área de la robótica, estos materiales se pueden comportar simultáneamente como sensores y como actuadores. También presentan importantes propiedades como elementos nanotecnológicos, gracias a su auto-organización espontánea en nanopartículas inteligentes cuando la temperatura excede el valor de la de transición.

3.5.1 Síntesis de los polímeros recombinantes de tipo elastina

En los polipéptidos o recombinámeros de tipo elastina (ELRs por sus siglas en inglés), al estar compuestos, en muchos casos, por un elevado número de repeticiones del pentapéptido Val-Pro-Gly-Xaa-Pro (VPGXG, donde X es el residuo invitado y puede ser cualquier aminoácido excepto Pro) ¹⁵, las rutas sintéticas propuestas en los comienzos de su síntesis como la química combinatoria y sus variantes demostraron no ser adecuadas debido a los reducidos rendimientos y los largos procesos de purificación y producción. Como era de esperar, de nuevo se buscó inspiración en la naturaleza para tratar de desarrollar una tecnología capaz de reproducir dichas moléculas con la misma exactitud y sencillez con la que lo logran los sistemas biológicos de forma rutinaria. Así se pensó en el empleo de cepas bacterianas para la producción de este tipo de proteínas, ya que prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos puede ser reproducida por los ribosomas presentes en esta clase de organismos vivos, ofreciendo una alternativa directa y eficaz a la síntesis química ordinaria ¹⁴.

Dentro del uso de bacterias, una de las estrategias más utilizadas para lograr expresar la secuencia del polímero de elastina consiste en emplear técnicas recombinantes. A través de esta tecnología es posible codificar genéticamente el polipéptido deseado en un inserto de ADN e introducirlo en el sistema biológico utilizando un plásmido. Gracias a las técnicas actuales disponibles en el área de la ingeniería genética, diseñar cadenas de doble hélice de ADN a la carta no supone ningún problema y es posible construir cualquier inserto a partir de la fusión de monómeros sintéticos para codificar cualquier secuencia proteica ya sea de procedencia natural o diseñada artificialmente ¹⁴.

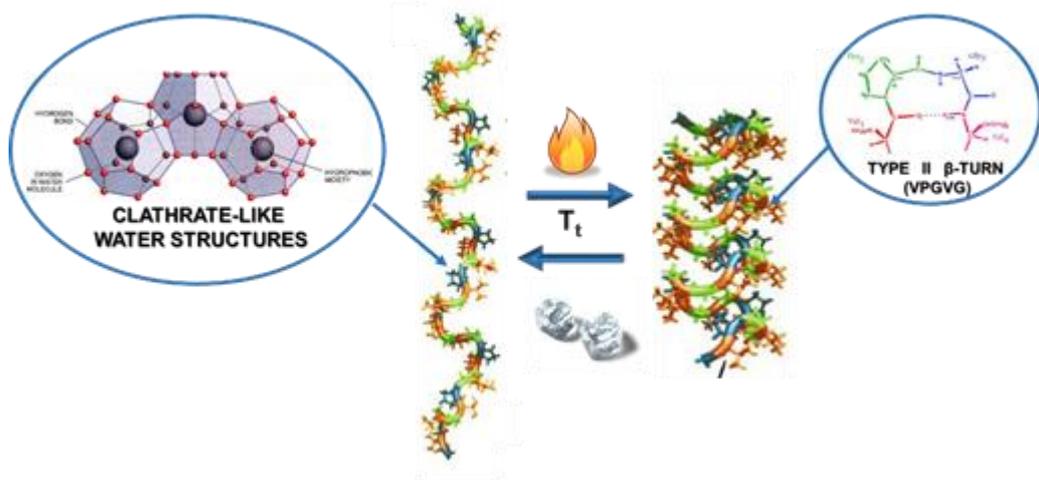
El empleo de esta metodología recombinante conlleva numerosos pasos para lograr la síntesis del inserto, dichos pasos se realizan de forma segura y controlada pudiendo producir, una vez aislada la cepa transformada con el plásmido de interés, grandes cantidades de ELRs por fermentación.

3.5.2 Características fisicoquímicas de los polímeros tipo elastina

Los ELRs exhiben un comportamiento inusual en solución acuosa que se relaciona con una temperatura de transición inversa (TTI) que produce una agregación reversible de los ELRs por encima de una llamada temperatura de transición (TT). Por debajo de esta temperatura de transición (TT), ELRs permanece hidratado y soluble en soluciones acuosas, mientras que, a temperaturas más altas que este TT, se agregan, adoptando una estructura más ordenada excluyendo el agua y volviéndose insolubles. Este proceso es completamente reversible después de la posterior refrigeración de la muestra ¹⁶. Este ITT también se conoce comúnmente como coacervación y se observó por primera vez en la elastina¹⁷. La coacervación en solución acuosa no es una propiedad común de las proteínas; la mayoría de las proteínas sufren desnaturalización con aumento de la temperatura y se convierten en estructura menos ordenada, a diferencia de los polipéptidos de elastina que parecen ser más ordenados a través del proceso de coacervación ¹⁸.

3. Introducción a los biomateriales

Esta temperatura de transición es característica de cada polímero y al superarse el polímero puede adoptar formas como por ejemplo hidrogeles, dependiendo de la composición de los bloques de elastina, es decir, del aminoácido escogido en la posición X del pentapéptido de elastina. Además, gracias a la rápida velocidad de transición a temperatura fisiológica, los ELRs pueden ser inyectados como líquidos, formándose el hidrogel de forma instantánea al entrar en contacto con el organismo en el que se inyecta ¹⁵.



3.5.3 Biocompatibilidad de los polímeros tipo elastina

La característica de mayor importancia a la hora de usar este tipo de materiales es su biocompatibilidad. En general, los polímeros tipo elastina presentan una extraordinaria biocompatibilidad; por ejemplo el poli(VPGVG) ha sido expuesto a la batería completa de pruebas recomendadas por el ASTM (American Society for Testing Materials) para materiales y dispositivos en contacto con tejidos, fluidos de los tejidos y sangre. El grado de biocompatibilidad es excepcional, y supera al que presentan biomateriales ya clásicos como la silicona y los poliuretanos ¹⁹. También supera aquellos implantes realizados con proteínas naturales tratadas, pues todos ellos presentan algún grado de sensibilización y respuesta alérgica del que carece el poli(VPGVG) y sus derivados. Pruebas en otros polímeros que surgen por la sustitución de alguno de los aminoácidos del poli(VPGVG) han demostrado también una extraordinaria biocompatibilidad ²⁰.

En la Tabla 3.3 se muestra el resultado de los 11 análisis estándar recomendados por la “American Society for the Testing of Materials” (ASTM) para los materiales en contacto con tejidos y fluidos.

Tabla 3.3. Resultado de los análisis sobre poli(VPGVG) según ASTM.

TIPO DE ANÁLISIS	RESULTADO
TEST DE MUTAGENIDAD DE AMES	NO MUTAGÉNICO
CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS DE AGAROSA	NO TÓXICO
TEST DE TOXICIDAD SISTÉMICA AGUDA	NO TÓXICO
TOXICIDAD INTRACUTANEA	NO TÓXICO
TEST DE IMPLANTACIÓN INTRAMUSCULAR	FAVORABLE
TOXICIDAD INTRAPERITONEAL AGUDA	NO TÓXICO
ANTIGENICIDAD SISTÉMICA	NO ANTIGÉNICO
TEST DE MAXIMIZACIÓN DE MAGNUSSON Y KLINGMAN DE SENSIBILIZACIÓN DÉRMICA	NO SENSIBILIZANTE
TEST DE PIROGENICIDAD	NO PIROGÉNICO
ESTUDIO DE COAGULACIÓN DE LEE-WHITE	TIEMPO NORMAL
TEST DE HEMOLISIS “IN VITRO”	NO HEMOLÍTICO

La pureza que se puede alcanzar en la purificación de los polímeros tipo elastina permite su utilización en campo biomédico a pesar de ser biosintetizados. Productos para usos farmacéuticos, como por ejemplo la insulina, obtenidos desde fuentes bacterianas como *E. coli*, precisan que las impurezas sean menores de 10 partes por millón. Los biomateriales obtenidos por la misma fuente en cambio, debido a la cantidad necesaria que es empleada en los distintos dispositivos, requieren un grado de pureza mayor de tres órdenes de magnitud. En el caso de los polímeros tipo elastina este grado de pureza se puede alcanzar mediante varios ciclos de purificación mediante la separación de fase reversible que sufren al variar la temperatura ⁸.

3.5.4 Diseño y estructura del polímero (El-Silk)2

Una de las principales desventajas de los hidrogeles formados a partir de ELRs es que no presentan una estructura fibrilar y pierden su integridad con facilidad en un exceso de medio acuoso hinchándose y pasando de un hidrogel a una dispersión de moléculas micelares independientes, sino están entrecruzados químicamente ²¹.

Por otro lado, los bloques “silk-like” (SL), es decir, las secuencias derivadas de la seda del gusano de seda (*Bombyx mori*), han demostrado que adoptan una estructura de tipo lámina- β , que se caracteriza por su estabilidad ²². La naturaleza estable de esta conformación junto con su biocompatibilidad ha propiciado el desarrollo de una amplia variedad de materiales inspirados en los bloques tipo seda y tipo seda-elastina ²³.

3. Introducción a los biomateriales

Una de las desventajas que se encuentran al trabajar con bloques tipo seda es que la cinética de formación de estructuras tipo lámina- β es muy lenta. Esto hace que al trabajar con polímeros formados completamente por bloques tipo SL, o con alto porcentaje de estos, no sea posible inyectarlos como líquidos y pretender que formen hidrogeles de forma rápida y efectiva ²⁴.

Por tanto, la combinación de bloques “elastin-like” (EL) y “silk-like” (SL) permite mejorar las características de los hidrogeles formados con ambos componentes por separado, aumentando significativamente la estabilidad de los mismos gracias a los dominios SL, y haciendo que se formen las láminas- β mucho más rápidamente al transicionar los bloques EL, lo provoca una mayor densidad de moléculas, y, por consiguiente, que sea más fácil la interacción entre los dominios SL ²⁵. En este sentido, el polímero (EI-Silk)₂ aúna ambos componentes en una molécula de estructura tetrabloque en la que los bloques EL son los predominantes, anfifílica y capaz de formar hidrogeles por respuesta a un aumento de temperatura ²⁶. Además de formar hidrogeles mediante una autoorganización, pasando de un estado sólido a un estado de gel fibroso, los bloques EL reducen el grado de cristalinidad de los bloques SL, mejorando así las capacidades elásticas del conjunto ¹⁵.

Como resultado de estas características, este polímero resulta idóneo para formar geles más estables que pueden tener diversas aplicaciones biomedicina, como, por ejemplo:

- Ingeniería de tejidos ²⁷.
- Dosificación de fármacos ²⁸.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos químicos

En este estudio se han utilizado gran variedad de reactivos químicos. En la tabla 4.1 puede observarse una relación de todas estas sustancias, así como de las empresas proveedoras que se han encargado de suministrarlas.

Tabla 4.1 Reactivos utilizados y empresas proveedoras.

Reactivo	Proveedor
Ampicilina	Fisher Bioreagents
Acrilamida/Bis-acrilamida	Berlabo
Persulfato amónico (APS)	Scharlau
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Fisher Bioreagents
N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	Sigma
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	Scharlau
n-butanol	Scharlau
Cloruro de cobre	Scharlau
MUNS	Fisher Bioreagents
D(+)-Glucosa	Fisher Bioreagents
Glicerol	Fisher Bioreagents
Antifoam 204	Sigma
Cloruro sódico	Fisher Bioreagents
Ácido Clorhídrico (HCl)	Fisher Bioreagents
Hidróxido Sódico (NaOH)	Fisher Bioreagents

4.2 Medios de cultivo

Los medios utilizados tanto en el crecimiento de las bacterias como en la producción del polímero son los siguientes:

- LB (Luria-Broth) Utilizado en cultivos meramente reproductivos y sin producción de polímero debido a la ausencia de lactosa en este medio.
- TB (Terrific Broth) Utilizado para cultivos con producción debido a la presencia de lactosa
Se esteriliza en autoclave.
- LB-Agar: Solución gelificada con Agar de medio LB utilizado en placas Petri.

4. Materiales

4.3 Soluciones de aplicación general en el laboratorio

- Tris 1M pH 6.8 de composición 60,6g de Tris por cada litro de agua bidestilada
- Tris 1M pH 8.8 de composición 121,2g de Tris por cada 500ml de agua bidestilada.
- Running buffer o tampón para el desarrollo de la electroforesis de composición por cada litro de agua destilada: 3,02g Tris, 14,4g glicerol y 1,0g SDS 10% (w/v).
- Tampón de lavado de bacterias de composición por cada litro de agua bidestilada 2,42g de Tris y 8,181g de NaCl.
- Tampón de sonicación de composición por cada litro de agua bidestilada: 2,42g de Tris y 0,372g de EDTA.

4.4 Equipos de laboratorio.

Para el estudio se han utilizado gran cantidad de materiales y equipos tanto desechables como reutilizables. Estos se enumeran a continuación:

- Equipos y materiales reutilizables
 - Pipetas regulables de distintas medidas con rango 0.1-1000 μ l
 - Autoclave de la marca selecta.
 - Mechero Bunsen
 - Pinzas
 - Equipo de electroforesis BIO RAD PowerPac Basic
 - Placa calefactora de 100 °C
 - Oscilador
 - BIO RAD Gel Doc EZ Imager
 - Incubador Certomat H y R
 - Erlenmeyer
 - Vasos de precipitados
 - Agitador magnético Heidolph MR Hei-Mix L
 - Espectrometro Agilent Technologies Cary Series UV-Vis.
 - Vortex Heidolph
 - Centrifuga Beckman coulter Avanti J-26 XP
 - Centrifuga Thermo Scientific Legend Micro 21R
 - Disruptor GEA Niro Soavi Panda Plus
 - Agitador horizontal (Camara fría)
- Materiales de un único uso
 - Eppendorf de 1.5 y 2 ml
 - Placas Petri
 - Recipientes Falcon de 50ml
 - Asas de siembra
 - Palillos estériles
 - Tripa de diálisis

- Parafilm

A mayores de todo esto, el principal equipo utilizado es el fermentador, del cual se hablará en el apartado 5 en detalle.

5 REACTOR

5.1 Características básicas

El equipo principal usado en este trabajo es el reactor Applikon Biotechnology MiniBio 500 controlado por el equipo my-Control de la misma marca.

Este reactor cuenta con un recipiente de vidrio autoclavable de capacidad total de 550mL y 400mL de volumen de trabajo. El reactor montado y listo para su utilización, pero vacío sin medio se muestra en la figura 5.1

Figura 5.1 Reactor Applikon Biotechnology MiniBio 500



5. Reactor

5.2 Control

5.2.1 Sensores

- Oxígeno: El equipo cuenta con un sensor polarográfico de oxígeno.
- pH: El equipo cuenta con un sensor clásico de membrana de vidrio.
- Temperatura: El equipo cuenta con un sensor de Pt-100 en el plato superior.

5.2.2 Actuadores

- Agitación: El sistema cuenta con agitador central de aspas tipo Rhuston de velocidad máxima 1750 rpm.
- Temperatura: Para el control de la temperatura el sistema cuenta con un condensador de gas sustentado por energía eléctrica.
- pH: El sistema cuenta con dos bombas peristálticas conectadas a dos recipientes de HCl y NaOH de alta concentración para el control del pH de medio.
- Oxígeno: Para el control de la densidad de O₂ el sistema esta conectado a suministros de aire y Oxígeno puro estando la entrada de aire permanentemente abierta y la de Oxígeno controlada a necesidad mediante una válvula de aguja.

5.2.3 Controlador digital

Para controlar este equipo se cuenta con un servidor red digital con múltiples opciones de configuración de los puntos de trabajo. La interfaz de trabajo del controlador se muestra en la figura 5.2

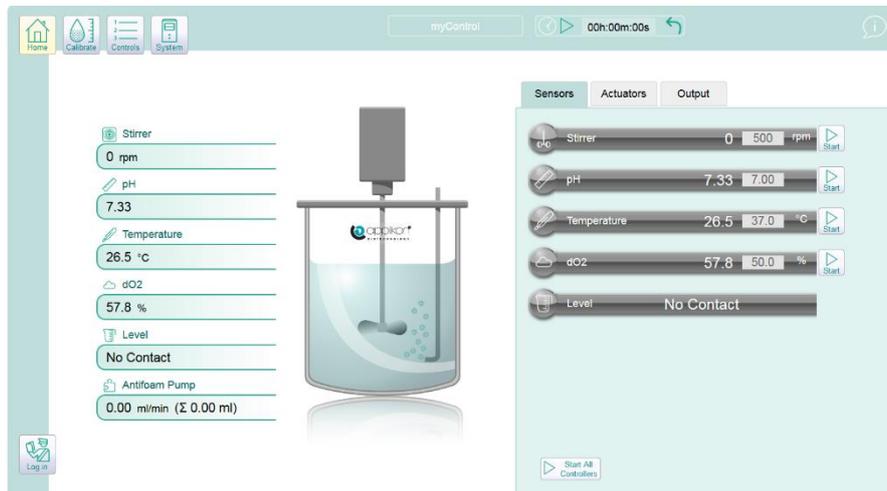


Figura 5.2 Imagen del sistema de control web del reactor.

6 PROCEDIMIENTO DE BIOPRODUCCIÓN

6.1 Preparación de la placa de cultivo LB-Agar

El proceso comienza con la preparación de una placa Petri de cultivo. La placa se prepara a partir de medio LB-Agar al que se adiciona glucosa estéril y el antibiótico frente al que la bacteria con la que se trabaja presenta resistencia.

En todo momento se trabaja con material y medio estéril y en las condiciones lo más asépticas posibles, haciendo uso de una campana de flujo laminar.

En este caso las concentraciones utilizadas fueron 1% de glucosa, 0.1% de Ampicilina.

6.2 Cultivo en placa

La bacteria con la que se va a trabajar ha sido sometida a un proceso de transformación genética en el cual se le ha insertado un plásmido que contiene el gen que codifica el biopolímero. Tras esto, la bacteria crece y se divide produciendo numerosas copias del plásmido. Un screening de las colonias transformadas permite seleccionar aquella en la que la bioproducción es máxima. Con objeto de mantener esta colonia, asegurándonos una producción constante a lo largo del tiempo y en producciones sucesivas, se crea el denominado “glicerol stock” para almacenar un clon bacteriano, sin que esta sufra sustanciales modificaciones de sus características.

El “glicerol stock” mostrado en la figura 6.1 consiste en una mezcla de la suspensión celular bacteriana con glicerol estéril al 80%, que se conserva a -80°C en crioviales. Este proceso no afecta a la bacteria debido a que el glicerol protege la membrana celular evitando que el agua que acompaña a la bacteria cristalice y rompa las células.

La siembra de la placa se realiza con el “glicerol stock”. Para ello se transfiere asépticamente, con un asa de siembra, una pequeña muestra de la suspensión celular, desde el tubo que la contiene a la placa con medio de cultivo estéril. Tras esto y con el fin de individualizar las colonias se harán sucesivos ciclos de arrastre y esterilización del asa con el fin de realizar una siembra por agotamiento. La placa recién sembrada se incuba, durante 24 horas a una temperatura de 37°C. El resultado puede verse en la figura 6.2.



Figura 6.1 Glicerol stock

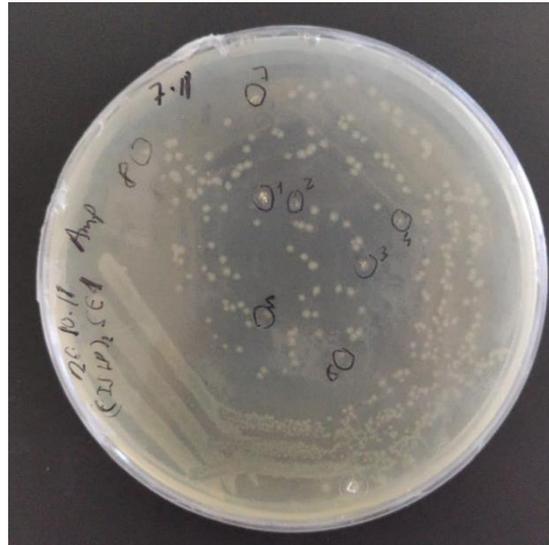


Figura 6.2 Placa con siembra por agotamiento

6.3 Screening

Se realiza un análisis previo de la expresión proteica de varias colonias seleccionadas aleatoriamente con el fin de seleccionar la colonia de mayor bioproducción para su uso posterior en el fermentador. Para ello se realizan cultivos en Falcons con agitación en medio TB estéril introduciendo una muestra de cada colonia para después analizar la expresión mediante electroforesis y de esta manera seleccionar siempre la de mayor producción.

6.4 Preparación de inóculo

Una vez seleccionada la colonia de mayor capacidad de producción y con la ayuda de un palillo estéril se hace un cultivo en flask en medio LB con glucosa añadida para conseguir una población bacteriana superior. Este cultivo se realiza durante aproximadamente 20 horas, primero unas 6 horas en un falcon con 5ml de medio trasladando después el contenido de este a dos Erlenmeyer añadiendo 30 ml de nuevo medio de cultivo LB a cada uno.

6. Procedimiento de bioproducción

Una vez obtenido el cultivo se comprueba con el espectrofotómetro su población y se centrifuga el volumen necesario para que la población total en el inoculo sea la deseada calculándolo mediante la fórmula:

$$Abs_{inoculo} * V_{Inoculo} = Abs_{Medida} * V_{Centrifuga}$$

Una vez centrifugado se resuspendera en nuevo medio TB en la cantidad que se desee inocular al fermentador.

6.5 Bioproducción en fermentador

Una vez obtenido el inoculo y con el fermentador y el medio de cultivo previamente autoclavados se activan los controladores del reactor y se procede a la inoculación del fermentador con una jeringuilla.

Durante el proceso se tomarán periódicamente muestras para, mediante el espectrofotómetro, hacer un seguimiento del crecimiento bacteriano.

6.6 Lavado de células y purificación

Una vez finalizada la bioproducción se procede a la recogida de la masa celular y a la centrifugación y lavado de las mismas, por resuspensión en un tampón de lavado cuya composición queda recogida en el capítulo 4 apartado 4.3. Se llevan a cabo ciclos de resuspensión-centrifugación hasta que el sobrenadante sea incoloro. Posteriormente las células se resuspenden en el denominado tampón de sonicación que está formado por Tris 20mM y EDTA 1mM. Antes de proceder a la ruptura de la célula la suspensión celular se adiciona un inhibidor de proteasas, el fluoruro de fenilmetanosulfonilo para evitar que, durante esta etapa, las proteasas endógenas liberadas tras la ruptura celular rompan el polímero en puntos específicos. A continuación, se procede a pasar varias veces la masa bacteriana por un disruptor de alta presión, aproximadamente 1500 bar.

Una vez rota la bacteria se centrifuga en frio la suspensión y se elimina el precipitado, quedando el polímero en disolución. Tras esto el sobrenadante se podrá almacenar congelado para esperar a un momento más adecuado o bien se podrá proceder directamente a la purificación del mismo.

Dicha purificación se llevará a cabo mediante el esquema que se muestra en la figura 6.3.

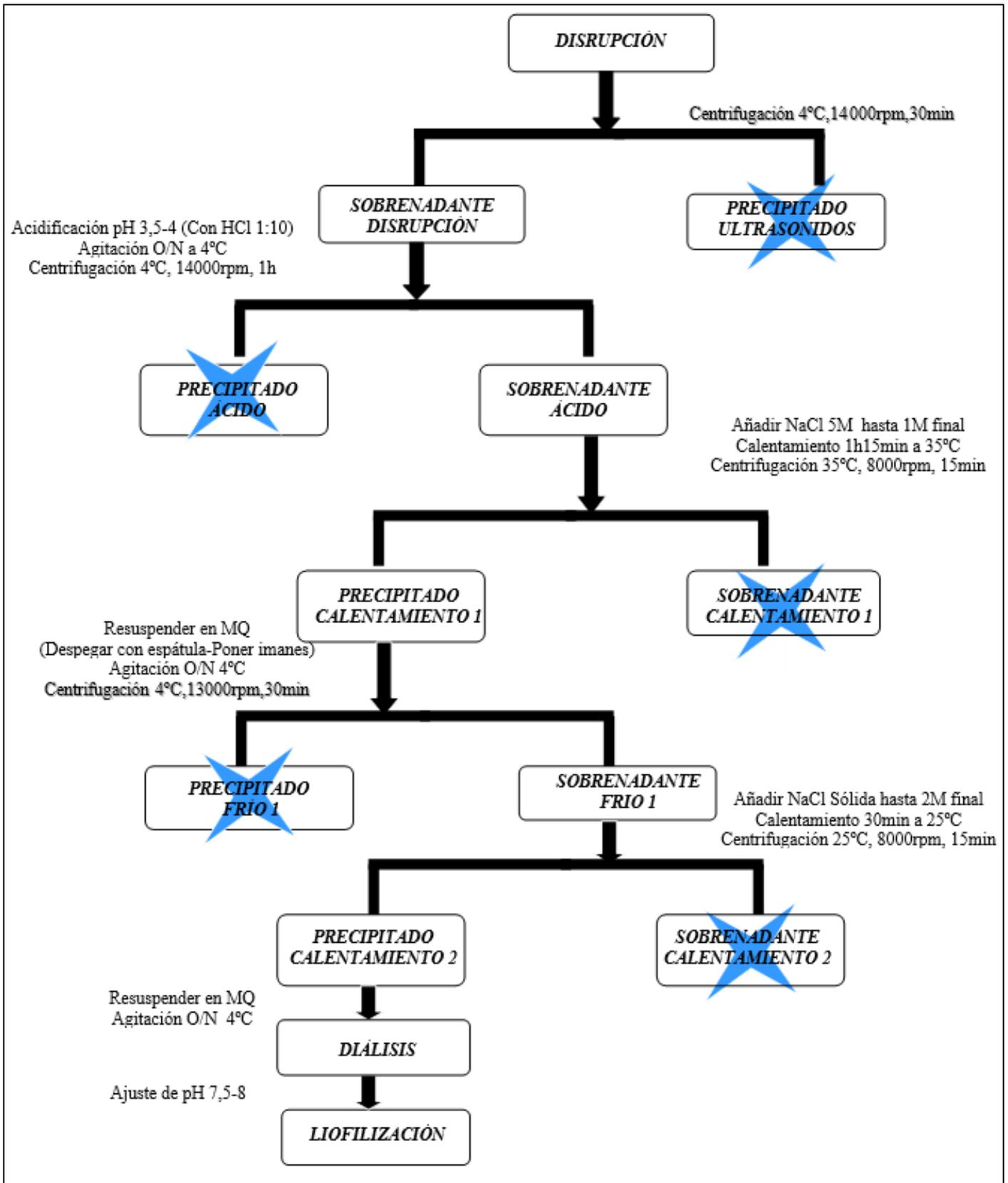


Figura 6.3 Proceso de purificación del polímero EI(Silk)₂

7 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

7.1 Técnica de electroforesis

7.1.1 Introducción

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico de aquellas moléculas que poseen carga eléctrica

El parámetro que determina el comportamiento de una molécula en un campo eléctrico es la movilidad electroforética, U , que se define, como la velocidad de migración por unidad de campo (E , en voltios por cm), como se muestra en la ecuación 7.1.

$$U = \frac{dX}{Edt} [=] \frac{cm}{s*V} \quad \text{Ecuación 7.1}$$

La movilidad electroforética depende de la carga, de la forma y del tamaño de las moléculas. La carga de las moléculas no es fácilmente evaluable, pues depende del medio (pH, fuerza iónica).

La electroforesis se puede desarrollar de dos maneras. En la llamada *electroforesis libre*, el campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones. Su principal problema es que el medio en que se desarrolla es un fluido, por lo que es poco resolutiva al incidir mucho la difusión y la convección. Por el contrario, la otra modalidad, la *electroforesis en zona*, es una de las técnicas más utilizadas en bioquímica por su gran resolución y es la utilizada por ello en este trabajo. Aquí el campo eléctrico se aplica a un medio o a un soporte estabilizante, en vez de a un fluido, evitando así sus inconvenientes. La muestra se deposita en una reducida zona del soporte, lo que da nombre a esta modalidad.

Para llevar a cabo una separación electroforética zonal se necesitan los siguientes elementos: una fuente de tensión (o de alimentación) que proporciona el campo eléctrico, mediante dos electrodos, positivo (ánodo) y negativo (cátodo), entre los que se establece una diferencia de potencial, una cubeta o recipiente en cuyos extremos se sitúan los electrodos, un soporte electroforético (gel) y el tampón de electroforesis.

7. Cuantificación de la bioproducción

7.1.2 Factores que afectan a la electroforesis

El resultado de una electroforesis depende de diferentes factores y es necesario conocerlos para lograr la máxima resolución.

- **Campo eléctrico**

Es lo que posibilita que haya electroforesis. A su vez, como gradiente de potencial que es, depende de diferentes parámetros cuya incidencia hay que analizar.

Diferencia de potencial entre electrodos (V): Se mide en voltios y es lo que define el campo eléctrico (diferencia de potencial entre electrodos referida a la distancia, d , entre éstos, V/d). Cuanto mayor sea, mayor será la velocidad de migración de las moléculas. En este caso la diferencia de potencial será variable y dependerá de la resistencia manifestada.

Intensidad (I): Se mide en amperios (A), y cuantifica el flujo de carga eléctrica. Está relacionada con el factor anterior a través de la ley de Ohm, mostrada en la ecuación 7.2.

$$V = I \cdot R \qquad \text{Ecuación 7.2}$$

Para este trabajo todas las electroforesis se llevaron a cabo con una intensidad de 25 mA

Resistencia (R): Se mide en ohmios. Cuanto mayor sea la resistencia del soporte, menor será la movilidad electroforética. La resistencia depende de la naturaleza del soporte, de sus dimensiones (anchura, longitud y sección) y de la concentración del tampón de electroforesis.

Temperatura (T): El paso de una corriente eléctrica produce calor (efecto Joule). Este efecto será tanto mayor, cuanto mayor sea la diferencia de potencial y la resistencia del sistema. Debe controlarse, pues puede afectar a la muestra (desnaturalizándola), al soporte e incluso al equipo electroforético, si la temperatura se eleva demasiado.

- **Muestra**

La movilidad electroforética de una molécula es tanto mayor cuanto mayor sea su carga, y disminuye según aumenta su tamaño, pues mayor es la fricción de la molécula con el medio y menor es su carga por unidad de superficie (factor que multiplicado por el valor del campo daría el de la fuerza que actúa sobre la molécula.) Así las moléculas globulares se mueven con mayor facilidad que las elongadas (la esfera presenta la mínima superficie a igualdad de volumen). Por ello moléculas del mismo tamaño y carga, pero de distinta forma, pueden diferir en la movilidad electroforética, y ser separables por electroforesis.

- **Tampón**

Durante la electroforesis se produce electrolisis de agua, generándose protones en la proximidad de ánodo e iones hidroxilo en la del cátodo. Este entorno se haría más

básico, mientras que el anódico, se acidificaría. Un tampón es, por tanto, esencial en toda electroforesis. Su composición no debe afectar a las moléculas a separar, aunque en algunos casos se aproveche la unión de alguno de sus iones para producir una mejor separación. La fuerza iónica condiciona la movilidad electroforética de las sustancias a separar, pues influye en su esfera de solvatación y en la conductividad del sistema. Es necesaria, por tanto, una fuerza iónica suficiente para mantener el pH y la conductividad durante todo el proceso. Sin embargo, una fuerza iónica muy elevada interfiere, por contra, en la electroforesis. Por ello se utilizan tampones con fuerzas iónicas moderadas (0,05-0,10M). Pero, es el pH la característica del tampón que debe ser controlada más cuidadosamente, puesto que determina la carga de la muestra.

7. Cuantificación de la bioproducción

7.2 Equipo electroforético.

El equipo electroforético utilizado en este proyecto cuenta con una fuente Power Pack Basic. Esta fuente permite fijar como constantes intensidad o voltaje alcanzando límites de 400mA, 300V y 75W. La fuente permite conectar varias cubetas simultáneamente en paralelo teniendo que aumentar la intensidad utilizada al realizar dos o más electroforesis simultáneamente. En la figura 7.1 se muestra la fuente utilizada.



Figura 7.1 Fuente de alimentación utilizada en las electroforesis

A mayores se utilizaron cubetas de electroforesis como la mostrada en la Figura 7.2 en donde se colocaron los soportes con los geles y las muestras.



Figura 7.2 Cubeta utilizada para las electroforesis

7.3 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

7.3.1 Introducción

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas, aunque también es útil para ácidos nucleicos.

Es el método más utilizado debido a sus numerosas ventajas. La fundamental es que posee un gran poder de separación. Los geles de poliacrilamida no solo evitan la convección y minimizan la difusión, sino que, además, participan directamente en el proceso de separación. Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas, de manera que se produzca un efecto de tamizado molecular.

7.3.2 Preparación del soporte

El soporte se prepara a partir de un compuesto de bajo peso molecular (acrilamida) o monómero, que forma largas cadenas lineales (polímero). Estas poseen abundantes grupos polares que las hacen solubles en medio acuoso. En función de la concentración de acrilamida se obtienen entramados más o menos densos, utilizando para los análisis en este caso una mezcla de dos fases, un Stacking con un 4% de acrilamida y un Resolving con un 10% de acrilamida. La polimerización de la acrilamida se consigue por adición de catalizadores. El proceso se inicia habitualmente por la adición de persulfato amónico, a una disolución acuosa de acrilamida con tris-(hidroximetil)-aminometano, utilizado como tampón, y dodecilsulfato sódico, utilizado para desnaturar las proteínas. Aunque esto inicia la reacción de polimerización se requiere la adición de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) como propagador. Ajustando las cantidades de persulfato y TEMED puede controlarse la velocidad de polimerización.

La forma habitual en que se desarrolla la PAGE es en placa y puede llevarse a cabo en posición horizontal o vertical, según el tipo de cubeta empleado. Lo más habitual, sobre todo para la separación de proteínas, es el modo vertical, que es el utilizado en este trabajo.

Para la realización de este proceso se utilizan dos cristales cuadrados, uno de ellos con una hendidura en la parte superior, dos separadores para poner en los laterales entre ambos cristales y un soporte de gelificación. Tras montar los cristales y añadir el catalizador a la mezcla del Resolving se vierte la mezcla entre ambos cristales y se deja gelificar con un poco de N-Butanol que ayuda a reducir la tensión superficial y así conseguir que la parte superior de esta fase del gel sea homogénea. Una vez gelificado el Resolving, retiramos el resto de agua y butanol que haya podido quedar y añadimos el Stacking con catalizador insertando un "peine" en su parte superior para crear "pocillos" donde se cargarán posteriormente las muestras a analizar.

Una vez terminada la preparación del gel se traslada a la cubeta de electroforesis, añadiendo Loading Buffer hasta que esté en contacto.

7.3.3 Aplicación de la muestra

7. Cuantificación de la bioproducción

La aplicación de las muestras en los pocillos se realiza mediante pipetas o jeringuillas que permitan dispensar pequeños volúmenes (2-10 μ L). La masa aplicada es del orden de 1-20 μ g, aunque pueden aplicarse cantidades menores (hasta unos pocos nanogramos) si se dispone de métodos de detección (tinción) suficientemente sensibles. En el tampón de la muestra, también se añade el marcador electroforético para determinar el final del proceso. El Azul de Bromofenol es el marcador más utilizado.

7.3.4 Localización de los componentes separados: tinción

Finalizada la PAGE hay que separar el gel de las placas de vidrio que habían servido de molde. Esto se logra haciendo palanca entre ambas placas con una espátula o los propios separadores. Alternativamente, puede haberse cargado una muestra conocida en el pocillo de un extremo, para así orientar el resto del gel y para usarla como patrón conocido.

Para la visualización de las proteínas separadas en el gel es necesario teñirlas. El colorante más utilizado en PAGE, para proteínas, es el Azul de Coomassie y alguno de sus derivados, pero en este caso debido a la estructura del polímero de interés tendremos que utilizar tinción de cobre. El colorante utilizado para la tinción de los geles en este caso ha sido una disolución de CuCl_2 de 0.3M. Se trata de una tinción negativa del gel. Éste se teñirá por inmersión en esta solución durante unos 10-15 minutos. Al cabo de este tiempo se lavarán los geles en agua destilada también durante unos 10-15 min. El resultado final son bandas blancas sobre un fondo azul claro.

7.3.5 Descripción del equipo de imagen y del programa de tratamiento.

El equipo de imagen utilizado para el análisis de los resultados de la electroforesis fue el Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad, equipo que cuenta con soporte para realización de análisis con UV de DNA y análisis de tinciones con de Coomassie, cobre, plata y zinc.

7.4 Normalización de muestras.

Para los análisis de expresión ha sido necesario llevar a cabo una normalización de las muestras en función de su densidad de biomasa. Para ello se utilizaron los resultados proporcionados por los análisis del espectrofotómetro y se ajustaron las diluciones y las cargas de muestra de forma que en todas las muestras se cargase siempre la misma cantidad de células.

El método utilizado se basa en los parámetros mostrados en la tabla 7.1.

Tabla 7.1 Tabla de valores de la normalización de las muestras.

Intervalos de absorbancia	Volumen de resuspensión [μL]	Volumen de carga [μL]
0,1-0,5	20	5/A
0,5-2	50	12,5/A
2-5	100	25/A
5-10	200	50/A
10-20	400	100/A
20-40	800	200/A

8 PLANIFICACIÓN DE EXPERIMENTOS

8.1 Selección de variables

En cuanto a la elección de las variables a estudiar se optó por utilizar 2 cepas diferentes SE1 y BL21.

Por un lado, la cepa BL21 es la utilizada anteriormente y que en condiciones sin oxigenación estaba dando unos rendimientos bajos de en torno a 225g/L.

Por otro lado, la cepa SE1 es una nueva cepa comercial que presenta una elevada estabilidad plasmídica que la permite tener un mayor crecimiento celular sin perder por ello el plásmido que la dota de expresión.

Para estudiar el comportamiento de ambas cepas con respecto a la oxigenación se utilizó 0% y 50% de oxígeno con la cepa BL21 y 0%, 25% y 50% con la cepa SE1, que es el principal punto de interés del estudio.

8.2 Procedimiento de realización de ensayos.

Se realizaron los ensayos durante el día para poder tomar y medir muestras cada hora. Por ello la planificación precisaba de 3 días por cada fermentador realizado:

- El primero para la preparación del reactor con su paso por el autoclave y la preparación del preinóculo.
- El segundo para la realización de la fermentación y la toma y medida de muestras cada hora.
- El tercero para el lavado y disrupción de células.

Una vez estuviese lavada y rota la biomasa se planificó el almacenaje de la proteína en congelador para realizar la purificación en grupos de 3 días de fermentación debido a que las cantidades con las que se trabajaría serían muy reducidas y los equipos de centrifugación tenían capacidad suficiente para ello.

Las condiciones de trabajo que se mantuvieron constantes fueron una temperatura de 37 °C, un pH de 7 y un inóculo inicial de 40ml con una absorbancia de 5 a 600nm disuelto en TB.

Además, el medio utilizado fueron siempre 340mL de una disolución de TB de la marca Formedium en la concentración indicada por el fabricante, 55,85g/L, con una adición de 2.625ml de glicerol y 23.3µL de Antifoam 204 de Sigma-Aldrich. Como antibiótico se usaron siempre 195µL de ampicilina.

9 RESULTADOS

9.1 Análisis y evolución de la población bacteriana (cantidad de biomasa)

Con el objetivo de cuantificar la biomasa presente a distintos tiempos de la fermentación y así conocer el perfil de crecimiento de la población bacteriana se realizaron medidas de absorbancia a una longitud de onda de 600nm, estas medidas son directamente proporcionales a la población total de Escherichia Coli de la forma expresada en la ecuación 9.1^{29 30}.

$$1.0 * Abs = 8 \times 10^8 \text{celulas/ml} \quad (\text{Ecuación 9.1})$$

El seguimiento de la biomasa realizado durante los procesos de fermentación se realizó con una periodicidad de una hora. Los valores de las absorbancias se recogen en las tablas 9.1 a 9.5 siendo representados en las figuras 9.1 a 9.5.

9. Resultados

- **Bacteria SE1 0% de oxígeno**

Se realizaron dos cultivos en estas condiciones.

Tabla 9.1 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 0% de oxígeno

08/11/2018		13/12/2018	
Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs
0,00	0,4	0,00	0,5
1,00	1,4	1,00	1,2
2,00	4,0	2,00	3,5
3,00	6,5	3,00	5,2
4,00	8,5	4,00	7,7
5,00	9,6	5,00	8,9
6,00	10,2	6,00	8,8
7,00	10,6	7,00	8,8
8,00	10,8	8,00	9,2
9,00	12,4	9,00	10,2
10,00	13,2	10,00	12,0
11,00	12,8	11,00	13,2

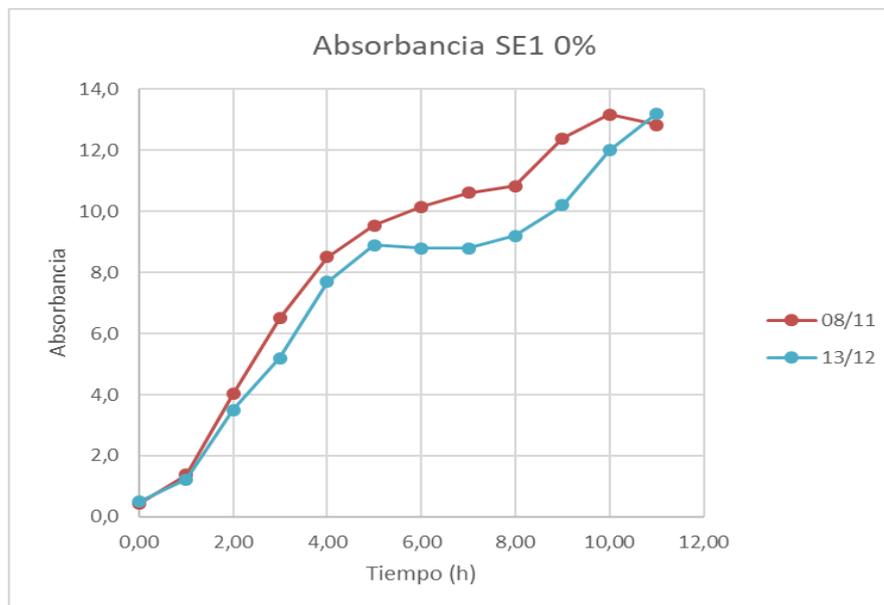


Figura 9.1 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 0% de oxígeno

- **Bacteria SE1 0% de oxígeno**

Se realizaron dos cultivos en estas condiciones.

Tabla 9.2 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 25% de oxígeno

11/10/2018		18/12/2018	
Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs
0,00	0,5	0,00	0,5
1,00	2,0	1,00	1,2
2,00	4,1	2,00	3,2
3,00	6,3	3,00	5,5
4,00	7,8	4,00	7,4
5,00	9,9	5,00	9,7
6,00	12,4	6,00	10,6
7,00	12,6	7,00	12,3
8,00	12,8	8,00	12,4
9,00	13,9	9,00	12,8
10,00	18,0	10,00	16,7
10,75	20,8	11,00	20,7
12,00	24,6		

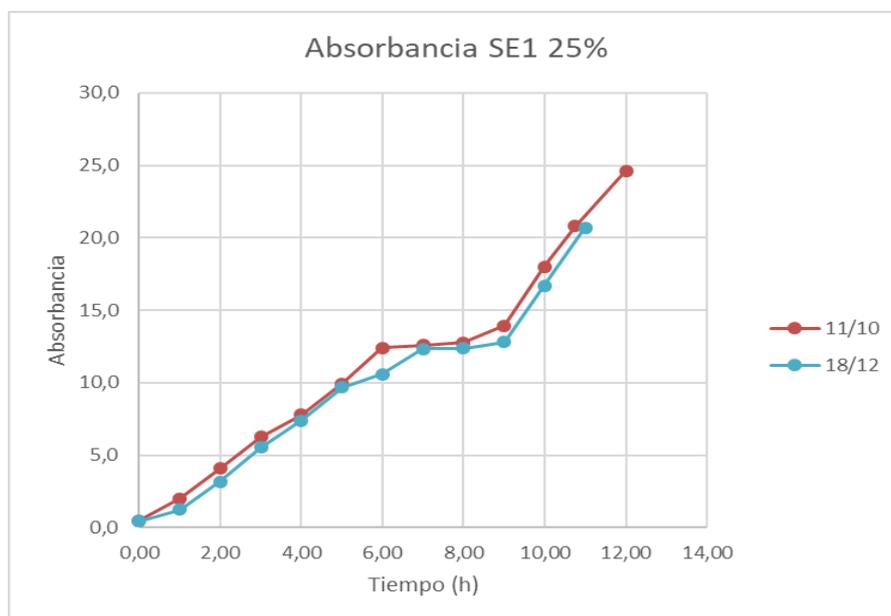


Figura 9.2 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 0% de oxígeno

9. Resultados

- **Bacteria SE1 50% de oxígeno:**

Se realizaron tres cultivos en estas condiciones.

Tabla 9.3 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 50% de oxígeno

09/10/2018		06/11/2018		13/11/2018	
Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs
0,00	0,5	0,00	0,5	0,00	0,5
1,00	1,6	1,00	1,7	1,00	1,3
2,00	3,7	2,00	3,9	2,00	3,5
3,00	8,0	3,00	6,1	3,00	5,5
4,00	13,0	4,00	7,8	4,00	7,4
5,00	18,3	5,00	9,7	5,00	9,4
6,00	18,8	6,00	10,8	6,00	11,8
7,00	19,4	7,00	11,5	7,25	15,1
8,00	25,1	8,00	13,7	8,00	19,2
9,00	32,6	9,00	18,0	9,00	27,7
10,00	39,0	10,00	24,0	10,00	37,0
10,75	38,9	11,00	32,4	11,00	36,5

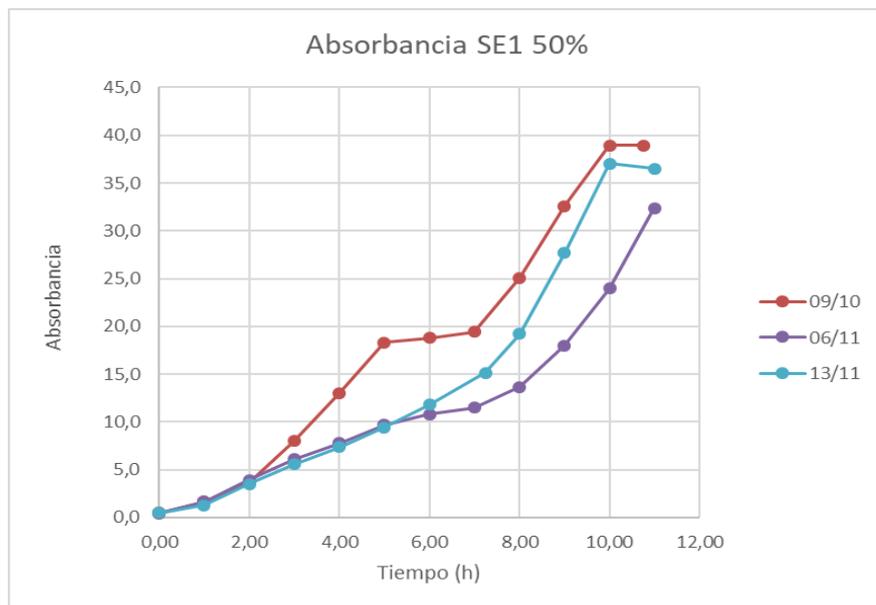


Figura 9.3 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa SE1 y 50% de oxígeno

- **Bacteria BL21 0% de oxígeno:**

Se realizaron dos cultivos en estas condiciones.

Tabla 9.4 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa BL21 y 0% de oxígeno

07/02/2019		19/02/2019	
Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs
0,00	0,5	0,00	0,5
1,00	1,4	1,00	1,3
2,00	2,8	2,00	2,6
3,00	3,7	3,00	3,5
4,00	4,3	4,00	4,4
5,00	4,7	5,00	4,8
6,00	5,2	6,00	4,8
7,00	5,5	7,00	5,2
8,00	5,5	8,00	5,5
9,00	5,6	9,00	5,6
10,00	5,6	10,00	5,6

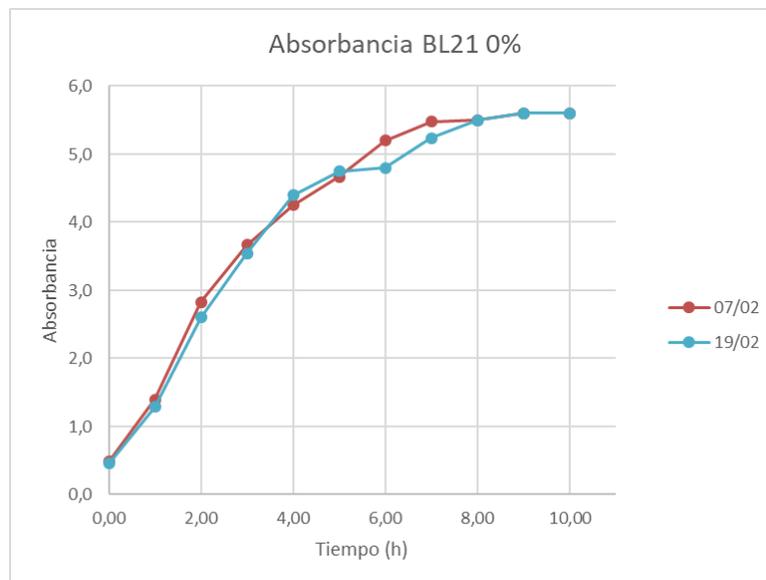


Figura 9.4 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa BL21 y 0% de oxígeno

9. Resultados

- **Bacteria BL21 50% de oxígeno:**

Se realizaron dos cultivos en estas condiciones.

Tabla 9.5 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa BL21 y 50% de oxígeno

12/02/2019		26/02/2019	
Tiempo [h]	Abs	Tiempo [h]	Abs
0,00	0,4	0,00	0,5
1,00	1,1	1,00	1,8
2,00	3,8	2,00	4,3
3,00	6,3	3,25	7,4
4,00	7,8	4,00	8,7
5,00	9,6	4,75	9,6
6,00	11,3	6,00	12,0
7,00	12,1	7,00	13,0
8,00	12,9	8,00	15,5
9,00	14,4	9,00	17,2
10,00	16,0	10,00	19,5
11,00	16,0	11,00	20,0

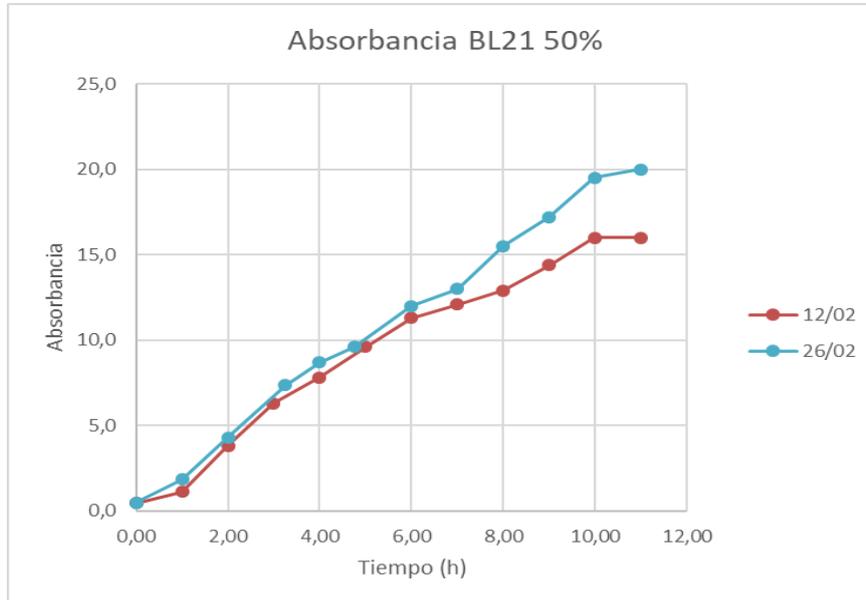


Figura 9. 5 Resultados de la absorbancia de las experiencias con cepa BL21 y 50% de oxígeno

- **Comparación de los resultados:**

En la figura 9.6 se puede ver la comparación de todos los resultados.

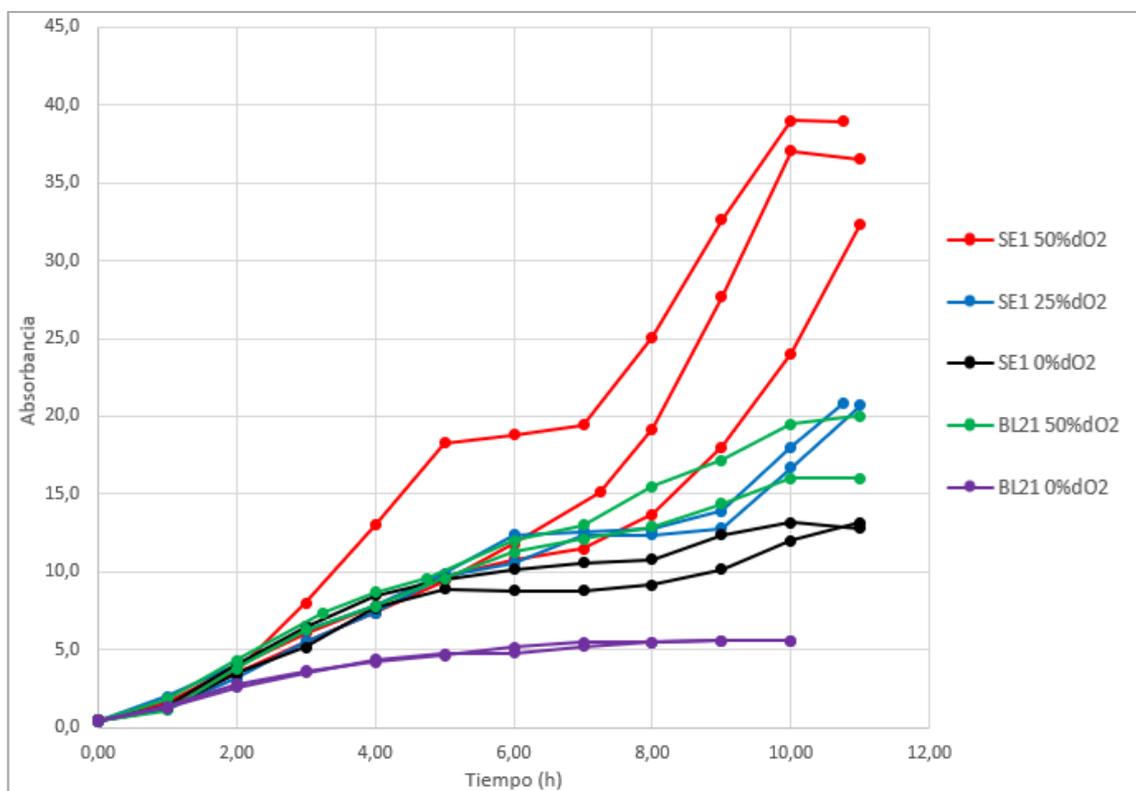


Figura 9.6 Comparación de la evolución de la absorbancia en distintas condiciones

- **Discusión de los resultados:**

Como se puede observar con los resultados de las espectrofotometrías mostradas anteriormente, la población bacteriana en los experimentos con la cepa SE1 es superior al de la BL21 en igualdad de condiciones. Siendo más acusada la superioridad de crecimiento para SE1 al realizar los ensayos con una adición de oxígeno durante el proceso fermentativo.

De esta forma, para las condiciones óptimas, SE1 con 50% dO₂, la absorbancia alcanza valores de en torno a 37. Sin embargo, en las mismas condiciones la cepa BL21 menores de 20.

Comparando las mismas cepas en diferentes condiciones observamos un aumento de la población ante la adición de oxígeno que para ambas cepas es aproximadamente proporcional, pues la absorbancia máxima alcanzada con un 50% de oxígeno es del orden de 3 veces mayor que la alcanzada sin oxígeno.

En los experimentos realizados con adición de oxígeno se puede observar en general (gráficas 9.1 a 9.6) la aparición de un intervalo intermedio con carácter estacionario en lo que a crecimiento se refiere que ocurre entre las 5 y las 8 horas de proceso. Esto se relaciona con un crecimiento bacteriano diauxico. Este hecho se caracteriza por la existencia de dos

9. Resultados

fases de crecimiento exponencial, una, la primera, en la cual la población bacteriana toma como fuente de hidrocarburos la glucosa presente en el medio y otra, la segunda, en la cual la población bacteriana pasa a nutrirse de la lactosa presente en el medio TB con el que se realizan los ensayos³¹. Este tipo de distribución en escala logarítmica se ajusta a una distribución como la que se muestra en la figura 9.1.

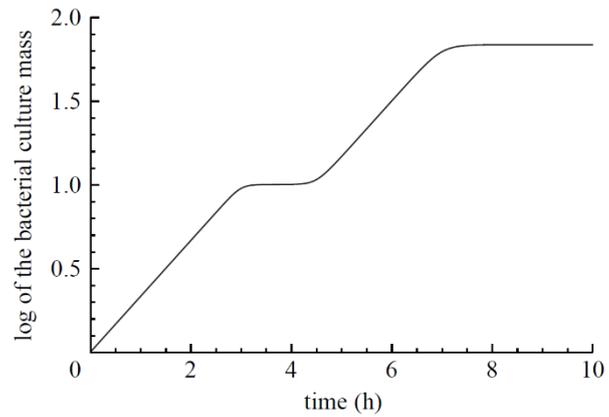


Figura 9.7 Ejemplo de un crecimiento diauxico ideal.

9.2 Análisis de la expresión de producción

En segundo lugar, se llevó a cabo el análisis de la expresión bacteriana, es decir la cuantificación de la bioproducción del biopolímero que se quiere sintetizar. El aumento de la biomasa en una fermentación, aunque a priori sea una variable a optimizar, no conlleva implícitamente que la producción aumente. Es necesario cuantificar para cada cultivo la proteína expresada.

El análisis de la expresión bacteriana se llevó a cabo mediante análisis de electroforesis el día posterior al cultivo normalizando las muestras de acuerdo a su absorbancia y analizando las áreas con una muestra patrón de concentraciones de polímero conocidas. Esta normalización se hizo acorde a lo explicado en el apartado 7.4.

Los resultados obtenidos se observaron en las imágenes hechas a los geles de las cuales 2 ejemplos se muestran en las figuras 9.8 y 9.9. En éstas cada columna corresponde a una muestra diferente dejando dos de ellas para 2 muestras patrón, una como forma de identificar nuestro polímero entre todas las proteínas presentes y otro con muestras conocidas con el fin de poder realizar una recta de calibrado.

9. Resultados

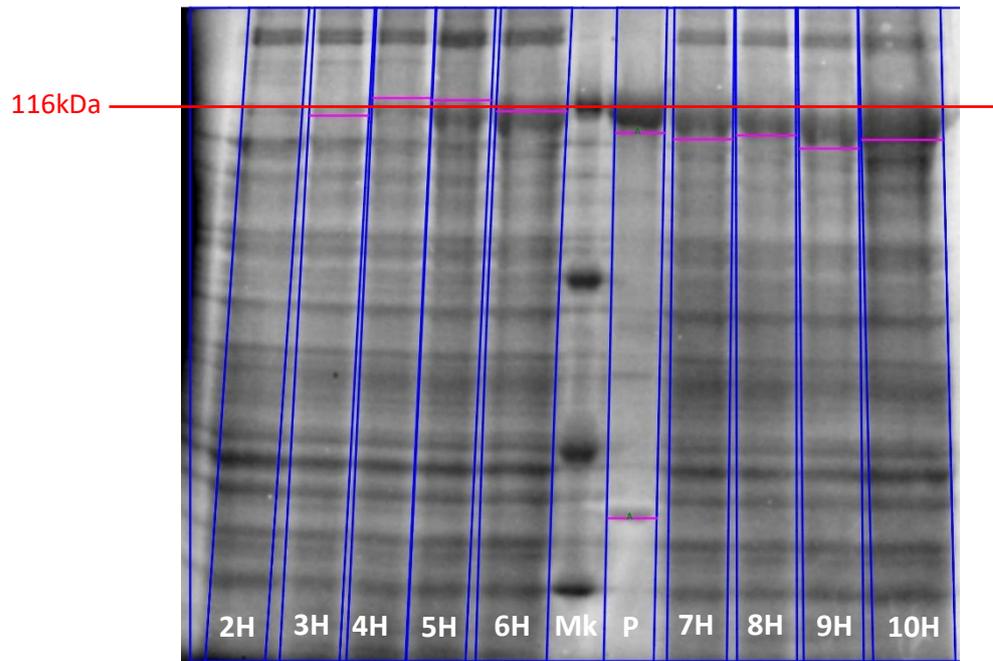


Figura 9.8 Resultado de la electroforesis del día 13 de diciembre de 2018

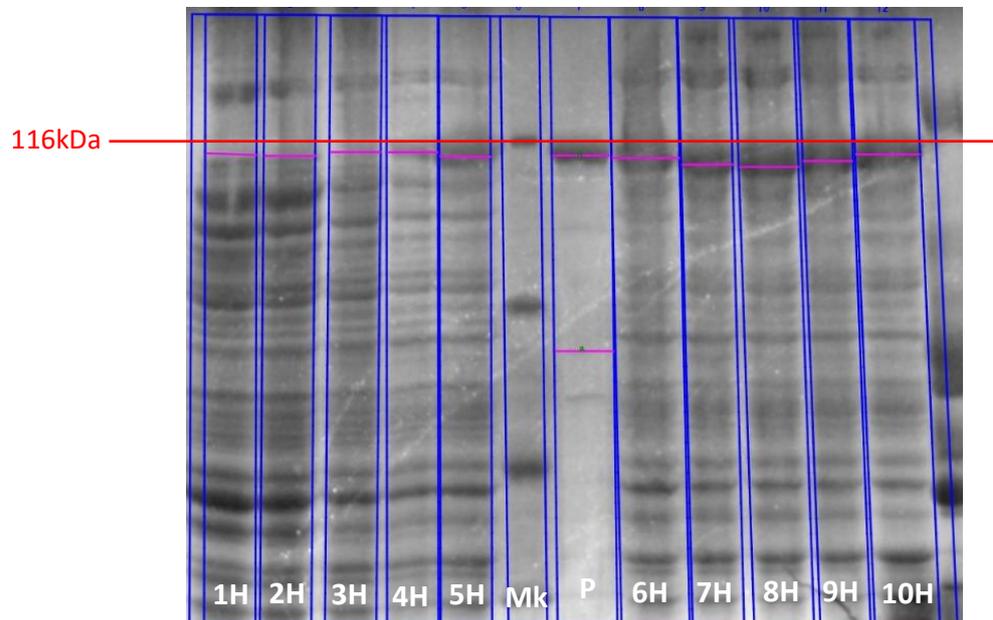


Figura 9.9 Resultado de la electroforesis del día 8 de noviembre de 2018

Los resultados numéricos son los mostrados en las tablas 9.6 a 9.10 y representados en las figuras 9.10 a 9.14.

- **Bacteria SE1 0% de oxígeno:**

Tabla 9.6 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 0% de oxígeno

08/11/2018		13/12/2018	
Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada
0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	1,00	0,00
2,00	0,18	2,00	0,22
3,00	0,50	3,00	0,56
4,00	0,60	4,00	0,65
5,00	0,75	5,00	0,80
6,00	0,92	6,00	0,99
7,00	0,99	7,00	1,01
8,00	1,10	8,00	1,05
9,00	1,16	9,00	1,07
10,00	1,20	10,00	1,16

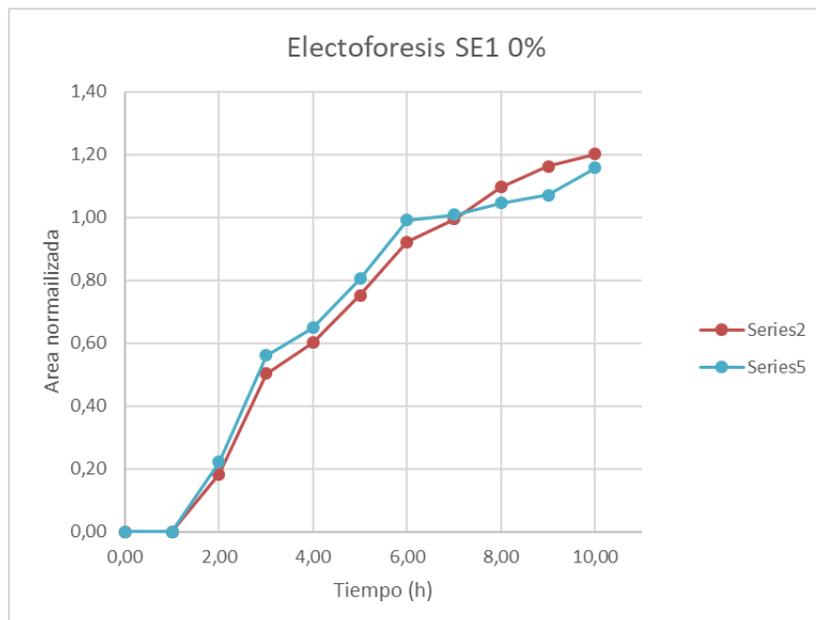


Figura 9.10 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 0% de oxígeno

9. Resultados

- **Bacteria SE1 25% de oxígeno:**

Tabla 9.7 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 25% de oxígeno

11/10/2018		18/12/2018	
Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada
0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	1,00	0,00
2,00	0,00	2,00	0,21
3,00	0,10	3,00	0,35
4,00	0,17	4,00	0,44
5,00	0,53	5,00	0,50
6,00	0,55	6,00	0,71
7,00	0,69	7,00	0,95
8,00	0,93	8,00	0,83
9,00	1,18	9,00	0,95
10,00	1,46	10,00	0,95

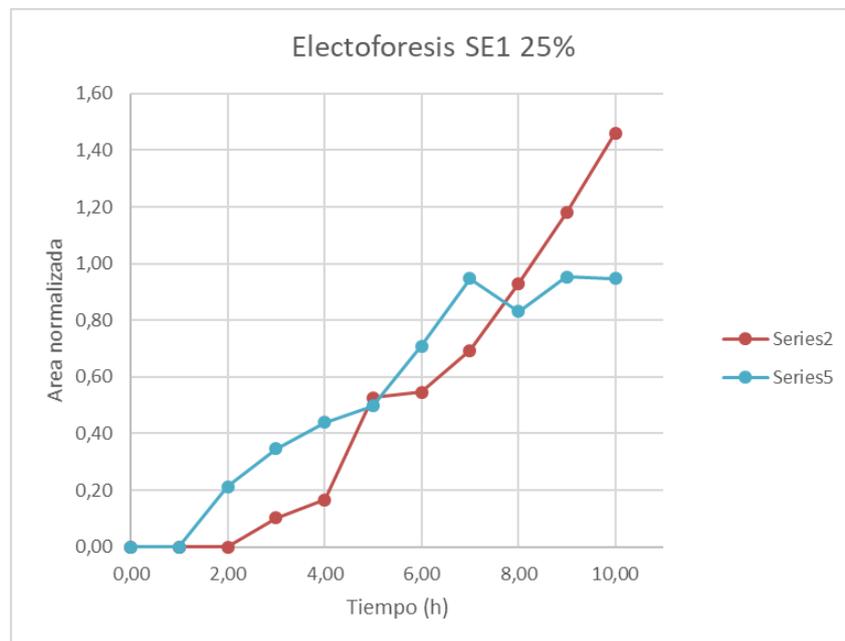


Figura 9.11 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 25% de oxígeno

- **Bacteria SE1 50% de oxígeno:**

Tabla 9.8 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 50% de oxígeno

09/10/2018		06/11/2018		13/11/2018	
Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
2,00	0,13	2,00	0,34	2,00	0,35
3,00	0,26	3,00	0,44	3,00	0,49
4,00	0,38	4,00	0,58	4,00	0,66
5,00	0,65	5,00	0,62	5,00	0,68
6,00	0,71	6,00	0,69	6,00	0,71
7,00	0,84	7,00	0,88	7,25	0,86
8,00	0,93	8,00	0,92	8,00	0,91
9,00	1,01	9,00	0,99	9,00	1,05
10,00	1,08	10,00	1,09	10,00	1,10

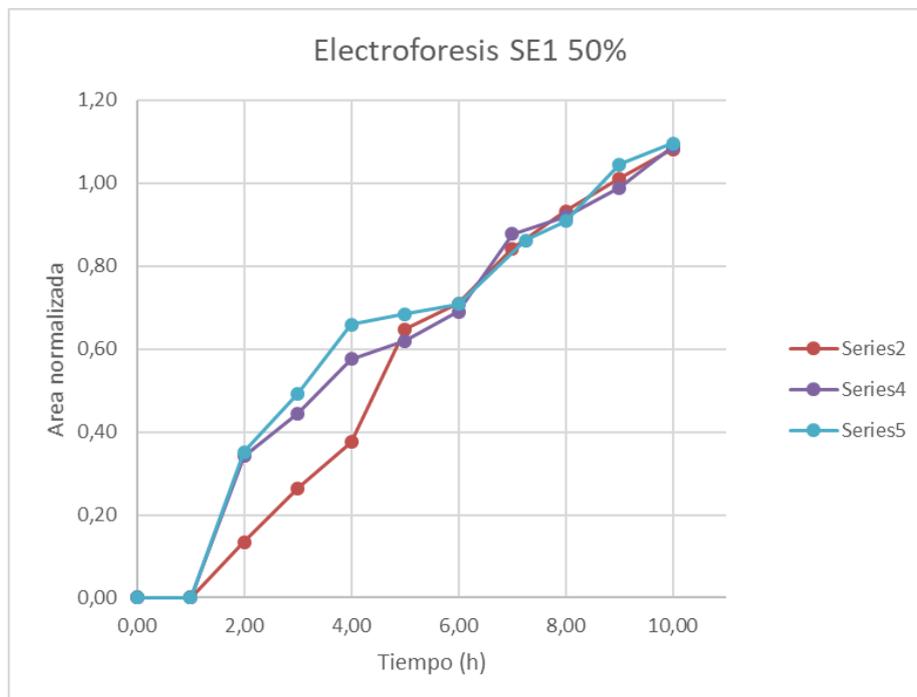


Figura 9.12 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa SE1 y 50% de oxígeno

9. Resultados

- **Bacteria BL21 0% de oxígeno:**

Tabla 9.9 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa BL21 y 0% de oxígeno

07/02/2019		19/02/2019	
Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada
0,00	0,18	0,00	0,00
1,00	0,36	1,00	0,00
2,00	0,50	2,00	0,00
3,00	0,72	3,00	0,07
4,00	0,94	4,00	0,55
5,00	0,98	5,00	0,65
6,00	1,18	6,00	0,74
7,00	1,22	7,00	0,77
8,00	1,21	8,00	0,92
9,00	1,20	9,00	1,14
10,00	1,17	10,00	1,17

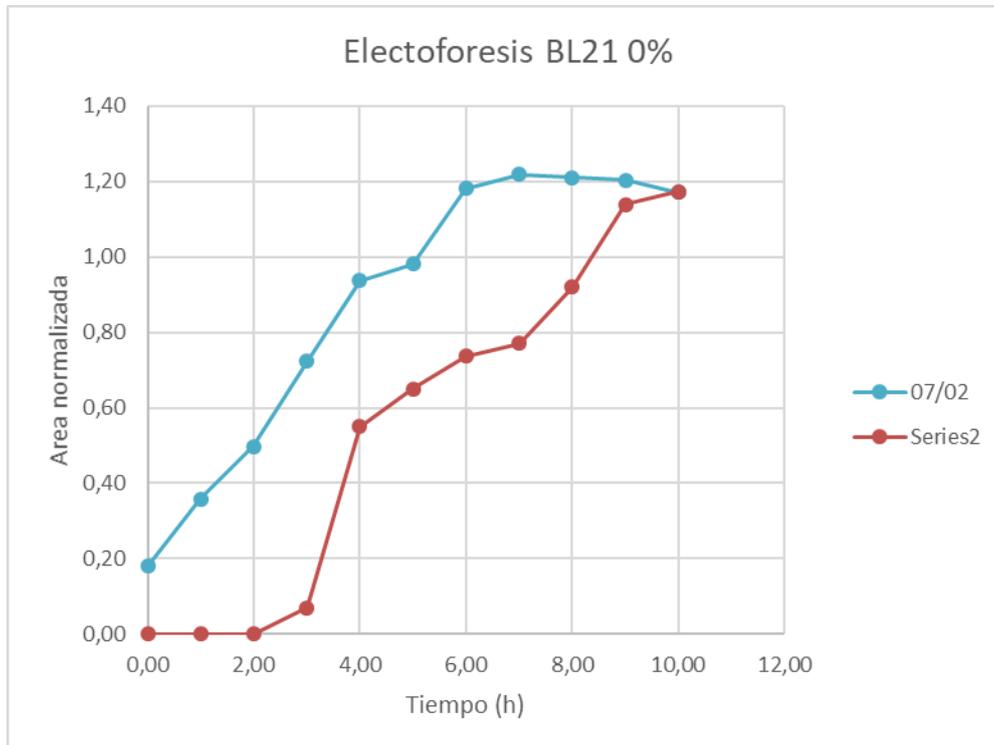


Figura 9.13 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa BL21 y 0% de oxígeno

- **Bacteria BL21 50% de oxígeno:**

Tabla 9.10 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa BL21 y 5 0% de oxígeno

12/02/2019		26/02/2019	
Tiempo [h]	Área Normalizada	Tiempo [h]	Área Normalizada
0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	1,00	0,10
2,00	0,15	2,00	0,16
3,00	0,32	3,25	0,35
4,00	0,58	4,00	0,42
5,00	0,70	4,75	0,58
6,00	0,69	6,00	0,60
7,00	0,87	7,00	0,83
8,00	1,04	8,00	0,96
9,00	1,13	9,00	1,13
10,00	1,14	10,00	1,17
11,00	1,16	11,00	1,24

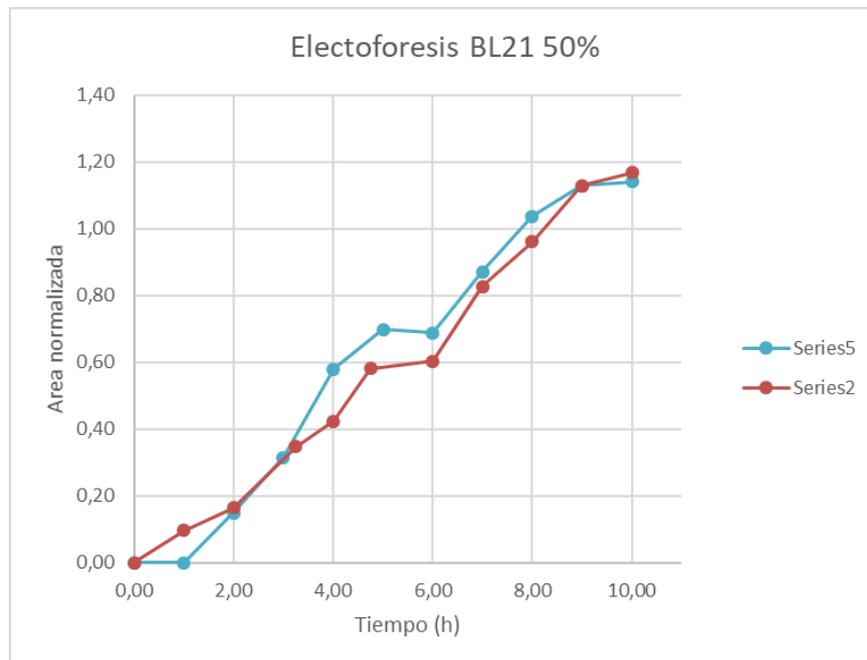


Figura 9.14 Resultados de las electroforesis de las experiencias con cepa BL21 y 50% de oxígeno

9. Resultados

- **Varianza de muestreo**

Para la cuantificación del polímero producido se utilizó como ya se ha dicho la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, que proporciona los valores de intensidad relativa para cada una de las suspensiones celulares. El procedimiento completo y detallado se encuentra descrito en el apartado 7.

La electroforesis en estas condiciones ha sido estudiada con anterioridad para calcular la varianza obteniéndose un valor de la varianza de 0,3 para unos datos de media 15,1 ³².

Por ello, y dado que la desviación típica es proporcional al valor medio se puede calcular la varianza y la desviación típica de medida de cada una de las condiciones. Tras ello se pueden calcular unos intervalos de confianza que en este caso nos proporcionan una seguridad de que al 99% de posibilidades el valor está en dicho intervalo.

Dicho intervalo de confianza corresponde al creado por los errores mostrados en la tabla 9.11.

Tabla 9.11 Errores calculados para cada una de las condiciones

Condiciones	Error
SE1 50%	0,028
SE1 25%	0,031
SE1 0%	0,040
BL21 50%	0,034
BL21 0%	0,042

- **Comparación de los resultados:**

Para la comparación de las distintas condiciones se realizó el cálculo de los puntos máximo y mínimo que podrían tener cada una de las medidas en base a los errores mostrados en la tabla 9.11 y la representación de estos se muestra en figura 9.15.

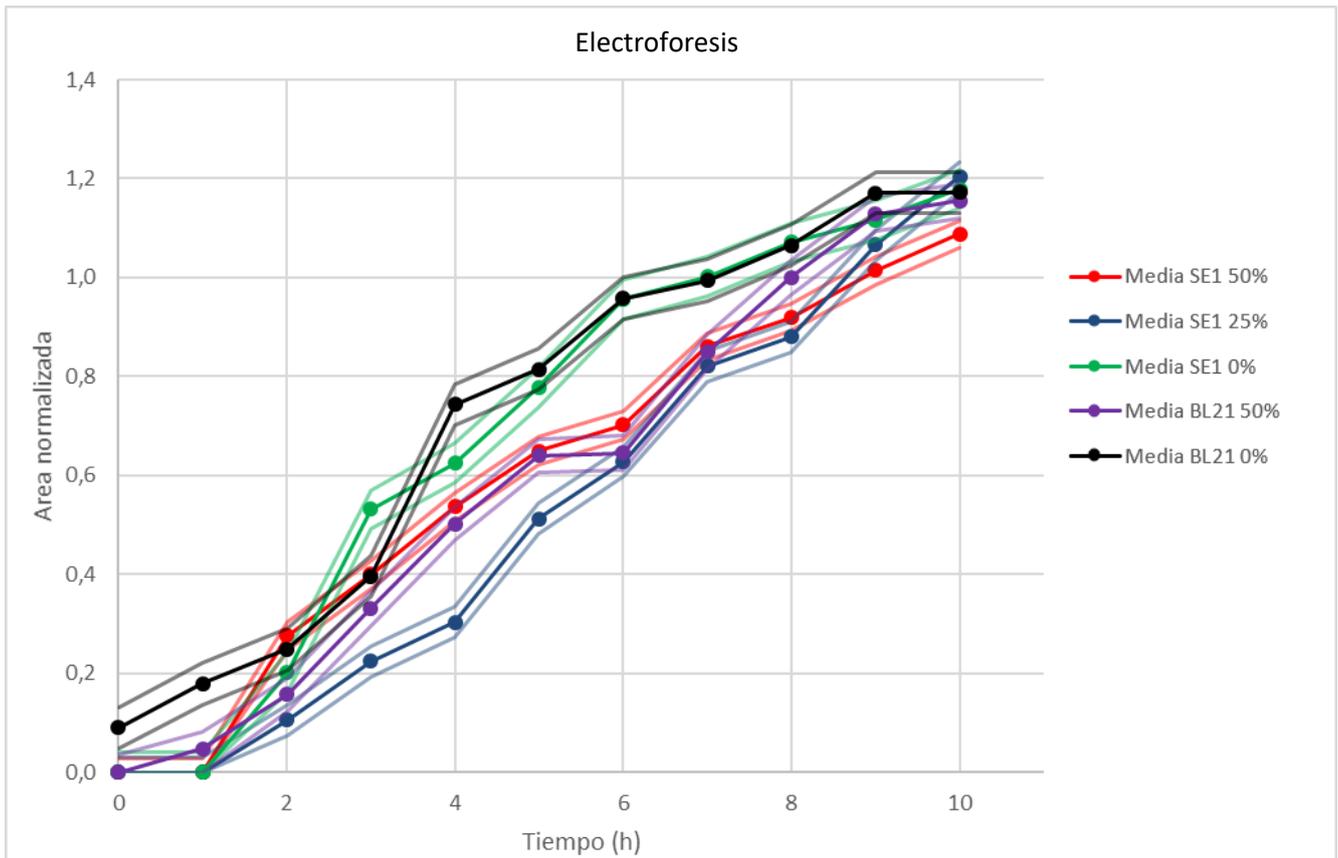


Figura 9. 15 Media de los resultados de las electroforesis para las distintas condiciones de fermentación con los intervalos de confianza representados.

- **Discusión de los resultados:**

Como se observa en la gráfica 9.11, la expresión normalizada de la biomasa es similar en todas las condiciones aun manteniéndose ligeramente por debajo en los casos en los que existió adición de oxígeno durante la etapa intermedia del proceso. Esto es un resultado acorde a lo esperado dado que una de las ventajas presentadas por la bacteria SE1 con respecto a la BL21 es su capacidad para mantener el plásmido que propicia la producción a lo largo del tiempo pese a su elevada tasa de crecimiento en condiciones de alta oxigenación.

9. Resultados

9.3 Rendimiento

El objetivo principal de este TFG es aumentar el rendimiento en la bioproducción de este biomaterial; por tanto, se ha purificado y liofilizado el biopolímero obtenido en cada ensayo, procediendo posteriormente a su pesada. Los valores obtenidos, en mg de biopolímero por litro de cultivo, se muestran en las tablas 9.13 y 9.14.

Tabla 9.6 Resultados de rendimiento obtenidos con la cepa SE1

SE1							
DO ₂	50%			25%		0%	
Ensayo	06/11/2018	13/11/2018	27/11/2018	11/10/2018	18/12/2018	08/11/2018	13/12/2018
Medio (ml)	293	315	320	270	310	320	315
Masa obtenida (mg)	269	250	275	137	145	85	92
Rendimiento (g/L)	0,853	0,873	0,859	0,507	0,468	0,266	0,292

Tabla 9.7 Resultados de rendimiento obtenidos con la cepa SE1

BL21				
DO ₂	50%		0%	
Ensayo	12/02/2019	26/02/2019	07/02/2019	19/02/2019
Medio (ml)	285	280	290	280
Masa obtenida (mg)	78,2	80,3	63,3	58,72
Rendimiento (g/L)	0,274	0,287	0,218	0,210

Por lo tanto, los rendimientos medio de producción son los mostrados en la tabla 9.15.

Tabla 9.8 Rendimiento de producción media para cada una de las condiciones estudiadas

Condiciones	Rendimiento (g/L)
SE1 0%	0,279
SE1 25%	0,488
SE1 50%	0,862
BL21 0%	0,214
BL21 50%	0,281

Comparando los demás datos con los de las condiciones empleadas anteriormente, BL21 con 0%, el aumento de producción en % es el mostrado en la tabla 9.16.

Tabla 9.9 Aumento de rendimiento en % comparando con BL21 al 0%

Condiciones	Aumento [%]
SE1 0%	130,4
SE1 25%	228,0
SE1 50%	402,8
BL21 50%	131,3

Para observar el efecto de la adición de oxígeno en cada una de las cepas se calculó el aumento de producción entre las condiciones de máxima oxigenación, 50%, y las condiciones sin adición de oxígeno obteniendo un aumento del 309% para la SE1 y del 131% para la BL21

Por último, comparando los datos para ambas cepas en las más elevadas condiciones de oxigenación vemos que la producción de la SE1 es un 306,8% mayor que la de la cepa BL21

- **Discusión de los resultados:**

Al igual que con el crecimiento celular, en el caso del rendimiento final se observa una producción muy superior en la nueva cepa para todo el espectro de oxigenación. Por otro lado, dentro de la propia cepa SE1 el rendimiento se ve mucho más afectado por la adición de oxígeno que en el caso de la cepa BL21. De esta forma, el rendimiento en las condiciones estudiadas más favorables aumenta en aproximadamente 4 veces con respecto a las condiciones utilizadas con anterioridad.

10 COSTE DE BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO

10.1 Introducción

En el presente estudio económico se procede a calcular los costes derivados de la obtención del biopolímero puro. Para ello se han tenido en cuenta las dos etapas implicadas en el proceso. La etapa de producción incluye la preparación de medios, de inóculo, limpieza del fermentador, toma de muestras y extracción y lavado de células. La etapa de purificación por su parte consiste en una disrupción, varios ciclos de calentamiento – enfriamiento, diálisis y por último una liofilización.

10.2 Coste de reactivos

El coste de reactivos supone todo aquello que se consume en el transcurso del proceso de producción y purificación de biopolímero, reactivos, medios de cultivo, soluciones, etc.

Este coste se puede separar en dos partes diferentes: la primera, los costes debidos al proceso de producción y la segunda, los costes debidos al ciclo de purificación. En la tabla 10.1 se encuentra la relación de costes debidos a los reactivos.

Los cálculos se han hecho en base a cultivos de 390mL, que es la cantidad añadida inicialmente a cada fermentador. Cabe destacar que pese a que en los ensayos la cantidad de medio extraída del fermentador fue menor esto es debido a que durante dichos ensayos se extrajeron muestras para su análisis cada hora.

Tabla 10.1 Coste de reactivos de la producción por cada litro de cultivo.

Proceso	Reactivo	Precio [€/g o €/ml]	Cantidad por litro de cultivo [g o ml]	Coste litro de cultivo [€/L]	Coste anual [€]
Preparación de placa	LB	0,0347	0,534	0,02	1,20
	Agar	0,3071	0,321	0,10	6,34
	Ampicilina	2,4	0,021	0,05	3,31
	Glucosa	0,023	1,068	0,02	1,58
	MQ	0,0008	21,368	0,02	1,10
Electroforesis	Tris 0,5	0,013616667	0,534	0,01	0,47
	Tris 1,5	0,04085	1,607	0,07	4,23
	Acrilamida	0,102	1,816	0,19	11,94
	APS	1,53	0,048	0,07	4,74
	TEMED	2,24	0,005	0,01	0,75
	n-Butanol	0,03034	0,064	0,00	0,13
	SDS	0,1062	1,068	0,11	7,31
	MQ	0,0008	11,295	0,01	0,58

10. Coste de bioproducción del biopolímero

Proceso	Reactivo	Precio [€/g o €/ml]	Cantidad por litro de cultivo [g o ml]	Coste litro de cultivo [€/L]	Coste anual [€]
Preparación de inóculo	LB	0,0347	3,667	0,13	8,20
	TB	0,0646	5,728	0,37	23,84
	Ampicilina	2,4	0,167	0,40	25,79
	Glucosa	0,023	8,333	0,19	12,36
	MQ	0,0008	269,231	0,22	13,89
Preparación de fermentador	TB	0,0646	50,256	3,24	209,18
	Glicerol	0,11079	6,731	0,75	48,08
	Ampicilina	2,4	0,487	1,17	75,38
	Antifoam	1,766	0,060	0,11	6,80
	Oxígeno	59,05	0,256	15,14	976,14
	MQ	0,0008	871,795	0,70	44,96
Lavado	Tampón de lavado	0,0016	4615,385	7,38	476,09
	Tampón de sonicación	0,0010	1025,641	1,03	66,12
	Inhibidor de proteasas	42,02	0,051	2,15	138,92
Purificación	NaCl	0,031324	419,569	13,14	847,30
	Tampón de sonicación	0,1573	6,748	1,06	68,44
	MQ	0,0008	40512,821	32,41	2089,49
TOTAL [€]				80,26	5174,68

De los datos de la tabla 10.1, se obtiene el coste de reactivos para la realización de un litro de cultivo, es de 80,26€.

10.3 Costes de amortización

Por otra parte, para todos los equipos se considera un periodo de amortización de diez años, excepto para los equipos informáticos para los cuales, se consideran cinco años, con cuota lineal. Los equipos utilizados se pueden ver en tabla 10.2.

10. Coste de bioproducción del biopolímero

Tabla 10.2 Presupuesto de equipos utilizados.

Equipos	Precio (€)	Vida útil (años)	Coste anual (€)
Campana	5650	10	565,00
Bunsen	87,75	10	8,78
Frigorífico	1441,3	10	144,13
Ultracongelador	9541	10	954,10
Congelador	805	10	80,50
Máquina de hielo	721,25	10	72,13
Agitador orbital	1230	10	123,00
Centrífuga	34.615	10	3461,50
Centrífuga de mesa refrigerada	4390,47	10	439,05
Disruptor	20000	10	2000,00
Liofilizador	8215,9	10	821,59
Estufa	1850	10	185,00
Fermentador	20000	10	2000,00
Incubador Calor	791,99	10	79,20
Incubador Agitacion	399,41	10	39,94
Autoclave	10739,44	10	1073,94
Purificador de agua de tipo I	12765	10	1276,50
Purificador de agua destilada	2447,17	10	244,72
Medidor de pH	416	10	41,60
Agitador magnético con calentamiento	273	10	27,30
Fuente electroforesis	458,29	10	45,83
Equipo soporte electroforesis	702	10	70,20
Equipo fotografico	4975	5	995,00
Soporte UV	480	5	96,00
Espectrofotómetro	3100	10	310,00
Balanza	835	10	83,50
Vortex	420	10	42,00
Agitador basculante	1505	10	150,50
Ordenador	600	5	120,00
TOTAL	149454,97		15551,00

10. Coste de bioproducción del biopolímero

El coste total del equipamiento utilizado asciende a 149.454,97 euros de los cuales 6.055 corresponden a equipamiento informático. Considerando las amortizaciones señaladas y una producción anual de 74.8 litros de cultivo, asumiendo cuatro fermentadores por semana y 48 semanas de operación al año.

Es reseñable el hecho de que los costes asociados a equipos, trabajando en unas cantidades tan pequeñas será previsiblemente menor, dado que los equipos con los que se trabajó estaban muy sobredimensionados para los volúmenes de trabajo.

Teniendo en cuenta esto último, se puede suponer que los costes de amortización reales para el proceso en este caso son despreciables debido a que el proceso se encuentra integrado en unas instalaciones en las que los equipos son utilizados mayoritariamente para otros fines.

10.4 Coste de material

Para un estudio de los costes se procede a la división del grupo material en material de vidrio, material desechable y otros materiales. Para el material de vidrio y el resto de los materiales de uso común se estima un periodo de uso de un año.

Los costes estimados para estos materiales fueron calculados por año, es decir, para los 74.8 litros de cultivo. El coste estimado anual es de:

- 141.87€ en material de vidrio
- 2813.62€ en material desechable
- 265,86 € en el resto del material.

En las tablas 10.3, 10.4 y 10.5 se detallan los precios del material utilizado, clasificados en vidrio, desechables y de múltiples usos.

Tabla 10.3 Relación del material de vidrio utilizado, y sus costes asociados.

Material de Vidrio	Coste unitario (€)	Unidades	vida útil (años)	Coste total (€/año)
Vaso de precipitados (250ml)	4,976	5	1	24,88
Botellas de cristal (1 litro)	12,06	4	1	48,24
Erlenmeyer (250 ml)	9,375	2	1	18,75
Cristales electroforesis	25	2	1	50
TOTAL				141,87

10. Coste de bioproducción del biopolímero

Tabla 10.4 Relación del material de desechable utilizado, y sus costes asociados.

Material desechable	Precio unitario (€/u)	Unidades (u/ferm)	Coste total (€/ferm)	Coste total (€/año)
Placa Petri	0,19	0,33	0,06	12,41
Eppendorf (1,5 ml)	0,03	35,00	1,01	194,07
Palillos	0,00	3,33	0,00	0,03
Papel albal	0,46	0,00	0,00	0,30
Parafilm	0,80	0,10	0,08	15,42
Cinta carrocera	0,05	0,50	0,03	4,91
Guantes	0,13	6,00	0,76	145,44
Tripas de diálisis	9,05	0,50	4,52	868,72
Pipetas pasteur	0,09	3,00	0,26	49,08
Puntas de pipetas	0,10	60,00	6,25	1200,00
Jeringuillas plástico	0,19	1,00	0,19	36,86
Falcon	0,34	5,00	1,68	323,23
TOTAL			14,65	2813,62

Tabla 10.5 Relación del material de varios usos utilizado, y sus costes asociados.

Material de varios usos	Coste unitario (€)	Amortización (años)	Coste total (€/año)
Asa platino	13,29	1,00	13,29
Gradillas	12,40	1,00	12,40
Marcadores	1,59	0,33	4,82
Espátulas	3,66	1,00	3,66
Imanes	4,25	0,50	8,49
Micropipetas	666,00	3,00	222,00
Tupper	0,60	0,50	1,20
TOTAL			265,86

10. Coste de bioproducción del biopolímero

10.5 Costes totales

En la tabla 10.6 se resumen los costes anuales del proceso teniendo en cuenta los costes de amortización.

Tabla 10.6 Resumen de los costes anuales finales

Coste total con O ₂ y la cepa SE1	
Reactivos	5174.68
Equipos	15551,00
Material	3208,21
TOTAL	23933.88

Tras el cálculo de los costes totales, estimando una producción en las condiciones óptimas, 50 %dO₂ y la cepa SE1, de 0,862 g/L, con 74,8L de cultivo anual la producción total será de 64,47 g/año. Esto dará un coste de producción de 371,20€/gramo. Por otra parte, en caso de optar por las alternativas sin oxígeno del coste anual calculado anteriormente habría que eliminar 976,14€ de gasto de oxígeno, con lo que el gasto anual sería de 22.957,74€. Por ello, para la cepa usada anteriormente, la BL21, con una producción media de 0,214g/L el coste por gramo resulta de 1.434,21g/L.

Por último, si se utilizase la nueva cepa, la SE1, pero sin oxígeno el rendimiento sería de 0,279g/L, por lo que el coste sería de 1100,08€/L.

Si tuviéramos en cuenta los costes directos únicamente, es decir sólo costes de material y reactivos los costes totales serán de 8382,89€/año para los casos con adición de O₂ y SE1, lo que supondrá un coste del polímero de 130,01€/g.

Para los casos sin adición de O₂ habrá que restar igualmente 976,14€ del Oxígeno, por tanto, el gasto anual será de 7406,74. Esto supondrá un coste final de 462,71€/g para la producción con la cepa BL21 y 354,91€/g para la producción sin Oxígeno con la cepa SE1.

Esto significa que el coste se reduce en un 71,9% si pasamos de producir en las condiciones anteriores a producir con la nueva cepa y una densidad de oxígeno del 50%.

11 CONCLUSIONES

En conclusión, en lo que a biomasa obtenida se refiere los resultados muestran que la adición de oxígeno es favorecedora para el aumento de la población bacteriana con el tiempo, sin embargo, la nueva cepa SE1 muestra bajo todas las condiciones un crecimiento muy superior. De esta manera, el valor de absorbancia mayor de todos los alcanzados es de 38,9 para la cepa SE1 con 50% dO_2 mientras que, para las condiciones utilizadas con anterioridad, BL21 sin oxígeno, esta cifra alcanzaba valores de en torno a 5.6. Esto significa por tanto un aumento del 694% en la población bacteriana entre las condiciones iniciales y las nuevas condiciones óptimas. En lo que a comparación de cepas se refiere en las mismas condiciones, la diferencia con el 50% de oxígeno es de los 38,9 puntos de absorbancia alcanzados por la cepa SE1 a los 20 puntos alcanzados por la cepa BL21 en las mismas condiciones. Esto supone un aumento del 194,5%

A nivel de expresión celular, los resultados de las electroforesis demuestran que, para condiciones iguales, la expresión entre las cepas se mantiene constante. Por otro lado, al comparar los casos sin y con oxígeno se observa una ligera diferencia en etapas intermedias de la fermentación por la cual en los casos con oxígeno la expresión de las bacterias es menor que para los casos sin adición de oxígeno. Sin embargo, la expresión se iguala en los tramos finales del proceso fermentativo para todos los casos. Este resultado es el esperado, pues la estabilidad plasmídica, y con ello de expresión, es una de las características más relevantes de la nueva cepa SE1.

En cuanto al rendimiento el aumento es significativo ante el cambio de condiciones. En las condiciones óptimas estudiadas, SE1 con 50% dO_2 , se obtuvieron 862mg por cada litro de cultivo extraído del fermentador. Esto supone un aumento del 402,8% con respecto a los 214mg/L obtenidos con las condiciones anteriores de operación, BL21 sin oxígeno. También se observa que el rendimiento de producción al añadir oxígeno a la cepa BL21 aumenta de una forma mínima, siendo solo un 131% del rendimiento inicial. Por el contrario, al añadir oxígeno a la cepa SE1 si se observa un aumento del 309% en el rendimiento de producción al comparar las condiciones con un 50% de oxígeno añadido con las condiciones sin oxígeno.

En términos económicos, este estudio supone la posibilidad de aumentar la producción a un coste mínimo, siendo el oxígeno el único gasto adicional. De esta forma, el coste de producción del polímero se reduciría de 462,71€/g a 130,01€/g con las nuevas condiciones, o lo que es lo mismo, supone una reducción de costes del 71,9%.

Como conclusiones generales se podría por tanto afirmar que la nueva cepa SE1, en términos productivos presenta únicamente ventajas. Al producir significativamente más en las mismas condiciones, y presentando un elevado aumento productivo en presencia de oxígeno los costes de producción se reducen drásticamente haciendo con ello mucho más rentable la potencial producción y venta del polímero.

12 BIBLIOGRAFIA

1. Peppas, N. A. & Langer, R. New challenges in biomaterials. *Science* (80-). **263**, 1715 LP – 1720 (1994).
2. Guidoin, R. *et al.* Dacron as Arterial Prosthetic Material: Nature, Properties, Brands, Fate and Perspectives. *Biomater. Med. Devices. Artif. Organs* **5**, 177–203 (1977).
3. Haynes, D. R., Crotti, T. N. & Zreiqat, H. Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. *Biomaterials* **25**, 4877–4885 (2004).
4. Costerton, J. W., Montanaro, L. & Arciola, C. R. Biofilm in Implant Infections: Its Production and Regulation. *Int. J. Artif. Organs* **28**, 1062–1068 (2005).
5. Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **428**, 487–492 (2004).
6. Payne, G. F. Biopolymer-based materials: the nanoscale components and their hierarchical assembly. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 214–219 (2007).
7. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385–4415 (2003).
8. Girotti, A. Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina. PhD. Thesis. (Universidad de Valladolid, 2008).
9. Kikuchi, A. & Okano, T. Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J. Control. Release* **101**, 69–84 (2005).
10. Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K.-Y., Schulten, K. & Baneyx, F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat. Mater.* **2**, 577–585 (2003).
11. Jones, R. A. L. Tough and smart. *Nat. Mater.* **3**, 209–210 (2004).
12. Peppas, N. A., Zach Hilt, J., Khademhosseini, A. & Langer, R. *Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. Advanced Materials - ADVAN MATER* **18**, (2006).
13. Parry, D. A. D. & Squire, J. M. B. T.-A. in P. C. Fibrous Proteins: New Structural and Functional Aspects Revealed. in *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* **70**, 1–10 (Academic Press, 2005).
14. González, M. & Rodríguez-Cabello, J. C. Polímeros obtenidos mediante tecnología recombinante: Recombinámicos de tipo elastina. *Rev. plásticos Mod. Cienc. y*

12. Bibliografía

- Tecnol. polímeros* **115**, (2018).
15. Fernández-Colino, A., Arias, F. J., Alonso, M. & Rodríguez-Cabello, J. C. Self-Organized ECM-Mimetic Model Based on an Amphiphilic Multiblock Silk-Elastin-Like Corecombinamer with a Concomitant Dual Physical Gelation Process. *Biomacromolecules* **15**, 3781–3793 (2014).
 16. Rodríguez-Cabello, J. C. et al. Elastin-Like Polymers: Properties, Synthesis, and Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* 1–36 (2017). doi:doi:10.1002/0471440264.pst656
 17. Urry, D. W., Starcher, B. & Partridge, S. M. *Coacervation of Solubilized Elastin Effects a Notable Conformational Change.* (1969).
 18. Rodríguez-Cabello, J. C., Alonso, M., Pérez, T. & Herguedas, M. M. Differential scanning calorimetry study of the hydrophobic hydration of the elastin-based polypentapeptide, poly(VPGVG), from deficiency to excess of water. *Biopolymers* **54**, 282–288 (2000).
 19. Rodríguez Cabello, J. C., De Torre, I. G., Cipriani, F. & Poczka, L. Elastin-like materials for tissue regeneration and repair. in (eds. Barbosa, M. A. & Martins, M. C. L. B. T.-P. and P. as B. for T. R. and R.) 309–327 (Woodhead Publishing, 2018). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00012-7
 20. Wise, D. L. et al. *Biomaterials Handbook—Advanced Applications of Basic Sciences and Bioengineering.* (2003).
 21. Lim, D. W., Nettles, D. L., Setton, L. A. & Chilkoti, A. In situ cross-linking of elastin-like polypeptide block copolymers for tissue repair. *Biomacromolecules* **9**, 222–230 (2008).
 22. Takahashi, Y., Gehoh, M. & Yuzuriha, K. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*). *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 127–138 (1999).
 23. Altman, G. H. et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, 401–416 (2003).
 24. Haider, M. et al. Molecular Engineering of Silk-Elastinlike Polymers for Matrix-Mediated Gene Delivery: Biosynthesis and Characterization. *Mol. Pharm.* **2**, 139–150 (2005).
 25. Nagarsekar, A. et al. Genetic Engineering of Stimuli-Sensitive Silkelestin-like Protein Block Copolymers. *Biomacromolecules* **4**, 602–607 (2003).
 26. Yang, Y. J., Holmberg, A. L. & Olsen, B. D. Artificially Engineered Protein Polymers.

- Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **8**, 549–575 (2017).
27. Altunbas, A. & Pochan, D. J. Peptide-Based and Polypeptide-Based Hydrogels for Drug Delivery and Tissue Engineering BT - Peptide-Based Materials. in (ed. Deming, T.) 135–167 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/128_2011_206
 28. Megeed, Z., Cappello, J. & Ghandehari, H. Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1075–1091 (2002).
 29. Peñuelas-Urquides, K. *et al.* Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 287–289 (2013).
 30. Perilla, M. *et al.* *Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World.* (2003).
 31. Moisés, S. & C, M. M. Quantitative approaches to the study of bistability in the lac operon of Escherichia coli. *J. R. Soc. Interface* **5**, S29–S39 (2008).
 32. Bahillo Guitiérrez, S. & García Lera, R. Diseño de experimento para la optimización de Variables de Control de un proceso Biotecnológico de Obtención de Polímeros Proteicos con potenciales Aplicaciones Médicas. Trabajo de fin de estudios. (Universidad de Valladolid, 2008).

I. ANEXO I ELECTROFORESIS

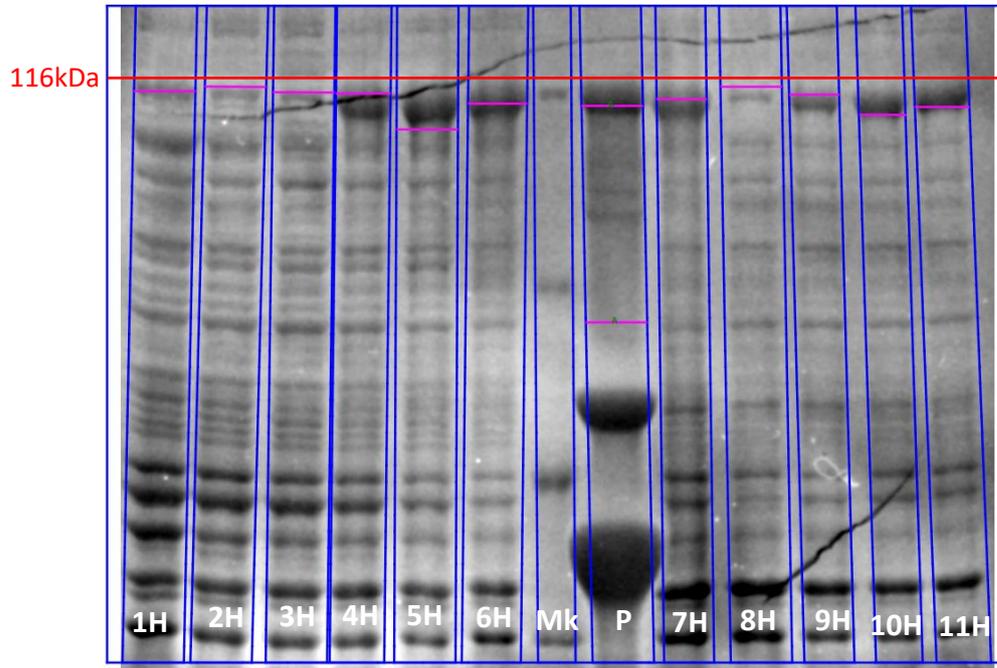


Figura I.1 Electroforesis del 9 de octubre de 2018

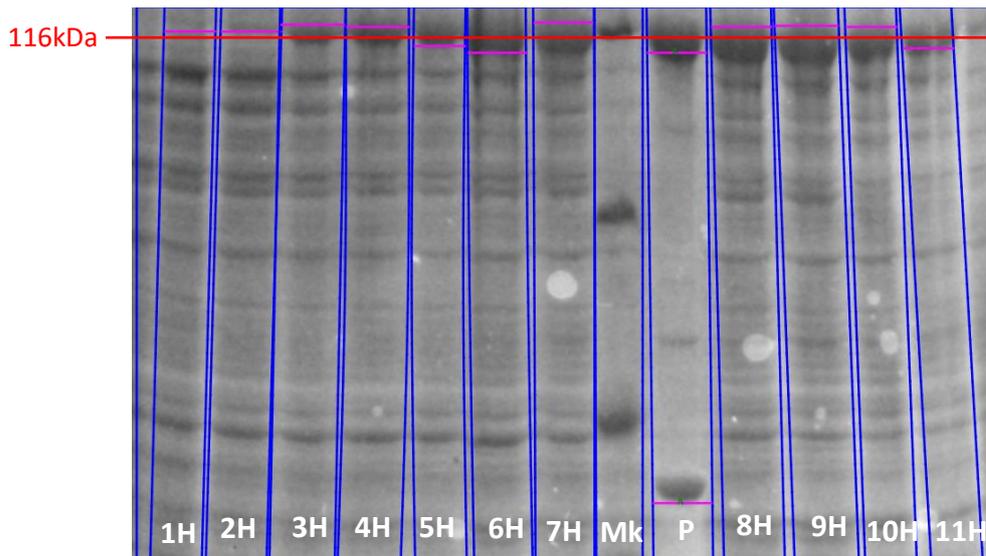


Figura I.2 Electroforesis del 6 de noviembre de 2018

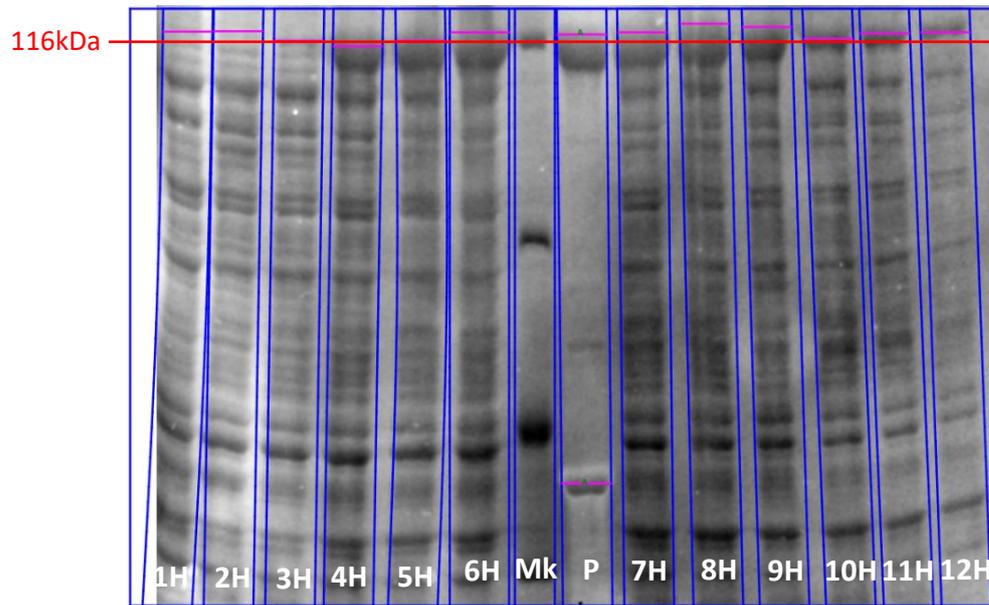


Figura I.3 Electroforesis del 13 de noviembre de 2018

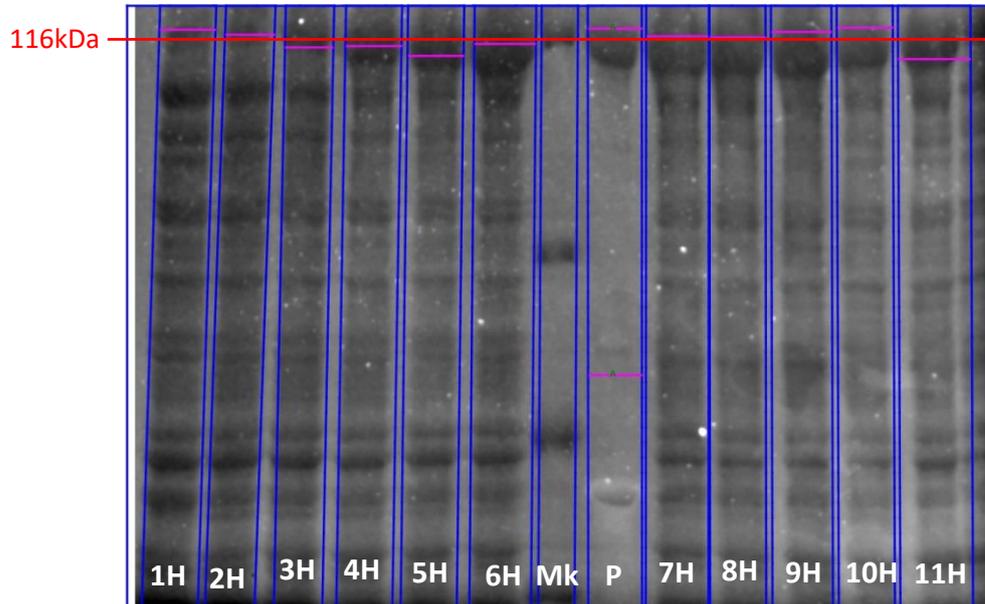


Figura I.4 Electroforesis del 11 de octubre de 2018

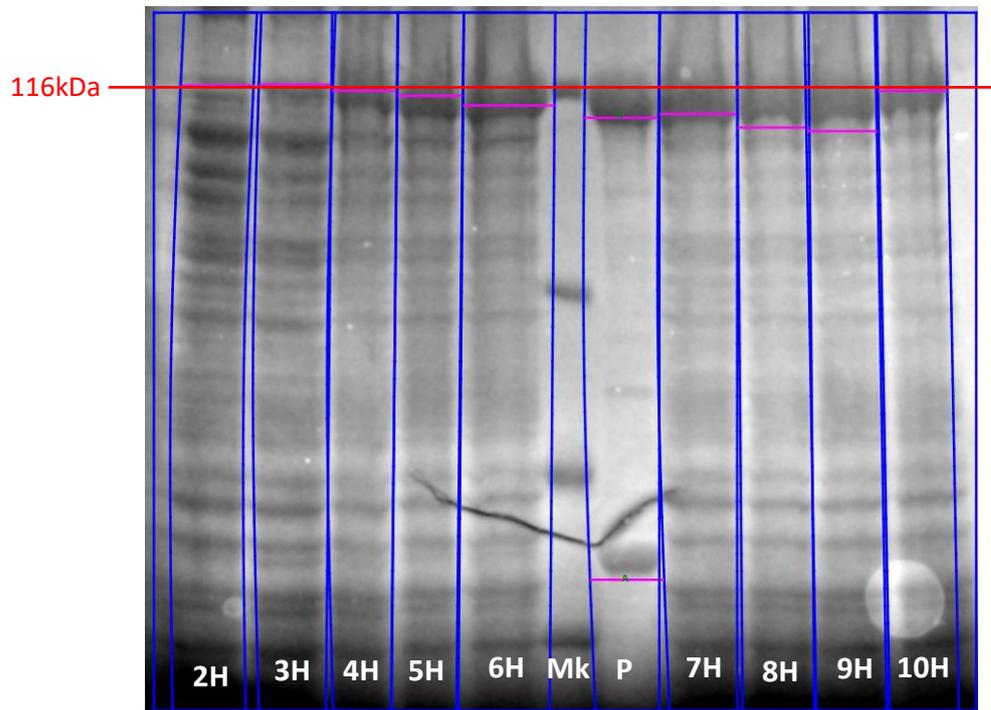


Figura I.5 Electroforesis del 18 de diciembre de 2018

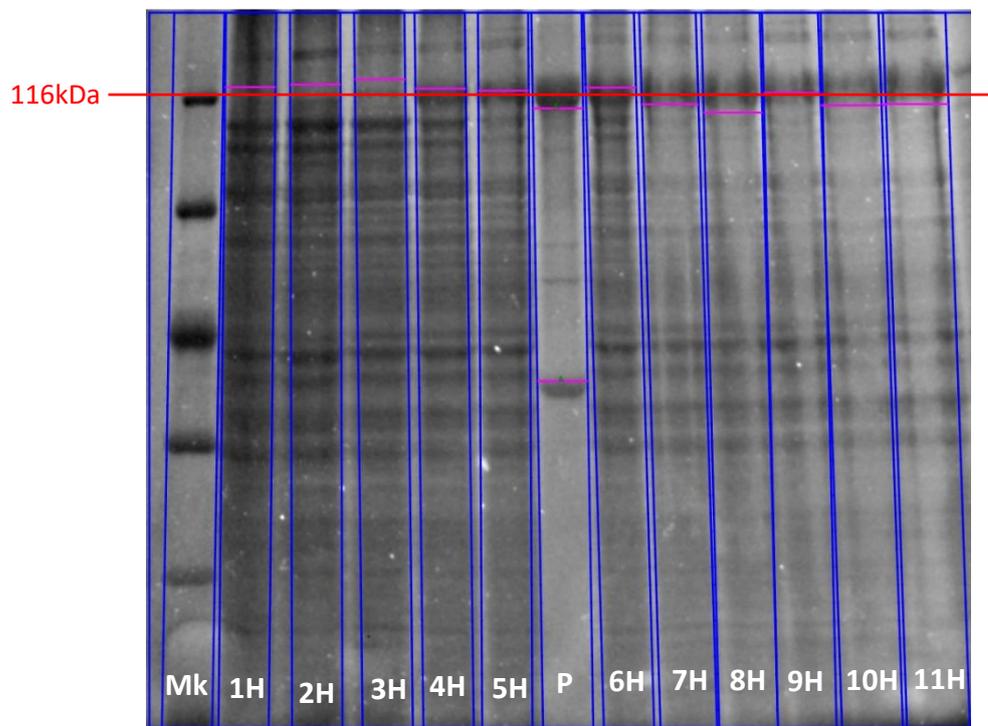


Figura I.6 Electroforesis del 7 de febrero de 2019

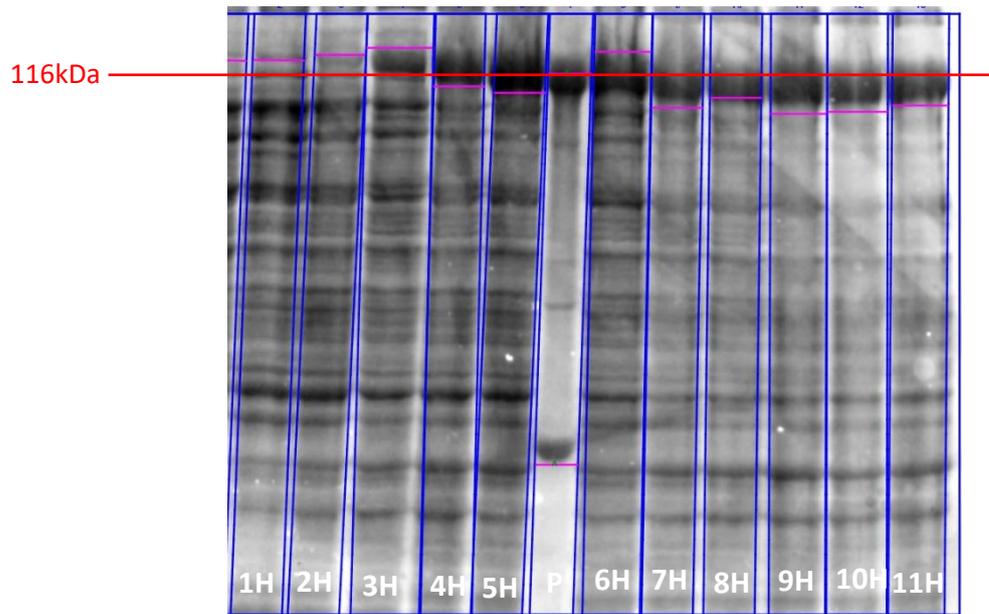


Figura I.7 Electroforesis del 12 de febrero de 2019

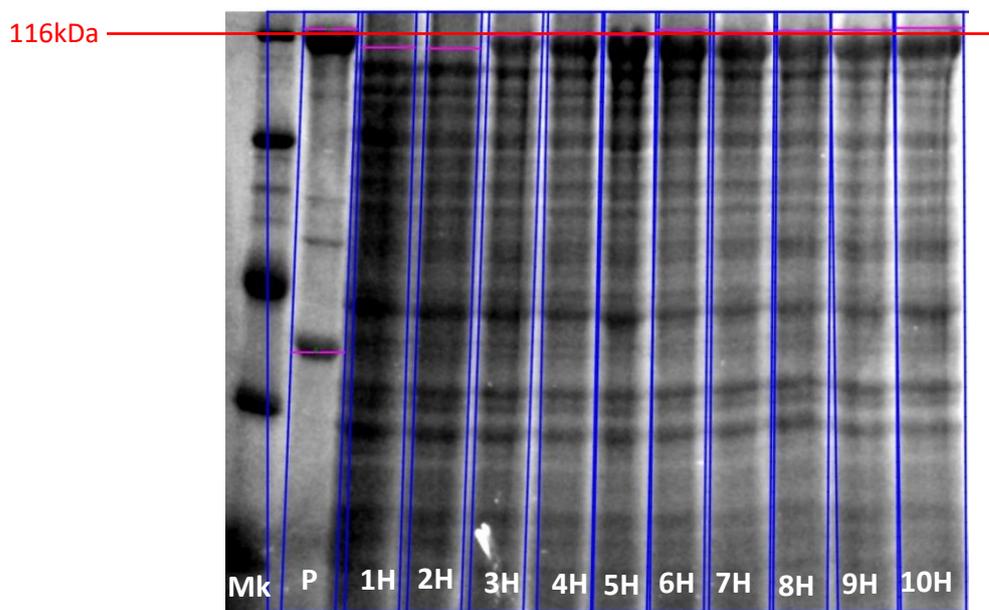


Figura I.8 Electroforesis del 19 de febrero de 2019

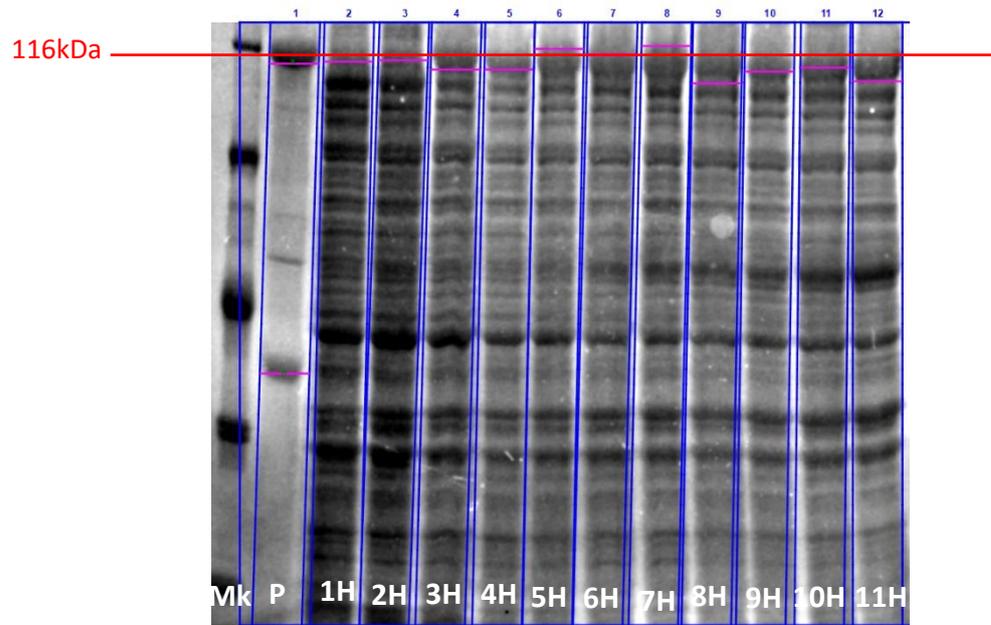


Figura I.9 Electroforesis del 26 de febrero de 2019