



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *PICHIA PASTORIS* PARA LA  
PRODUCCIÓN DE CUTINASAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MONTSERRAT TAGLE GIL**

**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2020**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Amelia María de Guadalupe Farrés González-Sarabia

**VOCAL:** Profesor: Beatriz Ruiz Villafán

**SECRETARIO:** Profesor: Carmina Montiel Pacheco

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Genaro Jiménez Reyes

**2° SUPLENTE:** Profesor: Javier Axosco Marin

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 311-312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Circuito de la Investigación Científica s/n Ciudad Universitaria.

Esta tesis se realizó con apoyo económico del proyecto PAPIIT IT 203118 y de PAIP 5000-9095

### **ASESOR DEL TEMA**

**Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Sarabia**

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

**M. en C. José Augusto Castro Rodríguez**

### **SUSTENTANTE**

**Montserrat Tagle Gil**

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA PAPIIT IT203118, del cual fui becaria, y PAIP 5000-9095, Facultad de Química.

Índice.....	5
Índice de figuras y tablas.....	7
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Introducción.....	13
Planteamiento del problema.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
1. Marco teórico .....	16
1.1 La cutícula y la cutina	
1.1.1 Estructura de la cutina	
1.2 Cutinasas	
1.2.1 Reacciones realizadas por las cutinasas	
1.2.2 Microorganismos productores de cutinasas y propiedades de estas	
1.2.3 Aplicaciones de las cutinasas	
1.3 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de producción de enzimas heterólogas	
1.3.1 Condiciones para la producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	
1.4 Metabolismo del metanol	
1.4.1 Tipos de fenotipos de metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i>	
2. Antecedentes del grupo de trabajo.....	31
3. Metodología.....	35
3.1 Propagación de cepa <i>P. pastoris</i> KM71H ANCUT 1 y <i>P. pastoris</i> KMH71H ANCUT 3 CP	
3.2 Reactivación de <i>Pichia pastoris</i>	

<b>3.3 Crecimiento de microorganismo en medio BMGY</b>	
<b>3.4 Expresión de enzimas recombinantes (ANCUT 1 y ANCUT 3)</b>	
<b>3.5 Cuantificación de proteína total soluble en microplaca</b>	
<b>3.6 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca</b>	
<b>3.7 Determinación de actividad enzimática y perfil de proteínas en geles de poliacrilamida</b>	
<b>3.7.1 Electroforesis</b>	
<b>3.7.2 Zimograma</b>	
<b>3.7.3 Preparación de soluciones A y B</b>	
<b>3.7.4 Perfil de proteína</b>	
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Cepas KM71H ANCUT 1 CP</b>	
<b>4.2 Cepas KM71H ANCUT 3 CP</b>	
<b>4.3 Perfiles de proteínas e identificación de enzimas con actividad cutinasa</b>	
<b>4.4 Comparación entre las distintas cepas de <i>Pichia pastoris</i> productoras de las cutinasas recombinantes ANCUT 1 y ANCUT 3</b>	
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Perspectivas.....</b>	<b>78</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>88</b>

Anexo I. Confección de banco celular de trabajo

Anexo II. Preparación de soluciones A y B

Anexo III. Curva de calibración de albumina sérica bovina empleada para la determinación de proteína total soluble por de método de Bradford

Anexo IV. Cálculo de actividad específica y productividad

Anexo V. Análisis estadístico empleado

Anexo VI. Composición y preparación de medios empleados

Anexo VII. Análisis de las secuencias de los genes que codifican para las cutinasas recombinantes AN CUT 1 y AN CUT 3 por medio de los servidores ExPASy, NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0 Server.

## Índice de figuras y tablas

Figura 1. Ubicación de la cutícula con respecto a las células epidérmicas y sección transversal de la misma que muestra la posición de los principales polímeros que la conforman.

Figura 2. Estructuras de Fsp cutinasa (A) y la cutinasa de *Thermobifida fusca* (B).

Figura 3. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de una cutinasa.

Figura 4. Reacciones catalizadas por las cutinasas.

Figura 5. Consideraciones generales para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*.

Figura 6. Ruta del metanol en *P. pastoris*. 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, formiato deshidrogenasa, 5, dihidroxiacetona sintasa 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bifosfato aldolasa 8, fructosa 1,6-bifosfatasa.

Figura 7. a) Plásmido pPICZ $\alpha$ -A-*ancut* 1. Esquema del plásmido pPICZ $\alpha$ -A-*ancut* 1. B) Plásmido pPICZ $\alpha$ -A-*ancut* 3. Esquema del plásmido pPICZ $\alpha$ -A-*ancut* 3.

Figura 8. Alineamiento entre la secuencia de ANCUT 1 optimizada en el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* contra la secuencia silvestre.

Figura 9. Alineamiento entre la secuencia de ANCUT 3 optimizada en el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* contra la secuencia silvestre.

Figura 10. Diagrama de plan de trabajo realizado; metodología modificada de Invitrogen

Figura 11. Cepa KM71H ANCUT 1 CP crecida en medio YPDA.

Figura 12. Observación al microscopio de la tinción Gram de una colonia seleccionada de la cepa KM71H ANCUT 1 CP, con un aumento de 100x.

Figura 13. Cepa KM71H ANCUT 3 CP crecida en medio YPDA.

Figura 14. Observación al microscopio de la tinción Gram de colonia seleccionada (cepa KM71H ANCUT 3 CP) con un aumento de 100x.

Figura 15. Perfil de proteínas y zimograma de las cutinasas provenientes de las cepas KM71H ANCUT 1 Y KM71H ANCUT 3 CP.

Figura 16. Perfil de proteínas de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP y zimograma de las cutinasas provenientes de las cepas KM71H ANCUT 1, KM71H ANCUT 3, X33 ANCUT 1 y X33 ANCUT 3 (todas CP).

Tabla 1. Estructuras de los principales monómeros de cutina.  $X = 5, 6, 7, 8$ ;  $y = 5, 6, 7, 8$ ,  $x + y = 13$ .

Tabla 2. Cutinasas conocidas aisladas de su organismo WT (tipo salvaje) o expresadas en un hospedero heterólogo.

Tabla 3. Principales aplicaciones de las cutinasas.

Tabla 4. Cepas de *P. pastoris* utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas.

Tabla 5. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 Y KM71H ANCUT 3 CP, respecto a la cantidad de inductor.



Tabla 6. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 Y KM71H ANCUT 3 CP respecto a la cantidad de inóculo empleada para la inducción, considerando la cantidad de inductor idónea para cada cepa.

Tabla 7. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y X33 ANCUT 1, respecto a la cantidad de inductor.

Tabla 8. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 3 CP y X33 ANCUT 3, respecto a la cantidad de inductor.

Tabla 9. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 y KM71H ANCUT 3 CP respecto a las cepas X33 ANCUT 1 y X33 ANCUT 3 CP.

### Abreviaturas

ANCUT 1	Cutinasa recombinante 1 proveniente de <i>Aspergillus nidulans</i>
ANCUT 3	Cutinasa recombinante 3 proveniente de <i>Aspergillus nidulans</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AOX	Promotor de la enzima alcohol oxidasa
BHET	bis 2-hidroxiétil tereftalato
BMGY	Amortiguadored Glycerol-complex Medium
BMMY	Amortiguadored Methanol-complex Medium
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Codones preferenciales
Cys	Cisteína
D.O	Densidad óptica
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Gly	Glicina
h	Hora
His	Histidina
kDa	kiloDalton
KLa	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h <sup>-1</sup> )
L	Litros
mA	Miliamperio
Man	Manosa
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (por sus siglas en ingles)
Qp	Productividad volumétrica (U/L h)

PET	Tereftalato de polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
pNFA	p-Nitrofenil acetato
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
Thr	Treonina
TPA	Ácido tereftálico
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U	Unidad de actividad enzimática
Val	Valina
v/v	Concentración volumen-volumen
WT	Tipo silvestre (por sus siglas en inglés)
Xaa	Cualquier aminoácido excepto prolina
YP	Medio extracto de levadura y peptona
YPD	Medio extracto de levadura, peptona y dextrosa
YPDA	Medio extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar
Zeo	Zeocina
°C	Grado Celsius
$\alpha$	Nivel significativo
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro

## Resumen

Las cutinasas son enzimas pertenecientes a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas que comparten propiedades catalíticas con esterasas y lipasas. Son empleadas en áreas como la industria de alimentos, detergentes, producción de biodiesel e hidrólisis de polímeros sintéticos; estas son producidas por diversos microorganismos. Debido a su amplio uso, muchos genes de cutinasas han sido expresados en sistemas de expresión heterólogos, como es el caso de *P. pastoris*; ya que de manera general en estos sistemas se genera una mayor producción de proteínas.

En el presente estudio se evaluaron el efecto del inductor (metanol) y del tamaño de inóculo, sobre la producción de proteína soluble, biomasa, actividad volumétrica, actividad específica y productividad de las enzimas recombinante ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP (cutinasas de *A. nidulans*) clonadas mediante inserción de genes sintéticos empleando codones de uso preferencial en la cepa *P. pastoris* KM71H (fenotipo Mut<sup>S</sup> de acuerdo a su capacidad de metabolizar al metanol). Se confirmó la actividad de ambas cutinasas realizando geles SDS-PAGE y zimogramas; en estos últimos se apreciaron diferentes bandas con distinto peso molecular (en ambas cepas), esto se puede deber a la unión de oligosacáridos a la proteína de interés, ya que *P. pastoris* puede realizar la O-glicosilación y N-glicosilación. Posteriormente se determinaron las concentraciones óptimas de inductor e inóculo. En el caso de la cepa KM71H ANCUT 1 CP se determinó una concentración de inductor óptima de 0.5%; concentración con la que se determinó que 0.5% era la cantidad de inóculo óptimo, los valores obtenidos son  $188 \pm 10$  U/mL para la actividad volumétrica,  $0.153 \pm 0.001$  mg/mL para proteína total soluble,  $1237 \pm 145$  U/mg para la actividad específica y  $3917 \pm 208$  U/Lh para la productividad volumétrica. En el caso de la cepa KM71H ANCUT 3 CP la concentración óptima de inductor fue de 1.5%, y 2.0% para el inóculo, obteniéndose una actividad volumétrica de  $189 \pm 6$  U/mL,  $0.147 \pm 0.002$  mg/mL de proteína total soluble,  $1281 \pm 36$  U/mg de actividad específica y  $3938 \pm 125$  U/Lh de productividad.

Los resultados se compararon con los obtenidos en la cepa X33, fenotipo Mut<sup>+</sup> (fenotipo silvestre de acuerdo al metabolismo del metanol). De manera general se determinó en la cepa X33, ya sea CP o no, se obtienen mejores resultados en el caso de la expresión de

las cutinasas en comparación con las cepas KM71H CP. Por otro lado comparando geles los zimogramas de los fenotipos Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>S</sup>, se observa que tanto para la ANCUT 1CP como para la ANCUT 3 CP se aprecian diferentes perfiles de bandas con actividad, esto se puede deber a los tipos de glicosilaciones que realiza *P. pastoris* dependen del fenotipo de esta y de la proteína en así.

Por otro lado, comparando a ANCUT 1 CP producida en KM71H respecto a ANCUT 3 CP producida en KM71H, se observó que la producción de ANCUT3 CP es mayor que la de ANCUT 1 CP, considerando las condiciones óptimas de cada una.

## Introducción

Las cutinasas son enzimas cuya función biológica es la degradación de la cutina en plantas. Industrialmente, son empleadas en diversas áreas como la industria de alimentos, detergentes, producción de biodiesel y la degradación polímeros sintéticos (Dutta *et al.*, 2009). La obtención de este tipo de enzimas se puede realizar a partir tanto de microorganismos nativos, por ejemplo *F. culmorum* (Canavati *et al.*, 2016), *A. oryzae* y *A. nidulans*, como de microorganismos recombinantes, como es el caso de *Escherichia coli* KH 802, en donde se clonó y secuenció el gen en de cutinasa de *Fusarium solani f. pisi*. (Dutta *et al.*, 2009). Un medio para obtener este tipo de enzimas es el empleo de *Pichia pastoris* como microorganismo hospedero, ya que se ha empleado para la síntesis de proteínas heterólogas, a partir del promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX), enzima que se requiere en el metabolismo de metanol y sólo se produce cuando la levadura crece en presencia de este alcohol como fuente de carbono. Dependiendo de cómo se lleve a cabo el metabolismo del metanol, se tendrán 3 fenotipos diferentes: Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>S</sup> y Mut<sup>-</sup>.

Una de las ventajas que ofrece esta levadura es que el medio de crecimiento resulta económico y puede formularse libre de toxinas (Cregg *et al.*, 1993); además de que es útil para el escalamiento en la producción de proteínas heterólogas en diferentes tipos de biorreactores (Baumgartner *et al.*, 2003). Sin embargo, se tiene que considerar el empleo de una estrategia adecuada cuando se desean obtener altos niveles de producción; en esta se tiene que tomar en cuenta aquellos factores que influyen tanto en el metabolismo de la levadura como en la producción de proteínas heterólogas tales como la densidad celular al inicio de la inducción, la concentración de metanol en el medio de cultivo, el fenotipo empleado, el pH del medio de cultivo entre otros (Serrano-Rivero *et al.*, 2016).

## Planteamiento del problema

La concentración de metanol en cultivos que emplean a *P. pastoris* como sistema de expresión es uno de los parámetros más relevantes que influye en la producción de la proteína recombinante, pues se usa como inductor en su producción y en niveles bajos pueden no ser suficiente para iniciar la transcripción de AOX, mientras que niveles altos pueden ser tóxicos para las células, por lo que es importante y de suma relevancia determinar la concentración que resulta idónea para generar este tipo de proteínas. Así mismo la densidad celular al inicio de la inducción resulta ser otro factor clave ya que un cultivo con alta densidad celular puede conducir a una lisis de un porcentaje de células, generando así una producción deficiente de la proteína heteróloga; este mismo comportamiento se puede producir cuando se tiene una deficiencia de biomasa.

Debido a las aplicaciones potenciales que ofrecen las cutinasas, su producción es de interés y considerando que las cepas Mut<sup>S</sup> (KM71H), al contar solamente con el promotor AOX2 requieren de una menor cantidad de metanol en su metabolismo para la producción de proteínas heterólogas en comparación a las cepas Mut<sup>+</sup>(X33), se considera que su empleo reduciría costos de operación, siendo viables para una posible producción industrial.

Por otro lado, el empleo y comparación de diferentes fenotipos de *Pichia pastoris*, referentes al metabolismo del metanol, como sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes es un tema poco explorado en el que se encuentran resultados diferentes entre una cepa y otra. Por ejemplo, Pedro *et al.*, (2015) evaluaron el empleo de una cepa Mut<sup>+</sup> (X33) y una cepa Mut<sup>S</sup> (KM71H) en la biosíntesis de hMBCOMT (una catecol-O-metiltransferasa) recombinante, obtenido resultados de productividad más favorables para la cepa X33. Por otro lado, Ping *et al.*, (2016) realizaron la comparación de las condiciones optimizadas para la expresión de hTopoI (ADN humano topoisomerasa I) en cepas KM71H (Mut<sup>S</sup>) y X33 (Mut<sup>+</sup>) de *P. pastoris*, concluyendo que la cepa Mut<sup>S</sup> (KM71H) expresó y secretó un mayor nivel de hTopoI expresado como proteína heteróloga en presencia de metanol en comparación con el Mut<sup>+</sup> (X33).

## Hipótesis

Se espera que en el medio que tenga la menor concentración de metanol y mayor concentración de inóculo se produzca la mayor cantidad de enzima para las cepas de *Pichia pastoris* KM71H CP que expresan las enzimas recombinantes ANCUT 1 y ANCUT 3.

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar las condiciones óptimas de producción de cutinasas en el modelo de expresión heterólogo de *P. pastoris* (KM71H), mediante la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de metanol e inóculo sobre la producción de biomasa, proteína, actividad volumétrica, y actividad específica para las enzimas recombinantes ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP.

### Objetivos específicos

- Evidenciar la presencia de las proteínas recombinantes por medio de geles SDS-PAGE, en las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP.
- Determinar la concentración de inductor óptima para la producción de cutinasas ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP en las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP.
- Determinar la concentración de inóculo de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP óptima para la producción de las cutinasas ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP.
- Comparar la producción de biomasa y la producción de la cutinasa recombinante ANCUT 1 CP respecto a la cutinasa recombinante ANCUT 3 CP expresadas en las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP respectivamente.
- Comparar la producción de biomasa y producción de las cutinas recombinantes expresadas en las cepas del fenotipo Mut<sup>S</sup> (KM71H) con respecto a las expresadas en las cepas del fenotipo Mut+ (X33).

## 1. Marco teórico

### 1.1 La cutícula y la cutina

Las partes aéreas de las plantas superiores, que incluyen hojas, tallos, flores y frutos, están cubiertas completamente de una membrana continua lipídica extracelular denominada cutícula, la cual está compuesta por una cubierta superior de ceras epicuticulares, seguida por otra capa inferior formada por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa cuticular (Figura 1) (Tafolla *et al.*, 2013).

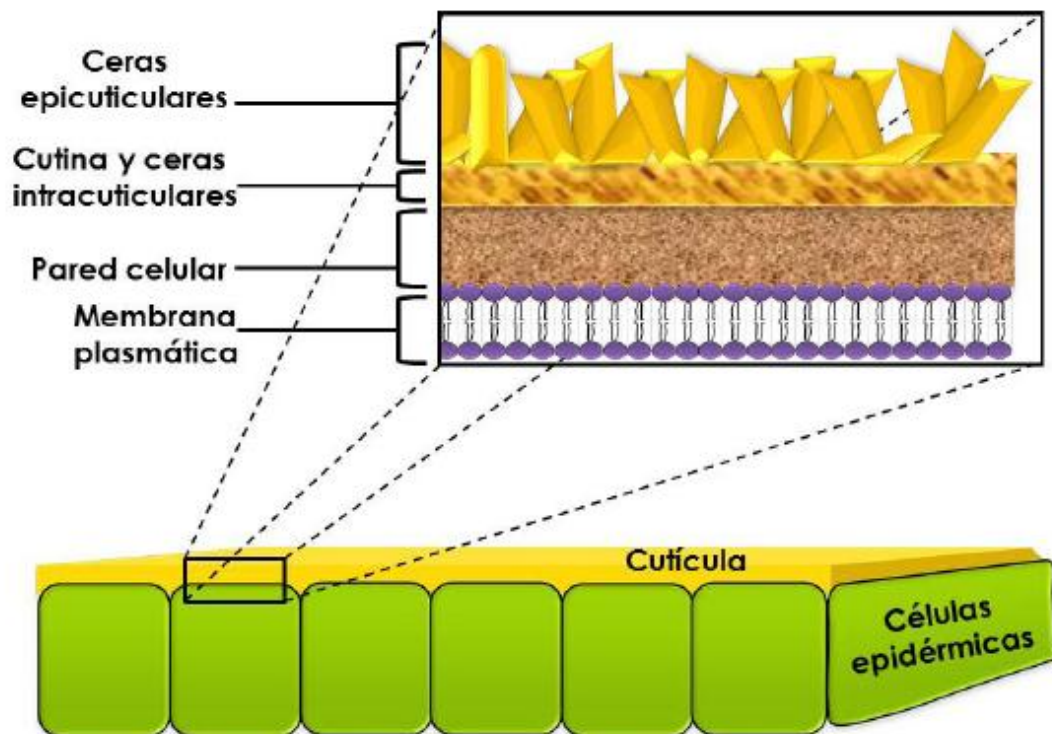


Figura 1. Ubicación de la cutícula con respecto a las células epidérmicas y sección transversal de la misma que muestra la posición de los principales polímeros que la conforman (Tafolla *et al.*, 2013).

Entre las principales funciones que cumple la cutícula en las plantas se encuentra la reducción de la pérdida de agua y difusión de gases, evita acumulación de agua y polvo, participa en las interacciones planta-insecto, controla los cambios de temperatura y provee soporte mecánico.



### 1.1.1 Estructura de la cutina

La cutina es el principal componente de la cutícula y se encuentra en una proporción que varía desde el 40 al 80 % del peso, según la especie. Es considerada la primera barrera con la que se encuentran los patógenos de las plantas en su camino hacia la penetración (Nikolaivits *et al.*, 2018).

La cutina es un biopolímero heterogéneo constituido principalmente en ácidos grasos oxigenados (epoxilados e hidroxilados) de dieciséis y dieciocho carbonos los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, así también como glicerol (Tafolla *et al.*, 2013). Los monómeros de cutina típicos de las clases C16 y C18 se muestran en la Tabla 1, sin embargo, también existen monómeros menores presentes en la cutina los cuales pueden ser ácidos grasos, alcoholes grasos, aldehídos y cetonas.

Tabla 1. Estructuras de los principales monómeros de cutina. X = 5, 6, 7, 8; y = 5, 6, 7, 8, x + y = 13. (Modificada de Nawrath, 2002).

Familia de C16	Familia de C18
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
<b>Acido palmítico</b>	<b>Ácido oleico</b>
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
<b>Acido 16-hidroxipalmitico</b>	<b>Acido (9)-18-hidroxioléico</b>
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH} \\   \qquad \qquad   \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\   \qquad \qquad   \qquad   \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \qquad \text{OH} \end{array}$
<b>Ácidos dihidroxipalimico</b>	<b>Acido 9,10,18 trihidroxióctadecenoico</b>
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\   \qquad \qquad \qquad \diagdown \diagup \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array}$
	<b>Acido 18-hidróni-9,10,-epóxióctadecenoico</b>

La cutina es una de las barreras con la que se encuentran los microorganismos patógenos en su penetración hacia la planta, por lo que muchos de estos microorganismos producen a las cutinasas para realizar la degradación enzimática de la cutícula.

## 1.2 Cutinasas

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son aquellas enzimas encargadas en la naturaleza, de la degradación de la cutina. De manera general están conformadas por alrededor de 197-200 residuos de aminoácidos y oscilan entre un peso molecular de 20 y 35 kDa (Chen *et al.*, 2010; Egmond y De Vlieg, 2000). Son serin-esterasas pertenecientes a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, las cuales presentan una triada catalítica Ser-His-Asp (Figura 2). Estas enzimas muestran propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, ya que pueden hidrolizar ésteres solubles, triacilgliceroles, fosfolípidos (Roussel *et al.*, 2014) y polímeros insolubles (Nikolaivits *et al.*, 2018); además de las reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua (Castro *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia de las lipasas, las cutinasas no presentan la tapa característica de las lipasas que cubre su sitio activo, por lo que la serina nucleofílica se encuentra expuesta al solvente. Esto no es una regla de todas las cutinasas, ya que la cutinasa nativa Tr de *Trichoderma reesi* posee una tapa que cubre su sitio activo y requiere la presencia de detergentes para su actividad, como ocurre con las lipasas (Roussel *et al.*, 2014).

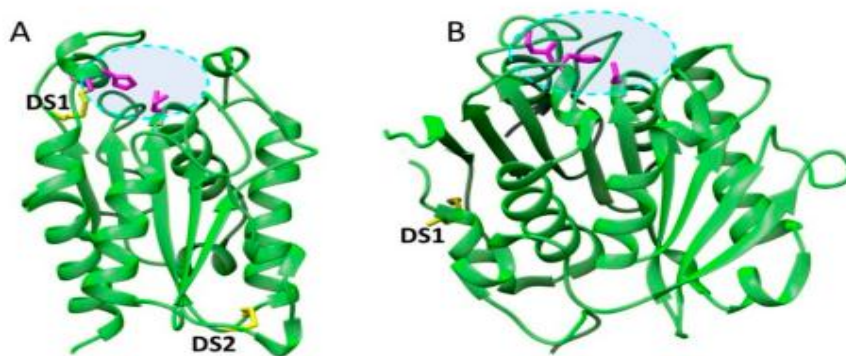


Figura 2. Estructuras de Fsp cutinasa (A) y la cutinasa de *Thermobifida fusca*. Se muestran los residuos de la tríada catalíticas en color magenta y los enlaces disulfuro (DS) en color amarillo. Los círculos discontinuos de color turquesa marcan la hendidura de unión del sustrato (Modificada de Nikolaivits *et al.*, 2018).

### 1.2.1 Reacciones realizadas por las cutinasas

La principal reacción que llevan a cabo las cutinasas es la hidrólisis de la cutina; donde el mecanismo de hidrólisis (Figura 3) se logra mediante una acilación y desacilación, incluida la formación de un intermediario covalente entre el grupo carbonilo del éster que se hidroliza y la serina catalítica (Nikolaivits *et al.*,2018).

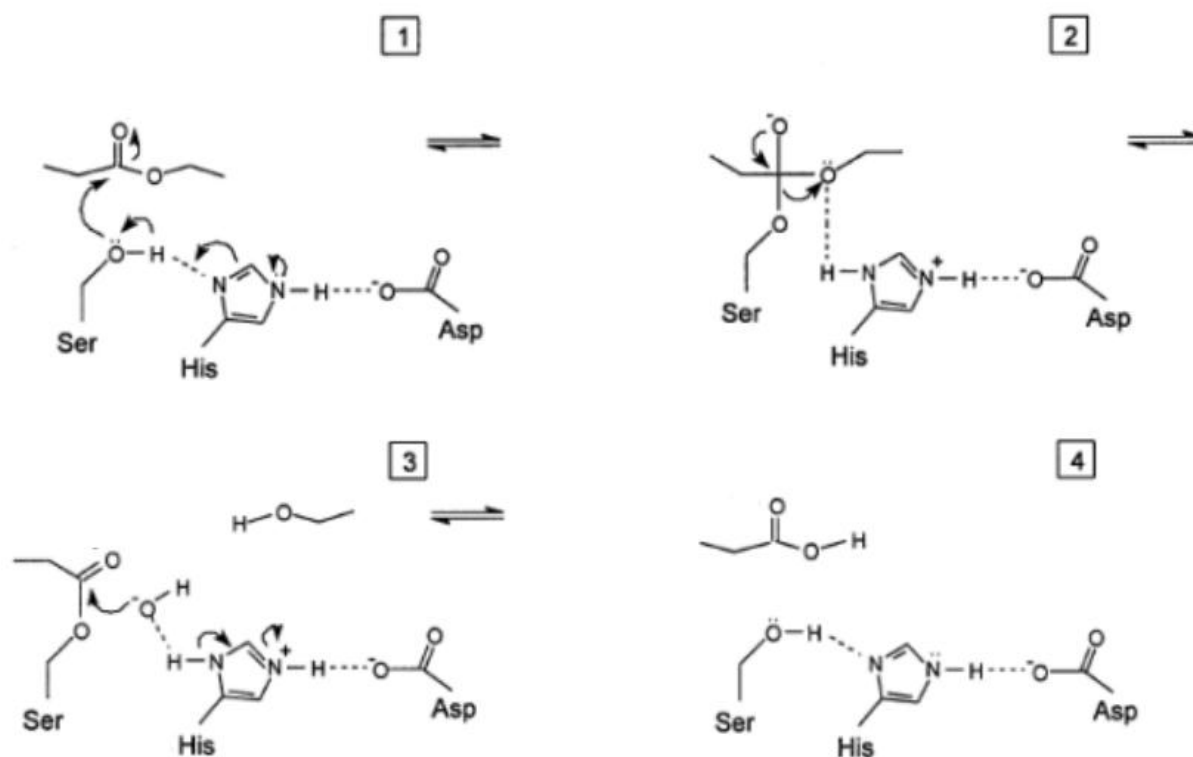


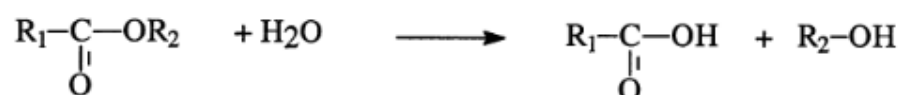
Figura 3. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de una cutinasa.

1. Enlazamiento del sustrato al sitio activo, 2. Formación del primer intermediario tetraédrico,
3. Ataque del ion OH del agua sobre la acil-enzima y liberación de la mitad alcohólica del sustrato,
4. Desacilación del complejo acil-enzima para reiniciar el ciclo catalítico. Modificado de Solís, 2013.

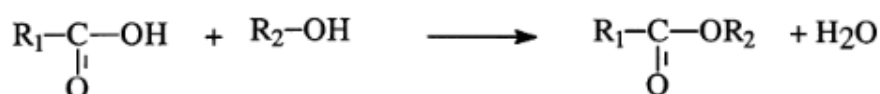
Por otra parte, entre las reacciones de síntesis que llevan a cabo las cutinasas se encuentran la esterificación (síntesis de un éster), transesterificación (intercambio de la posición de ácidos grasos, respecto a otra molécula), interesterificación (intercambio de posición de ácidos grasos dentro de la misma molécula) y alcoholisis (reacción de un

triglicérido con alcohol para formar alquil ésteres y glicerol) (Figura 4). Sin embargo, la actividad termodinámica del agua del medio de reacción es en gran parte responsable de la determinación del predominio de cada tipo de reacción (Fontes *et al.*, 2009); siendo las reacciones de síntesis predominantes en medios con baja cantidad de agua.

Hidrólisis:



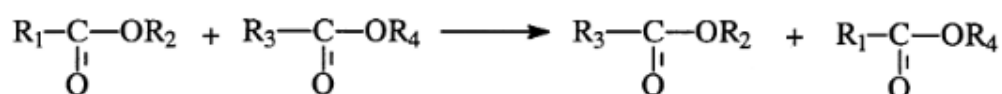
Esterificación:



Transesterificación:



a) Interesterificación



b) Alcohólisis



Figura 4. Reacciones catalizadas por las cutinasas. Adaptado de Villeneuve *et al.* (2000)

### 1.3.1 Microorganismos productores de cutinasas y propiedades de éstas.

Estas enzimas son producidas por diversos microorganismos fitopatógenos, principalmente hongos como es el caso de *Thielavia terrestris*, *Cryptococcus magnus*, *Paraphoma sp.*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus nidulans*. Muchos de los genes de las cutinasas fungales

han sido expresados en hospederos eucariontes tal es el caso de *P. pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cutinasas conocidas aisladas de su organismo silvestre (WT) o expresadas en un hospedero heterólogo (Modificada de Nikolaivits *et al.*, 2018).

Nombre	Origen	Hospedero	Peso molecular (kDa)	pH óptimo
Proveniente de hongos				
<i>F. solani</i> cutinase	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	20	8
MFCUT1	<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Pichia pastoris</i>	22	-
THCUT1	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	29	7.5-8.0
CUTAB1	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	24	7.0-9.0
AnCut5	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	22.8	6.0
TtcutA	<i>Thielavia terrestres</i>	WT	25.3	4.0
PaE	<i>Pseudozyma antártica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	20.4	9.5
<i>G. cingulata</i> cutinase	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	25	8.0
Tr cutinase	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	23.8	6.0
ScCut1	<i>Sirococcus conigenus</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	20	4.7-5.2
FoCut5a	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	23	8.0
Acut1-6hp	<i>Arxula adenivorans</i>	<i>A. adenivorans</i> G1212	21.6	5.0
McCut	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	21.9	8.0
MtCUT	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Pichia pastoris</i> KM71H	23.4	8.5
CutL1	<i>Aspergillus oryzae</i>	WT	21.6	9.0
ANCUT2	<i>Aspergillus nidulans</i>	WT	29	9.0

Proveniente de bacterias				
Tfu_0883	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>E. coli</i> BL21 Rosetta (DE3) PlysS cells	29	8.0
Thc_Cut1	<i>Thermobifida cellulositytica</i>	<i>E.coli</i> BL21-Gold (DE3)	29.4	8.0
Cut1	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	30.1	8.0
Cut2	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	29.6	8.0
Tcur1278	<i>Thermomonospora curvata</i>	<i>E. coli</i> TOP10	35	8.5
Tcur0390	<i>Thermomonospora curvata</i>	<i>E. coli</i> TOP10	35	8.5

Las cutinasas generalmente trabajan a un pH neutral o alcalino (7.0-9.5) como es el caso de Tfu\_0883, Cut1, Cut2, Tcur1278, Tcur0390, la cutinasa de *F. solani*, CutL1, CUTAB1, PaE, la cutinasa de *G. cingulata*; sin embargo, existen algunas cutinasas, como AnCut5, la cutinasa Tr y ScCut1, que trabajan a pH ácidos (4.0-6.0). En general, las cutinasas de origen bacteriano operan a temperaturas entre 50-60°C, mientras que las cutinasas de origen fungal a temperaturas ente 40-45°C, esto puede deberse a que algunas de las cutinasas de origen bacteriano provienen de bacterias termófilas, como es el caso de la cutinasa Tfu\_0883 de *Thermobifida fusca* y Thc\_Cut2 de *Thermobifida cellulositytica*.

### 1.2.3 Aplicaciones de las cutinasas

Los procesos biotecnológicos son una opción interesante para diversos sectores ya que presentan ventajas como un consumo bajo de energía, mayor rendimiento del proceso, procesos de producción más baratos y baja generación de residuos (Fontes *et al.*, 2009). Debido a las diversas reacciones que llevan a cabo las cutinasas y a sus propiedades bioquímicas, éstas se consideran como enzimas versátiles ya que muestran propiedades interesantes para las aplicaciones en productos y procesos industriales (Carvalho, 1998). Algunas de estas aplicaciones se pueden observar en la Tabla 3. Son empleadas en diversas áreas como en la industria de alimentos, detergentes, producción de biodiesel, degradación enzimática de sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, así como en

agricultura (Dutta et al., 2009). Sin embargo, el uso potencial más relevante de estas enzimas, es la degradación de polímeros sintéticos (Nikolaivits et al., 2018).

Tabla 3. Principales aplicaciones de las cutinasas.

Industria	Empleo	Ejemplo	Fuente
Producción de productos lácteos	Modificación en la composición estructural básica de los aceites y grasas modificando los triglicéridos mediante diferentes maneras, como la hidrogenación, hidrólisis (ruptura del enlace éster) e interesterificación.	Lipólisis parcial de la grasa de la leche de cabra empleando la cutinasa de <i>F. solani pisi</i> .	Regado et al. (2007)
Síntesis de saborizantes y aromas	Producción de sabores naturales por métodos enzimáticos.	Transesterificación de acetato de butilo y hexanol, empleando la cutinasa recombinante de <i>F. solani pisi</i> , obteniendo acetato de hexilo, un éster de cadena con notas a pera.	Carvalho et al. (1996)
Producción de compuestos fenólicos	Modificación de la hidrofobicidad de derivados de los ácidos benzoicos y cinámico con que tienen en su estructura un anillo benzoico con uno o más grupos hidroxilo y/o grupos metoxilo junto con otro grupo carboxilo (los cuales tienen propiedades de antioxidantes, anti alergénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, y anti carcinogénicos) por medio de la esterificación de con un alcohol graso.	Estudio de la esterificación del ácido ferúlico con 1-octanol usando la cutinasa <i>F. solani</i> .	Stamatis et al. (1999)
Conservación del medio ambiente / descontaminación de suelos y ecosistemas acuáticos	Degradación de insecticidas y pesticidas por medio de la hidrólisis.	Degradación del malatión empleando la cutinasa de <i>F. oxysporum</i>	Kim et al. (2005)
Industria textil	Modificación de la	Modificación de la	Vertommen

	hidrofobicidad de la fibra de poliéster a través de la hidrólisis de enlaces éster solo en la superficie de esta.	superficie de tereftalato de polietileno y poliéster, poliamida y acrílico empleando la cutinasa de <i>F. solani pisi</i>	<i>et al.</i> (2005)  <i>Silva et al.</i> (2005)
Degradación de polímeros	Degradación de polímeros insolubles por medio de la hidrólisis.	Degradación del poli succinato de butileno (PbS) y poli succinato de hexileno (PHS) por la cutinasa de <i>F. solani</i> .  Hidrólisis de policaprolactona (PCL) por una cutinasa de <i>M. thermophila</i> (MtCUT)  Hidrólisis de restos de PET en mezclas de polímeros procedentes de botellas comerciales, por medio de la cutinasa Thc_Cut1	<i>Bai et al.</i> (2018)  <i>Yang et al.</i> (2018)  <i>Gamerith et al.</i> (2017)

Debido a las diversas aplicaciones que tienen este tipo de enzimas, su producción es de suma relevancia; por esto varios microorganismos han sido empleados como sistemas de expresión de estas proteínas ya que permiten obtener mayores cantidades de éstas con características semejantes a las nativas mediante técnicas de ingeniería genética y cultivo celular (ver Tabla 2). Uno de los sistemas de expresión más empleados es *P. pastoris*. La cutinasa de *G. cingulata* fue empleada por *Diba et al.* 2005 cuantificando la actividad de esta, mientras que *Wan et al.*, 2014 clonó esta misma en *P. pastoris* cuantificando su actividad; los resultados obtenidos por ambos autores indican que la cutinasa expresada en *P. pastoris* tiene una actividad volumétrica  $17 \times 10^3$ , veces mayor que la nativa. Además, la producción de las cutinasas de manera nativa resulta ser más costosa, ya que de requiere de cutina como inductor y la obtención de esta requiere metodologías previas como lo describe *Lin et al.*, 1978.



### 1.3 *Pichia pastoris* como sistema de producción de enzimas heterólogas.

Esta levadura ha sido reconocida como uno de los hospederos más importantes en la industria para la producción de proteínas heterólogas. Esto se debe a que presenta diversas capacidades, como crecer en medios definidos relativamente baratos (compuestos por una fuente de carbono; ya sea metanol, glicerol o metanol, biotina, sales y agua) (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). Por otra parte, presenta una alta eficacia de secreción de la proteína recombinante de interés, ya que secreta pequeñas cantidades de proteínas endógenas al medio de cultivo, por lo que las proteínas heterólogas secretadas al medio se encuentran parcialmente puras, lo que facilita su futura purificación (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). *P. pastoris* ofrece diversas ventajas en comparación a otros sistemas de expresión (eucarionte y procarionte), ya que se caracteriza por un adecuado crecimiento, altos niveles de productividad de proteínas recombinantes, ausencia de contaminación por endotoxinas y bacteriófagos, fácil manipulación genética por vectores de expresión bien caracterizados, ausencia de patogenicidad en humanos, diversidad de modificaciones post-traduccionales que incluyen plegamiento de polipéptidos, la formación de enlaces disulfuro, O- y N-glicosilación, metilación, acilación, modificación proteolítica (Rabert *et al.*, 2013, Zhiliang *et al.*, 2018).

Por estas razones esta levadura es útil para el escalamiento en la producción de proteínas heterólogas en diferentes tipos de biorreactores (Baumgartner *et al.*, 2003). Más de 1000 proteínas heterólogas han sido clonadas y expresadas en este sistema, entre las que se encuentran la invertasa, la lisozima humana, el inhibidor de proteasas de Kunitz, el precursor de la insulina y la albúmina sérica (Serrano-Rivero *et al.*, 2016).

En comparación con otros sistemas de expresión, como es el caso de *S. cerevisiae*, *P. pastoris* sintetiza cadenas de oligosacáridos de menor grado de polimerización, además de que esta levadura es capaz de realizar la O-glicosilación de tal manera que los oligosacáridos se adicionan a la proteína secretada a partir de un residuo de manosa, que luego es extendido por la adición de  $\alpha$ -1,2 manosa (Santos *et al.*, 2008).

La expresión de cualquier gen exógeno en *P. pastoris* requiere tres pasos básicos: (1) la inserción del gen en un vector de expresión, (2) introducción del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris* y (3) examen de posibles cepas de expresión para el producto de

gen heterólogo (Cereghino *et al.*, 2000). Ahmad *et al.*, 2014 establece que al momento de diseñar estrategias para la clonación y expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* se deben de considerar algunos puntos relevantes, como es el caso de la selección de la cepa hospedera, del promotor a emplear, de un marcador de selección adecuado, la vía de secreción de la proteína heteróloga, la integración genómica dentro del casete de expresión y principalmente una apropiada elección del vector de expresión (Figura 5).

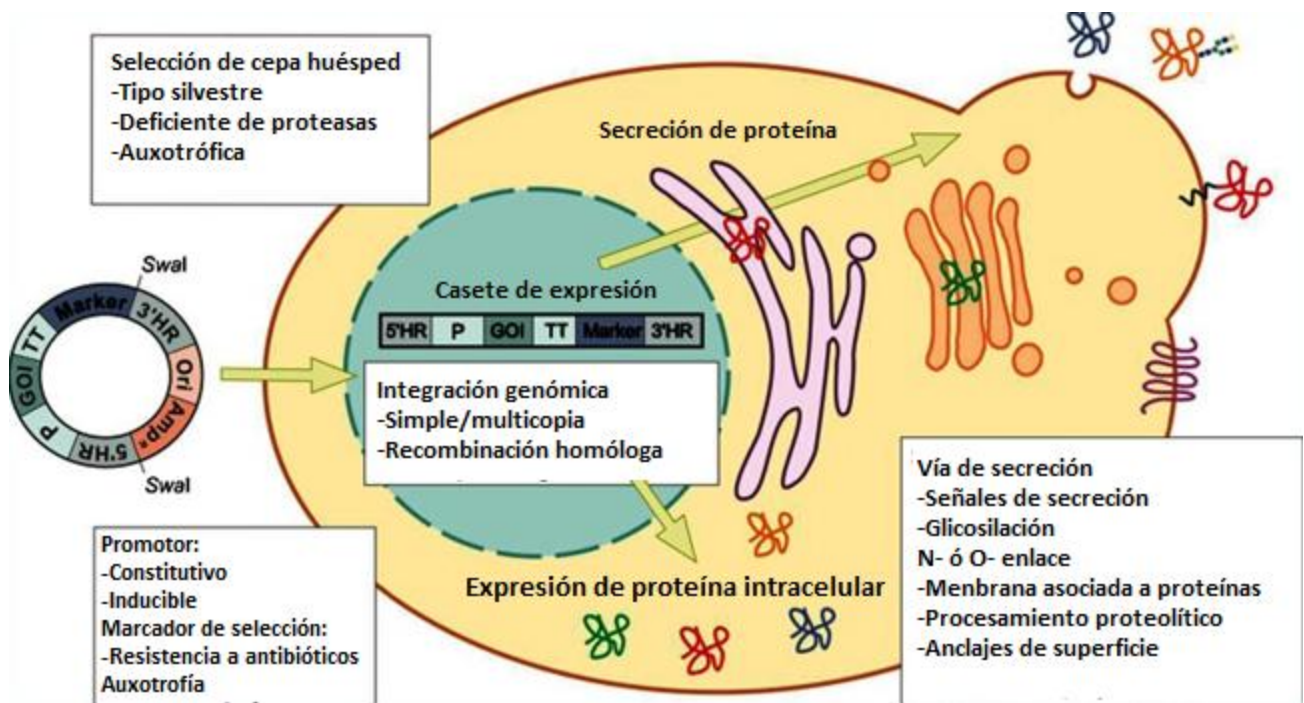


Figura 5. Consideraciones generales para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*. Los plásmidos de expresión que albergan los genes de interés (GOI) se linealizan antes de la transformación. Marcadores seleccionables (por ejemplo, Amp<sup>R</sup>) y el origen de replicación (Ori). El nivel de expresión de la proteína de interés puede depender de (I) el locus de integración cromosómica, que está dirigido por las regiones homólogas 5' y 3' (5'HR y 3'HR), y (II) el número de copia del gen. Se muestra un par promotor representativo (P) y un terminador de la transcripción (TT). Las secuencias señal adecuadas guiarán la proteína recombinante para la expresión intracelular o secretora, y regirán la integración o el anclaje de la membrana (adaptado de Ahmad *et al.*, 2014).

### 1.3.1 Condiciones para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*

Una estrategia adecuada en el cultivo de *P. pastoris* es esencial cuando se desean obtener altos niveles de producción de la proteína heteróloga, por lo que se deben tener en cuenta los diversos factores que influyen en el metabolismo de la levadura y en la producción de dichas proteínas; estos factores principalmente son:

- Composición y concentración de los componentes del medio de cultivo.
- La fuente de carbono.
- La fuente de nitrógeno.
- El pH del medio de cultivo.
- La temperatura.
- Concentración de oxígeno disuelto

Además de que necesita todo esto, existen factores que son determinantes en la expresión de proteínas en sistemas como *P. pastoris* estos son la cantidad de biomasa al momento de realizar la inducción, el fenotipo con el que se esté trabajando y la capacidad de secreción de la proteína heteróloga; otro factor a considerar es en donde se realiza la producción de la proteína recombinante ya que Santos *et al.*, 2008, establecen que la productividad de *P. pastoris* en matraces con agitación es hasta 10 veces menor en comparación con cultivos efectuados en biorreactor, debido a que en este último tipo de cultivo se mantiene un ambiente controlado.

### 1.4 Metabolismo del metanol

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica, por lo que puede utilizar compuestos reducidos en carbono, como es el caso del metanol, como única fuente de carbono y energía (Santos *et al.*, 2008). Los genes que permiten que esta levadura sea capaz de utilizar el metanol son AOX1 y AOX2, pertenecientes a la enzima alcohol oxidasa, inducidos por el metanol.

El metabolismo del metanol requiere de rutas metabólicas que implican varias enzimas únicas. En un principio el metanol ingresa al interior de la célula mediante una difusión facilitada y los productos resultantes del metabolismo del metanol son liberados al exterior de la célula por medio de difusión pasiva (Santos, 2008); además se considera que todo el metanol que ingresa a la célula pasa directamente al peroxisoma.

En la primera etapa en la ruta de utilización del metanol, la enzima alcohol oxidasa (Fig. 6-1) realiza la oxidación del metanol para generar formaldehído y el peróxido de hidrógeno, cabe destacar que esta enzima se encuentra en el peroxisoma y que se requiere de oxígeno en el medio para realizar esta reacción. Respecto al peróxido de hidrógeno formado, la catalasa (Fig. 6-2), que también se encuentra en el peroxisoma, lo degrada en oxígeno y agua. Una parte del formaldehído generado sale del peroxisoma al citosol y otra parte se queda en el peroxisoma, al formaldehído que sale al citosol se le adjunta una molécula de glutatión para proteger al formaldehído de la reacción con radicales libres.

Por medio de la enzima formaldehído deshidrogenasa (Fig. 6-3) y  $\text{NAD}^+$ , el formaldehído pasa a formato, liberando NADH, al grupo glutatión (GSH) y formato; este último se transforma en  $\text{CO}_2$  por medio de la formato deshidrogenasa (Fig. 6-4).

El formaldehído restante que se encuentra en el peroxisoma se asimila para formar constituyentes de material celular por la vía xilulosa monofosfato; esta ruta se inicia en el interior de los peroxisomas y finaliza en el citoplasma. En un principio la dihidroxiacetona sintasa (transquelatosa) (Fig. 6-5) realiza la transferencia del grupo glicolaldehído de la xilulosa 5-fosfato (XU5P) al formaldehído, formando gliceraldehído fosfato (GAP) y dihidroxiacetona (DHA), seguidamente el DHA entra al citosol y es fosforilada a través de la enzima tioquinasa (Fig. 6-6), siendo también llamada dihidroxiacetona quinasa, resultando en la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). A continuación, ocurre la condensación del DHAP con GAP formando una molécula de fructosa 1, 6 bifosfato (FBP) por medio de la enzima fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (Fig. 6-7); posteriormente a través de la catálisis realizada por la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa (Fig. 6-8) ocurre la formación de una molécula de fructosa 6-fosfato (F6P).

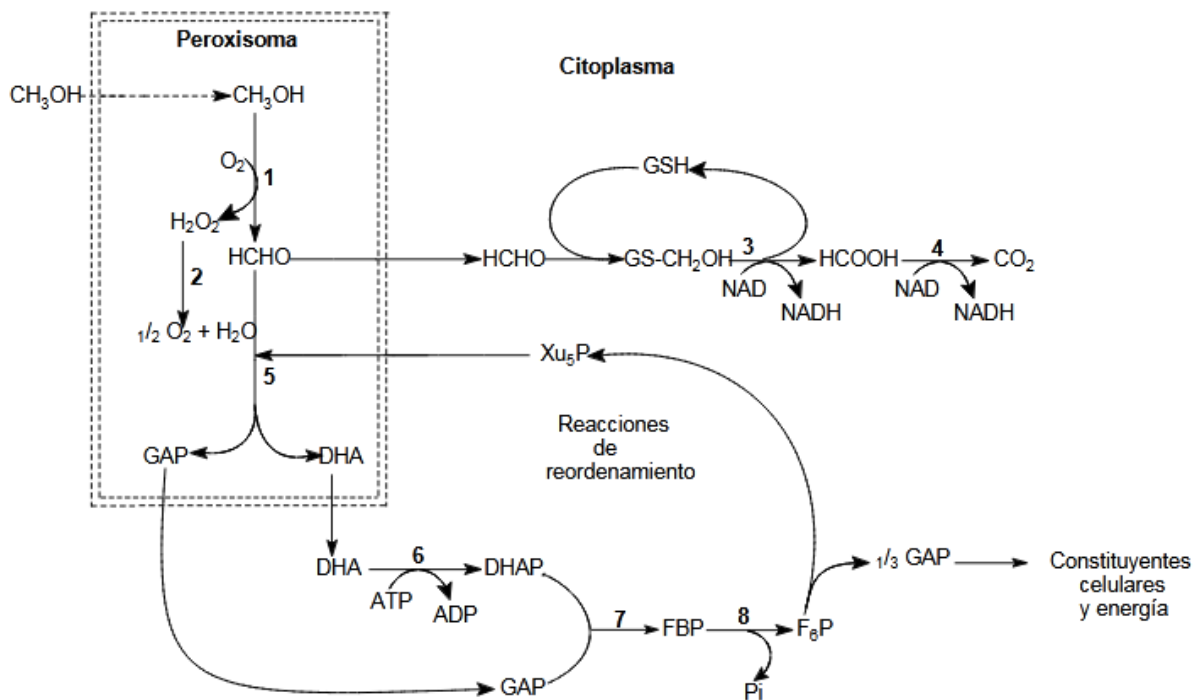


Figura 6. Ruta del metanol en *Pichia pastoris*. 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, formato deshidrogenasa, 5, dihidroxiacetona sintasa 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bifosfato aldolasa 8, fructosa 1,6-bifosfatasa. Modificado de Cereghino (2000).

#### 1.4.1 Tipos de fenotipos de metabolismo del metanol en *P. pastoris*

De acuerdo con su capacidad de metabolizar el metanol, las cepas de *P. pastoris* se pueden clasificar en los fenotipos Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup> y Mut<sup>-</sup> (Tabla 4). Las cepas que crecen en metanol a la tasa de la cepa silvestre, corresponden al fenotipo Mut<sup>+</sup> portan los genes AOX1 y AOX2. Sin embargo, hay otros dos tipos de cepas hospedero disponibles que varían con respecto a su capacidad para utilizar metanol debido a eliminaciones de uno o ambos genes AOX. Estas últimas no requieren de las grandes cantidades de metanol utilizadas habitualmente para cultivos a gran escala, como ocurre con la cepa Mut<sup>+</sup>, ya que presentan una utilización lenta del metanol. En general, las cepas Mut<sup>s</sup> tienen eliminado parcialmente alguno de los genes AOX, por ejemplo la cepa KM71H (*aox1::ARG4*), cuyo gen *aox1* se ha sustituido parcialmente con el gen *arg4* (arginosuccinato liasa) de *S. cerevisiae* y crece a una tasa más lenta. Por otra parte, la cepa Mut<sup>-</sup> es aquella en la que

se eliminaron ambos genes AOX y es totalmente incapaz crecer en metanol (Cereghino *et al.*, 2000).

Tabla 4. Cepas de *P. pastoris* utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas (Modificada de Serrano-Rivero *et al.*, 2016)

<b>CEPA</b>	<b>GENOTIPO</b>	<b>FENOTIPO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Y-11430</b>	Silvestre	Mut <sup>+</sup>	Consumo alto de metanol
<b>X33</b>	Silvestre	Mut <sup>+</sup>	Consumo alto de metanol
<b>GS115</b>	<i>his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo alto de metanol, auxótrofa a histidina
<b>KM71</b>	<i>his4, arg4aox1::ARG4</i>	Mut <sup>S</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo bajo de metanol, auxótrofa a histidina
<b>KM71H</b>	<i>aox1::ARG4</i>	Mut <sup>S</sup> , His <sup>+</sup>	Consumo bajo de metanol.
<b>MC100-3</b>	<i>his4, arg4aox1::SARG4, aox2::PHIS4</i>	Mut <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>	Incapaz de consumir metanol, auxótrofa a histidina
<b>SMD1 168</b>	<i>pep4, his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His-deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A
<b>SMD1 165</b>	<i>prb1, his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa B
<b>SMD1 163</b>	<i>pep4, prb1, his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A, proteinasa B, ni carboxipeptidasa Y



Optimized	7	ATGAACCCAATTAGATTGGATCAAAGACAAATCACTGGTAACGAATTGAGAGATGGTTCT
Original	7	ATGAATCCAATCCGTCTCGATCAACGCCAGATCACGGGAAACGAGCTCCGCGACGGTTCC
Optimized	67	TGTCATGATGTTACTTTTATTTCGCTAGAGGTTCTACTGAGTTGGGTACTTGGGTTCT
Original	67	TGCCACGATGTACCTTTATCTTCGCTCGTGGCTCTACTGAGCTTGGGTACTTGGGCAGC
Optimized	127	ACTGTTGGTCCTGCTACTTGTAAACGTTTTGAAGTTGAGAAAACCAGGTCAAGTTGCTTGT
Original	127	ACCGTCGGGCCCGCTACCTGCAATGTCTGAAACTCAGGAAGCCCGGCCAAGTCGCATGC
Optimized	187	CAAGGTGTTGCTCCTGCTTACATCGCTGATTTGGCTTCTAACTTTTGCCACAAGGTA
Original	187	CAGGGCGTTGCGCCGGCGTATATCGCCGACCTGGCTTCTAACTTTCTGCCACAAGGAACG
Optimized	247	AACCAAATCGCTATTAATGAGGCTAAGTCTTTGTTTCGAGTTGGCTGCTTCTAAGTGTCT
Original	247	AACCAAATTGCTATTAACGAAGCCAAATCTCTTTTTGAACTCGCGCGTCCAAGTGCCCC
Optimized	307	AACACTAAAATTGTTGCTGGTGGTTACTTCTCAAGGTGCTGCTGTTATGCATGCTGCTATT
Original	307	AACACCAAGATCGTCGCGGGTGGATACAGCCAGGGAGCGGCAGTCATGCATGCTGCCATC
Optimized	367	TCTACTTTGTCTTCTACTGTTCAAGATCAAATTAAGGGTGTGTTTGTGTTGGAGATACT
Original	367	TCGACGCTCTCGAGTACTGTTCAAGACCAGATCAAGGGGTTGTTCTCTTTGGCGACACG
Optimized	427	AGAAACAAACAAGATGGTGGTAGAATCCCAACTTCCCTACTGATAAGACTAAGATCATC
Original	427	CGCAATAAACAGGATGGCGGACGTATTCCGAACTTCCCACTGATAAGACAAAGATCATT
Optimized	487	TGTGCTTTCGGAGATTTGGTTTGTGAAGGTACTTTGGTTATTACTGCTGCTCACTTGTCT
Original	487	TGTGCATTTGGTGATCTGGTTTGCAGGGCACGCTCGTCATTACTGCGGCTCATCTTAGT
Optimized	547	TATATTGATGATGTTCCAGATGCTGCTGATTTCTTGGTTGGTAAATTG
Original	547	TACATTGATGATGTTCCGGATGCTGCTGACTTCTTGTGGGAAGCTT

Figura 8. Alineamiento entre la secuencia de ANCUT 1 optimizada en el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* contra la secuencia silvestre. Tomado de Sabido, 2018.



Optimized	7	ATG <b>ACTCCATTGCCTTCTGATACTGATGTTTCTTTGGAAAGAAGACAATCTATGAACTCT</b>
Original	7	ATGACGCCCTCCCCAGCGATACCGATGTCTCCCTCGAGCGCCGCCAGATATGAACTCC
Optimized	67	AAC <b>GATTGGAGAAGGGAGATTGTAAGTCTGTTGCTTTTATTTCGCTAGAGGTTCTACT</b>
Original	67	AACGACCTTGAGAAGGGCGACTGCAAATCTGTGGCATTTCATCTTCGCCCGGGCTCCACT
Optimized	127	GAAATT <b>GGTAACATGGGTTTTGTTGTTGGTCCAGGTGTTTGTCTAATTTGAAGTCTACT</b>
Original	127	GAAATTGGCAACATGGGCTTCGTCTCGGCCCGGTGTCTGTAGCAACCTAAAATCTACC
Optimized	187	<b>TTGGGTTCTGATAAAGTTGCTTGTC</b> CAAGGTGTTGGTGGTGCTTACACTGCTGGTTGATT
Original	187	CTGGCTCCGACAAGTTCGCTGTCAAGGCGTCCGGCGCCCTACACAGCGGGTCTGATC
Optimized	247	CAAAAC <b>GCTTTGCCAGCTAATACTGATTCTGGTTCTATTAAGGAGGCTGTTAAAATGTTTC</b>
Original	247	CAAAACGCCCTCCCGCAAATACTGACTCGGGCTCCATCAAAGAGGCGCTCAAGATGTTTC
Optimized	307	<b>GATTTGGCTGCTAAGTGTCTCTGATACTCAAATTGTTGCTGGTGGTTATTCTCAAGGTTCT</b>
Original	307	GACCTCGCCGCTAAATGCCCGGATACTCAGATCGTGGCGGGAGGATACAGTCAGGGCTCT
Optimized	367	<b>GCTGTTATTGATAACGCTATTCAA</b> AAGTTGGATGATTCTACTAGAGATAGAGTTAAAGGT
Original	367	GCGGTTATTGACAATGCAATCCAGAAGCTCGATGATAGTACCAGGGATCGAGTCAAGGGT
Optimized	427	GTT <b>GTTTGTTCGGTTTCACTAGAAATTTGCAA</b> GATAAGGGTCAAATCCAGGTTACCTT
Original	427	GTGTGTCTCTTTGGTTTCACGCGGAATCTCCAGGATAAGGGCCAGATTCCCGGGTACCCG

Figura 9. Alineamiento entre la secuencia de ANCUT 3 optimizada en el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* contra la secuencia silvestre. Tomado de Sabido, 2018.

Hernández en el 2013 clonó la enzima ANCUT 1 de *A. nidulans* en *P. pastoris* X33 usando el vector pPICZαB. Esta misma cepa fue empleada por Castro en 2017, realizando un escalamiento en biorreactor para lograr una mayor producción de la enzima, llegando a incrementar 6 veces la productividad volumétrica en obtenida a nivel matraz Erlenmeyer de 250 mL.

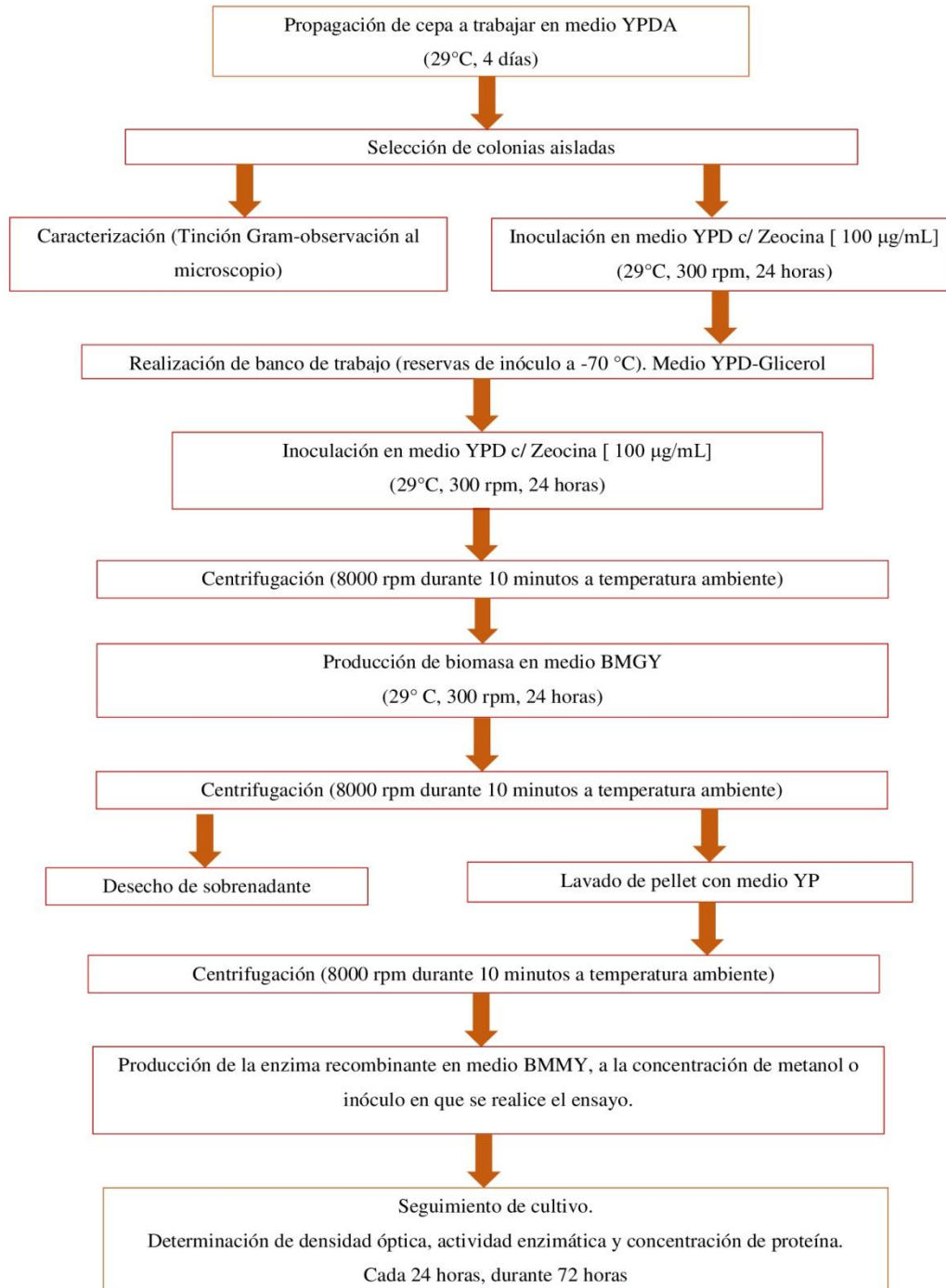
Morales (2018) evaluó el efecto del pretratamiento mecánico para modificar la cristalinidad del PET y así facilitar su degradación, usando la cutinasa ANCUT 1. Mediante análisis químicos, físicos, medición de cambios morfológicos y estructurales, determinó la eficiencia de la degradación de los polímeros PET y BioPET. Para el caso del BioPET, se observó que el empleo de un pretratamiento mecánico y un tratamiento con la enzima a 40°C durante 4 semanas logró disminuir su cristalinidad de un 63.24% a un 3.98%. Igualmente,

para el caso del PET (tereftalato de polietileno) se puede apreciar la disminución de la cristalinidad mediante micrografías por medio de microscopía electrónica de barrido. Además, se determinó la presencia de los monómeros TPA (Ácido tereftálico) y BHET (bis 2-hidroxiétil tereftalato), que son compuestos de degradación generados por la enzima.

El grupo de trabajo clonó la enzima ANCUT3 de *A. nidulans* en *P. pastoris* X33 usando el vector pPICZαB. Con esta cepa Lovera y Torres (2019) realizaron la optimización en la producción de la enzima recombinante (Qp) a nivel matraz. Las condiciones óptimas de pH inicial y concentración de inductor fueron de 6 y 0.5%, respectivamente, considerando una inducción en matraz Erlenmeyer de 250 mL con medio BMMY a un  $kLa$  teórico de  $96 \text{ h}^{-1}$ . Una vez que se logró la optimización en matraz se llevó a cabo el escalamiento en biorreactor de 1 L aumentando 2.39 veces el valor en la Qp.

De igual manera Lovera y Torres (2019) determinaron las condiciones idóneas para aumentar el rendimiento en la degradación del PET por la cutinasa recombinante ANCUT3, evaluando los parámetros de temperatura, tipo de soluciones amortiguadoras de pH, estandarización en la relación enzima-sustrato, efecto de la adición de iones metálicos y el tamaño de partícula del sustrato. Obtuvieron los mejores resultados cuando se empleó amortiguador Tris-HCl pH 9, a  $35^\circ\text{C}$  con un tamaño de partícula de tamiz #50, una proporción enzima-sustrato 20 U/mg de PET y una solución de iones de sulfato de magnesio; la degradación se comprobó al tener la presencia del monómero TPA.

### 3. Metodología



Nota: <sup>A</sup>: La determinación de la densidad óptica se realizó espectrofotométricamente a una  $\lambda=600$  nm.

<sup>B</sup>: La determinación de la actividad enzimática se realizó en microplaca utilizando como sustrato p-nitrofenilacetato a una  $\lambda=420$  nm.

<sup>C</sup>: La determinación de concentración de proteína se realizó mediante el método de Bradford.

Figura 10. Diagrama de plan de trabajo realizado; metodología modificada de Invitrogen (2010).

EasySelect™ Pichia Expression Kit. User Manual.

### 3.1 Propagación de cepa *P. pastoris* KM71H ANCUT 1 y *P. pastoris* KM71H ANCUT 3 CP

Se inoculó la cepa de *P. pastoris* KM71H ANCUT 1 CP o KM71H ANCUT 3 CP, la cual se encontraba previamente en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en medio YPDA (extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar) y se incubó a  $29^{\circ}\text{C}$  por 4 días en la incubadora estática marca Gravity Convection. Posteriormente se escogió una colonia aislada, para ambas cepas, se realizó una tinción Gram y se observó al microscopio.

Al comprobar que el cultivo no se encontraba contaminado, se procedió a realizar bancos celulares de trabajo con el fin de realizar la preservación del cultivo y disminución en la variabilidad de los resultados, previniendo cambios en las características morfológicas y bioquímicas de la cepa; estos consisten en un determinado volumen de una suspensión de células de *P. pastoris* KM71H ACNCUT 1 CP o ANCUT 3 CP en YP-glicerol 15% almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Estos se originaron de acuerdo con lo descrito en el Anexo I.

### 3.2 Reactivación de *Pichia pastoris*

La reactivación de las cepas se realizó inoculando  $200\ \mu\text{L}$  del banco celular de trabajo deseado en un matraz Erlenmeyer de  $250\ \text{mL}$  con  $25\ \text{mL}$  de medio YPD con zeocina ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), para incubarse a  $29^{\circ}\text{C}$  a  $300\ \text{rpm}$  en la incubadora INNOVA 40 marca New-Brunswick, durante 24 horas o hasta alcanzar una densidad óptica entre 2 y 5 ( $\lambda\ 600\ \text{nm}$ ). Transcurrido el tiempo de incubación el medio se centrifugó a  $8000\ \text{rpm}$  durante 10 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Biofuga primoR Heraeus), se separó el sobrenadante del pellet y posteriormente se realizó un lavado del pellet resultante con  $10\ \text{mL}$  de YP (extracto de levadura y peptona), este se volvió a centrifugar a  $8000\ \text{rpm}$  durante 10 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Biofuga primoR Heraeus) y se separó el pellet del sobrenadante.

### 3.3 Crecimiento de microorganismo en medio BMGY

El pellet resultante de la reactivación fue transferido a matraz Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio complejo BMGY (Amortiguadored Glycerol-complex Medium) e incubado en la incubadora INNOVA 40 marca New-Brunswick a 29°C a 300 rpm durante 24 horas o hasta alcanzar una densidad óptica entre 2 y 5 ( $\lambda$  600 nm). Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga Biofuga PrimoR Heraeus, para posteriormente separar el pellet y el sobrenadante. Se le realizó un lavado con 10 mL de medio YP y se volvió a centrifugar. Por último, el pellet resultante se suspendió en 10 mL de medio YP, a esto se le considera como el “inóculo”.

### 3.4 Expresión de enzimas recombinantes ANCUT 1 y ANCUT 3

La expresión de las enzimas se realizó en el medio BMMY (Amortiguadored Methanol-complex Medium). Se realizaron dos diferentes ensayos, para determinar la concentración de inductor idónea y para determinar la concentración de inóculo ideal.

Para el caso de la determinación de la concentración idónea de inductor se inoculó una D.O. (aproximadamente 0.6 mL) del “inóculo” en 25 mL del medio BMMY en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con una concentración de inductor de 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 3.0% (dependiendo del ensayo) y se incubó a 29°C y 300 rpm en la incubadora INNOVA 40 marca New-Brunswick.

Para la determinación de concentración de inóculo idónea, se inoculó el volumen correspondiente a 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 3.0% (dependiendo del ensayo) del “inóculo” en 25 mL del medio BMMY en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con la concentración de inductor idónea (previamente determinada para cada cepa) y se incubó a 29°C y 300 rpm en la incubadora INNOVA 40 marca New-Brunswick. Además, se realizó un ensayo considerando la transferencia total del “inóculo”, obteniendo así una alta concentración de células; a este ensayo se le llamó “Todo Pellet”.

En ambas determinaciones (concentración de inductor e inóculo idónea) se tomaron muestras de 1 ml del cultivo a 0, 24, 48 y 72 horas de incubación, las cuales se

centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en la centrifuga Allega x-30R marca Beckman Colter para separar el sobrenadante del pellet y poder emplear el sobrenadante en la cuantificación de proteína total soluble y actividad enzimática. Por otra parte, se determinó la cantidad de biomasa referida como la densidad óptica a 600 nm para estos mismos tiempos. Cada 24 horas se realizó una adición de inductor a la concentración empleada o idónea, dependiendo de la determinación realizada, considerando el nuevo volumen de medio presente.

### 3.5 Cuantificación de proteína total soluble en microplaca

La medición de proteína se realizó mediante el método de Bradford en microplaca. Las muestras de sobrenadante del cultivo se diluyeron con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7 hasta que entraran dentro de los valores de la curva de calibración (2-10  $\mu\text{g/mL}$ ). Se tomaron 160  $\mu\text{L}$  de cada dilución y se colocaron en un pozo de la microplaca con 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. El blanco de la reacción se preparó con 160  $\mu\text{L}$  del amortiguador empleado y 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Se mezclaron las muestras y el blanco y se incubaron durante 5 minutos; transcurrido el tiempo se realizó la lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Epoch (Bradford 1977, Whiteley C & Lee D, 2006). En el Anexo I se puede observar la curva de calibración empleada para la cuantificación de proteína.

### 3.6 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca

Las muestras de los sobrenadantes de las fermentaciones se diluyeron con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9. Para realizar la medición se colocaron 170  $\mu\text{L}$  de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9 y 10  $\mu\text{L}$  de la dilución realizada en un pozo de la microplaca, el blanco se consideró como 180  $\mu\text{L}$  de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9. En el momento de realizar la lectura en el equipo Epoch se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil acetato (pNFA) 1 mM y se leyó la absorbancia a 420 nm, para así determinar la actividad volumétrica. En esta metodología se definió unidad de actividad enzimática como los  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol que

son generados por minuto bajo las condiciones de ensayo empleadas, de acuerdo con la metodología descrita por del Del Monte *et al.*, (2012).

### 3.7 Determinación de actividad enzimática y perfil de proteínas en geles de poliacrilamida.

#### 3.7.1 Electroforesis

Se prepararon geles de electroforesis a una concentración de acrilamida de 12.5% para el gel separador y 4% para el concentrador (Carrillo *et al.*, 2013). Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis marca BioRad iniciando aproximadamente con amperaje de 38 mA y finalizando próximamente con 10 mA, a un voltaje constante de 100 Volts durante aproximadamente dos horas y media en un baño de hielo. Como referencia se utilizó un marcador Bio-Rad Standards Low Range. Una vez terminada la electroforesis el gel se lavó con agua destilada y se procedieron a realizar los ensayos de zimograma y perfil de proteínas.

#### 3.7.2 Zimograma

Las muestras fueron concentradas por ultrafiltración (Celda de ultrafiltración AMICON de 10 kDA, Beverly, MA) aproximadamente 10 veces y corridas en geles de electroforesis como se describió previamente. Una vez terminada la electroforesis el gel lavó con agua destilada y se incubó en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 con Tritón X-100 al 0.5 % durante 30 minutos, para renaturalizar la enzima. Pasado este tiempo se lavó el gel con agua destilada y se dejó en una solución de  $\alpha$ -naftil acetato (Solución A, ver anexo II) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se desechó a la solución y se lavó con agua destilada para agregar la solución de Fast Red (Solución B, ver anexo II) hasta observar la aparición de bandas color marrón que indican la presencia de actividad enzimática (Karpushova *et al.*, 2010).

### 3.7.3 Perfil de proteína

Las muestras destinadas al perfil de proteínas provienen del tratamiento del sobrenadante concentrado por ultrafiltración (Celda de ultrafiltración AMICON de 10 kDA, Beverly, MA) aproximadamente 10 veces. Una vez terminada la electroforesis el gel se lavó con agua destilada y se empleó el colorante azul de CoomassieG-250 (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific) para la tinción de bandas. Posteriormente se destiñó con solución desteñidora (Laemmli, 1970).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Cepa KM71H ANCUT 1 CP

- Propagación y aislamiento de la cepa

Como puede apreciarse en la Figura 11, el banco de trabajo proviene de una cepa aislada y en la tinción al microscopio realizada a la misma (Figura 12), se puede observar la ausencia de otro tipo de morfologías que no correspondan a la levadura empleada en este estudio, por lo cual se parte de un cultivo puro que no presenta ningún otro tipo de microorganismo.



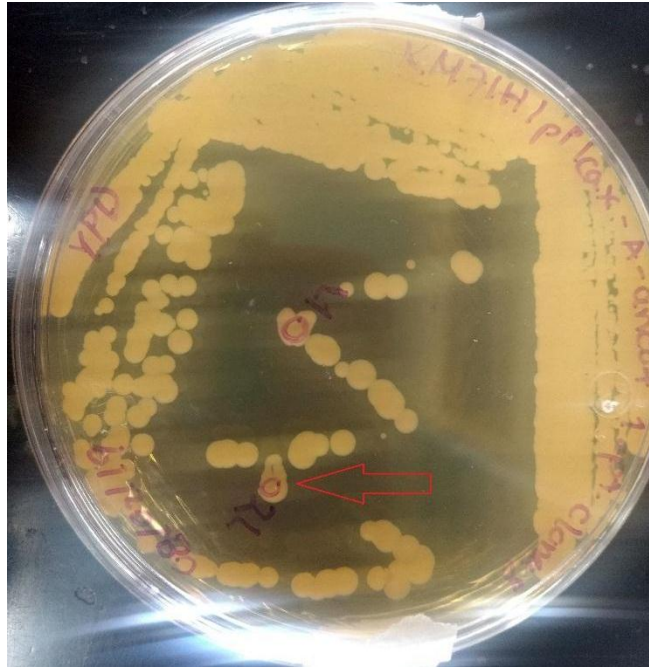


Figura 11. Cepa KM71H ANCUT 1 CP crecida en medio YPDA. La colonia seleccionada se indica con una flecha roja.

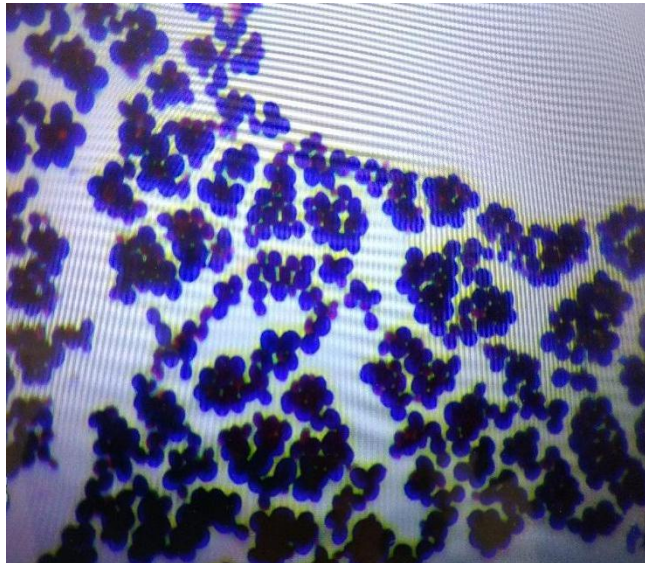


Figura 12. Observación al microscopio de la tinción Gram de una colonia seleccionada de la cepa KM71H ANCUT 1 CP, con un aumento de 100x; se aprecian levaduras con forma ovoide, en algunos casos se puede apreciar la gemación de la levadura.

En un principio se corroboró la presencia de la cutinasa ANCUT 1 CP realizando geles SDS-PAGE además de zimogramas, los resultados se aprecian en la sección 4.3, Figura 15. Posteriormente se realizaron las determinaciones de concentración de inductor e inóculo respectivamente.

- Cinética de crecimiento y producción de la cutinasa ANCUT 1 CP a diferentes concentraciones de metanol en la cepa KM71H ANCUT 1 CP de *P.pastoris*.

En el Gráfico 1 se aprecia que existe disminución en la producción de biomasa conforme se incrementa la concentración del inductor. Esto puede atribuirse a que concentraciones mayores de 2% v/v de metanol pueden ser tóxicas para la levadura empleada (Invitrogen, 2010). El análisis estadístico empleado para cada tiempo establece en todos los casos una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inductor empleada, considerando  $\alpha$  de 0.05 a excepción del tiempo cero. La concentración de inductor a la cual se presenta un mayor crecimiento celular a las 48 y 72 horas fue de 0.5%

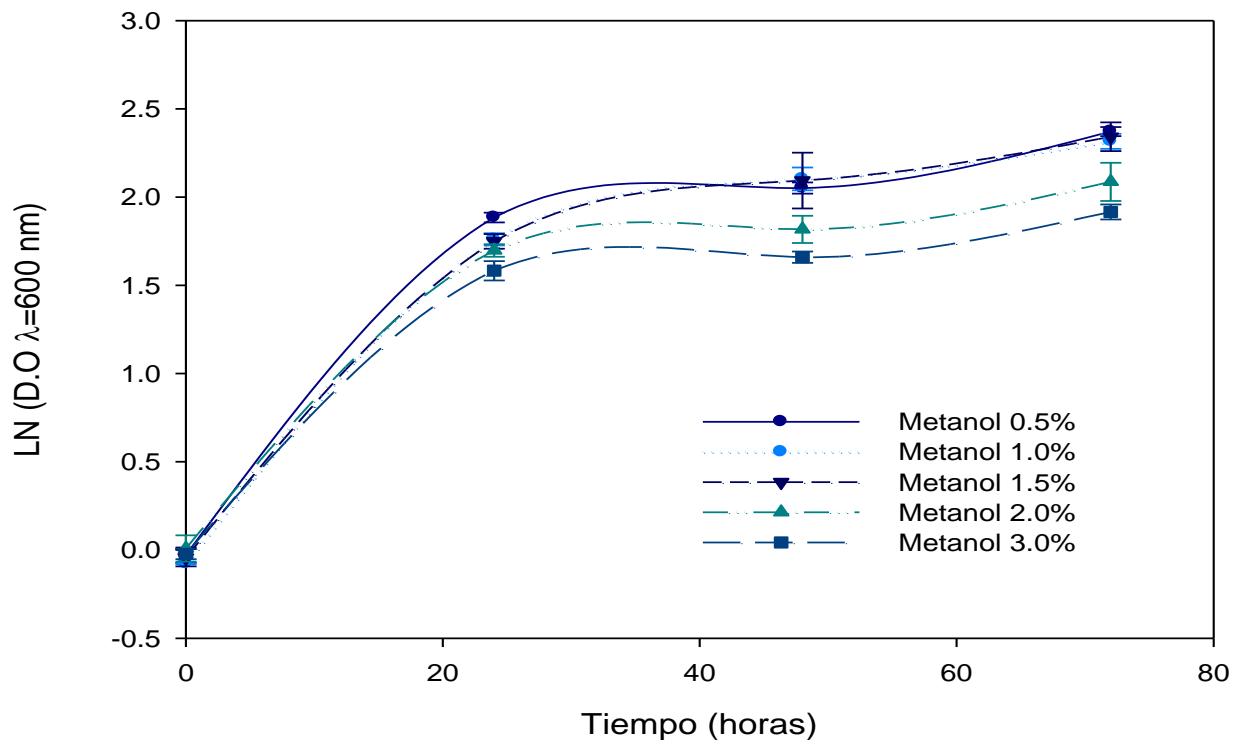


Gráfico 1. Cinética de crecimiento de la cepa KM71H ANCUT 1 a diferentes concentraciones de inductor. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

Por otra parte, Serrano-Rivero *et al.*, (2016) reporta que un exceso de metanol puede llegar a afectar la eficiencia de la transcripción y la actividad metabólica celular; al tener una

menor transcripción se genera una menor traducción, lo que repercute en una menor síntesis de la proteína recombinante, y, por lo tanto, una menor concentración de proteína. Esto puede observarse en el Gráfico 2, al presentarse las concentraciones más bajas de proteína total soluble a los tiempos de 48 y 72 horas con 3.0% y 1.5% de metanol. El análisis estadístico empleado para cada tiempo establece en todos los casos una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inductor empleada, considerando  $\alpha=0.05$ . De acuerdo con el Gráfico 2, 0.5% es la cantidad de inductor a la cual se presenta una mayor concentración de proteína a las 48 horas ( $0.181\pm 0.005$  mg/mL), siendo esta la misma concentración de inductor que presenta una mayor biomasa; esto se atribuye a que un factor importante en la producción de proteínas recombinantes es la biomasa presente (Serrano-Rivero *et al.*, 2016).

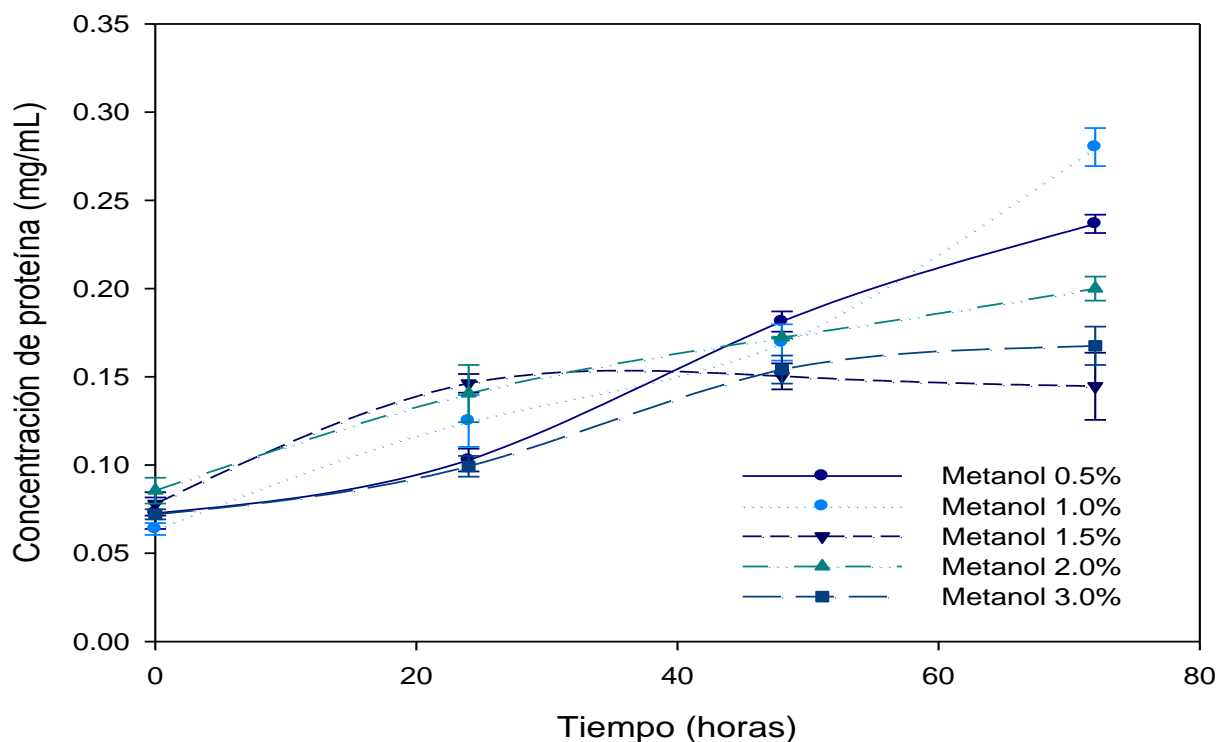


Gráfico 2. Efecto de la concentración de inductor sobre la concentración de proteína total soluble a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. 1 Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

A 0.5 y 1% de inductor se observan las mayores actividades volumétricas a las 48 h ( $188.03 \pm 1.45$  U/mL y  $182.07 \pm 7.11$  U/mL respectivamente) (Gráfico 3). El análisis estadístico empleado para cada tiempo establece, en todos los casos, una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inductor empleada, considerando  $\alpha$  de 0.05. Una variación del pH en el medio de cultivo puede atribuirse a una lisis por un exceso de metanol, generando así un factor que afecta la actividad enzimática, esto se puede observar en las concentraciones de 3.0% y 2.0% a las 48 y 72 horas respectivamente.

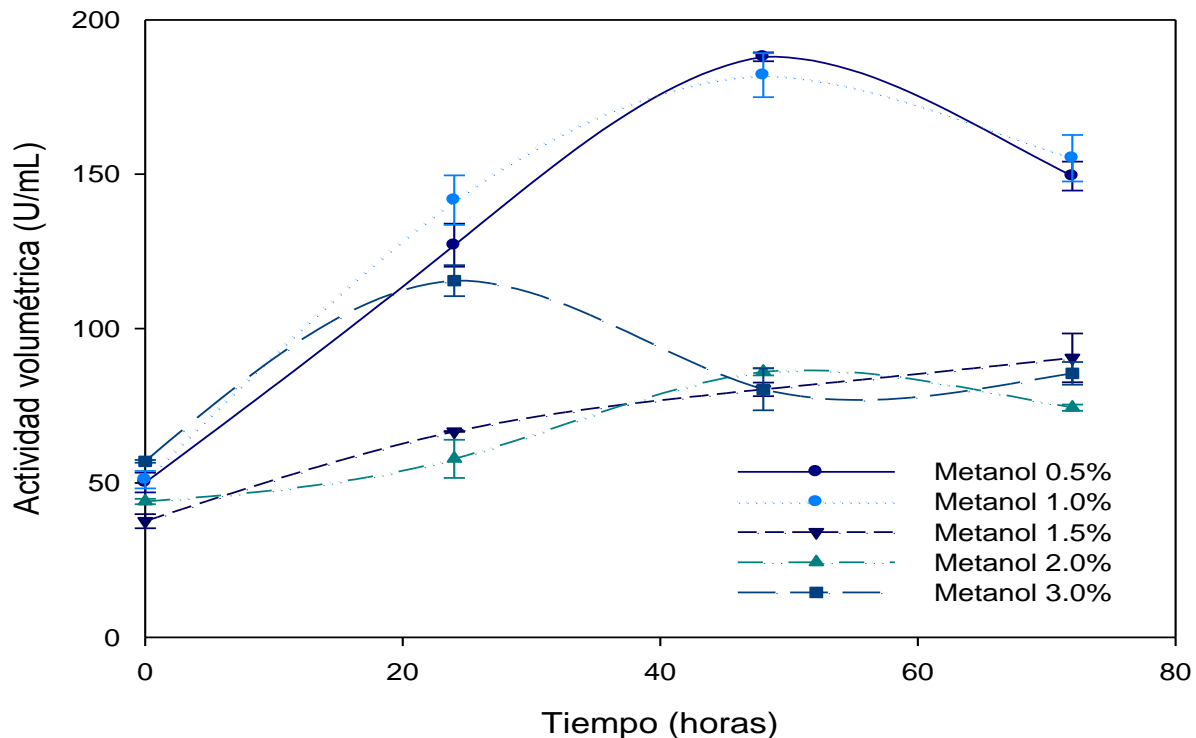


Gráfico 3. Efecto de la concentración de inductor sobre la actividad volumétrica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

El Gráfico 4 presenta las actividades específicas de los ensayos a diferentes tiempos de cultivo. Como puede apreciarse, la concentración a la cual se presenta una mayor actividad específica corresponde a 1.0%, seguida de 0.5% a las 48 horas. El análisis estadístico empleado para cada tiempo establece, en todos los casos, una diferencia

significativa tomando en cuenta la cantidad de inductor empleada, considerando  $\alpha$  de 0.05, este gráfico se correlaciona con el Gráfico 3, ya que estas mismas concentraciones de inductor resultan ser las que generan una mayor actividad volumétrica. Así mismo se aprecia que la actividad específica empieza a descender después de las 48 horas.

Dado lo descrito anteriormente y debido a encontrarse entre los valores más altos de biomasa, concentración de proteína, actividad volumétrica y actividad específica, se determinó que la concentración óptima de inductor para la cepa KM71H ANCUT 1 CP corresponde a 0.5%.

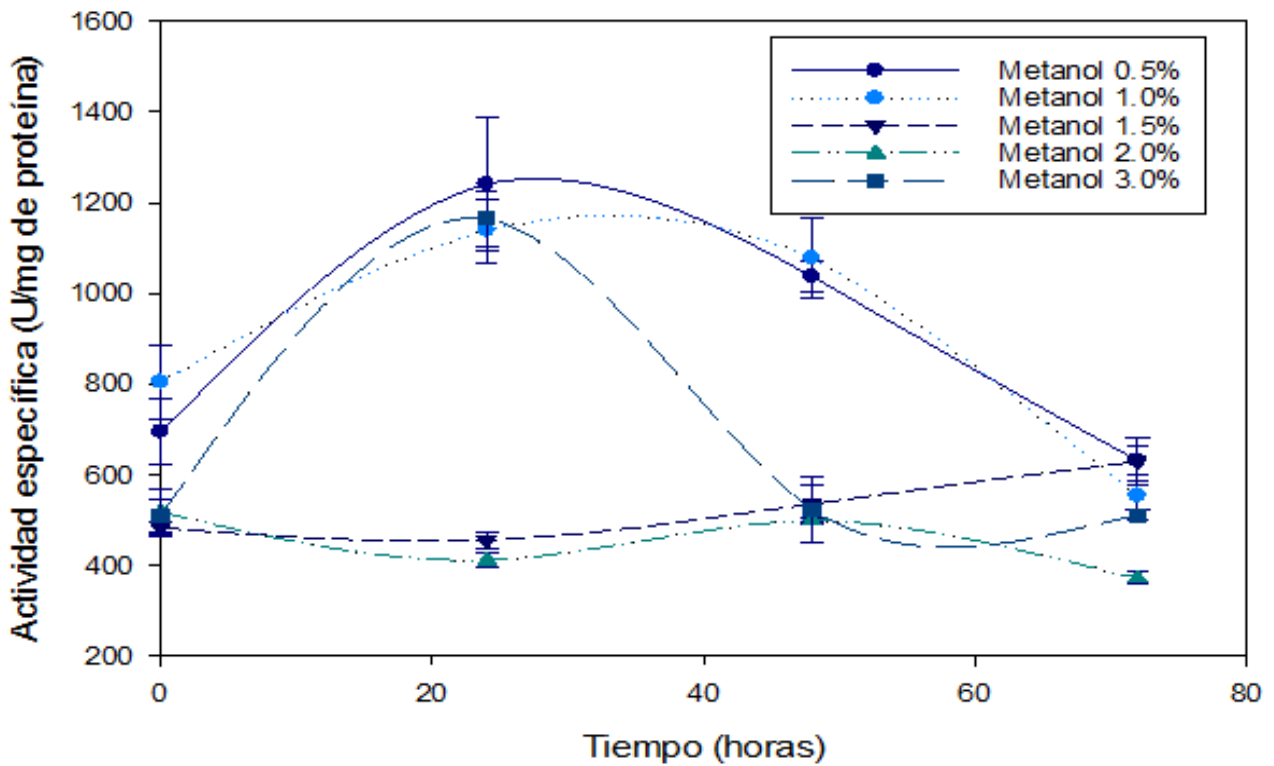


Gráfico 4. Efecto de la concentración de inductor sobre la actividad específica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

- Cinética de crecimiento y producción, con 0.5% de metanol, de la cutinasa ANCUT 1 CP variando las concentraciones de inóculo de la cepa KM71H ANCUT 1 CP de *P. pastoris*.

El Gráfico 5 muestra que en las concentraciones de inóculo 1 y 2 % la pendiente de la fase exponencial no se encuentra tan pronunciada. En el caso de “Todo el Pellet”, la biomasa no aumenta y se mantiene constante; mientras que en las concentraciones de 0.1 y 0.5 % la fase exponencial se prolonga más. El análisis estadístico establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando  $\alpha$  de 0.05. Al ser *P. pastoris* un organismo aeróbico estricto, su crecimiento se da por medio de una vía aeróbica por lo cual el oxígeno debe estar siempre presente en el medio de cultivo para evitar estrés y muerte celular (Cereghino *et al.*, 2002); esta premisa se puede comprobar en el caso de “Todo Pellet”, ya que se puede especular que a esa concentración de inóculo no se está dando un adecuado consumo de oxígeno disuelto en el medio, generando así un leve o incluso nulo crecimiento, también por este mismo motivo se puede suponer se puede observar que en las concentraciones más bajas de inóculo se presenta una fase de crecimiento más pronunciada debido a que se está dando un mejor consumo de oxígeno disuelto en el medio.

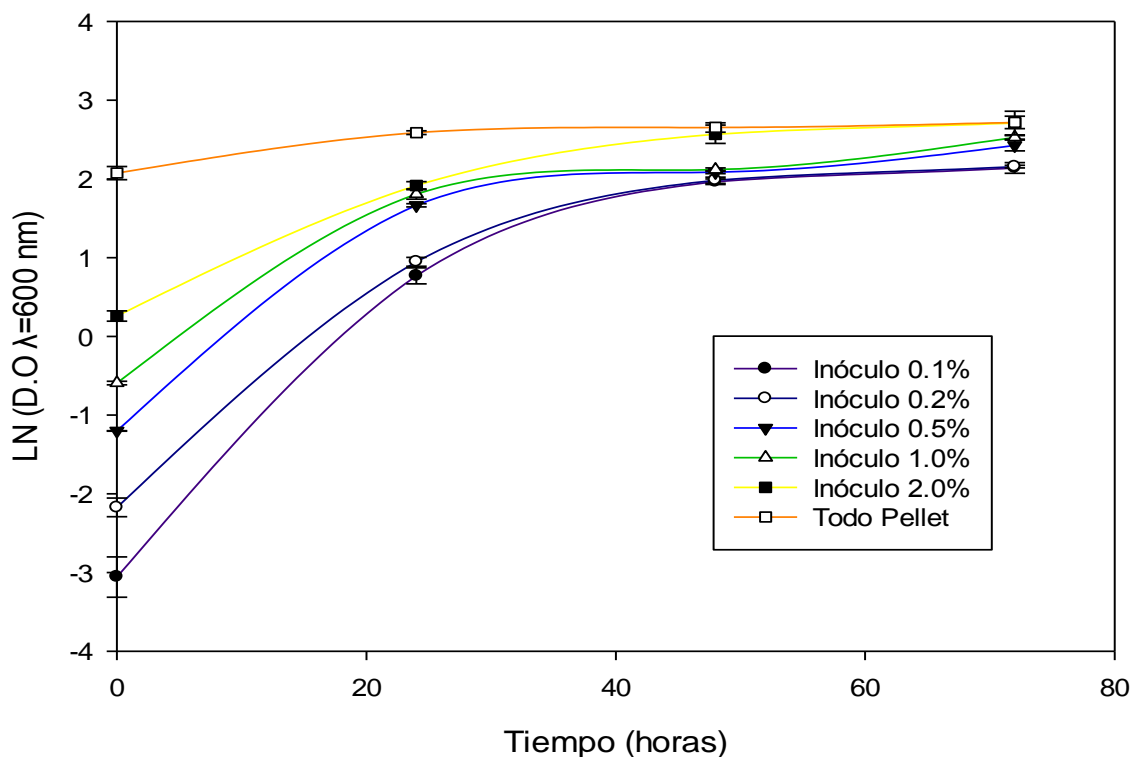


Gráfico 5. Cinética de crecimiento de la cepa KM71H ANCUT 1 a diferentes concentraciones de inóculo, utilizando metanol como fuente de carbono. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

Por otra parte, Jahic *et al.* (2003) establece que un problema significativo en cultivos con alta densidad es que pueda llegar a existir la secreción de proteasas al medio, posiblemente por liberación durante la lisis celular o por un exceso de producción en las vacuolas, en donde su concentración varía de acuerdo con las condiciones nutricionales, resultando en la secreción de estas al citosol y eventualmente al medio de cultivo (Sinha *et al.*, 2005). Este problema se presenta más frecuentemente en cultivos a nivel matraz, debido a que solo en ambientes controlados, como en un biorreactor, se pueden alcanzar altas densidades celulares. Esta premisa se puede apreciar en los Gráficos 5,6 y 7 para los casos de 2.0% y “Todo Pellet” ya que no presenta un notable aumento de biomasa (Gráfico 5) y presenta una menor actividad volumétrica (Gráfico 6) respecto a los otros ensayos. Aunque las proteasas de *P. pastoris* no se encuentran del todo caracterizadas, existen varios informes que establecen una posible degradación de las proteínas recombinantes debido a estas enzimas (Sinha *et al.*, 2005) explicándose así una menor actividad

volumétrica; la presencia este tipo de proteínas puede deberse a una posible muerte celular, la cual puede originarse por factores externos o endógenos (Martinet *et al.*, 1999). Existen tres principales proteasas presentes en *P. pastoris*; la proteinasa A (una aspartil proteasa), proteinasa B y una carboxipeptidasa (Higgins y Cregg, 1998). Algunas acciones sugeridas para disminuir la producción de proteasa y evitar la degradación proteolítica de la proteína recombinante son la adición de inhibidores de la proteasa o el uso de cepas deficientes en proteasas (Sinha *et al.*, 2005).

El análisis estadístico correspondiente al Gráfico 6 establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

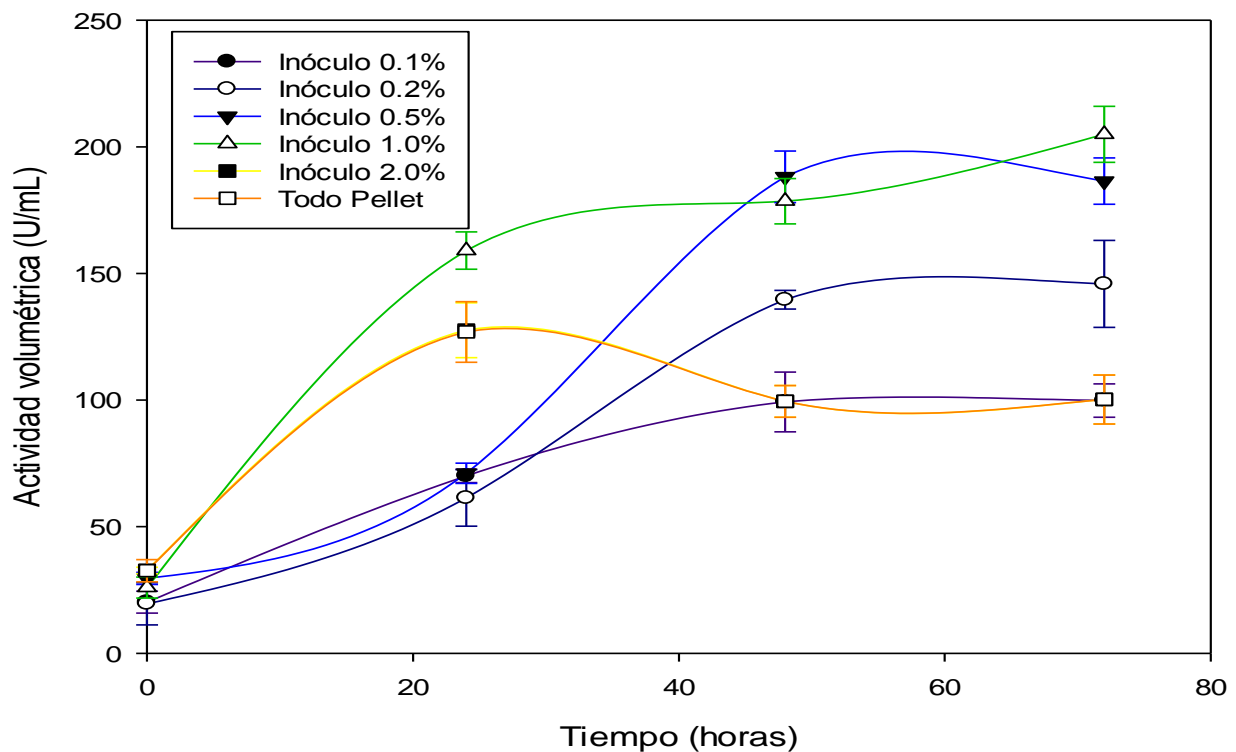


Gráfico 6. Efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad volumétrica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios, de dichos ensayos.



Serrano-Rivero *et al.*, (2016) establece que el metabolismo del metanol en cultivos de alta densidad de *P. pastoris* trae como consecuencia un aumento en la consumo del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, siendo este uno de los factores que influyen tanto en el metabolismo de la levadura como en la producción de las proteínas heterólogas; ya que si las células crecen bajo condiciones limitantes de oxígeno disuelto disminuyen los niveles de producción de la proteína heteróloga; lo cual se puede apreciar en el Gráfico 6, en el caso de “Todo el Pellet”.

En el caso de la concentración de 2.0% se puede apreciar en el Gráfico 7, que esta es la concentración de inductor que presenta una mayor cantidad de proteína a las 48 horas, sin embargo, se puede apreciar en el Gráfico 6, que esta misma concentración presenta una baja actividad volumétrica; esto puede deberse a que se esté dando una acumulación de biomasa lo cual este originado una deficiencia en el consumo de oxígeno ocasionado así una lisis de las células; esta lisis celular puede modificar el pH del medio de cultivo; ocasionando una pérdida de la actividad de la enzima.

El análisis estadístico, para el caso del Gráfico 7 establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

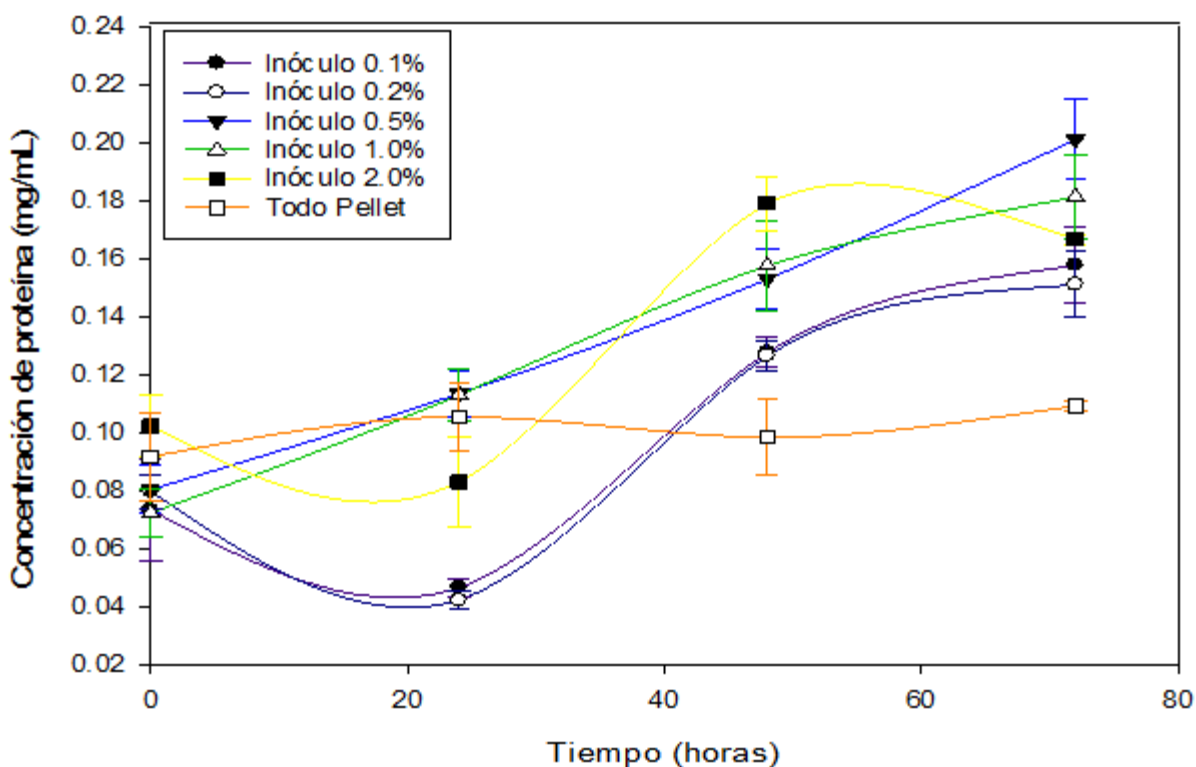


Gráfico 7. Efecto de la concentración de inóculo sobre la concentración de proteína total soluble a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

En el Gráfico 9 se puede apreciar que los valores de las actividades específicas más altos, para todas las concentraciones de inóculo a excepción de la concentración 0.5%, se dan a las 24 horas; así mismo se observa que esta actividad se encuentra en descenso conforme transcurre el tiempo del cultivo; caso contrario de la concentración de 0.5% ya que es la mayor respecto a los otros ensayos para las 48 horas de incubación con  $1237 \pm 145$  U/ mg de proteína.

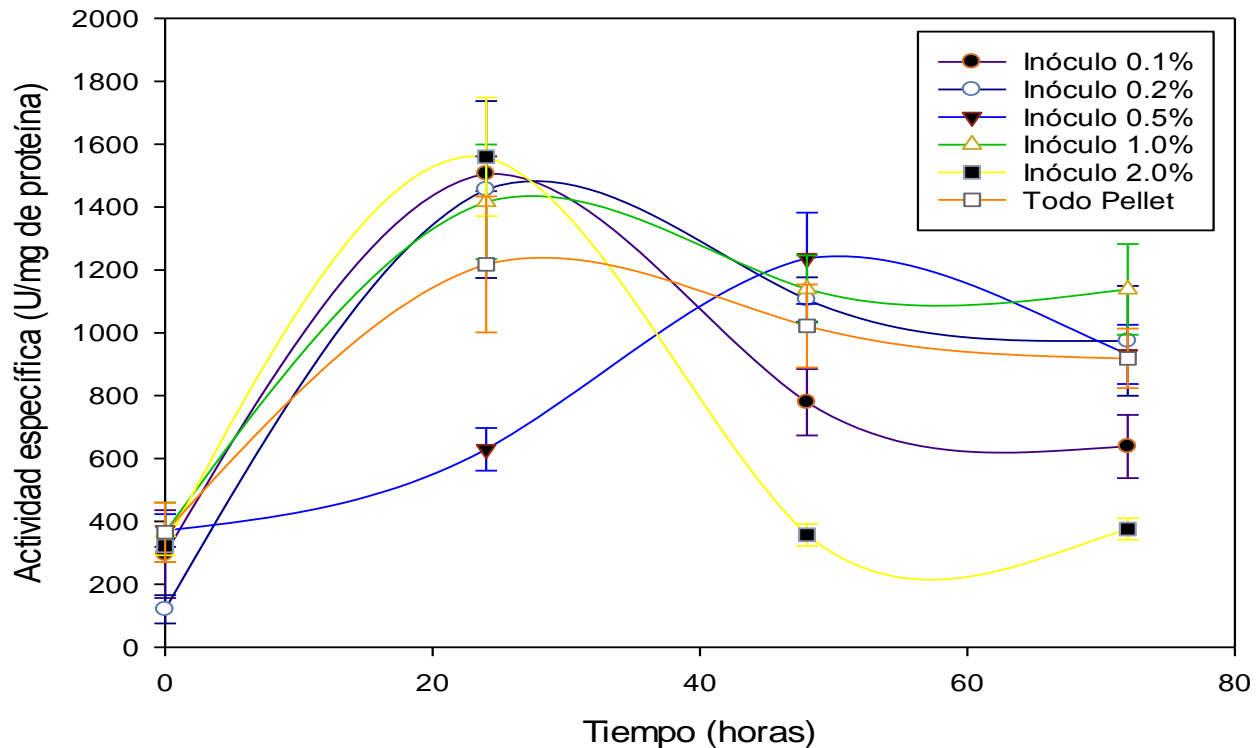


Gráfico 8. Efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad específica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 1 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

Considerando una mayor actividad volumétrica, actividad específica y concentración de proteína (excepto 2.0% y 1.0% de inóculo) se determinó que la concentración idónea de inóculo corresponde a 0.5%.

## 4.2 Resultados de cepa KM71H ANCUT 3 CP

- Propagación y aislamiento de la cepa

Como puede apreciarse en la Figura 13, el banco de trabajo proviene de una cepa aislada y en la tinción al microscopio realizada de la cepa aislada (Figura 14), se puede observar la ausencia de otro tipo de morfologías que no correspondan a la levadura empleada en este estudio, por lo cual se parte de un cultivo puro que no presenta ningún otro tipo de microorganismo.

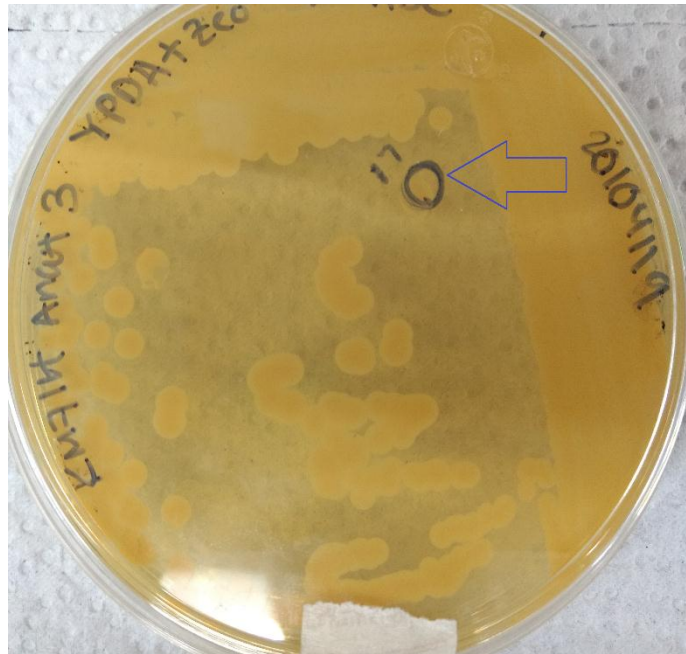


Figura 13. Cepa KM71H ANCUT 3 CP crecida en medio YPDA. La colonia seleccionada se indica con una flecha azul.

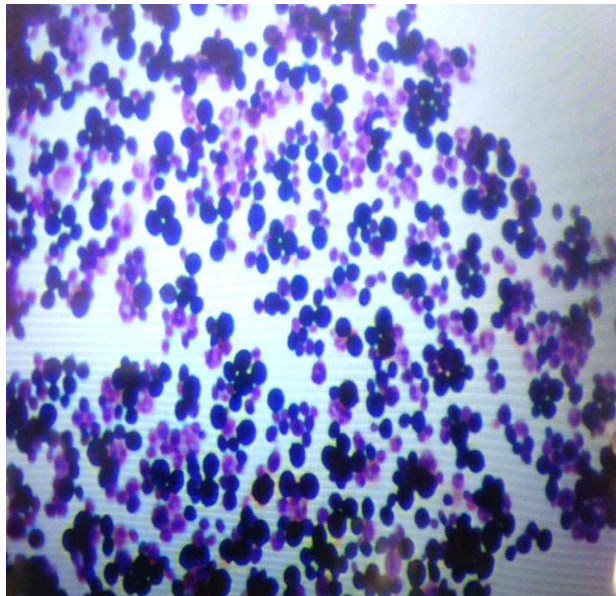


Figura 14. Observación al microscopio de la tinción Gram de colonia seleccionada (cepa KM71H ANCUT 3 CP) con un aumento de 100x; se aprecian levaduras con forma ovoide, en algunos casos se puede apreciar la gemación de la levadura.

En un principio se corroboró la presencia de la cutinasa ANCUT 3 CP realizando geles SDS-PAGE además de zimogramas, los resultados se aprecian en la sección 4.3, Figura 15. Posteriormente se realizaron las determinaciones de concentración de inductor e inóculo respectivamente.

- Cinética de crecimiento y producción de la cutinasa ANCUT 3 CP a diferentes concentraciones de metanol en la cepa KM71H ANCUT 3 CP de *P. pastoris*.

En el Gráfico 9 se aprecia que existe disminución en la producción de biomasa a 3.0% de metanol, como en el caso anterior esto puede deberse a la toxicidad del inductor. El análisis estadístico establece que no existe una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para el tiempo 0, sin embargo, existe una diferencia significativa para los tiempos de 24, 48 y 72 horas, considerando  $\alpha$  de 0.05.

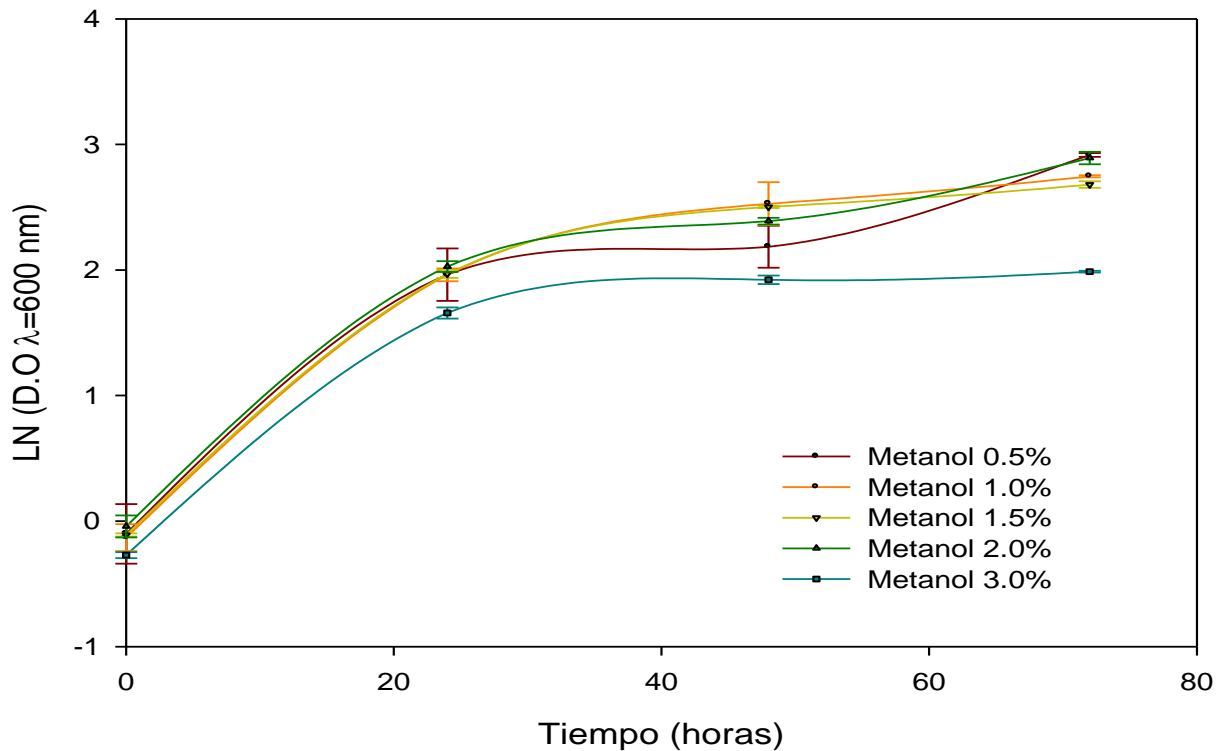


Gráfico 9. Cinética de crecimiento de la cepa KM71H ANCUT 3 CP a diferentes concentraciones de inductor. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

Katakuta *et al.*, 1998 establece que la adición de metanol como inductor durante la producción de proteínas recombinantes es de suma importancia ya que no solo induce la producción de la proteína, sino que también proporciona una fuente de energía para el hospedero. Sin embargo, un exceso de metanol inhibe el crecimiento del hospedero, mientras que una cantidad insuficiente de metanol produce menos energía y por lo tanto una producción de biomasa deficiente. La premisa de un exceso de inductor se puede apreciar en los Gráficos 9 y 10, para la concentración de inductor de 3.0% ya presenta la menor cantidad de biomasa y de actividad volumétrica a las 48 horas. El análisis estadístico empleado establece, en el caso del Gráfico 10, que existe una diferencia significativa considerando  $\alpha$  de 0.05 en todos los tiempos a excepción del tiempo 0.

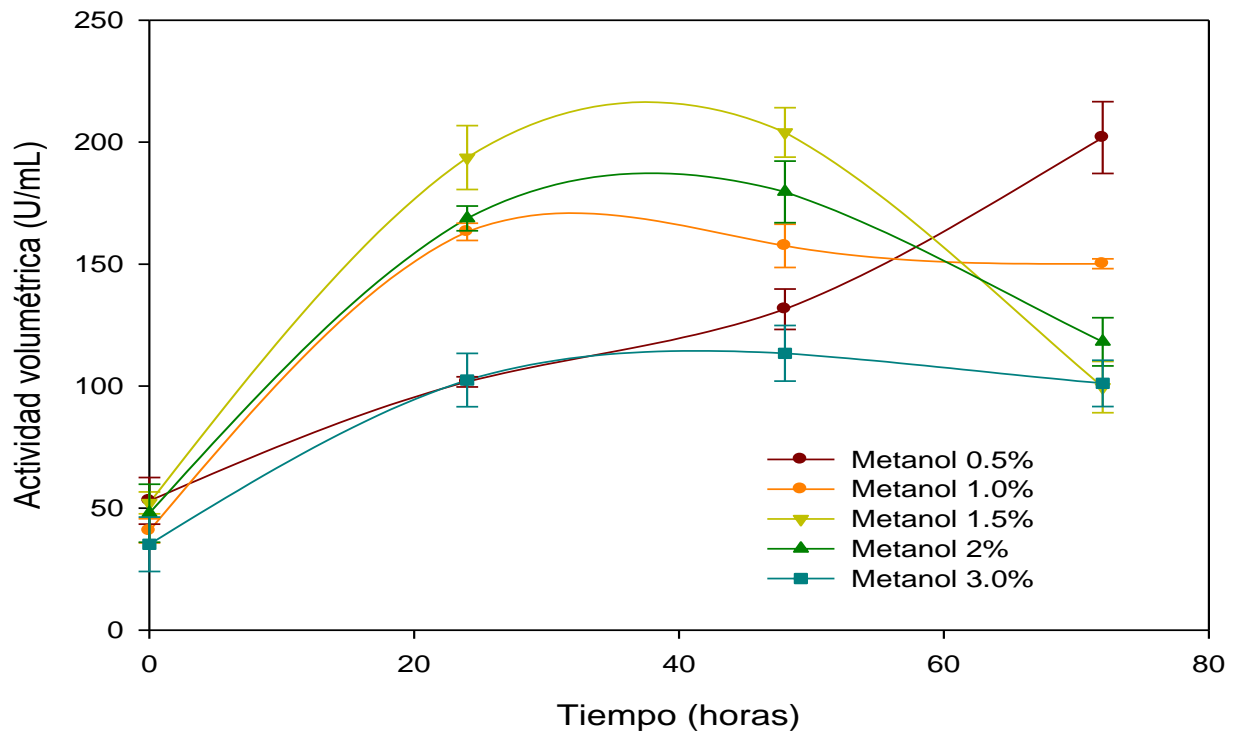


Gráfico 10. Efecto de la concentración de inductor sobre la actividad volumétrica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 3 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

En el Gráfico 10 se puede apreciar que en la mayoría de los casos la actividad volumétrica se incrementa conforme al tiempo, presentándose las mayores actividades volumétricas a las 48 horas en las concentraciones de inductor de 1.5% ( $204 \pm 10$  U/mL) y 2.0% ( $174 \pm 12$  U/mL), sin embargo después de este tiempo tanto la actividad volumétrica como la específica empiezan a descender, a diferencia del Gráfico 11, en donde se observa que después de las 48 horas la cantidad de proteína total soluble aumenta. Esto se puede estar atribuyendo a un aumento en la actividad de proteasas o como tal la presencia de estas dentro del citoplasma y en el medio después de las primeras 48 horas de inducción, siendo la presencia de estas proteínas perjudicial para la producción de las proteínas recombinantes (Sinha *et al.*, 2005). Respecto al análisis estadístico para la concentración de proteína, este indica que existe una diferencia significativa en todos los tiempos excepto 48 h, considerando una  $\alpha$  de 0.05. Para el caso de la actividad volumétrica y específica el

análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa en todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

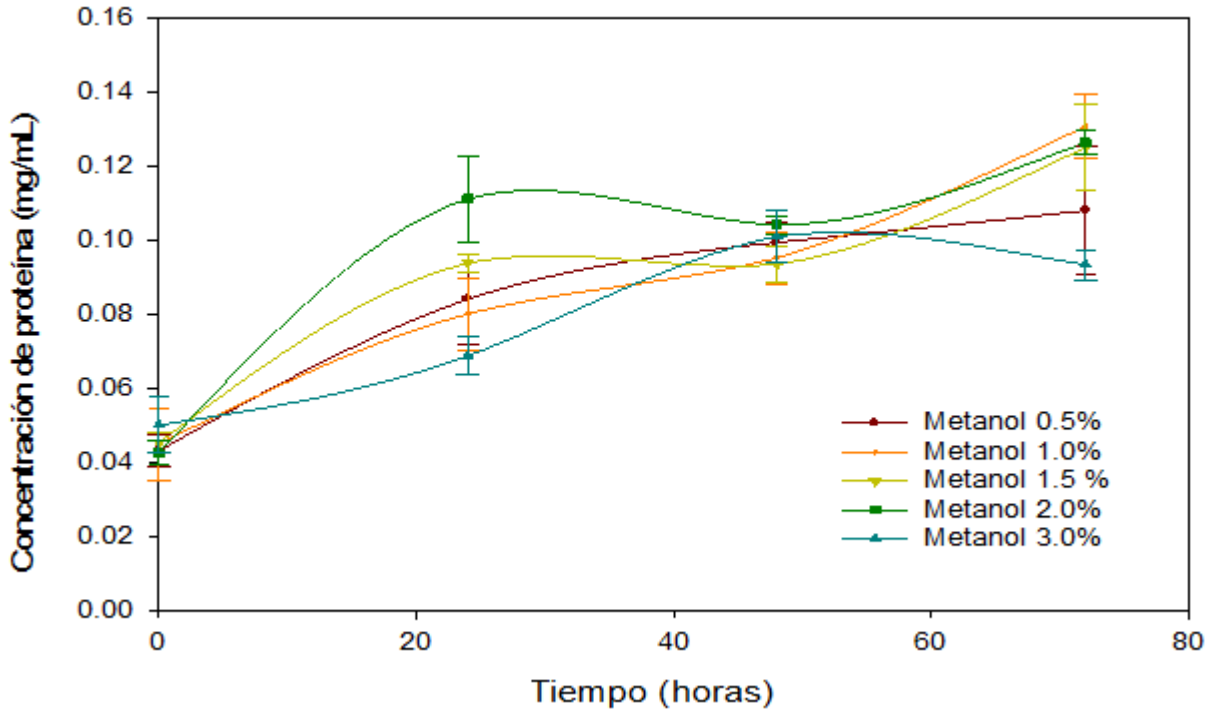


Gráfico 11. Efecto de la concentración de inductor sobre la concentración de proteína total soluble a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 3 CP. 1 Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

En el caso de la concentración de 0.5%, se puede observar tanto el Gráfico 10 como en el Gráfico 12 que después de las 48 horas de cultivo la actividad volumétrica y la actividad específica se encuentran en aumento, específicamente en el Gráfico 10 se puede apreciar que incluso el valor obtenido a las 72 horas en la concentración 0.5% de metanol es muy similar al obtenido a las 48 horas con una concentración de 1.5% de inductor; esto puede deberse a que a de las 48 a las 72 horas de cultivo la concentración de 0.5% presenta una segunda fase exponencial (Gráfico 9), llenado a valores de biomasa semejantes, produciéndose la enzima recombinante de interés en esa fase.

Por lo descrito anteriormente se estableció una concentración de inductor óptima de 1.5%, ya que presenta los más altos valores de biomasa, actividad volumétrica, actividad específica en un menor tiempo, a comparación de la concentración de 0.5%, y no tiene una



diferencia significativa de concentración de proteína total soluble respecto a las otras concentraciones de inductor empleadas.

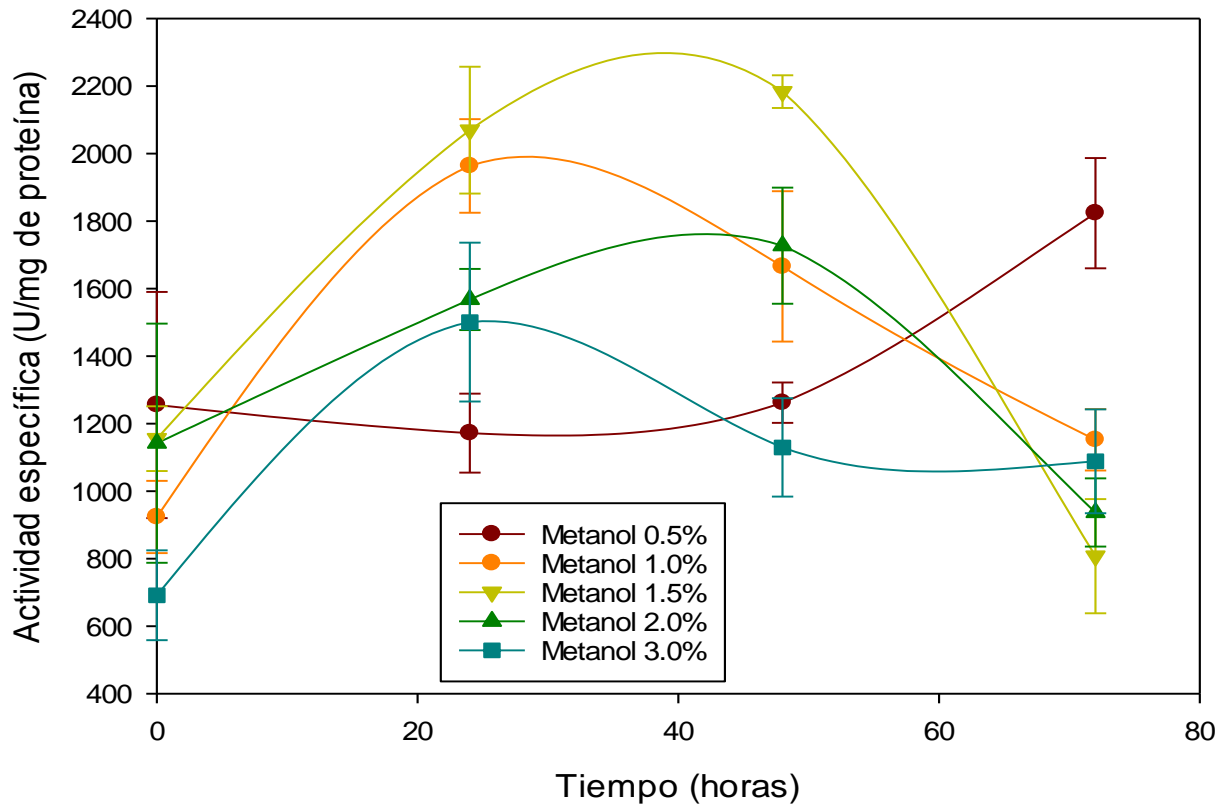


Gráfico 12. Efecto de la concentración de inductor sobre la actividad específica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 3 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

- Cinética de crecimiento y producción, con 1.5% de metanol, de la cutinasa ANCUT 3 CP variando las concentraciones de inóculo de la cepa KM71H ANCUT 3 CP de *P. pastoris*.

En el Gráfico 13 se puede observar que en el caso de “Todo Pellet” la biomasa no presenta un aumento significativo y se mantiene constante en una continua fase estacionaria como ocurrió con la cepa KM71H ANCUT 1 CP, lo cual puede estar debiendo a que el metabolismo del metanol en cultivos con alta densidad trae como consecuencia un aumento en el consumo de oxígeno disuelto en el medio de cultivo ocasionando los

mencionado anteriormente en la discusión de la cepa KM71H ANCUT 1 CP; esto se puede corroborar en el Gráfico 14 y 15, ya que este ensayo presenta una de las más bajas actividades volumétricas y concentración de proteína total soluble.

En el caso de las concentraciones de inóculo de 0.5% y 1.0% la fase exponencial se prolonga más, sin embargo en las concentraciones de 0.1% y 0.2% de inóculo la pendiente de la fase exponencial es más pronunciada en comparación con las de 0.5% y 1.0%. El análisis estadístico establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

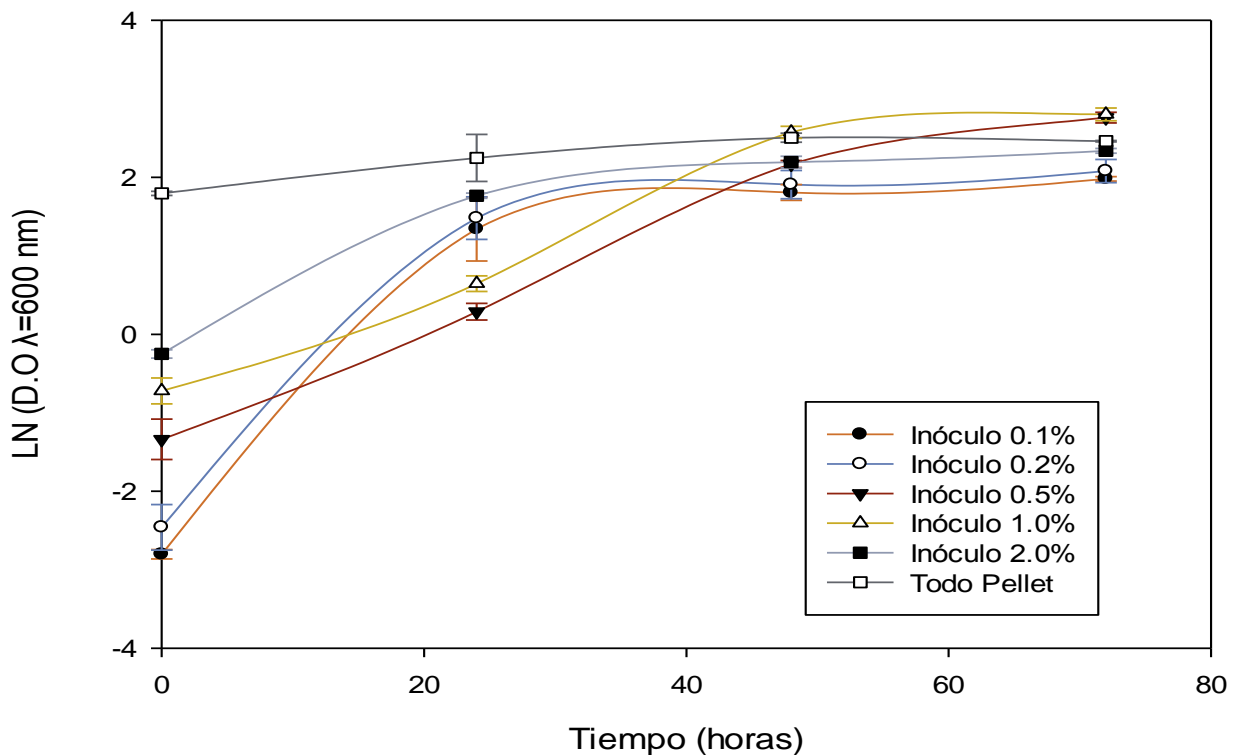


Gráfico 13. Cinética de crecimiento de la cepa KM71H ANCUT 3 CP a diferentes concentraciones de inóculo, utilizando metanol como fuente de carbono. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

En el Gráfico 14 se puede observar cómo varía la actividad volumétrica respecto al tiempo para las concentraciones de inóculo empleadas. En el tiempo de 48 horas, el ensayo que presenta una mayor actividad volumétrica es el de 2.0%. En el caso de las concentraciones

de 0.1% y 0.2% se puede observar que conforme avanza el tiempo de cultivo, la actividad volumétrica y la concentración de proteína (Gráfico 15) se encuentra en aumento; esto pudiera deberse a que en las primeras horas de cultivo la cantidad del metanol suministrado puede encontrarse en una cantidad excesiva, respecto a la cantidad de biomasa presente, dando como resultado una deficiente producción de la proteína de interés. El análisis estadístico establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

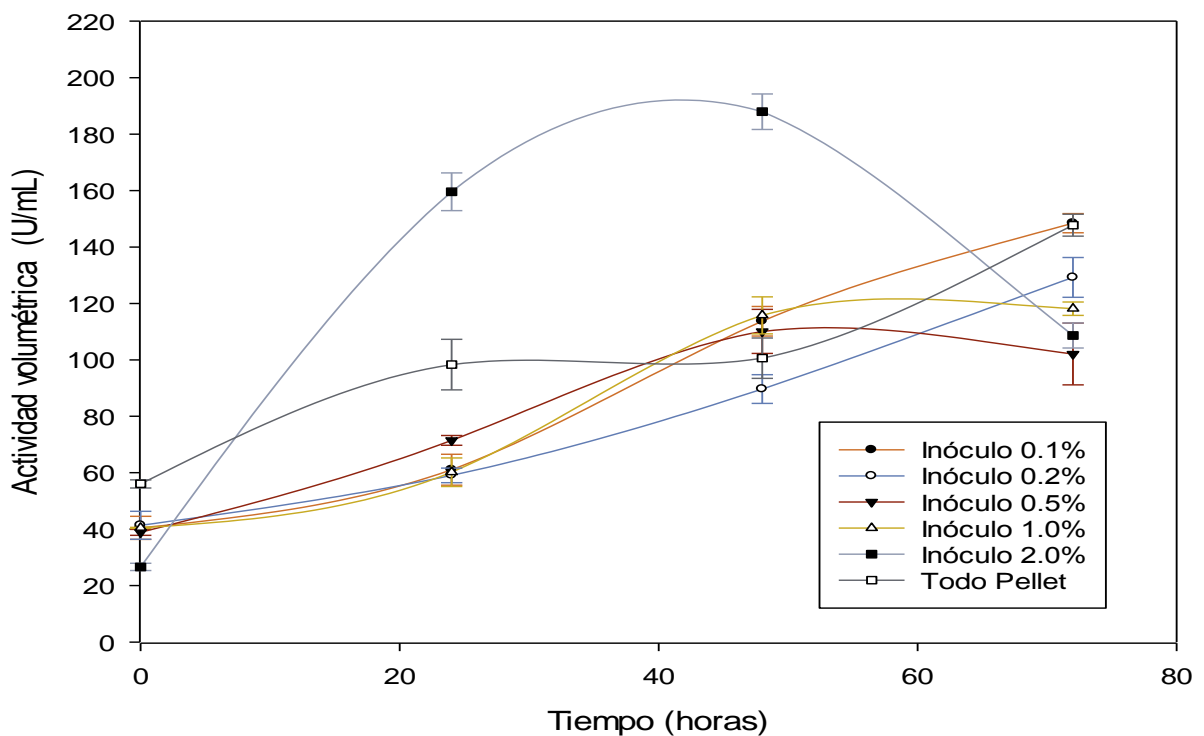


Gráfico 14. Efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad volumétrica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 3 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios, de dichos ensayos.

Respecto al Gráfico 15, la cantidad de inóculo que presenta una mayor cantidad de proteína corresponde a 2.0%, seguida de 0.1%, 0.2%. Una alta concentración de proteína y una baja actividad volumétrica puede estar debido a una deficiencia en el plegamiento de la proteína recombinante ya que como se aprecia en el Gráfico 13, en estas dos concentraciones de inóculo (0.1% y 0.2%) la fase logarítmica se da en un menor tiempo a comparación a otros ensayos, por lo que la síntesis de la proteína es más rápida, dando

como resultado un menor tiempo para que las cadenas de péptidos nacientes se plieguen correctamente. El análisis estadístico establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

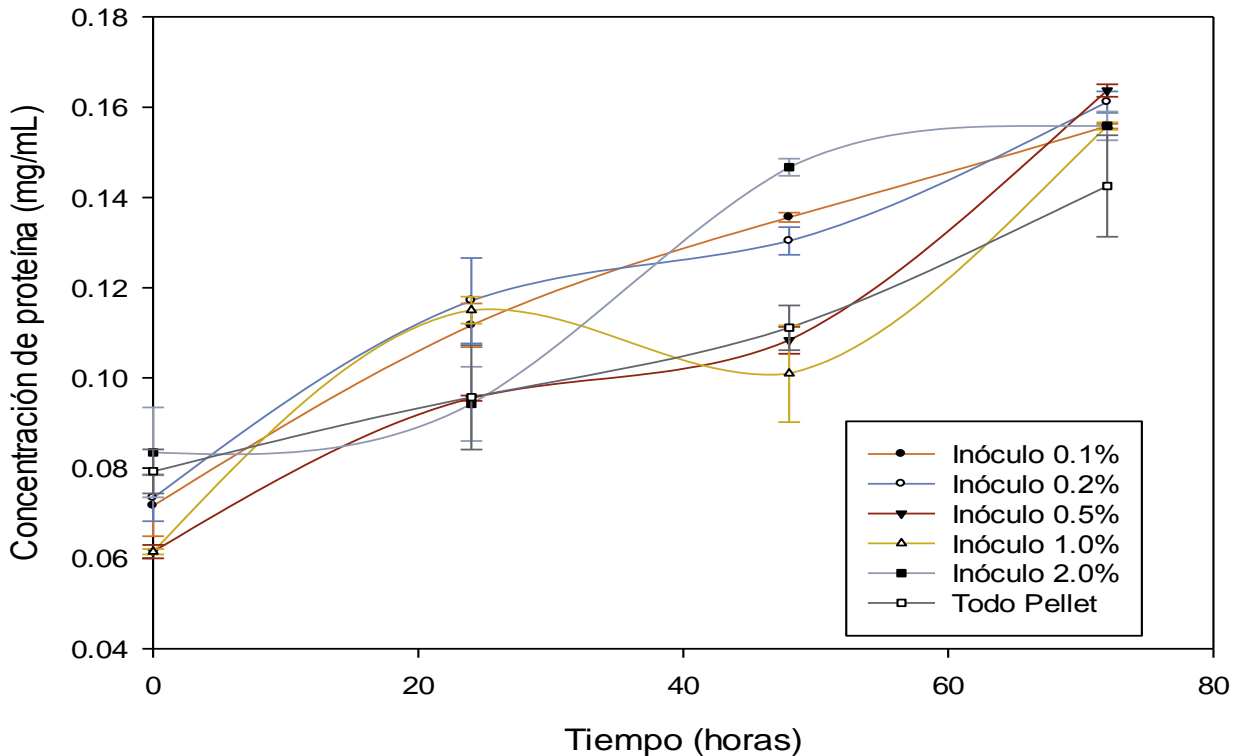


Gráfico 15. Efecto de la concentración de inóculo sobre la concentración de proteína total soluble a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H AN CUT 3 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

Para el Gráfico 16, se aprecia que la concentración de 2.0% de inóculo es aquella que presenta el valor más alto de actividad específica, seguido de las concentraciones de 1.0% y 0.5%. En el caso de estas últimas, aunque producen una menor cantidad de proteína (Gráfico 15) presentan una mayor actividad volumétrica (Gráfico 14) por ello la actividad específica aumenta, ya que la actividad específica se define el cociente de la actividad volumétrica respecto a la cantidad de proteína. El análisis estadístico establece una diferencia significativa tomando en cuenta la cantidad de inóculo empleada para todos los tiempos, considerando una  $\alpha$  de 0.05.

Debido a que la concentración de inóculo de 2.0%, presenta los más actividad volumétrica, proteína total soluble y actividad específica las 48 horas respecto a las otras concentraciones de inductor empleadas, se determinó esta concentración como la óptima.

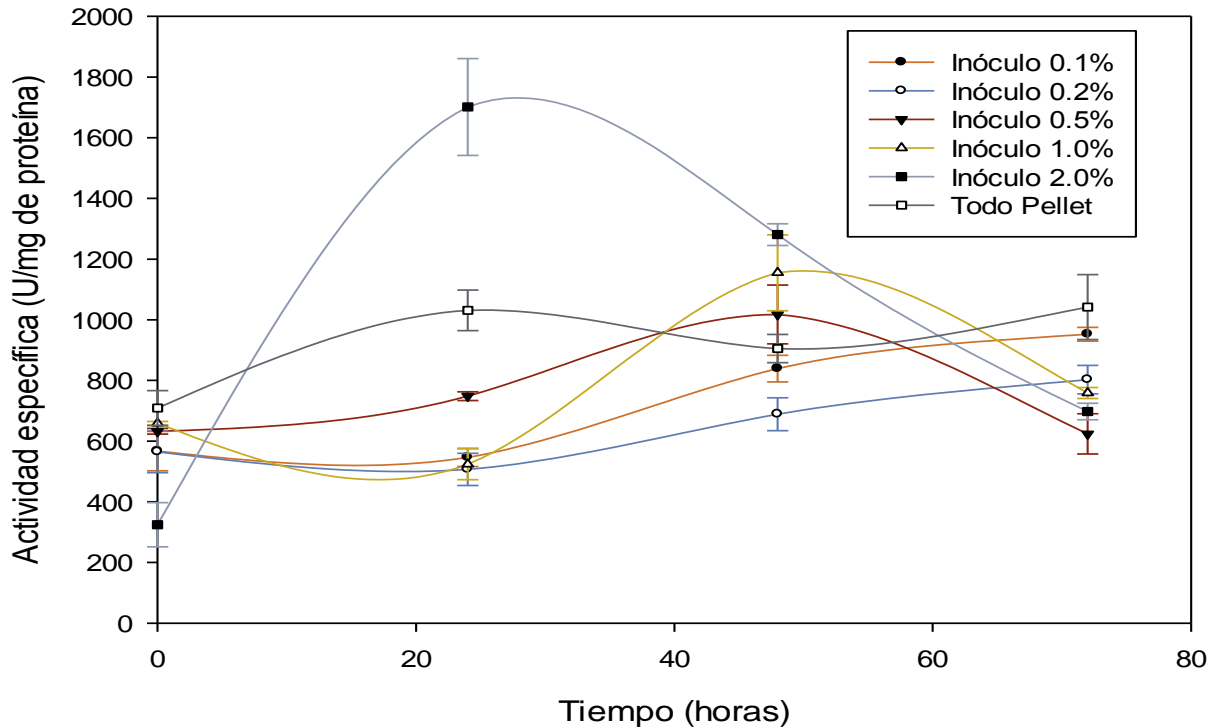


Gráfico 16. Efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad específica a diferentes tiempos del cultivo para la cepa KM71H ANCUT 3 CP. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los promedios de dichos ensayos.

#### 4.3 Perfiles de proteínas e identificación de enzimas con actividad cutinasa

Con el fin de corroborar la presencia de la enzima de interés, se realizaron geles SDS-PAGE además de zimogramas (Figura 15). Tanto para la muestra de la cepa KM71H ANCUT 1 CP como para la muestra KM71H ANCUT 3 CP se puede apreciar la presencia de 4 bandas de actividad (Zimograma) con distinto peso molecular. Esto puede deberse a que se están presentando diversas conformaciones de la enzima de interés, y todas tienen actividad. Brettahaver *et al.* (1999) establece que la adición de oligosacáridos a las proteínas permite modificar sus propiedades fisicoquímicas, ya que la glicosilación

representa un cambio significativo en el tamaño, carga e hidrofobicidad de una proteína y por lo tanto puede influir sobre propiedades como la solubilidad, viscosidad y estructura terciaria. La adición de oligosacáridos también puede llegar a modificar la secreción y el transporte intracelular de la proteína (Mendelzon, 1986). Las diversas conformaciones se pueden atribuir a una posible glicosilación de la proteína recombinante ya que al agregarse oligosacáridos a la estructura de la proteína su tamaño se ve modificado.

Santos *et al.* (2008) establece que *P. pastoris* siendo empleada como sistema de expresión puede llegar a producir patrones de glicosilaciones como son la N-glicosilación y la O-glicosilación. La N-glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que se produce en los sistemas de expresión de levaduras y desempeña una variedad de funciones relacionadas con la secreción de proteínas, su plegamiento y su estabilidad (Wang *et al.*, 2020). Consiste principalmente en la transferencia de un oligosacárido al átomo N de la cadena lateral del aminoácido de asparagina (Asn), obteniéndose un oligosacárido precursor (Glc3Man9GlcNAc2), este sufre posteriormente diversas modificaciones en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, las que dependen del tipo de organismo (Arias, 2012). Para este tipo de glicosilación la secuencia de aminoácidos consecutivos que puede servir como sitio de unión de un polisacárido (sequón) se compone de Asn-Xa-Ser ó Asn-Xaa-Thr, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina. La posición del sequón en relación con su cercanía a la C-terminal es un factor decisivo para la glicosilación; ya que se ha observado que los sequones que se encuentra más cerca de la N-terminal son propensos a ser glicosilados (Kangwa *et al.*, 2018). En el caso de la O-glicosilación, esta comienza en el aparato de Golgi con la unión de la N-acetilglucosamina (GalNAc) o manosa a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr). En el caso de *P. pastoris* los oligosacáridos se adicionan a la proteína secretada a partir de un residuo de manosa que luego es extendido por la adición de otros residuos de  $\alpha$ -1,2 manosa y finalmente protegido con una  $\beta$ -O fosfomanosa (Santos *et al.*, 2008).

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican tanto para las cutinasas AN CUT 1 como para la AN CUT 3 por medio del servidor ExPASy Translate (Bioinformatics Resource Portal). Posteriormente la secuencia de aminoácidos se analizó para encontrar posibles sitios de N- y O-glicosilación

mediante los servidores NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0 Server (Technical University of Denmark) respectivamente. Los resultados obtenidos de estos servidores indican que en el caso de la cutinasa ANCUT 1 de la cepa KM71H CP no presenta posibles sitios de N- o de O-glicosilaciones; sin embargo, al realizar el análisis de las posibles Asn que pueden encontrarse glicosiladas, por medio del servidor NetNGlyc 1.0, se encontraron 6 posibles Asn susceptibles a la glicosilación (Anexo VII). Gavel and von Heijne (1990) y Luke (2012) establecen que algunas proteínas glicosiladas, no contienen la secuencia consenso del sequón Asn-Xaa-Thr / Ser alrededor de la Asn glicosilada, por lo que la presencia de este sequón, puede no ser necesaria ni implica glicosilación; como es el caso del factor de Von Willebrand humano y la proteína C humana, en donde la Asn glicosilada se encuentra en la secuencia Asn-Xaa-Cys. Otros ejemplos de secuencias en donde se han encontrado glicosilaciones son Asn-Xaa-Val y Asn-Gly. Por otro lado, la cutinasa ANCUT 3 no presenta posibles sitios de N-glicosilación, pero sí presenta 4 posibles sitios de O-glicosilación en las posiciones 6 (Ser), 8 (Thr), 17(Ser) y 182 (Ser) por lo que para esta enzima las cuatro bandas que se observan en el gel pueden corresponder a una O-glicosilación, pudiendo estar todos los sitios glicosilados o solamente uno con una diferencia en la cadena del oligosacárido unido. Al analizar las posibles Asn que pueden glicosilarse, por medio del servidor NetNGlyc 1.0, se encontraron 8 Asn susceptibles a la glicosilación (Anexo VII).

En el caso del perfil de proteínas, en éste se pueden apreciar, entre todas las bandas, las correspondientes a las mostradas en el zimograma para ambas muestras. Sin embargo, se tiene diferencias entre 0.3 y 2.3 kDa, esto puede atribuirse a una desviación en la migración de la proteína. De manera general, la migración de las proteínas se puede ver principalmente afectada por la fuerza del campo eléctrico aplicado, la temperatura, la carga neta de la molécula, tamaño y forma de esta (Yábar, 2003).

De manera general, los pesos moleculares observados, tanto en el perfil de proteínas y el zimograma se encuentran en el intervalo de peso molecular reportado para las cutinasas, ya que estas enzimas oscilan entre 20 y 35 kDa (Chen *et al.*, 2010; Egmond y De Vlieg, 2000).

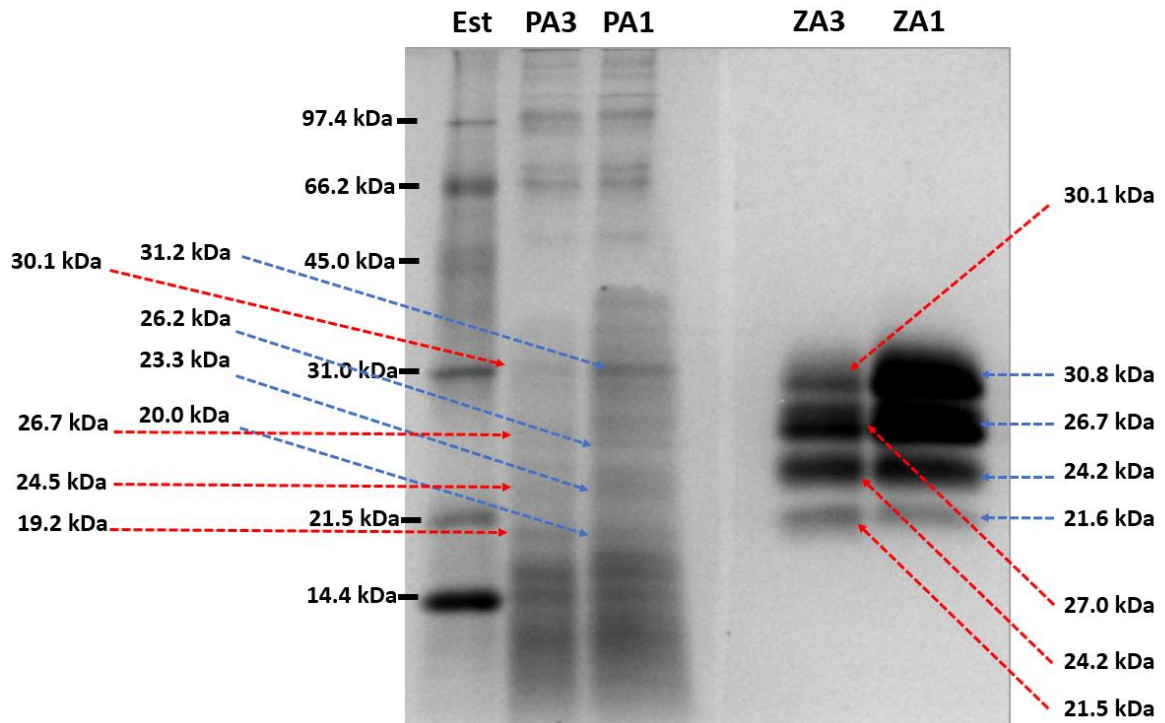


Figura 15. Perfil de proteínas (lado izquierdo) y zimograma (lado derecho) de las cutinasas provenientes de las cepas KM71H ANCUT 1 Y KM71H ANCUT 3 CP, mostrándose sus respectivos pesos moleculares. Se muestra el estándar empleado (Est), el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 1 (PA1) CP, el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 3 (PA3) CP, el zimograma correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 1 (ZA1) CP, el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 3 (ZA3) CP.

#### 4.4 Comparación entre las distintas cepas de *P. pastoris* productoras de las cutinasas recombinantes ANCUT 1 y ANCUT 3.

- Comparación de la cepa *P. pastoris* KM71H ANCUT 1 CP respecto a la cepa KM71H ANCUT 3 CP

Como puede apreciarse en la Tabla 5 la cepa KM71H ANCUT1 CP responde mejor a las concentraciones más bajas de inductor (realizando la comparación por pares dentro de cada concentración) en comparación a la cepa KM71H ANCUT3 CP, ya que en presenta una actividad volumétrica mayor para las concentraciones de metanol de 0.5% y 1.0% de 1.38 y 1.16 veces respectivamente en comparación a la cepa KM71H ANCUT 3 en esas



mismas concentraciones. La cepa KM71H ANCUT 3 CP presenta los valores más altos de actividad específica en comparación a la cepa KM71H ANCUT 1 en las concentraciones de inductor más elevadas, ya que su actividad volumétrica, es mayor 2.55, 2.02 y 1.41 veces para las concentraciones de 1.5%, 2.0% y 3.0% respectivamente. Por otro lado, se puede observar que la cepa KM71H ANCUT 1 CP requiere de una menor cantidad de metanol para obtener valores semejantes a los obtenidos por KM71H ANCUT 3 CP, esto se puede observar en el caso de la actividad volumétrica en la cepa KM71H ANCUT 1 CP a 0.5% de metanol y la cepa KM71H ANCUT 3 CP con una concentración de 2.0%, ya que prácticamente son los mismos valores considerando su desviación.

Respecto a las concentraciones de metanol de 1.5% y 2.0% se puede apreciar que, aunque la cepa KM71H ANCUT 3 CP tiene una mayor cantidad de biomasa, presenta una menor concentración de proteína; en comparación a la cepa KM71H ANCUT 1 CP esto puede deber a que esta cepa se encuentre en un estado de estrés oxidativo. Edwards-Jones *et al.* (2005) establecen que el estrés oxidativo se asocia con altas concentraciones de metanol; este puede provocar una lisis celular, una proteólisis de la proteína de interés y la liberación de otras proteínas nativas (García-Ortega *et al.*, 2019). Además, el estrés oxidativo genera una disminución en la velocidad de crecimiento del microorganismo; estos dos factores explican por qué en estas concentraciones de metanol la cepa KM71H ANCUT 1 presenta una alta cantidad de proteína respecto a la cantidad de biomasa presente.

En el caso de la productividad volumétrica para las concentraciones de 1.5%, 2.0% y 3.0% (realizando la comparación por pares, dentro de cada concentración) ésta es mayor 2.55, 2.02 y 1.41 respectivamente a las concentraciones anteriormente mencionadas para la cepa KM71. En los parámetros de biomasa y actividad específica, en todas las concentraciones de inductor los valores son mayores para la cepa KM71H ANCUT 3 CP respecto a la cepa KM71H ANCUT 1 CP.

Considerando las concentraciones de inductor en las cuales se presentan los valores más elevados, 0.5% para la cepa KM71H ANCUT 1 CP y 1.5% para la cepa KM71H ANCUT 3 CP; la cepa KM71H ANCUT 3 CP presenta una cantidad de biomasa y actividad específica 1.57 y 2.11 mayores, respectivamente, en comparación a la cepa KM71H ANCUT1 CP. La

diferencia de la concentración de inductor óptima para la obtención de la proteína heteróloga entre ambas clonas se puede atribuir a que, a pesar de las dos posean el mismo fenotipo, la secuencia y conformación de la proteína expresada afectan el resultado. Serrano-Rivero *et al.*, (2016) establece que es importante tener en consideración que existe una concentración óptima de metanol para cada tipo de proteína heteróloga; la cual varía en un rango de 0.1% a 3.0%, en el que se localizaron las concentraciones óptimas de inductor.

Tabla 5. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 CP Y KM71H ANCUT 3 CP, respecto a la cantidad de inductor.

	Metanol 0.5%		Metanol 1.0%		Metanol 1.5%		Metanol 2.0%		Metanol 3.0 %	
	KM71H ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP	KM71H ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP	KM71H ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP	KM71H ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP	KM71H ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP
<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	188 ±1	131 ±8	182 ±7	157 ±9	80 ±2	204 ±10	86 ±1	174 ±12	80 ±7	113 ±11
<b>Densidad óptica</b>	7.78±0.24	8.9±1.6	8.2±0.52	12.64±0.2	8.19±1.4	12.2±0.1	6.17±0.47	10.90±0.3	5.19±0.17	6.8±0.23
<b>Proteína (mg/mL)</b>	0.181±0.005	0.099±0.005	0.170 ±0.010	0.095 ±0.007	0.150 ±0.007	0.093±0.004	0.172±0.001	0.104±0.004	0.154±0.004	0.093 ±0.004
<b>Actividad específica (U/mg proteína)</b>	1037 ±33	1261 ±58	1077 ±87	1665 ±222	535 ±41	2184 ±48	499 ±7	1721 ±172	523 ±70	1129 ±145
<b>Qp (U/Lh)</b>	3917 ±21	2729 ±167	3792 ±146	3271 ±189	1667 ±42	4250 ±208	1792 ±21	3625 ±250	1667 ±146	2354 ±229

Datos de las 48 h de inducción con una concentración de inóculo inicial de una D.O en todos los casos.

Como se observa en al Tabla 6, en la concentración de inductor de 0.1% tanto la cepa KM71H ANCUT CP como la cepa KM71H ANCUT 1 CP presentan valores muy similares de actividad volumétrica, densidad óptica, concentración de proteína y actividad específica; sin embargo, en las concentraciones de 0.2% y 0.5% la cepa KM71H ANCUT 1 CP presenta los valores más altos en todos casos a excepción de los parámetros de proteína y densidad óptica respectivamente. Respecto a la concentración de 2.0% la cepa KM71H

ANCUT 3 CP presenta valores superiores a la cepa KM71H ANUT 1 CP en los todos los parámetros excepto densidad óptica.

Considerando la concentración de inóculo a la cual se presentan los mayores valores para cada una de las cepas 0.5% (KM71H ANUT 1 CP) y 2.0% (KM71H ANUT 3 CP), se puede observar en la Tabla 6 que los valores de todos los parámetros son similares entre sí (considerando sus desviaciones estándar).

Tabla 6. Comparación de las cepas KM71H ANUT 1 CP Y KM71H ANUT 3 CP, respecto a la cantidad de inóculo empleada para la inducción, considerando la cantidad de inductor idónea para cada cepa.

	INÓCULO 0.1%		INÓCULO 0.2%		INÓCULO 0.5%		INÓCULO 1.0%		INÓCULO 2.0%		TODO PELLET	
	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP	KM71H ANUT 1 CP	KM71H ANUT 3 CP
<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	99 ±12	114 ±5	140 ±4	90 ±5	188 ±10	110 ±8	179 ±9	116 ±7	99 ±6	189 ±6	99 ±6	101 ±7
<b>Densidad óptica</b>	7.14 ±0.03	6.10 ±0.44	7.27 ±0.29	6.8 ±1.13	8.06 ±0.16	8.76 ±0.1	8.32 ±0.18	13.15 ±0.98	13.10 ±1.47	8.99 ±0.66	14.23 ±0.86	12.25 ±0.55
<b>Proteína (mg/mL)</b>	0.128 ± 0.005	0.136 ± 0.001	0.129 ± 0.005	0.130 ± 0.003	0.153 ± 0.010	0.108 ± 0.003	0.157 ± 0.015	0.101 ± 0.011	0.279 ± 0.009	0.147 ± 0.002	0.098 ± 0.013	0.111 ± 0.005
<b>Actividad específica (U/mg proteína)</b>	779 ±106	839 ±44	1106 ±71	688 ±54	1237 ±145	1018 ±97	1139 ±106	1155 ±125	357 ±35	1281 ±36	1022 ±132	905 ±47
<b>Qp (U/Lh)</b>	2063 ±250	2375 ±104	2917 ±83	1875 ±104	3917 ±208	2292 ±167	3729 ±188	2417 ±145	2063 ±125	3938 ±125	2063 ±125	2104 ±145

Datos a las 48 h de inducción.

El escalamiento es una actividad de importancia fundamental para convertir el conocimiento generado a nivel laboratorio en una realidad práctica con valor comercial (Sharini, 2016), por lo tanto, el factor del costo-beneficio es un parámetro para determinar la rentabilidad de este proceso. Dado que el parámetro de productividad volumétrica es uno de los factores críticos para el diseño de un proceso y su optimización (Looser *et al.*,

2015), se determinó que la cepa KM71H ANCUT 3 CP resulta mejor para realizar un escalamiento. Sin embargo, se tiene que considerar que la diferencia de productividad entre ambas cepas no presenta un gran valor y que la cepa KM71H ANCUT 3 CP requiere el triple de la concentración de inductor, aumentando el costo de la producción; por lo que para próximos estudios se tendría que evaluar directamente en un biorreactor.

- Comparación de la cepa *Pichia pastoris* KM71H ANCUT 1 CP respecto a cepa X33 ANCUT 1

Uno de los factores que influyen drásticamente en la producción de proteínas y el desarrollo del cultivo es la capacidad de asimilación de metanol de la cepa hospedero fenotipo Mut, además de que este es un parámetro que tiene que ser considerado en la optimización de la producción de la proteína recombinante (Cos *et al.*,2006; Looser *et al.*,2015). Como puede apreciarse en la Tabla 7, la cepa KM71H ANCUT 1 CP presenta los valores de actividad y crecimiento más altos en 0.5% de metanol; mientras que la cepa X33 los muestra en 3.0%. Esta diferencia puede deberse a que las cepas carentes de alguno de los genes AOX, como es el caso del fenotipo Mut<sup>S</sup>, requieren una menor concentración de metanol para inducir la expresión; esto puede ser útil en cultivos de mayor volumen, en donde una gran cantidad de metanol a veces se considera como un potencial peligro de incendio (Higgins y Cregg, 1998). Como puede apreciarse en la Tabla 7, en el caso de biomasa, ésta es mayor en todas las concentraciones de metanol empleadas en la cepa X33 en comparación a la cepa KM71H, lo anterior se debe a que la cepa KM71H pertenece al fenotipo Mut<sup>S</sup>, el cual se caracteriza por tener un crecimiento lento en metanol debido a su dependencia del gen AOX2 para la alcohol oxidasa.

Considerando las concentraciones en las que se presentan los mayores valores (0.5% para la cepa KM71H ANCUT 1 y 3.0% para la cepa X33 ANCUT 1) la cepa X33 ANCUT 1 presenta una actividad volumétrica 5.1 veces mayor y una densidad óptica 2.57 veces mayor respecto a la cepa KM71H ANCUT 1 CP. En el caso de la actividad específica, esta es mayor 9.1 en el caso de la cepa la X33 ANCUT 1 respecto a la KM71H ANCUT 1 CP.

La concentración de proteína total soluble la cepa KM71H ANCUT 1 CP es 1.77 veces mayor en comparación con la cepa X33 ANCUT 1.

Tabla 7. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y X33 ANCUT 1, respecto a la cantidad de inductor.

	Metanol 0.5%		Metanol 1.5%		Metanol 3.0%	
	KM71H ANCUT 1 CP	X33 ANCUT 1	KM71H ANCUT 1 CP	X33 ANCUT 1	KM71H ANCUT 1 CP	X33 ANCUT 1
<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	188 ±1	205±15	80±2	658±76	80±7	959±140
<b>Densidad óptica</b>	7.78±0.24	19±1	8.19±1.4	20±2	5.19±0.17	20±2
<b>Proteína (mg/mL)</b>	0.181 ±0.005	0.101 ±0.011	0.150 ±0.007	0.102 ±0.062	0.154 ±0.004	0.102 ±0.203
<b>Actividad específica (U/mg proteína)</b>	1037 ±33	2475 ±165	535 ±41	6476 ±123	523 ±70	9423 ±688
<b>Qp (U/Lh)</b>	3917 ±21	4271 ±313	1667 ±42	13708 ±1583	1667 ±146	19979 ±2917

Datos de las 48 h de inducción con una D.O. = 1 en todos los casos.

Nota: Los datos correspondientes a la cepa X33 ANCUT 1 fueron tomados de Castro (2017).

Ambas cepas se trabaron bajo la misma metodología y condiciones

- Comparación de la cepa *P. pastoris* KM71H ANCUT 3 CP respecto a cepa X33 ANCUT 3

En la Tabla 7 se puede observar que el crecimiento es mayor en todas las concentraciones de inductor en la cepa X33 en comparación con la cepa KM71H, esto se puede deber a que la cepa KM71H pertenece al fenotipo Mut<sup>S</sup>, el cual se caracteriza por tener un crecimiento lento en metanol debido a su dependencia del gen AOX2 para la alcohol oxidasa, que es transcripcionalmente más débil en comparación con el gen AOX1 (Higgins y Cregg, 1998), por lo que la síntesis de la proteína es más lenta, dando como resultado

mayor tiempo para que las cadenas de péptidos nacientes se plieguen correctamente. Por otro lado, Looser *et al.*, 2015 establece que, al tener una tasa de crecimiento menor, el fenotipo Mut<sup>S</sup> respecto al Mut<sup>+</sup>, su crecimiento no acelera tan rápido por lo tanto su empleo a gran escala resulta más sencillo.

En la cepa KM71H ANCUT 3 CP se puede apreciar que los valores más altos se obtienen con una concentración de 1.5% de metanol a diferencia de la cepa X33 ANCUT 3, en donde los valores más elevados se obtienen en una concentración de 0.5%. Lo anterior se puede atribuir a que cepas Mut<sup>+</sup> son más sensibles a altas concentraciones de metanol residual por lo cual la concentración de metanol debe estar controlada (Higgins y Cregg, 1998) ya que se puede presentar la acumulación de formaldehído y peróxido de hidrogeno, los cuales incrementan el estrés oxidativo comprometiendo la viabilidad de la célula (Ping *et al.*, 2016).

Considerando las concentraciones en las que se presentan los mayores valores (1.5% para la cepa KM71H ANCUT 3 y 0.5% para la cepa X33 ANCUT 3). La actividad volumétrica de la cepa X33 ANCUT 3 resulta ser 3.1 veces mayor que la cepa KM71H ANCUT 3 CP, lo mismo ocurre en la productividad volumétrica. En el caso de la biomasa presente la cepa X33 ANCUT 3 presenta un valor 3.20 veces que el obtenido por la cepa KM71H ANCUT 3, así mismo la concentración de proteína y la actividad volumétrica es 1.98 y 1.57 veces mayor para la cepa X33 ANCUT 3 respecto a la cepa KM71H ACNUT 3 CP. Higgins y Cregg (1998) establecen que las cepas Mut<sup>+</sup> al tener una tasa de crecimiento más rápida en comparación a los otros fenotipos, su producción de proteínas heterólogas es más rápida; esto se observa en la Tabla 7 ya que la cepa X33 ANCUT 3 presenta, en todas las concentraciones de metanol, valores más altos de biomasa y concentración de proteína en comparación a la cepa KMH71 ANCUT3.

Tabla 8. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 3 CP y X33 ANCUT 3, respecto a la cantidad de inductor.

	Metanol 0.5%		Metanol 1.5%		Metanol 2.0%	
	KM71H ANCUT 3 CP	X33 ANCUT 3	KM71H ANCUT 3 CP	X33 ANCUT 3	KM71H ANCUT 3 CP	X33 ANCUT 3
<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	131 ±8	635±4	204 ±10	505±6	189 ±12	278±9
<b>Densidad óptica</b>	8.9± 1.6	39.03± 0.05	12.2± 0.1	34.4± 0.04	10.90± 0.3	37.5± 0.07
<b>Proteína (mg/mL)</b>	0.099 ±0.005	0.184 ± 0.003	0.093 ±0.004	0.097 ± 0.008	0.104 ±0.004	0.131 ± 0.005
<b>Actividad específica (U/mg proteína)</b>	1261 ±58	3438 ±44	2184 ±48	5223 ±44	1721 ±172	2129 ±12
<b>Qp (U/Lh)</b>	2729 ±167	13229 ±83	4250 ±208	10521 ±125	3625 ±250	5167 ±188

Datos de las 48 h de inducción con una D.O. = 1 en todos los casos.

Nota: Los datos correspondientes a la cepa X33 ANCUT 3 fueron tomados de Lovera y Torres (2019). Ambas cepas se trabaron bajo la misma metodología y condiciones.

De manera general se puede observar en las tablas 6 y 7, que las cepas X33 presentan valores superiores a los obtenidos en las cepas KM71H CP. Teóricamente se esperarían valores superiores en las cepas con optimización de codones, ya que esta es una técnica empleada para incrementar el nivel de expresión de proteínas heterólogas (Rong *et al.*, 2014); sin embargo ambas cepas poseen un fenotipo distinto y contienen diferentes vectores de expresión, y/o factores determinantes en la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* (Ahmad *et al.*, 2014).

- Comparación de la cepa *P. pastoris* KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP respecto a las cepas X33 ANCUT 1 CP y X33 ANCUT 3 CP

En la Tabla 8 se puede observar que para la cutinasa 1 (ANCUT 1), la cepa X33 CP comparada con KM71H CP presenta valores de actividad volumétrica, densidad óptica, actividad específica y productividad 1.76, 1.17, 2.29 y 1.76 veces mayores respectivamente. La mayor presencia de biomasa en la cepa X33 CP, en comparación a la cepa KM71H1 CP, se debe a que esta pertenece al fenotipo Mut<sup>+</sup>, la cual tiene una mayor tasa de crecimiento en el fenotipo Mut<sup>S</sup>. Para aumentar el crecimiento celular en una cepa del tipo Mut<sup>S</sup> Pedro *et al.*, 2015 establece que una alimentación mixta (glicerol-metanol) es comúnmente empleada en la fase de inducción ya que el glicerol es empleado como el sustrato para el crecimiento celular y el metanol para la producción de la proteína heteróloga a diferencia de una cepa Mut<sup>+</sup> en donde el metanol es empleado como fuente de energía y producción de la proteína heteróloga. Así mismo el uso de cultivos mixtos para las cepas Mut<sup>S</sup> es empleado para incrementar la productividad, por lo que un cultivo con estas características podría ayudar a incrementar los valores, sin embargo, se tiene que considerar que un exceso en la concentración de glicerol reprime al promotor AOX, lo que resultaría en una menor productividad. La cepa Mut<sup>S</sup> presenta una mayor acumulación de metanol en el medio en comparación a la cepa Mut<sup>+</sup> correlacionándose con la cantidad de biomasa presente; ya que la cepa Mut<sup>+</sup> presenta valores de biomasa mayores a los obtenidos en la cepa Mut<sup>S</sup> (Pedro *et al.*, 2015). Se puede asumir entonces que el metanol suministrado en la cepa Mut<sup>+</sup> es empleado más eficientemente en la producción de biomasa en comparación a la cepa Mut<sup>S</sup>.

La cepa KM71H CP presenta valores más elevados en comparación a la cepa X33 CP para la cutinasa 3 (ANCUT 3) en los parámetros de actividad volumétrica, concentración de proteína y productividad siendo mayor 1.25, 1.23 y 1.25 veces respectivamente. Esto se puede deber a que la cepa X33 CP se trató con las condiciones óptimas para las cepas KM71H CP, siendo que las cepas Mut<sup>+</sup> son más sensibles a altas concentraciones de metanol residual. Es posible que la concentración de inductor empleada fue mayor a la requerida y conducir a una muerte celular y a la pérdida de la actividad del gen AOX o, por



el contrario, fue menor la concentración e insuficiente para iniciar la transcripción (Pedro *et al.*, 2015).

Respecto a la biomasa presente, la cepa X33 CP presenta valor 1.69 veces mayor respecto a la cepa KM71H ANCUT 3 CP debido a que esta cepa pertenece al fenotipo Mut<sup>S</sup>, las cuales crecen lentamente en metanol debido a su dependencia del gen AOX2 para la alcohol oxidasa. Esto mismo lo corrobora Ping y colaboradores (2016) ya que realizaron la comparación de las condiciones óptimas de temperatura, concentración de inductor y estrategia de alimentación, para la expresión de la enzima hTopoI en las cepas Mut<sup>S</sup> (KM71H) y Mut<sup>+</sup> (X33), demostrando que la cepa Mut<sup>S</sup> expresa y secreta niveles más altos de la proteína heteróloga en comparación a la cepa Mut<sup>+</sup>. Uno de los puntos que abordan es que las cepas Mut<sup>+</sup> requieren un menor tiempo de incubación para producir un alto nivel de biomasa en comparación con la cepa Mut<sup>S</sup>. Sin embargo, en la optimización de la temperatura y concentración del inductor se puede apreciar que no existe una aparente relación, ya que el tiempo en que se tiene la mayor cantidad de biomasa no corresponde con el de mayor cantidad de proteína para la cepa Mut<sup>+</sup>. Así mismo, determinaron que la temperatura, concentración de inductor y estrategia de alimentación óptimas resultaron ser las mismas para ambas cepas. Un factor por considerar también es el tiempo de cultivo, ya que de manera general los valores más altos de densidad y proteína no resultan ser los mismos para ambas cepas.

Tabla 9. Comparación de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP respecto a las cepas X33 ANCUT 1 CP y X33 ANCUT 3 CP.

	KM71H ANCUT 1 CP	X33 ANCUT 1 CP	KM71H ANCUT 3 CP	X33 ANCUT 3 CP
<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	188 ±10	331 ±8	189 ±6	151 ±8
<b>Densidad óptica</b>	8.06 ±0.16	9.42 ±0.58	8.99 ±0.66	15.19 ±0.87
<b>Proteína (mg/mL)</b>	0.153 ± 0.010	0.117 ± 0.005	0.147 ± 0.002	0.145 ± 0.002
<b>Actividad específica (U/mg proteína)</b>	1237 ±145	2831 ±144	1281 ±36	1043 ±61
<b>Qp (U/Lh)</b>	3917 ±208	6896 ±167	3938 ±125	3146 ±167

Nota: Las concentraciones de inóculo e inductor empleadas en la inducción de las cepas X33 ANCUT 1 CP y X33 ANCUT 3 CP son aquellas en las que observó una mayor producción de proteína, crecimiento (considerado como densidad óptica) y actividad volumétrica para las cepas KM71H ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP. Datos de las 48 horas de inducción.

Respecto a la comparación realizada por medio de geles SDS-PAGE, se puede observar en la Figura 16 que las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP cuentan con la presencia de 4 bandas de actividad en el zimograma con distinto peso molecular. Como se dijo en el caso anterior, podría deberse a diferencias en patrón de glicosilación. Para X33 ANCUT 1 CP se puede apreciar la presencia de 3 bandas de actividad y para la cepa X33 ANCUT 3 CP se aprecian 2 bandas. Como se puede ver en la Imagen 5, las bandas correspondientes a las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP presentan bandas muy similares entre sí a diferencia de las cepas X33. Todas las cepas presentan una banda con un peso molecular muy similar, 21.6 kDa para la cepa KM71H ANCUT 1 CP, 21.5 kDa para la cepa KM71H ANCUT 3 CP, 23.1 kDa para la cepa X33 ANCUT 1 CP y 22.3 kDa para la cepa X33 ANCUT CP esto puede deberse a que la ocupación de los sitios de O-glicosilación y N-glicosilación pueden variar dependiendo de las células que expresan la proteína. Kangwa *et al.*, 2018 establecen que diversas formas de glucanos pueden afectar factores como la secreción, actividad y conformación de las proteínas. Así

mismo, esta modificación puede ser ventajosa o no, ya que esta adición permite modificar las propiedades fisicoquímicas de la proteína, la solubilidad, viscosidad y termorresistencia.

El peso molecular teórico de las cutinasas ANCUT 1 y ANCUT 3 se determinó a partir de su secuencia de aminoácidos por medio del servidor Protein Molecular Weight (Sequence Manipulation Suite), obteniéndose valores de 20.69 kDa y 21.39 kDa respectivamente. Considerando la banda más cercana al peso molecular obtenido teóricamente; la cutinasa ANCUT 1 de la cepa KM71H CP y X33 CP experimentalmente presentan una banda con un peso de 21.6 y 19.0 kDa, teniendo una diferencia de 0.91 kDa y 1.69 kDa respectivamente respecto a lo obtenido de la secuencia de aminoácidos. En caso de la cutinasa ANCUT 3, la cepa KM71H y X33 (ambas CP) presentan una banda con un peso de 21.5 y 22.3 kDa, teniendo una diferencia de 0.11 kDa y 0.70 kDa respectivamente. La diferencia entre los pesos moleculares obtenidos experimentalmente y los obtenidos teóricamente se puede atribuir a que el peso molecular teórico corresponde al peso de la enzima sin modificaciones.

De manera general se debe tener en cuenta que se tratan de diferentes tipos de cepas y que las cepas X33 CP se trataron con las condiciones óptimas para las cepas KM71H CP, por lo cual se tendría que determinar las concentraciones tanto de inductor como de inóculo óptimas para las cepas X33 ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP.

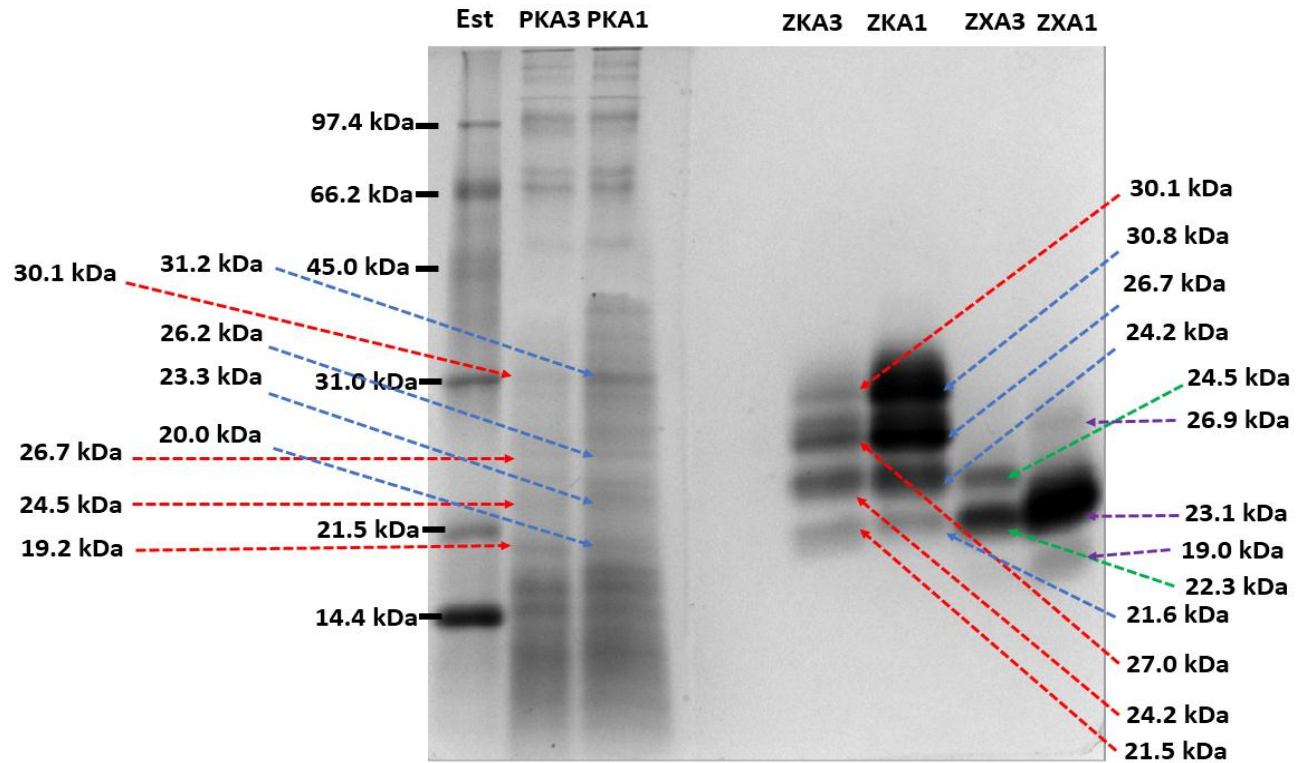


Figura 16. Perfil de proteínas (lado izquierdo) de las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP y zimograma (lado derecho) de las cutinasas provenientes de las cepas KM71H ANCUT 1, KM71H ANCUT 3, X33 ANCUT 1 y X33 ANCUT 3 (todas CP) con sus respectivos pesos moleculares. Se muestra el estándar empleado (Est), el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 1 CP (PKA1), el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 3 CP (PKA3), el zimograma correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 1 CP (ZKA1), el perfil de proteínas correspondiente a la muestra del sobrenadante ultrafiltrado de la cepa KM71H ANCUT 3 CP (ZKA3) y los zimogramas correspondientes a las muestras de los sobrenadantes de las cepas X33 ANCUT 1 CP (ZXA1) y X33 ANCUT 3 (ZXA3) CP.

## 5. Conclusiones

- La concentración óptima de inductor y de inóculo es la correspondiente a 0.5% para el caso de la cepa KH71H ANCUT 1 CP. Por lo cual se cumple la hipótesis establecida de acuerdo a la concentración de metanol, sin embargo no se cumple lo esperado respecto a la concentración de inóculo.
- La concentración óptima de inductor resultó ser la correspondiente a 1.5% para el caso de la cepa KH71H ANCUT 3 CP y 2.0% la concentración óptima de inóculo. Por lo cual no se cumple la hipótesis establecida de acuerdo a la concentración de metanol, pero si se cumple respecto a la concentración de inóculo.
- Se corroboró en zimogramas la presencia de las cutinasas ANCUT 1 CP y ANCUT 3 CP. Aunque los perfiles de proteínas para cada cepa muestran los pesos esperados también se presentan varias bandas con pesos moleculares cercanos, probablemente debido a glicosilaciones, predichas bioinformáticamente.
- Los patrones de pesos moleculares difieren entre las cepas Mut<sup>+</sup> (X33) y las cepas Mut<sup>S</sup> (KM71H).
- La cepa KM71H ANCUT 3 CP presenta una mayor producción de biomasa, actividad volumétrica, actividad específica y productividad volumétrica respecto a la cepa KM71H ANCUT 1 CP (considerando la concentración óptima de inductor e inóculo en cada caso), lo que implica que la secuencia de la proteína de interés afecta la expresión del gene.
- De manera general se determinó que las cepas Mut<sup>+</sup> (X33) tienen una mayor producción de biomasa en comparación a la cepa Mut<sup>S</sup> (KM71H). Sin embargo, la producción y actividad de la proteína heteróloga dependerá de la naturaleza de esta (si corresponde a la cutinasa ANCUT 1 ó 3) y de la cantidad de inductor empleada para su expresión en el medio de cultivo.

## 6. Perspectivas

- Evaluar otros parámetros del cultivo para optimizar la producción de las cutinasas por las cepas KM71H ANCUT 1 CP y KM71H ANCUT 3 CP.
- En el caso de la producción de proteasas, las cuales pueden influir en la proteólisis de las proteínas recombinantes generas en *P. pastoris*, Macauley *et al.* (2005) establece que algunas técnicas para evitar y/o disminuir la producción de este tipo de proteínas con son un ajuste de pH y te temperatura. Por lo tanto, para futuros ensayos se propone evaluar el efecto que tienen estos parámetros en la producción de la proteína recombinante y en la producción de proteasas.

## Referencias

- Ahmad, M., Hirx, M., Pichler, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5301–5317.
- Arias, C. (2012). Caracterización de la ruta de N-glicosilación de proteínas en el sistema de endomembranas del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Distribución al cloroplasto de N-glicoproteínas. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Departamento de Biología. pp.34-36.
- Baumgartner P, Harper K, Raemaekers RJM, Durieux A, Gatehouse AMR, Davies HV & Taylor MA (2003). Large-scale production and purification of recombinant *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1281-1285.
- Bai, Z.; Liu, Y.; Su, T.; Wang, Z.; (2018). Effect of hydroxyl monomers on the enzymatic degradation of poly (ethylene succinate), poly (butylene succinate), and poly (hexylene succinate). *Polymers (Basel)* 10, 90.
- Brettahaver, R., Castellino, F. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30, 193-200.
- Bradford MM. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 248-254.
- Carrillo, J.; Candia, M.; Lugo, R.; Espinoza, E.; Noriega, J. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS* 8 (1), 19-26.
- Carvalho, C. M. L., Serralheiro, M. L. M., Cabral, J. M. S., and Aires-Barros, M. R. (1996). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enzyme Microb. Technol.* (21), 117–123
- Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R., M., Cabral. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *J. Biotechnol.* 1 (3), 160-173.

Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., Farrés, A. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13(1), 16-25.

Castro, J. (2017). Mejoramiento de la producción de la cutinasa Ancut 1 utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. pp. 58-59.

Canavati, M., Águila, I., Barraza, I., Castellón, E., Correa, A., Sánchez, E., Conde, V., González, A., Méndez, D., Ruvalcaba, D., Sánchez, C. (2016). Growth and cutinase activity of *Fusarium culmorum* grown in solid-state fermentation. *Mex. J. Biotechnol.* 2016,1(2). 8-19

Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13. 329–332

Cereghino, J. y Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45-66.

Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J & Wu J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (63); 121-127.

Cos O, Ramón R, Montesinos JL & Valero F (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb. Cell. Fac.* 5(17);1-20.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* (11); 905–910.

Croteau, R. (1980). The biosynthesis of terpene compounds. Ed. *Fragrance and Flavor Substances*. D&PS Verlag, Germany. pp 13-36.

De Moreno, M. R., Smith, J. F., and Smith, R. V. (1986). Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *J. Pharm. Sci.*75,907–911.



Del Monte-Martínez A, González-Bacero J, Aragón-Abreu C, Palomo-Carmona JM, Guisán-Seijas JM, Díaz-Brito J. (2012), Selective and oriented immobilization of (phospho)lipases from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus* by interfacial adsorption. Rev CENIC Cienc. Biol.;43; 3-8.

Diba, F., Munir, A., Abdul, A., Zamrod, Z., Nor Muhammad, M., Sullivan, P. (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 13 (2); 63-69.

Dutta, K, Sen S & Veeranki VD (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. Process Biochem. 44(2);127–134.

Edwards-Jones, B., Aw, R., Barton, G., Tredwell, G., Jacob G. Leak, D. (2015). Translational Arrest Due to Cytoplasmic Redox Stress Delays Adaptation to Growth on Methanol and Heterologous Protein Expression in a Typical Fed-Batch Culture of *Pichia pastoris*. PLOS ONE 1-17.

Egmond V & de Vlieg J (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. Biochem. 82(11);1015-1021.

ExPASy Translate (Bioinformatics Resource Portal): <https://web.expasy.org/translate/>

Fontes, T., Alves, G. (2009). Cutinases: Properties and Industrial Applications. Adv. Appl. Microbiol. (66); 77-95.

Higgins, D.; J. Cregg. (1998). *Pichia* protocols. Humana Press. New Jersey. EUA. pp 95-107.

García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J., Valero, F. (2019). Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free *GAP* promoter. Where do we stand? New Biotechnol. 53; 24-34.

Gamerith, C.; Zartl, B.; Pellis, A.; Guillaumot, F.; Marty, A.; Acero, E.H.; Guebitz, G.M (2017). Enzymatic recovery of polyester building blocks from polymer blends. Process Biochem, 59, 58–64.

Gavel, Y. and Von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Engineering*. 3 (5): 433-442.

Guerrero, M., Cab-Barrera, E., Galán, L., Viader, J. (2014). *Biología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura*. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. pp. 425-427.

Invitrogen. (2010). EasySelect™*Pichia* Expression Kit. User Manual. [En línea] Disponible en: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf) [Último acceso el 26 de febrero de 2019].

Invitrogen. (2010). *Pichia* Fermentation Process Guidelines. [En línea] Disponible en: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm\\_prot.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf) [Último acceso el 15 de marzo de 2019].

Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors S-O. (2003). Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb. Cell Factories*. 2 (6),1-11.

Katakuta, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., Suga, K. (1998). Effect of Methanol Concentration on the Production of Human Pz-Glycoprotein I Domain V by a Recombinant *Pichia pastoris*: A Simple System for the Control of Methanol Concentration Using a Semiconductor Gas Sensor. *J. Ferment. Bioeng.* 86 (5). 482-487.

Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S & Schmid RD. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (67), 59-69.

Kangwa, M., Gama, J., Fernandez, H. (2018). Identification and characterization of N-glycosylation site on a *Mucor circinelloides* aspartic protease expressed in *Pichia pastoris*: effect on secretion, activity and thermo-stability. *AMB Expr.* 8 (15), 1-13.

Kim, Y. H., Ahn, J. Y., Moom, S. H., and Lee, J. (2005). Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere*. 60, 1349–1355.

Kim, H.Y., Min, J., Bae, K.D., Gu, M.B. & Lee, J. (2005) Biodegradation of dipropyl phthalate and toxicity of its degradation products: a comparison of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase and *Candida cylindracea* esterase. *Arch. Microbiol.* 184(1), 25-31.

Kolattukudy P.E. (1981). Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 539-567.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259);680-685.

Lin, T.S., Kolattukudy, P. E. (1978). Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *J. Bacteriol.* 133 (2); 942-951.

Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., Kover, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1177–1193.

Lovera, E., Torres, M. (2019). Optimización de condiciones para mejorar la producción y degradación de tereftalato de polietileno por la cutinasa ANCUT 3 expresada en *Pichia pastoris*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. pp.1-3, 49.

Luke, B. (2012). Beyond the Sequon: Sites of N-Glycosylation. Intech Open. En línea] Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/glycosylation/beyond-the-sequon-sites-of-n-glycosylation> [Último acceso el 1 mayo del 2020].

Macauley, S., Fazenda, M., McNeil, B., Harvey, L. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Wiley InterScience*. 22, 249–270.

Maeda H, Youhei Y. Keietsu A, Fumihiko H, Masayuki M, Ryoji I, Katsuya G & Tasuku N (2002). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(1), 778–788.

Martinet, W., Van den Plas, D., Raes, H., Reekmans, R., Contreras, R. (1999). Bax-induced cell death in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 21, 821–829.

Martínez, C, de Geus, P, Lauwereys, M, Matthyssens G & Cambillau C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature.* (356), 615-618.

Mendelzon, D. (1986). Mecanismo de glicosilación de proteínas en organismos de las proteínas en organismos de la familia Trypanosomatidae. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp 10-27.

Morales, S. (2018). Degradación de polietilen tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes AN CUT 1 y AN CUT 2 de *Aspergillus nidulans*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Mosquera, R., Peñuela, G., (2009). Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 22. 189-198.

Nawrath, C. (2002). The Biopolymers Cutin and Suberin. *The Arabidopsis Book.* The American Society of Plant Biologists. pp. 1-14.

NetNGlyc 1.0 Server (Technical University of Denmark):  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

NetOGlyc 4.0 Server (Technical University of Denmark):  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

Nikolaivits, E., Kanelli, M., Dimarogona M., Topakas E. (2018). A Middle-Aged Enzyme Still in Its Prime: Recent Advances in the Field of Cutinases. *Catalyst*, 8 (612), 1-28.

Pedro, A., Oppolzer D., Bonifácio, M., Maia, C., Queiroz, J., Passarinha, L. (2015). Evaluation of Mut<sup>S</sup> and Mut<sup>+</sup> *Pichia pastoris* Strains for Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase Biosynthesis. *Appl Biochem Biotechnol.* 175, 3840–3855.

Ping, R., Sin, L., Kwai, M., Miswan, N., Yin, B. (2016). Comparing the expression of human DNA topoisomerase I in KM71H and X33 strains of *Pichia pastoris*. *Electron. J. Biotechnol.* 21, 9–17.

Protein Molecular Weight (Sequence Manipulation Suite):  
[https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein\\_mw.html](https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein_mw.html)

Rabert, Claudia, et al. (2013). Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. Braz J Microbiol. 44(2), 351-356.

Regado, M. A., Cristo´va ˜o, B. M., Moutinho, C. G., Balcao, V. M., Aires-Barros, R., Ferreira, J. P. M., and Malcata, F. X. (2007). Flavour development via lipolysis of milk fat: Changes in free fatty acid pool. Int. J. Food Sci. Technol. 42, 961–968.

Rong, J., Zhi, L., Yuan, Y., De Xu, S., Ni, D., Shan, J., Li, P. (2014). Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of  $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. Biomed Res. Int. 2015, 1-9.

Roussel, A., Amara, S., Nyssölä, A., Mateos-Diaz, E., Blangy, S., Kontkanen, V., Westerholm-Parvinen, A., Carrière, F., Cambillau, C. (2014). A Cutinase from *Trichoderma reesei* with a Lid-Covered Active Site and Kinetic Properties of True Lipases. J. Mol. Biol. (426), 3757-3772.

Sabido, A. (2018). Optimización de un sistema de expresión en *Picha pastoris* para incrementar la producción de cutinasas degradadoras de PET de *Aspergillus nidulans*. Informe de actividades de estancia posdoctoral DGAPA 2018. Facultad de Química-UNAM.

Santos, S. (2008). Análisis cuantitativo y modelización del metabolismo de la levadura *Pichia pastoris*. Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona. pp 139.

Sharini, E. (20016). Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosácaridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apicola*. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. pp. 24

Sinha, J., Plantz, B., Inan, M., M. Meagher, M. (2005). Causes of Proteolytic Degradation of Secreted Recombinant Proteins Produced in Methylo-trophic Yeast *Pichia pastoris*: Case Proteins Produced in Methylo-trophic Yeast *Pichia pastoris*: Case Study With Recombinant

Ovine Interferon-T Study With Recombinant Ovine Interferon. *Biotechnol Bioeng.* 89 (1).102-112

Serrano-Rivero Y., Marrero. K., Fando. R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Rev. CENIC, Cienc. Quím.* 47 (2), 67-77.

Silva, F. A. M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, J. L. F. C., Matos, C., and Reis, S. (2000). Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2122–2126.

Silva, C. M., Carneiro, F., O'Neill, A., Fonseca, L. P., Cabral, J. M. S., Guebitz, G., and CavacoPaulo, A. (2005). Cutinase—A new tool for biodegradation of synthetic fibers. *J. Polym. Sci.* 43, 2448–2450.

Stamatis, H., Sereti, V., and Kolisis, F. M. (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 12, 1505–1510.

Solís, U. (2013). Escalamiento a nivel reactor para la producción de lipasa a partir de *Aspergillus niger* GH1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Pp. 10-13.

Tafolla, J., González, A., Tiznado, M., Zacarías, L., Báez, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (1), 3-12.

Vertommen, M. A. M. E., Nierstrasz, V. A., Van Der Veer, M., and Warmoeskerken, M. M. C. G. (2005). Enzymatic surface modification of poly (ethylene terephthalate). *J. Biotechnol.* 120, 376–386.

Viader J., Gallegos, Carreo J.G., Castillo M., Rojo A., Guerrero M. (2013). Design of Thermostable Beta-Propeller Phytases with Activity over a Broad Range of pHs and Their Overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (19), 6423-6430.

Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille, and M. J. Haas. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 9;113-148.

Wang, N., Yueju, K., Xu, F., Li, G., Liu, D. (2020). The effect of N-glycosylation on the expression of the tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris*. *Protein. Expr. Purif.* 166, 1-7.

Wan, W., Bakar, S.A., Bukhari, N.A., Gaspar, S.M., Nathan, S., Mahadi, N.M., Jahim, J., Murad, A.M.A., Othman, R., AbuBakar, F.D. (2014). High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense Cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. *J. Biotechnol.* 184; 219–228.

Walton and P. E. Kolattukudy. (1972). Determination of the structures of cutin monomers by novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry.* 2 (10), 1885-1896.

Whiteley C & Lee D (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Microb Technol.* (38);291-316.

Yábar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. División de Biología Molecular. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú. pp 19-20.

Yang, S.; Liu, M.; Long, L.; Zhang, R.; Ding, S. (2018) Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. *Process Biochem.* 66, 106–112.

Zhiliang Y., Zisheng Z. (2018). Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol. Adv.* 36, 182-195.

## Anexos

### Anexo I. Confección de banco celular de trabajo.

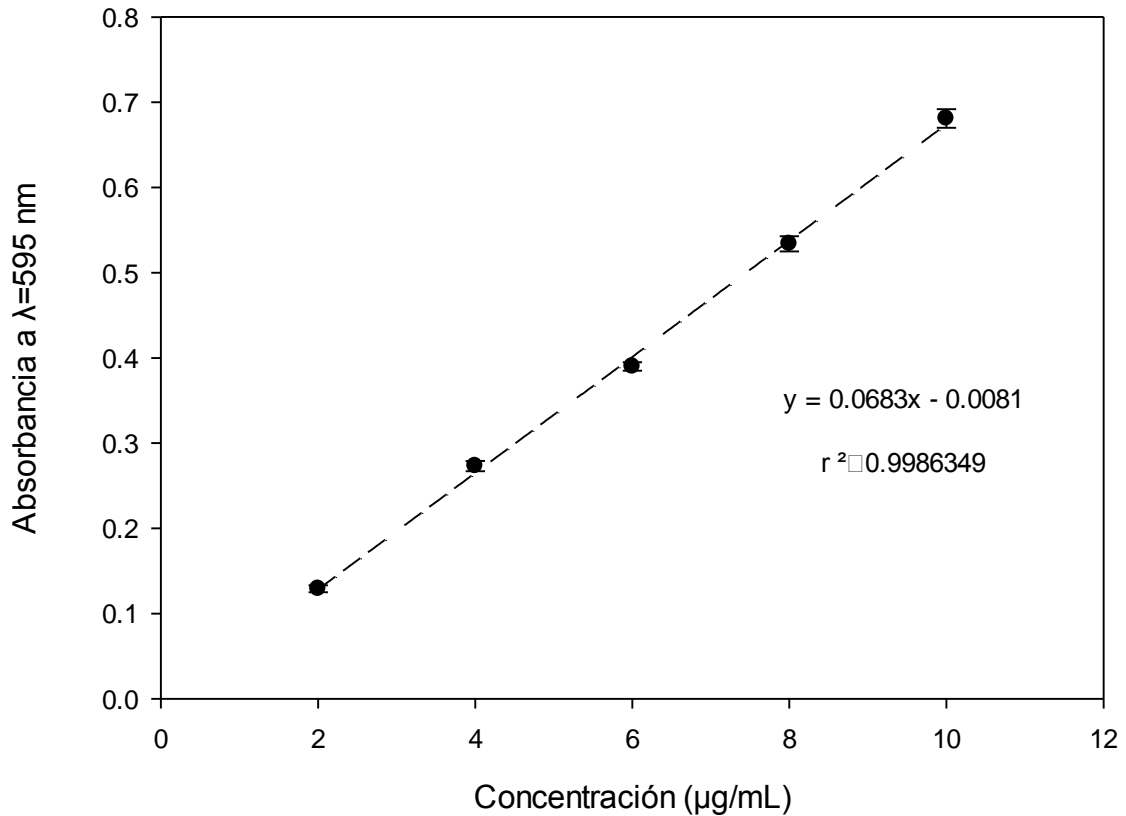
A partir de una colonia aislada de la cepa KM71H AN CUT 1 CP o AN CUT 3 CP se inoculó una asada en 25 mL de medio YPD con zeocina (100 µg/mL) y se incubó a 29°C, 300 rpm durante 24 horas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL en la incubadora Innova 40 marca New-Brunswick, hasta alcanzar una densidad óptica ( $\lambda$  600 nm) aproximada de 3-8, se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, para desechar el sobrenadante, y el pellet resultante se suspendió en 2 mL de medio YPD-Glicerol (15% v/v), posteriormente se tomaron alícuotas de 200 µL en viales Eppendorf de 0.6 mL y se guardaron a -70° C.

### Anexo II. Preparación de soluciones A y B

- Solución A: Se pesaron 10 mg de  $\alpha$ -Naftil acetato, se disolvieron en 2.5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 25 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.
- Solución B. Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 10 µL de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 10 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.



Anexo III. Curva de calibración de albumina sérica bovina. Empleada para la determinación de proteína total soluble por de método de Bradford



Cálculo para determinar la concentración de proteína

Considerando la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración:

$$y=0.0683x-0.0081$$

Donde:

X= Concentración de proteína en μg/mL

Y= Absorbancia de la muestra a λ=595 nm

Se realiza un despeje de X, para obtener la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{Abs} + 0.0081}{0.0683 \text{ mL}/\mu\text{g}}\right) (\text{Factor de dilución}) = \text{Concentración de proteína en } \mu\text{g/mL}$$

## Anexo IV. Cálculo de actividad específica y productividad

- Actividad específica

$$\left( \frac{\text{Actividad volumétrica}}{\text{Concentración de proteína}} \right) = \left( \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{mg \text{ proteína}}{mL}} \right) = \text{Actividad específica en U/mg proteína}$$

- Productividad volumétrica

$$\left( \frac{\text{Actividad volumétrica}}{L \times 48 \text{ hrs}} \right) = \left( \frac{U}{mL} \right) \left( \frac{1000 \text{ mL}}{L} \right) \left( \frac{1}{48 \text{ hrs}} \right) = \text{Productividad volumétrica en U/L} \times h$$

## Anexo V. Análisis estadístico empleado

- Análisis estadístico del efecto sobre la producción de biomasa, proteína y actividad volumétrica a diferentes concentraciones de metanol (cepa KM71H ANCUT 1)

### Tiempo 0

- Densidad óptica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.01156107	4	0.00289027	1.36505038	0.3131548	3.47804969
Dentro de los grupos	0.02117333	10	0.00211733			
<b>Total</b>	<b>0.0327344</b>	<b>14</b>				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si Fc es mayor que Ft Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F_t$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	657.509206	4	164.377301	34.043516	8.4783E-06	3.47804969
Dentro de los grupos	48.2844666	10	4.82844666			
Total	705.793673	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00077498	4	0.00019375	4.91489092	0.01879649	3.47804969
Dentro de los grupos	0.0003942	10	0.00003942			
Total	0.00116918	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad para F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	273737.022	4	68434.2556	20.6188329	8.0725E-05	3.47804969
Dentro de los grupos	33190.1693	10	3319.01693			
Total	306927.192	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 24 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad para F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4.60964	4	1.15241	23.918846	4.1938E-05	3.47804969
Dentro de los grupos	0.4818	10	0.04818			
Total	5.09144	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	16735.4804	4	4183.8701	118.880642	2.1857E-08	3.47804969
Dentro de los grupos	351.938721	10	35.1938721			
Total	17087.4191	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0054717	4	0.00136792	11.7508504	0.00085115	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00116411	10	0.00011641			
Total	0.0066358	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2033511.91	4	508377.976	82.3314708	1.301E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	61747.7098	10	6174.77098			
Total	2095259.62	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 48 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	21.36184	4	5.34046	11.1631689	0.00104291	3.47804969
Dentro de los grupos	4.784	10	0.4784			
Total	26.14584	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	38201.0831	4	9550.27079	454.825892	2.9157E-11	3.47804969
Dentro de los grupos	209.97641	10	20.997641			
Total	38411.0596	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00202405	4	0.00050601	9.89774535	0.00166433	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00051124	10	5.1124E-05			
Total	0.00253529	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1046865.23	4	261716.308	84.4094678	1.1534E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	31005.563	10	3100.5563			
Total	1077870.79	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 72 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	134.323707	4	33.5809267	62.6572171	4.8298E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	5.35946667	10	0.53594667			
Total	139.683173	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos



- Actividad volumétrica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	17511.5614	4	4377.89034	140.478262	9.6633E-09	3.47804969
Dentro de los grupos	311.641836	10	31.1641836			
Total	17823.2032	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.03516246	4	0.00879062	65.7527451	3.8352E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00133692	10	0.00013369			
Total	0.03649938	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	136791.269	4	34197.8172	34.4017353	8.0794E-06	3.47804969
Dentro de los grupos	9940.72447	10	994.072447			
Total	146731.993	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- **Análisis estadístico del efecto sobre la producción de biomasa, proteína y actividad volumétrica a diferentes concentraciones de metanol (cepa KM71H ANCUT 3)**

### Tiempo 0

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.06610507	4	0.01652627	1.43693339	0.29168825	3.47804969
Dentro de los grupos	0.11501067	10	0.01150107			
Total	0.18111573	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	706.184603	4	176.546151	2.18915575	0.14362438	3.47804969
Dentro de los grupos	806.4577	10	80.64577			
Total	1512.6423	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00010545	4	2.6362E-05	0.68611198	0.61769407	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00038423	10	3.8423E-05			
Total	0.00048968	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	615186.61	4	153796.652	2.78081497	0.08638805	3.47804969
Dentro de los grupos	553063.235	10	55306.3235			
Total	1168249.85	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 24 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	10.27724	4	2.56931	4.56657977	0.02344812	3.47804969
Dentro de los grupos	5.62633333	10	0.56263333			
Total	15.9035733	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	20812.9159	4	5203.22898	77.9983775	1.6886E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	667.094515	10	66.7094515			
Total	21480.0104	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00305913	4	0.00076478	9.44096699	0.00199245	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00081007	10	8.1007E-05			
Total	0.0038692	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1596213.48	4	399053.369	15.1346823	0.00030298	3.47804969
Dentro de los grupos	263668.151	10	26366.8151			
Total	1859881.63	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 48 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	69.7982933	4	17.4495733	12.6855553	0.00062605	3.47804969
Dentro de los grupos	13.7554667	10	1.37554667			
Total	83.55376	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	15121.5856	4	3780.3964	35.020022	7.4426E-06	3.47804969
Dentro de los grupos	1079.49573	10	107.949573			
Total	16201.0813	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00022358	4	5.5895E-05	1.71579225	0.22256494	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00032577	10	3.2577E-05			
Total	0.00054935	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c < F$  Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1973472.92	4	493368.229	21.2265041	0.00013239	3.63308851
Dentro de los grupos	209187.252	9	23243.028			
Total	2182660.17	13				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 72 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	239.0928	4	59.7732	276.292872	3.4529E-10	3.47804969
Dentro de los grupos	2.1634	10	0.21634			
Total	241.2562	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos



- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	22138.0506	4	5534.51264	53.2995404	1.0427E-06	3.47804969
Dentro de los grupos	1038.37906	10	103.837906			
Total	23176.4296	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00295178	4	0.00073795	6.74255147	0.00672923	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00109446	10	0.00010945			
Total	0.00404624	14				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1390668.75	4	347667.189	18.6207031	0.00022242	3.63308851
Dentro de los grupos	168039.02	9	18671.0022			
Total	1558707.77	13				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- **Análisis estadístico del efecto sobre la producción de biomasa, proteína y actividad volumétrica en diferentes concentraciones inóculo, considerando una concentración de metanol de 0.5% (cepa KM71H ANCUT 1).**

### Tiempo 0

- Densidad óptica

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	142.723425	5	28.544685	258.038956	8.8734E-12	3.10587524
Dentro de los grupos	1.32745933	12	0.11062161			
Total	144.050885	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1187.81	5	237.562001	17.8865243	3.4248E-05	3.10587524
Dentro de los grupos	159.379428	12	13.281619			
Total	1347.18943	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00886195	5	0.00177239	13.6381388	0.00013404	3.10587524
Dentro de los grupos	0.0015595	12	0.00012996			
Total	0.01042145	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	138213.191	5	27642.6383	3.86734779	0.02550453	3.10587524
Dentro de los grupos	85772.389	12	7147.69909			
Total	223985.58	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 24 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	242.701961	5	48.5403922	649.949461	3.6187E-14	3.10587524
Dentro de los grupos	0.8962	12	0.07468333			
Total	243.598161	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	24498.6723	5	4899.73446	63.5214915	3.256E-08	3.10587524
Dentro de los grupos	925.620796	12	77.1350664			
Total	25424.2931	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.05627199	5	0.0112544	43.5159596	2.7916E-07	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00310352	12	0.00025863			
Total	0.05937551	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1813253.83	5	362650.765	10.755054	0.00041906	3.10587524
Dentro de los grupos	404629.227	12	33719.1022			
Total	2217883.05	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

Tiempo 48 horas

- Densidad óptica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	147.463244	5	29.4926489	56.7524059	6.203E-08	3.10587524
Dentro de los grupos	6.23606667	12	0.51967222			
Total	153.699311	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	25634.9911	5	5126.99822	73.700287	1.3846E-08	3.10587524
Dentro de los grupos	834.786147	12	69.5655123			
Total	26469.7773	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.07702278	5	0.01540456	148.52955	2.3222E-10	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00124456	12	0.00010371			
Total	0.07826734	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1584179.74	5	316835.947	28.2751113	3.0309E-06	3.10587524
Dentro de los grupos	134465.655	12	11205.4713			
Total	1718645.39	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 72 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	131.509983	5	26.3019967	22.3281977	1.0759E-05	3.10587524
Dentro de los grupos	14.1356667	12	1.17797222			
Total	145.64565	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos



- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	33572.5477	5	6714.50953	54.8876735	7.5043E-08	3.10587524
Dentro de los grupos	1467.98196	12	122.33183			
Total	35040.5296	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.16155613	5	0.03231123	92.6783272	3.6708E-09	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00418366	12	0.00034864			
Total	0.16573979	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1131508.93	5	226301.786	16.8828342	4.6028E-05	3.10587524
Dentro de los grupos	160851.039	12	13404.2532			
Total	1292359.97	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- **Análisis estadístico del efecto sobre la producción de biomasa, proteína y actividad volumétrica en diferentes concentraciones inóculo, considerando una concentración de metanol de 1.5% (cepa KM71H ANCUT 3).**

### Tiempo 0

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	82.016367	6	16.403273	2800.7600		
Dentro de los grupos	0.0702806	7	0.0058567	3	5.7694E-18	3.10587524
Total	82.086648	3				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F_t$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F_t$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1311.28406	5	262.256811	28.3624108	2.9806E-06	3.10587524
Dentro de los grupos	110.959599	12	9.24663326			
Total	1422.24366	17				
Total	5220.68052	20				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00886195	5	0.00177239	13.6381388	0.00013404	3.10587524
Dentro de los grupos	0.0015595	12	0.00012996			
Total	0.01042145	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	273306.284	5	54661.2568	18.5980598	2.8009E-05	3.10587524
Dentro de los grupos	35269.0059	12	2939.08382			
Total	308575.29	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 24 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	130.909867	5	26.1819733	184.344033	6.4983E-11	3.10587524
Dentro de los grupos	1.70433333	12	0.14202778			
Total	132.6142	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	23352.8916	5	4670.57832	146.934188	2.4746E-10	3.10587524
Dentro de los grupos	381.442472	12	31.7868727			
Total	23734.3341	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.05627199	5	0.0112544	43.5159596	2.7916E-07	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00310352	12	0.00025863			
Total	0.05937551	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3253562.13	5	650712.425	106.931901	1.5946E-09	3.10587524
Dentro de los grupos	73023.5692	12	6085.29743			
Total	3326585.69	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 48 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	121.098778	5	24.2197556	43.4790362	2.805E-07	3.10587524
Dentro de los grupos	6.68453333	12	0.55704444			
Total	127.783311	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.07702278	5	0.01540456	148.52955	2.3222E-10	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00124456	12	0.00010371			
Total	0.07826734	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00483782	5	0.00096756	35.6676278	8.4719E-07	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00032553	12	2.7127E-05			
Total	0.00516335	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	699864.704	5	139972.941	25.1372816	5.7202E-06	3.10587524
Dentro de los grupos	66820.0847	12	5568.34039			
Total	766684.789	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

### Tiempo 72 horas

- Densidad óptica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	205.309067	5	41.0618133	67.899447	2.2204E-08	3.10587524
Dentro de los grupos	7.25693333	12	0.60474444			
Total	212.566	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos



- Actividad volumétrica

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5758.50323	5	1151.70065	31.1259086	1.7946E-06	3.10587524
Dentro de los grupos	444.016203	12	37.0013502			
Total	6202.51943	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Concentración de proteína

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.16155613	5	0.03231123	92.6783272	3.6708E-09	3.10587524
Dentro de los grupos	0.00418366	12	0.00034864			
Total	0.16573979	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos

- Actividad específica

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	373102.04	5	74620.408	22.8853457	9.4412E-06	3.10587524
Dentro de los grupos	39127.4359	12	3260.61966			
Total	412229.476	17				

Ho: No existe diferencia entre tratamientos

Si  $F_c$  es mayor que  $F$  Ho se rechaza

Dictamen:  $F_c > F$  Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

### Anexo VI. Composición y preparación de medios empleados

- Medio YPDA (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar)

Componente	Cantidad empleada (g/100 mL de medio)
Extracto de levadura	1
Peptona	2
Dextrosa	2
Agar	2

Método de preparación:

1. Disolver 1 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, 2 g de dextrosa y 2 g de agar en 80 mL de agua destilada.
2. Calentar el medio con frecuente agitación para una obtener una completa disolución del agar.
3. Aforar el medio hasta 100 mL.
4. Esterilizar por autoclave (121° C, 15 minutos y 15 Psi)

Se almacena a 4°C ya que bajo estas condiciones tiene una vida útil de varios meses.

- Medio YPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa)

Componente	Cantidad empleada (g/100 mL de medio)
Extracto de levadura	1
Peptona	2
Dextrosa	2

Método de preparación:

1. Disolver todos los componentes del medio en 80 mL de agua destilada.
2. Aforar el medio hasta 100 mL.
3. Esterilizar por autoclave (121° C, 15 minutos y 15 Psi)

Se almacena a temperatura ambiente o a 4°C; bajo estas condiciones tiene una vida útil de varios meses.

- Medio YPD+Zeocina

Componente	Cantidad empleada (g/100 mL de medio)
Extracto de levadura	1
Peptona	2
Dextrosa	2
Zeocina (100 mg/mL)	0.1 mL

Método de preparación:

1. Disolver el extracto de levadura, peptona y dextrosa en 80 mL de agua destilada.
2. Aforar el medio hasta 100 mL.
3. Esterilizar por autoclave (121° C, 15 minutos y 15 Psi)
4. Enfríe la solución aproximadamente a 60 ° C y agregue la cantidad de Zeocina correspondiente Nota: esta adición se tiene que realizar en condiciones estériles y en ausencia de luz.

Su almacenamiento tiene que ser en condiciones de ausencia de luz y a 4°C. Una vez preparado el medio este tiene una vida útil de dos semanas.

- Medio YP (Extracto de levadura, peptona)

Componente	Cantidad empleada (g/100 mL de medio)
Extracto de levadura	1
Peptona	2

Método de preparación:

1. Disolver los componentes del medio en 80 mL de agua destilada.
2. Aforar el medio hasta 100 mL.
3. Esterilizar por autoclave (121° C, 15 minutos y 15 Psi)

Se almacena a temperatura ambiente o a 4°C; bajo estas condiciones tiene una vida útil de varios meses.

- Medio BMGY (Amortiguadored Glycerol-complex Medium)

Componente	Concentración de solución stock	Concentración final de componente en el medio	Cantidad empleada de solución stock (mL/100 mL de medio)
YP	NA	NA	Hasta el aforo de 100 mL
Glicerol	10X	1%	10 mL
Biotina	500X	0.00004 %	200 µL
YNB	10X	1.34%	10 mL
Amortiguador de potasio pH=6	1M	100mM	10 mL

Método de preparación:

Realizar todos los componentes por separado (se pueden almacenar a una temperatura de 4°C) y añadir las cantidades especificadas en el cuadro anterior en un ambiente estéril.

Todos los componentes del medio se pueden esterilizar por medio de la autoclave, sin embargo, el YNB se esteriliza por filtración.

Su almacenamiento es a una temperatura de 4°C; bajo estas condiciones tiene una vida útil de dos meses.

- Medio BMMY (Amortiguador de Metanol-complex Medium)

Componente	Concentración de solución stock	Concentración final de componente en el medio	Cantidad empleada de solución stock (mL/100 mL de medio)
YP	NA	NA	Hasta el aforo de 100 mL
Biotina	500 X	0.00004 %	200 µL
YNB	10 X	1.34 %	10 mL
Amortiguador de potasio pH 6	1 M	100 mM	10 mL
Metanol	NA	NA	Dependiendo el ensayo realizado

NA: No aplica.

Método de preparación:

Preparar todos los componentes por separado (se pueden almacenar a una temperatura de 4°C) y añadir las cantidades especificadas en el cuadro anterior en un ambiente estéril.

Todos los componentes del medio se pueden esterilizar en autoclave, excepto YNB, que se esteriliza por filtración. El metanol no requiere esterilización.

Su almacenamiento es a una temperatura de 4°C; bajo estas condiciones tiene una vida útil de dos meses.

## Anexo VII. Análisis de las secuencias de los genes que codifican para las cutinasas recombinantes AN CUT 1 y AN CUT 3 por medio de los servidores ExPASy (Bioinformatics Resource Portal), NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0 Server (Technical University of Denmark)

### Cutinasa AN CUT 1

- Secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la cutinasa AN CUT 1

```
GAATTCATGAACCCAATTAGATTGGATCAAAGACAAATCACTGGTAACGAATTGAGAGATGGTTCTTGTCAT
GATGTTACTTTTTATTTTCGCTAGAGGTTCTACTGAGTTGGGTTACTTGGGTTCTACTGTTGGTCCTGCTACTTG
TAACGTTTGAAGTTGAGAAAACCAGGTCAAGTTGCTTGTCAAGGTGTTGCTCCTGCTTACATCGCTGATTTGG
CTTCTAACTTTTTGCCACAAGGTACTAACCAAATCGCTATTAATGAGGCTAAGTCTTTGTTGAGTTGGCTGCT
TCTAAGTGTCTAACACTAAAATTGTTGCTGGTGGTACTCTCAAGGTGCTGCTGTTATGCATGCTGCTATTTCT
TACTTTGTCTTCTACTGTTCAAGATCAAATTAAGGGTGTGTTTTGTTTGGAGATACTAGAAACAACAAGAT
GGTGGTAGAATCCCAAACCTTCCCTACTGATAAGACTAAGATCATCTGTGCTTTCCGAGATTTGGTTTGTGAAG
GTACTTTGGTTATTACTGCTGCTCACTTGTCTTATATTGATGATGTTCCAGATGCTGCTGATTTCTTGGTTGGT
AAATTGGCGGCCGC
```

- Secuencia de aminoácidos establecida por el servidor ExPASy-TRANSLATE (Bioinformatics Resource Portal)

MNPIRLDQRQITGNELRDGSCHDVTFIFARGSTELGYLGSTVGPATCNVLKLRKPGQVACQGVAPAYIADLASNF  
 PQGTNQIAINEAKSLFELAASKCPNTKIVAGGYSQGAAVMHAAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDTRNKQDGGRIFF  
 PTDKTKIICAFGDVCEGLVITAAHLSYIDDVPDAADFLVGKL

- Resultados obtenidos para la determinación de sitios potenciales de N-glicosilación (considerando el sequón Asn-Xaa-Ser/Thr) y las posibles asparaginas glicosiladas que no se encuentran en el sequón Asn-Xaa-Ser/Thr por medio del servidor NetNGlyc 1.0 (Technical University of Denmark)

<b>Considerando el sequón Asn-Xaa-Ser/Thr</b>		
<b>Posición</b>	<b>Aminoácidos vecinos a la Ans</b>	<b>Potencial</b>

**No se encontraron sitios para la posible glicosilación**

<b>Considerando las posibles Asn glicosiladas que no se encuentran en el sequón Asn-Xaa-Ser/Thr</b>		
<b>Posición</b>	<b>Aminoácidos vecinos a la Ans</b>	<b>Potencial</b>
2	NPIR	0.7033
14	NELR	0.7479
48	NVLK	0.7358
74	NFLP	0.2069
81	NQIA	0.6148
86	NEAK	0.6848
101	NTKI	0.6610
142	NKQD	0.4373
151	NFPT	0.4813

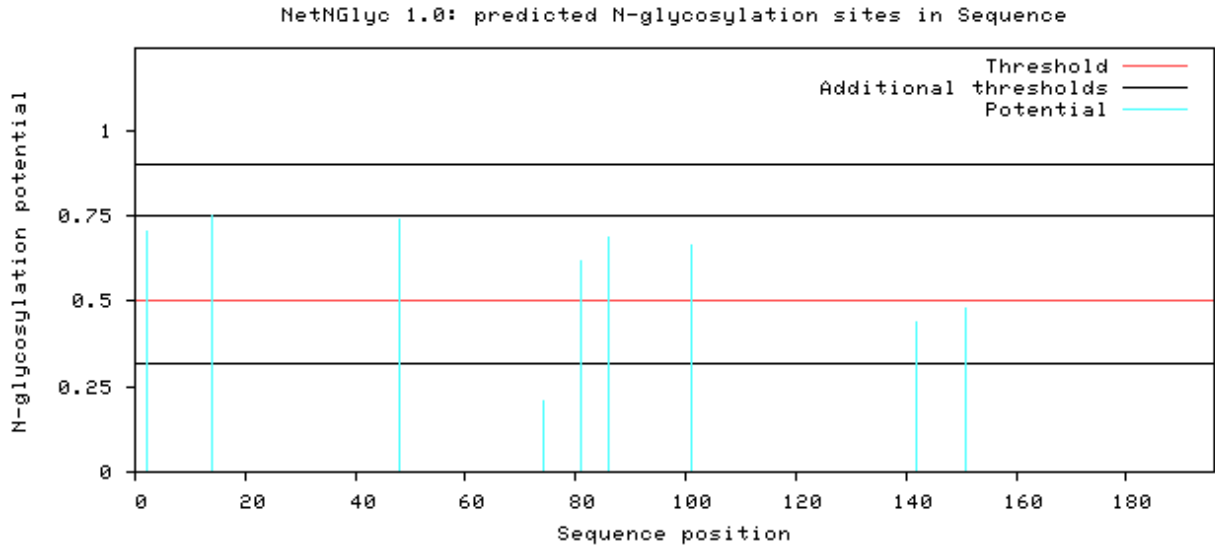


Gráfico 17. Posibles N-glicosilaciones para la cutinasa ANCUT 1, considerando las Ans susceptibles a glicosilación.

- Resultados obtenidos para determinar sitios potenciales de O-glicosilación por medio del servidor NetOGlyc 4.0 Server (Technical University of Denmark)

Posición	Aminoácido	Potencial
----------	------------	-----------

No se encontraron sitios para la posible glicosilación

### Cutinasa ANCUT 3

- Secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la cutinasa ANCUT 3

```
GAATTCATGACTCCATTGCCTTCTGATACTGATGTTTCTTTGGAAAGAAGACAATCTATGAACTCTAACGATTT
GGAGAAGGGGAGATTGTAAGTCTGTTGCTTTTATTTTCGCTAGAGGTTCTACTGAAATTGGTAACATGGGTTTT
GTTGTTGGTCCAGGTGTTTGTCTAATTTGAAGTCTACTTTGGGTTCTGATAAAGTTGCTTGCAAGGTGTTG
GTGGTGCTTACACTGCTGGTTTGATTCAAACGCTTTGCCAGCTAATACTGATTCTGGTTCTATTAAGGAGGC
TGTTAAATGTTTCGATTTGGCTGCTAAGTGTCTGATACTCAAATTGTTGCTGGTGGTTATTCTCAAGTTCTG
CTGTTATTGATAACGCTATTCAAAGTTGGATGATTCTACTAGAGATAGAGTTAAAGGTGTTGTTTTGTTCCGG
TTTCACTAGAAATTTGCAAGATAAGGGTCAAATTCAGGTTACCCTAAGGATCAAATAAGTTTATTGTGCT
GTTGGAGATTTGGTTTGTCTGGTACTTTGATCATCACTGCTTCTCATATGACTTACGGTTTGAACGCTGGAG
ATGCTGCTAAATTTTTGGCTTCTCAAGTTTCTGTTGCGGCCGC
```

- Secuencia de aminoácidos establecida por el servidor ExPASy-TRANSLATE (Bioinformatics Resource Portal)

MTPLPSDTDVSLERRQSMNSNDLEKGDCKSVAFIFARGSTEIGNMGFVVGPGVCSNLKSTLGSDKVACQGVGGA  
 YTAGLIQNALPANTDSGSIKEAVKMFDLAAKCPDTQIVAGGYSQGSVIDNAIQKDDSTRDRVKGVVLFQFTRN  
 LQDKGQIPGYPKDQTKVYCAVGDLVCSGTLITASHMTYGLNAGDAAKFLASQVSV

- Resultados obtenidos para la N-glicosilación (considerando el secuón Asn-Xaa-Ser/Thr) y las posibles asparaginas glicosiladas que no se encuentran en el secuón Asn-Xaa-Ser/Thr por medio del servidor NetNGlyc 1.0 (Technical University of Denmark)

<b>Considerando el secuón Asn-Xaa-Ser/Thr</b>		
<b>Posición</b>	<b>Aminoácidos vecinos a la Asn</b>	<b>Potencial</b>

**No se encontraron sitios para la posible glicosilación**

<b>Considerando las posibles Asn glicosiladas que no se encuentran en el secuón Asn-Xaa-Ser/Thr</b>		
<b>Posición</b>	<b>Aminoácidos vecinos a la Asn</b>	<b>Potencial</b>
19	NSND	0.6517
21	NDLE	0.6030
44	NMGF	0.7041
56	NLKS	0.7573
82	NALP	0.1453
87	NTDS	0.6090
125	NAIQ	0.5471
149	NLQD	0.5013
190	NAGD	0.5608



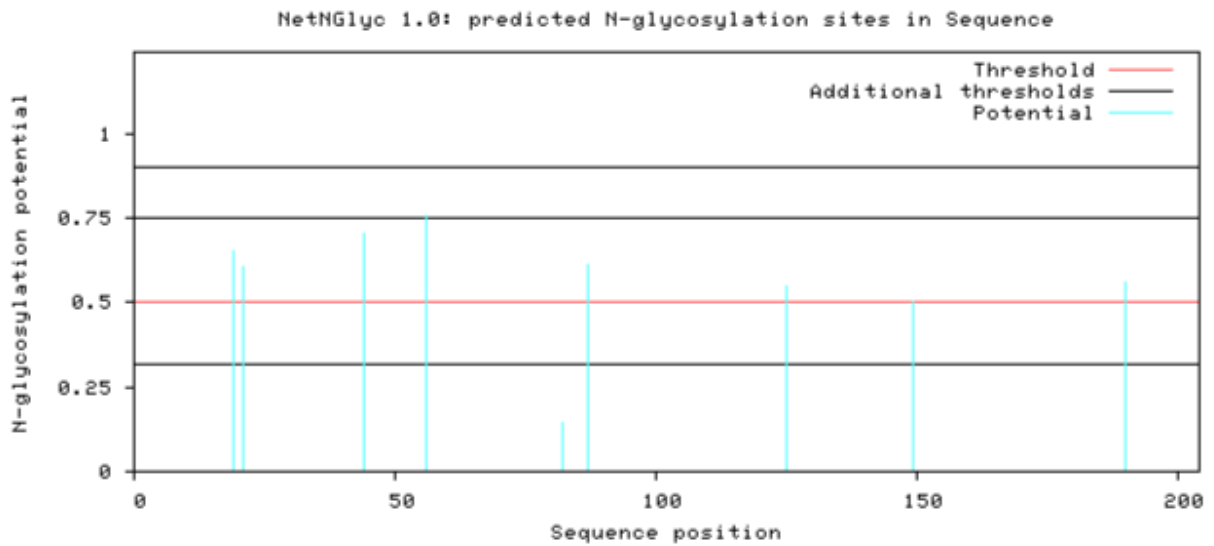


Gráfico 18. Posibles N-glicosilaciones para la cutinasa AN CUT 3, considerando las Asn susceptibles a glicosilación.

- Resultados obtenidos para determinar sitios potenciales de O-glicosilación por medio del servidor NetOGlyc 4.0 Server (Technical University of Denmark)

Posición	Aminoácido	Potencial
6	S	0.6468
8	T	0.5090
17	S	0.8511
182	S	0.5724