

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Estudio de las condiciones que afectan la  
modificación post-traducciona l de la penicilino  
acilasa en *Escherichia coli* JM101/pPA102”**

Tesis que presenta

**ALEJANDRA HERRERA CHAVARRÍA**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:

**Dr. Antonio de León Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2005



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudio de las condiciones que afectan la modificación post-traducciona l de la penicilino acilasa en *Escherichia coli* JM101/pPA102**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alejandra Herrera Chavarría** y aprobada el **22 de Diciembre de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez  
(Director de la tesis)

Dra. Ana Paulina Barba De La Rosa  
(Asesor de la tesis)

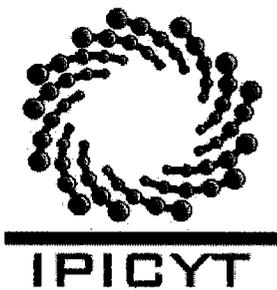
Dra. M. Leticia Santos Martínez  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto 39639 y de la beca académica 172370.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 020 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de diciembre del año 2005, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Alejandra Herrera Chavarría**

sobre la Tesis intitulada:

*Estudio de las condiciones que afectan la modificación post-traducciona de la penicilino acilasa en Escherichia coli JM101/pPA102*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Antonio De León Rodríguez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:38 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes diciembre de 2005.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



## Contenido

	<b>Página</b>
Constancia de aprobación de la tesis	i
Acta de examen	ii
Créditos institucionales	iii
Lista de tablas	v
Lista de figuras	v
Lista de ecuaciones	vi
Nomenclatura	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
<b>1. ANTECEDENTES</b>	
1.1 Producción de proteínas recombinantes	1
1.2 <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión	2
1.2.1 Exportación de proteínas	2
1.2.2 Cuerpos de inclusión	4
1.2.3 Proteólisis	4
1.2.4 Vías metabólicas	5
1.3 Modificación postraducciona	6
1.4 Penicilino acilasa (PA) como modelo de estudio	8
1.4.1 Penicilino acilasa en la industria	9
1.4.2 El gen <i>pac</i> y el procesamiento de su producto, ppPA	11
1.4.3 Producción de PA	13
1.4.4 Efecto de variables ambientales sobre la maduración de ppPA	17
1.4.5 Papel del oxígeno en el metabolismo bacteriano	18
1.5 Cultivos por lote	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 Sistema de fermentación	23
3.2 Sistema de expresión de PA: <i>E. coli</i> JM101/pPA102	24
3.3 Medios de cultivo	25
3.4 Conservación de la cepa	26
3.5 Inóculos	27
3.6 Estrategia experimental	27
3.7 Obtención y procesamiento de muestras	29
3.8 Métodos analíticos	29
3.8.1 Determinación de biomasa	29
3.8.2 Determinación de azúcares reductores	29
3.8.3 Determinación de actividad enzimática	30
3.8.4 Determinación de proteínas	31
3.9 Análisis del procesamiento <i>in vivo</i> del precursor de PA por electroforesis desnaturante.	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Efecto del oxígeno disuelto sobre la producción de PA	34

4.2	Efecto del oxígeno disuelto sobre la modificación postraducciona l de ppPA	39
4.3	Efecto de inhibidores de la transcripción, traducción y cadena respiratoria sobre la maduración de ppPA	42
4.4	Efecto de la temperatura cadena respiratoria sobre la maduración de ppPA	45
5.	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	50
6.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51
<b>APÉNDICES</b>		
A.	Preparación de soluciones	59
B.	Curvas estándar	62
C.	Cinéticas de crecimiento y producción de PA a diferente OD	66
D.	Perfil del OD y pH durante las fermentaciones	70
E.	Electroforesis en geles de poli acrilamida y SDS	71

### Lista de tablas

	<b>Página</b>	
1.1	Miembros integrantes de la superfamilia de las Ntn	10
3.1	Medio Luria Bertani (LB).	25
3.2	Medio mínimo (M9).	26
3.3	Preparación del Gel de Laemmli.	33
4.1	Parámetros cinéticos de cultivos por lote con glucosa a diferente tensión de oxígeno disuelto.	39
A-1	Composición de la solución del DNS.	60
A-2	Composición del reactivo E.	60
B-2	Curva estándar para determinación de azúcares reductores.	63
B-3	Curva estándar para determinación de actividad enzimática.	64
B-4	Curva estándar para determinación de proteínas.	65

### Lista de figuras

	<b>Página</b>	
1.1	Vías de exportación y plegamiento periplásmico.	3
1.2	Diagrama topológico de las Ntn- hidrolasas.	8
1.3	Sitio de acción de las enzimas penicilino acilasa y beta-lactamasa.	9
1.4	Relación del gen <i>pac</i> y su producto funcional.	11
1.5	Síntesis y maduración de la Penicilino Acilasa.	12
1.6	Estructura tridimensional de las ntn- hidrolasas.	13
1.7	Formación del producto.	20
3.1	Diagrama global del sistema del fermentador.	24
3.2	Mapa genético del plásmido pPA102.	25
3.3	Reacción química del 6-APA con PDAB.	30
4.1	Cinética de crecimiento y producción de PA a 50% de OD.	36

4.2	Cinética de crecimiento y producción de PA a 3% de OD.	37
4.3.	Análisis del procesamiento del precursor de la PA por PAGE: SDS a 3% de OD.	41
4.4	Efecto del nivel de OD y metabolitos sobre la maduración del precursor de PA.	43
4.5	Efecto de la inhibición de la cadena respiratoria sobre la maduración del precursor de PA.	44
4.6	Efecto de la inhibición de la traducción de proteínas de <i>novo</i> sobre la maduración del precursor de PA.	46
4.7	Efecto de la inhibición de la transcripción de RNAs de <i>novo</i> sobre la maduración del precursor de PA.	47
4.8	Efecto de la temperatura sobre la maduración del precursor de PA.	48
4.8	Análisis del procesamiento del precursor de PA por PAGE: SDS a diferente temperatura.	49
B-1	Curva estándar de peso seco.	62
B-2	Curva estándar de azúcares reductores.	63
B-3	Curva estándar de actividad enzimática.	64
B-4	Curva estándar de proteínas totales.	65
C-1	Cinética de crecimiento y producción de PA a 14% de OD.	66
C-2	Cinética de crecimiento y producción de PA a a 40% de OD.	67
C-3	Cinética de crecimiento y producción de PA a 3% de OD.	68
C-4	Cinética de crecimiento y producción de PA a 0-8% de OD	69
D-1	Perfil del OD y pH durante un cultivo a 3% de OD.	70
D-2	Perfil del OD y pH durante un cultivo a 50 % de OD.	70
D-3	Perfil del OD y pH durante un cultivo a 0-8% de OD.	70

### Lista de ecuaciones

	Página	
1-1	Velocidad de crecimiento específica	19
1-2	Ecuación de Monod	20
1-3	Ecuación de Leudeking- Piret	21
3-1	Actividad enzimática volumétrica	31
3-2	Concentración de proteínas	32

### Nomenclatura

<b>% OD</b>	Por ciento de oxígeno disuelto con respecto a la saturación del aire
<b>6-APA</b>	Ácido 6-aminopenicilánico
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>AEE</b>	Actividad enzimática específica
<b>AEV</b>	Actividad enzimática volumétrica

<b>AFA</b>	Ácido fenilacético
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>IPTG</b>	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Kb</b>	Kilopares de bases
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>km</b>	Kanamicina
<b>L</b>	Litros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>PA</b>	Penicilino acilasa
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos salino
<b>preproPA</b>	Subunidad alfa y beta de la penicilino acilasa más el péptido señal y el péptido conector
<b>proPA</b>	Subunidad alfa y beta de la penicilino acilasa más el péptido conector
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>U/mg<sub>biom</sub></b>	Unidades de actividad enzimática por miligramo de biomasa
<b>U/mg<sub>prot</sub></b>	Unidades de actividad enzimática por miligramo de proteínas
<b>xg</b>	Unidades de fuerza centrífuga

## RESUMEN

Estudio de las condiciones que afectan la modificación post-traducciona l de la penicilino acilasa en *Escherichia coli* JM101/pPA102. Mediante técnicas del ADN recombinante se han logrado aislar, clonar, expresar y sobreexpresar genes de interés, siendo *Escherichia coli* el huésped de excelencia, debido a que se conoce bien su genética, su accesibilidad, no toxicidad, crece en nutrientes de bajos costos, es de rápida reproducción, y el escalamiento es simple. Sin embargo, el hecho de tener un sistema de expresión eficiente no garantiza que la proteína de interés expresada llegue a ser biológicamente activa.

Se creía que las bacterias eran organismos incapaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales. Hoy en día se tienen reportes de glicosilaciones y procesamiento en proteínas y preproteínas de procariotes. La penicilino acilasa (PA), una enzima clave en la síntesis de penicilinas semisintéticas, es una proteína heterodimérica periplásmica, que es traducida en forma de precursor inactivo, el cual debe ser exportado, procesado y plegado correctamente para obtener actividad enzimática.

Las condiciones ambientales, constituyen un factor plenamente determinante para la expresión genética de cualquier organismo. En el caso de cultivos bacterianos, éstas se refieren a las condiciones de operación del biorreactor (pH, temperatura, oxígeno disuelto, naturaleza y concentración de los nutrientes, entre otras). En particular, se ha observado que el oxígeno disuelto (OD), afecta de manera directa variables como la velocidad específica de crecimiento y como consecuencia la producción de PA. En este trabajo se estudió el efecto del OD sobre el procesamiento post-traducciona l de la PA. Se realizaron cultivos por lote en bioreactor, en los que el pH, temperatura y OD fueron controlados. Se analizó la cinética de acumulación y procesamiento del precursor de PA. Los resultados indican que el OD es fundamental para el procesamiento del precursor de la penicilino acilasa.

**Palabras clave:** Proteínas recombinantes, procesamiento, oxígeno disuelto.

## ABSTRACT

Study of the environmental conditions on penicillin acylase post-translational modification in *Escherichia coli* JM101/pPA102. By means of the recombinant DNA techniques it is possible to isolate, clone and express genes of biotechnological interest. Due to its well-known genetics, accessibility, not toxicity, low-cost nutrients usage, rapid reproduction, and simple scale-up, *Escherichia coli* has been the host of excellence. Nevertheless, the fact of having an efficient expression system does not guarantee that the protein expressed manages to be biological active.

It was believed, that bacteria were not able to carry out posttranslational modifications. Nowadays there are reports of glycosilations and processing in proteins and preproteins of procariotes. Penicillin acylase (PA), a key enzyme in semisynthetic penicillin production, is a heterodimeric periplasmic protein that is translated as an inactive preproPa precursor, which must be exported, processed, and folded up correctly to produce the enzymatic activity.

The environmental conditions constitute a determinant factor on the genetic expression in any organism. In the case of bacterial cultures, these are referred to operation conditions in the bioreactor (pH, temperature, dissolved oxygen (OD), nutrients, and others). It has been observed, especially, that the OD affects directly variables such as the specific rate growth and as consequence the PA production. In this work, the effect of OD on the ppPA processing was evaluated. Batch cultures were realized in bioreactor, where the pH, temperature and OD were controlled. The PA production and ppPA processing kinetic was analyzed. The results indicate that the presence of oxygen is fundamental for the processing of the precursor of the penicilino acilasa.

**Keywords:** Recombinant proteins, processing, dissolved oxygen.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Producción de proteínas recombinantes

Recientes desarrollos en la tecnología del ADN recombinante han contribuido al apreciable progreso en la sobreexpresión de proteínas heterólogas. La manipulación genética ha mejorado la biosíntesis a nivel transcripcional y traduccional, sin embargo, el alto nivel de expresión de las proteínas recombinantes, con el uso de esta tecnología a menudo resulta en agregación y acumulación de cuerpos de inclusión, sobre todo si se trata de proteínas de exportación o secreción (Bowden y col., 1991).

Al combinar la manipulación genética con la ingeniería de fermentadores para optimizar las estrategias se ha logrado un incremento considerable en la producción de proteínas heterólogas.

La expresión de genes heterólogos en *E. coli* puede estar asociada con un incremento en la carga metabólica y el destino de las proteínas expresadas está determinado en parte por las actividades degradativas de la célula huésped (Hanning y Makrides, 1998). Se ha observado, que la sobreexpresión de algunas proteínas exportadas por *E. coli*, como la beta-lactamasa, fosfatasa alcalina y penicilino acilasa, tienden a formar cuerpos de inclusión citoplásmicos y/o periplásmicos. La eficiencia en la expresión de diferentes genes en *E. coli* yace en la regulación a nivel postraduccional (Chou y col., 1999). Entre las proteínas recombinantes de interés biotecnológico se encuentran las interleucinas, los interferones y la penicilino amidasa. Una característica que comparten es que deben someterse a una modificación postraduccional antes de llegar a su forma biológicamente activa. Las primeras, requieren de la formación de enlaces disulfuro, por lo que deben ser secretadas a periplasma, que confiere un ambiente oxidante para la formación de dichos enlaces; mientras que la penicilino amidasa, además de su exportación a periplasma, requiere experimentar un procesamiento autocatalítico poco usual en procariotes.

## 1.2 *Escherichia coli* como sistema de expresión

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos procariotes más usados para manipulación genética y para producción a nivel industrial de proteínas de interés biotecnológico. Comparada con otros sistemas de expresión establecidos (Baneyx y Mujacic, 2004), *E. coli* ofrece varias ventajas, incluyendo su genética bien conocida, accesibilidad, no toxicidad, nutrientes de bajo costo, rápida reproducción y escalamiento simple. Sin embargo, a menudo la sobreexpresión de proteínas foráneas conduce a respuestas metabólicas no deseadas, incluyendo cambios en las funciones de regulación y metabolismo central (Oh y Liao, 2000), retardo en el crecimiento celular (Bentley y col., 1990), destrucción de ribosomas y muerte celular (Dong y col., 1995).

### 1.2.1 Exportación de proteínas

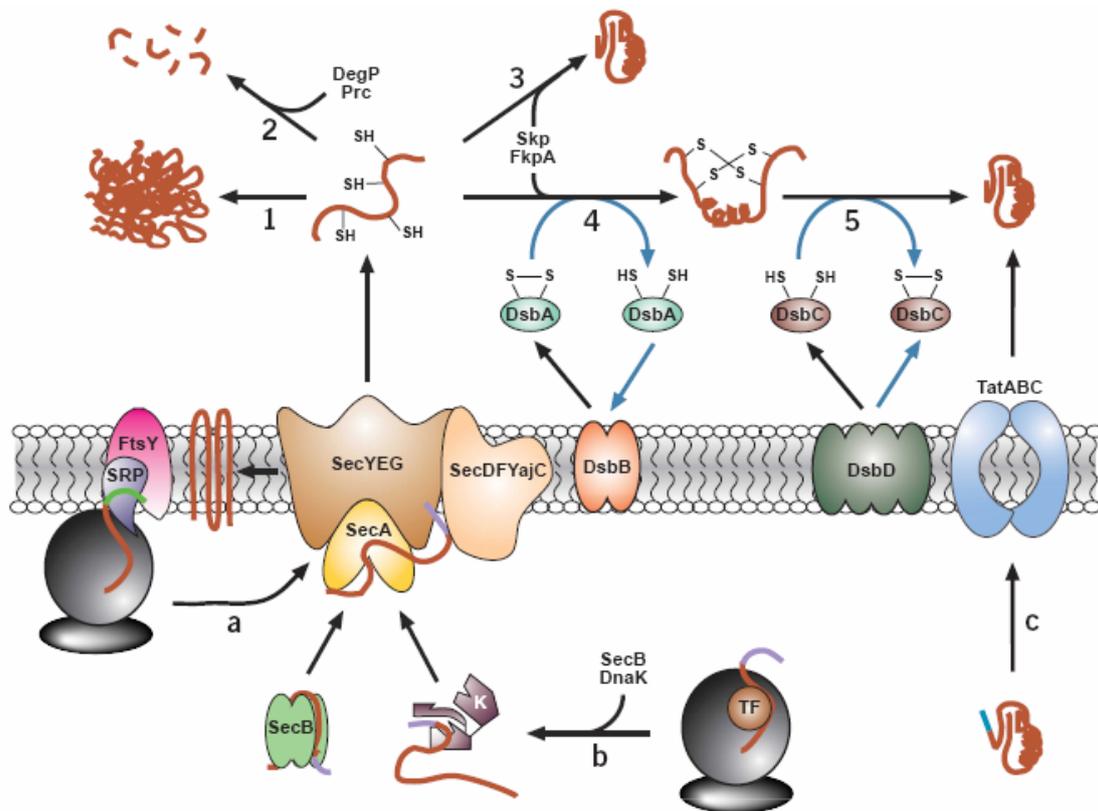
Se conocen tres sistemas de translocación mediante los cuales las preproteínas (proteínas con péptido señal<sup>a</sup>) pueden ser exportadas o integradas a membrana (SRP, Sec y Tat) (Figura 1-1).

Las preproteínas con secuencia señal altamente no polares o segmentos transmembranales de proteínas de membrana interna son reconocidos por SRP, el cual, junto con TF, escanean las cadenas polipeptídicas traducidas. La vía de exportación dependiente de SRP involucra la entrega del complejo cadena nascente- ribosoma a FtsY y la subsecuente translocación a través del translocón SecYEG-SecDFYajC (Figura 1-1a). Las preproteínas que cuentan con secuencias señales menos hidrofóbicas, son translocadas mediante la vía dependiente de Sec. TF se asocia con el polipéptido nascente, mientras la cadena crece, TF se disocia y el polipéptido se transfiere a SecB o DnaK que lo

---

<sup>a</sup> Un péptido señal es una secuencia de 20 a 30 aminoácidos de longitud que se encuentra en la región N-terminal de las preproteínas, contiene tres regiones distintas: 1) región hidrofílica o región amino-terminal básica, 2) región o cuerpo hidrofóbico y 3) región carboxi-terminal con aminoácidos de cadena corta en las posiciones -1 y -3 (Ignatova y col., 2002).

mantiene en una conformación extendida. La entrega a SecA y la translocación a través de SecYEG completan el proceso (Figura 1-1b).



**Figura 1-1.** Vías de exportación y plegamiento periplásmicas (Baneix y Mujacic, 2004).

Las preproteínas exportadas mediante la vía Tat normalmente presentan un motivo "twin" de arginina en su secuencia señal, la mayoría de ellas son proteínas de unión a cofactores redox necesarios para la respiración anaerobia. La maquinaria de exportación Tat se compone de 4 proteínas integradas a membrana TatA-B,C y D. El complejo TatBC reconoce a las proteínas sustrato y las entrega a TatA, la cual forma un canal con un diámetro de arriba de 70 Å con capacidad para acomodar sustratos. La vía de secreción dependiente de una pareja de argininas (Tat) exporta proteínas dobladas o parcialmente dobladas (Figura 1-1c). Comparándola con la velocidad de exportación de otras proteínas dependientes de Sec, la transportación de proteínas mediada por el transporte Tat es más lenta (Palmer y Berks, 2000).

Después de la ruptura del péptido señal, al pasar por cualquiera de los tres sistemas, los polipéptidos, pueden formar agregados (1), someterse a proteólisis por acción de DegP o Prc (2) o alcanzar una conformación nativa con o sin ayuda de moduladores del plegamiento (Skp y FkpA) (3). DsbA forma enlaces disulfuro en las proteínas que contienen cisteínas (4) mientras que DsbC isomeriza los enlaces disulfuro incorrectos (5) Estas oxidoreductasas son reactivadas por DsbB y DsbD, respectivamente.

### 1.2.2 Cuerpos de inclusión

Tomando en cuenta, que el ribosoma libera una cadena proteínica cada 35 segundos (Lorimer, 1996), y que la concentración macromolecular puede alcanzar hasta los 400 mg/mL, el plegamiento proteínico resulta un fenómeno extraordinariamente rápido.

En *E. coli* y otros sistemas, el plegamiento erróneo de las proteínas heterólogas es un problema común. La formación de cuerpos de inclusión y la simple degradación son dos limitantes por las que una proteína no alcanza su estructura conformacional correcta. Se ha observado, que la sobreexpresión de genes de interés que alcanza hasta el 50% de las proteínas celulares totales, por medio de promotores fuertes (*tac*, *trc* y T7) (Sawas y Makrides, 1996) o altas concentraciones de inductor, favorece la acumulación dentro de las células de agregados de proteínas insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Esto se debe quizá a la saturación de moduladores del plegamiento (Thomas y col., 1997).

### 1.2.3 Proteólisis

La degradación de proteínas mal dobladas por acción de proteasas y peptidasas del huésped, garantiza que los polipéptidos anormales no se acumulen dentro de la célula y permita el reciclaje de aminoácidos.

En el citoplasma, la degradación proteolítica es iniciada por cinco proteasas de choque térmico dependientes de ATP (Lon, ClpYQ/HslUV, ClpAP, ClpXP y FtsH) y se completa por peptidasas que hidrolizan secuencias hasta 2 a 5 residuos de longitud. En periplasma, la principal proteasa es DegP (aunque a bajas temperaturas presenta actividad de chaperona) seguida por Prc.

#### 1.2.4 Vías metabólicas

El nivel de OD y los nutrientes en el medio, dictan la ruta metabólica a usar por las bacterias.

En condiciones aerobias, la glucosa y otras hexosas se transforman en acetil CoA, cuyos carbonos se oxidan a CO<sub>2</sub> en el ciclo de Krebs. Esta vía, junto con la cadena respiratoria, en donde el aceptor final de electrones y protones es el oxígeno, y la fosforilación oxidativa resultan las vías más eficientes en el aporte de energía celular. Sin embargo, cuando la velocidad de consumo de glucosa es superior a su capacidad oxidativa (lo cual ocurre a altas velocidades específicas de crecimiento (Han y col., 1992)), parte del acetil CoA se hidroliza a CoA y ácido acético por acción de la acetil CoA sintetasa, éste mecanismo se conoce como “efecto Crabtree” o “efecto glucosa de las bacterias” (Doelle y col., 1982).

En condiciones microaerobias, el piruvato actúa como aceptor de electrones y es el intermediario en la generación de los ácidos orgánicos, mismos que se consumen cuando se agota la fuente de carbono. Se producen diferentes ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico, succínico y fórmico) y etanol. Este tipo de metabolismo, se conoce como fermentación ácido-mixta o efecto Pasteur.

En condiciones anaerobias, el piruvato se hidroliza a formiato y acetato. La oxidación del nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH), en lugar de penetrar en la cadena respiratoria, cede sus electrones a compuestos orgánicos con poco poder oxidante. El complejo formiato- hidrógeno- liasa, que

convierte al ácido fórmico en dióxido de carbono e hidrógeno molecular, es parte integral del metabolismo de *E. coli* durante condiciones anaerobias (Hörnsten, 1995).

### 1.3 Modificación postraducciona

La transcripción y la traducción son dos eventos que ocurren de manera simultánea en el citoplasma bacteriano. La vida media promedio de un ARNm bacteriano es de 1 a 2 min. La velocidad de traducción (15 aa por seg) bajo condiciones de cultivo óptimas es muy similar a la velocidad de transcripción (14 codones por segundo). La traducción de una secuencia de ARNm en una secuencia de aminoácidos en el ribosoma no siempre es el final del proceso de formación de una proteína. Algunos de los péptidos sintetizados en los ribosomas son modificados químicamente o procesados. Estas modificaciones pueden variar su actividad, su vida media o su localización celular.

La modificación química consiste en la unión de un grupo químico a los grupos amino- y carboxi-terminal o a los grupos reactivos de los aminoácidos internos de un polipéptido. Ejemplos de ésta son: la acetilación del N-terminal que regula la vida media de las proteínas dentro de la célula, evitando su degradación por proteasas; la glicosilación de residuos de treonina, asparagina y serina; la fosforilación de la serina; la hidroxiprolina y la hidroxilisina son formados por modificación química de los residuos de prolina y lisina mediante enzimas específicas después de la síntesis de las cadenas polipeptídicas del colágeno; de manera similar, existe la metilhistidina, en la actina y el carboxiglutamato en la protrombina, factor esencial de la coagulación.

Anteriormente, se pensaba que la glicosilación de las proteínas ocurría únicamente en eucariotes. Hoy en día existen reportes de N-O glicosilaciones en procariotes. Lindenthal y Elsinghorst (1999) identificaron glicoproteínas en *E. coli* (AIDA-I y TibA), Brimer y Montie (1998) identificaron en flagelina en *P. auruginosa* y Virji (1998) encontró una proteína glicosilada en el pelo (pilus) de

meningococos. Por lo general, la mayoría de las proteínas glicosiladas encontradas en bacterias, están relacionadas con su patogenicidad.

Los residuos cercanos al N-terminal de los péptidos destinados para exportación o secreción (precursores), son modificados químicamente por el agregado de grupos lipídicos.

Además de la modificación por la adición de algún grupo químico, algunas proteínas son procesadas de tal manera que se altera su actividad. La eliminación de restos C- ó N-terminales de un polipéptido por escisión del enlace peptídico mediado por una proteasa, es la forma más común de procesamiento. Como lo es el caso de la remoción de la metionina N-terminal en los péptidos de bacterias (Kuchel y Ralston, 1998). En eucariotes, la escisión proteolítica es un mecanismo de activación o inactivación, en especial de enzimas que intervienen en el proceso de coagulación sanguínea.

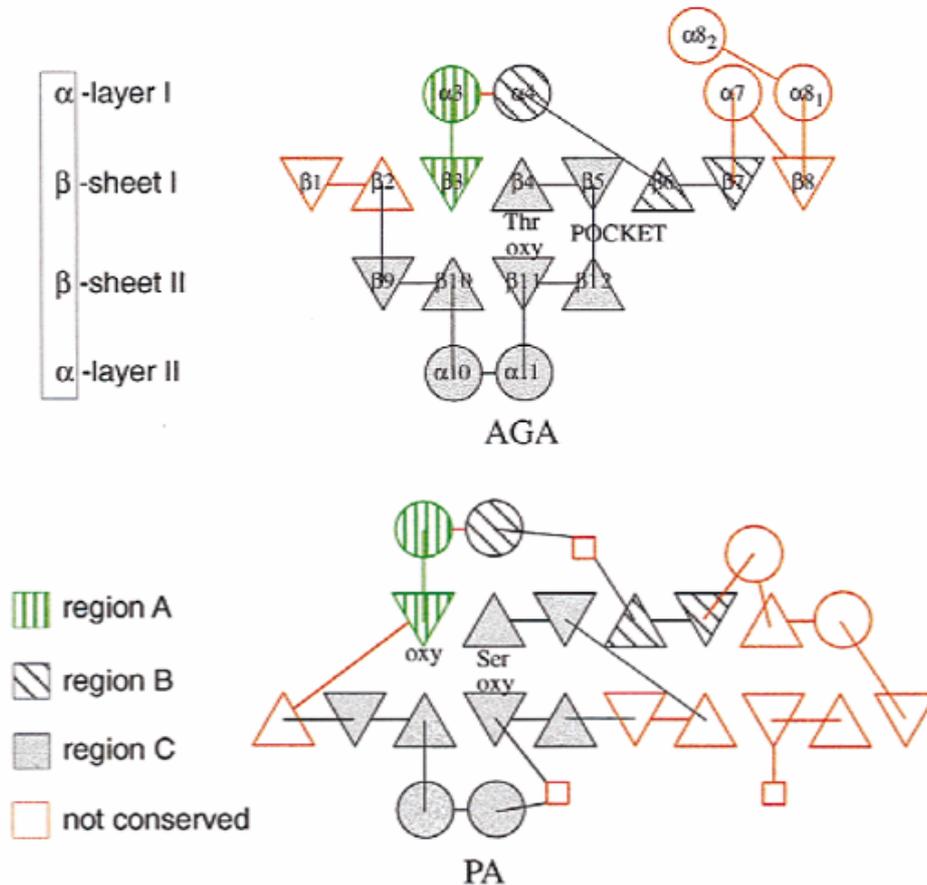
En eucariotes, las hormonas peptídicas como el factor de crecimiento epitelial y la insulina, y en procariotes, las Ntn-hidrolasas, como la PA y AGA, se sintetizan en forma de preproteínas, las cuales con un procesamiento proteolítico pueden llegar a ser biológicamente activas (Brannigan y col., 1995).

### **Ntn-hidrolasas**

Las Ntn-hidrolasas (Amino-terminal nucleofílicas-) son una superfamilia de proteínas que se caracterizan por sintetizarse en forma de preproenzimas, por experimentar un autoprocesamiento proteolítico y por el hecho de que el centro catalítico de las Ntn- hidrolasas lo forma un solo residuo de serina, cisteína o treonina con carácter nucleofílico (Brannigan y col., 1995, Duggleby y col., 1995; Seemuller y col., 1996; Guan y col., 1998; Saarela y col. 1998; Kasche y col., 1999; Lee y col., 2000).

Los miembros de esta superfamilia, presentan un motivo de cuatro capas compuestas por hojas beta y hélices alfa,  $\alpha\beta\beta\alpha$  (Oinonen y Rouvinen, 2000)

(Figura 1-2). La mayoría de estas enzimas participan en reacciones de síntesis. Algunas de ellas, se listan en la tabla 1-1.



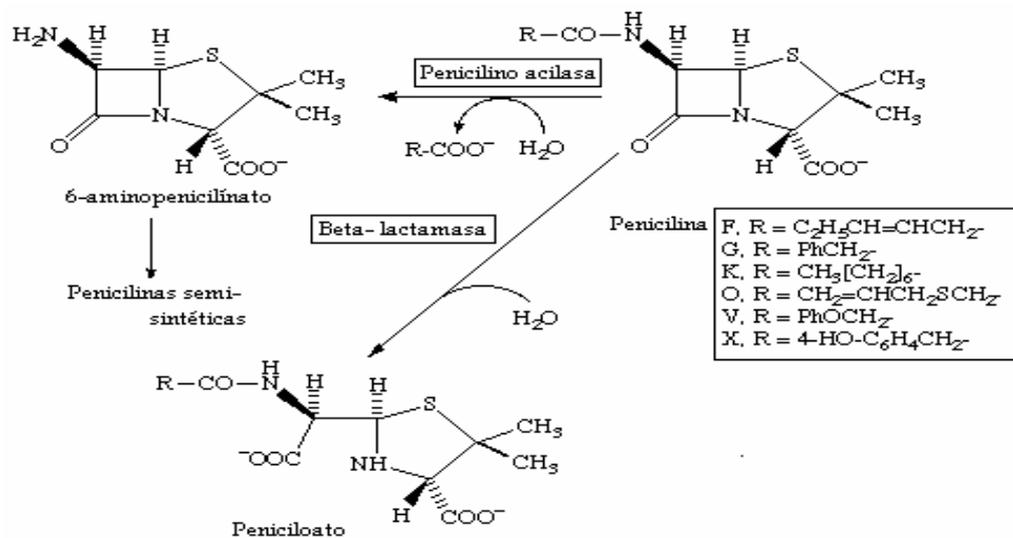
**Figura 1-2.** Diagrama topológico de dos Ntn- hidrolasas: AGA y PA (Oinonen y Rouvinen, 2000).

#### 1.4 Penicilino acilasa (PA) como modelo de estudio

La penicilino acilasa, penicilino amidasa o penicilinamidohidrolasa (PA, E.C. 3.5.1.11), se utiliza para hidrolizar la penicilina G en ácido fenilacético (AFA) y ácido 6- aminopenicilánico (6- APA) (Figura 1-3). Su importancia se ve reflejada principalmente en el uso de éste último, por la industria farmacéutica como materia prima en la producción de penicilinas semisintéticas.

### 1.4.1 Penicilino acilasa en la industria

El surgimiento e incremento de resistencia a las penicilinas y sus efectos colaterales, puso fuera de lugar sus beneficios potenciales en muchos casos de infecciones. El descubrimiento del 6-APA como centro activo y su producción mediante *Penicillium chrysogenum*, permitió la obtención de penicilinas semisintéticas.



**Figura 1-3.** Sitio de acción de las enzimas penicilino acilasa y beta-lactamasa. La beta-lactamasa elimina la acción biológica del antibiótico al hidrolizar el anillo lactámico y convertirlo en ácido penicilóico. La penicilino acilasa, hidroliza el enlace amino terminal del antibiótico y produce 6-APA.

Las penicilinas semisintéticas, entre ellas, ampicilina y amoxicilina (Parmar y col., 2000) son variantes de las penicilinas naturales, que se obtienen introduciendo nuevos grupos radicales (-R) con carboxilo en el 6-APA de manera artificial. Por lo general, éstas cuentan con propiedades que inhiben o disminuyen la acción de las beta-lactamasas (Goodman y Gilman, 1996). La PA ha ocupado hasta el segundo lugar en ventas a nivel mundial, con ingresos de más de 6 millones de dólares por año (Ospina y col., 1992). Más del 60% del 6-APA se produce por vía enzimática. La producción global estimada del 6-

APA para el año 2000 fue de 7000 toneladas por año (Illanes y col., 1994), y su costo de operación total fue de 52.57 dólares por Kg. La enzima representó aproximadamente 7% del costo total (Pinotti y col.,2000).

**Tabla 1-1.** Miembros integrantes de la superfamilia de las Ntn- hidrolasas.

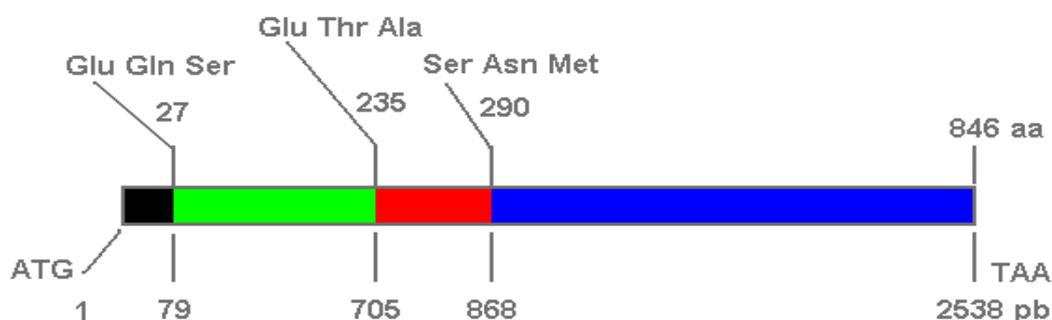
<b>Familia</b>	<b>Función biológica</b>	<b>Fuente natural</b>	<b>Referencia</b>
Aspartil-glucosaminidasa (AGA)	Hidrólisis de derivados de aspartil-glucosamina	Humano	Oinonen y col., 2000; Saarela y col., 1998
		<i>F. meningosepticum</i>	Guan y col., 1998; Guo y col., 1998
Penicilino acilasa	Hidrólisis de penicilinas	<i>E. coli</i>	Duggleby y col., 1995
		<i>P. rettgeri</i>	McDonough y col., 1999
		<i>B. sphaericus</i>	Suresh y col., 1999
Proteosoma	Degradación de proteínas mal plegadas	<i>S. cerevisiae</i>	Groll y col., 1997
		<i>T. acidophilum</i>	Löwe y col., 1995
		<i>E. coli</i>	Bochtler y col., 1997
Glutamina PRPP amidotransferasa	Síntesis de nucleótidos de purina	<i>E. coli</i>	Muchmore y col., 1998
Glucosamina 6-Fosfatotransferasa	Síntesis de compuestos con nitrógeno	<i>E. coli</i>	Isupov y col., 1997
Glucosil-asparaginasa	Hidrólisis de asparagina	Ratón	Grigoryev y col., 1996
		<i>E. coli</i>	Borek y col., 2000
Cefalosporin-amidasa	Hidrólisis de cefalosporinas	<i>P. diminuta</i>	Kim y col., 2000
L-amino-peptidasa-D-ala-esterasa/amidasa	Proteasa	<i>O. anthropi</i>	Bompard-Gilles y col., 2000

La PA, además de utilizarse como biocatalizador inmovilizado a nivel industrial para la obtención de 6-APA, se emplea como protector de grupos funcionales en reacciones selectivas de amidación e hidrólisis de amidas para resolver enantiómeros R- y S- durante la síntesis orgánica de xemilofiban, un agente antiplaquetario (Topgi y col., 1999). Otra aplicación importante de la PA es en la activación enzimática sitio- dirigida de pro-fármacos empleados en la terapia contra el cáncer (Vrudhula y col., 1993; Lu y col., 1999). Se cree, que el papel de PA en la naturaleza tiene que ver con la degradación de compuestos fenilacetilados para obtener AFA y utilizarlo como fuente de carbono cuando la bacteria se encuentra en modo libre (Valle y col., 1991).

#### 1.4.2 El gen *pac* y el procesamiento de su producto, ppPA

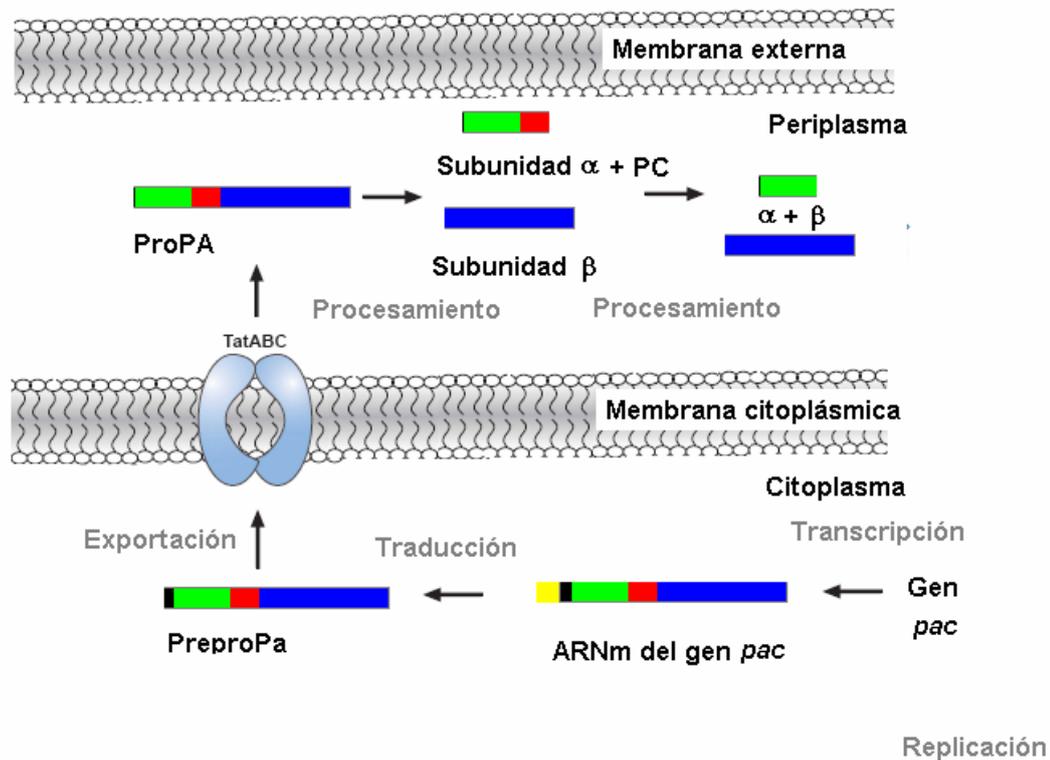
Aunque una gran variedad de especies de hongos, levaduras, actinomicetos y bacterias, contienen el gen *pac*, *Escherichia coli* ha sido el microorganismo más estudiado para la producción de PA (Duggleby y col, 1995).

El marco de lectura abierto del gen *pac* de *E. coli* ATCC11105 consta de 4 dominios estructurales (Figura 1-4): (i) un péptido líder de 78 pb (en color negro) (ii) una subunidad alfa de 627 pb (verde), (iii) un péptido conector de 162 pb (rojo) y (iv) una subunidad beta de 1671 pb (azul) (Schumacher y col., 1986).



**Figura 1-4.** Relación del gen *pac* y su producto funcional, la penicilino acilasa (Modificado de Schumacher y col., 1986).

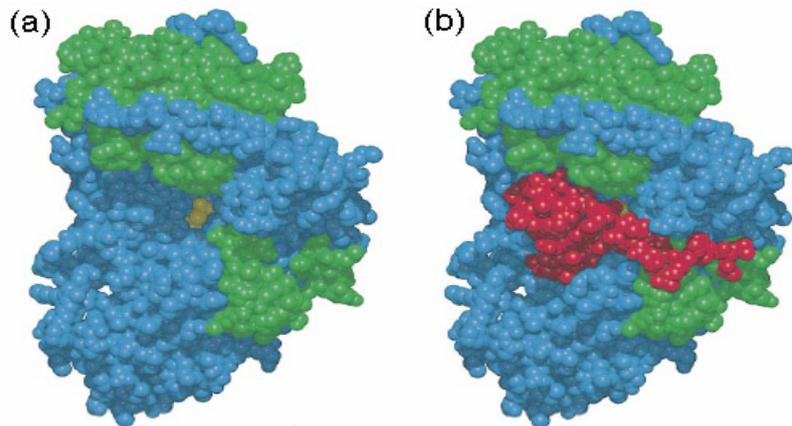
El polipéptido sintetizado del ARNm del gen *pac*, es conocido como preproPA (ppPA), y al igual que las pre-pro-insulinas y otras hormonas eucarióticas, tiene que experimentar toda una serie de modificaciones postraduccionales para adquirir su función enzimática (Figura 1-5).



**Figura 1-5.** Síntesis y maduración de la Penicilino Acilasa.

El ppPA es exportado a periplasma a través del complejo Tat (Ignatova y col., 2002). Un trabajo realizado por Gumper y col., (1996) sugirió que el procesamiento postraduccionales de la molécula de PA, incluyendo la escisión del péptido espaciador entre la subunidad alfa y beta, era realizada en la membrana citoplasmática o de manera autocatalítica. Más tarde, se establece la participación de los residuos Ser- 290 y Lys- 299 (Sizmann y col., 1990; Lee y col., 2000), en la ruptura del péptido señal (S) de 26 aminoácidos, originando el proPA (pPA), el cual, posteriormente se procesa autocatalíticamente, para generar dos segmentos, uno correspondiente a la subunidad beta y otro a la subunidad alfa unida todavía al péptido conector (PC) de 54 aminoácidos. La escisión del PC se realiza por la misma subunidad beta (Kasche y col., 1999).

Se ha mostrado que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la preproenzima y proenzima es necesaria para su transporte y maduración (Ignatova y col., 2005; Kasche y col., 2005). La figura 1-6 muestra la estructura tridimensional de la proenzima y la PA madura.



**Figura 1-6.** Estructura tridimensional de una ntn- hidrolasa. a) PA, subunidad beta, azul, subunidad alfa, verde, se muestra el centro catalítico en amarillo. b) proPA, péptido conector, rojo.

La forma activa esta constituida por un heterodímero de monómeros de 209 (alfa) y 566 (beta) aminoácidos con un peso molecular de 20.5-24.1 y 64.6-69 kDa respectivamente (Bock y col., 1983; Schumacher y col., 1986).

#### 1.4.3 Producción de PA

La economía general y la realización de los procesos de producción de 6-APA, son determinados principalmente por la actividad específica del biocatalizador de PA utilizado (Parmar y col., 2000). Con el fin de sobreexpresar el gen *pac*, han surgido diversos estudios empleando estrategias basadas en técnicas de genética clásica, ingeniería genética y/o bioingeniería con el fin de optimizar al máximo su producción. El uso de microorganismos recombinantes ha sido una alternativa adicional para obtener cepas hiperproductoras (Schewale y Sivaraman, 1989; Bhattacharya y col., 1993; Ramírez y col., 1994).

Se ha demostrado que la expresión de PA, dependiendo del sistema vector/huésped empleado, puede ser limitada por varias etapas, entre ellas la transcripción del gen *pac*, la traducción (Chou y col., 1999) y muy a menudo la agregación citoplásmica o periplásmica de precursores de PA (Scherrer y col., 1994; Sriubolmas y col., 1997), así como translocación, proteólisis periplásmica, plegamiento y ensamblaje de las subunidades que son propiamente las etapas postraduccionales (Ramírez y col., 1994; Xu y col., 2001).

Ramírez y col., (1994) reportaron un incremento de 4 veces en la actividad específica cuando la velocidad de crecimiento de *E. coli* JM101 (pPA102) se redujo de 0.5 a 0.01 h<sup>-1</sup> por limitación de glucosa en cultivos alimentados mantenidos a OD constante. Minimizando la velocidad de crecimiento por limitación de oxígeno de 0.35 hasta 0.25 h<sup>-1</sup> en cultivos por lote del mismo microorganismo, De León y col. (2003) obtuvieron un incremento de 2.4 veces en la actividad específica de la PA. Tales resultados podrían explicarse por un incremento en el número de copias de plásmidos que se replican a una velocidad constante, resultado de la restricción de la velocidad de crecimiento de la bacteria.

### **Efecto de los nutrientes**

En estudios realizados por Pinotti y col., (2000), observaron que la producción de PA mediante *Bacillus megaterium* (microorganismo capaz de secretar la enzima) era influenciada por el medio de cultivo. La actividad máxima (0.14 U/mL) se logró usando caseína hidrolizada con alcalasa y suero de queso.

### **Efecto de la temperatura**

La producción de PA bacteriana, ya sea nativa o recombinante, se favorece a temperaturas por debajo de los 30 °C (Chou y col., 2000; Keilmann y col., 1993; Meevootisom y Saunders, 1987).

En un principio, se creyó que altas temperaturas inhibían la transcripción de *pac* (Yang y col., 1988), después se dijo que la traducción del ARNm de *pac* y no su transcripción, era dependiente de la temperatura (Keilmann y col., 1993). Dai y col. (2001) realizaron cultivos por lote en matraz de *E. coli* DH10B y A56/pDB3 (acarreado el gen *pac* nativo completo de *E. coli* ATCC 11105), a diferentes temperaturas (22, 25, 28 y 37 °C), encontraron que la producción de la enzima era inversamente dependiente con la temperatura, al igual que en la cepa nativa. Para determinar la etapa limitante de su producción a 37 °C (transcripción o traducción), realizaron Western blots de la fracción soluble e insoluble de las muestras. La presencia de precursor y ausencia de enzima madura, llevaron a la conclusión de que la temperatura inhibía el proceso de maduración del precursor. Al lograr solubilizar el precipitado en urea 8M, concluyeron que éste se encontraba formando cuerpos de inclusión, debido quizás a un plegamiento incorrecto que limitaba su procesamiento.

### **Efecto del inductor**

En cultivos de *E. coli* JM101/pPA102 al aumentar la concentración de inductor (IPTG, 25-1000 µM), Zamora (1993) observó un efecto de saturación en la producción de PA, mientras que Sriubolmas y col. (1997), observaron una relación inversa de la concentración de inductor sobre la actividad de PA en *E. coli*/pQEA11. El vector pQEA11 contiene un gen *pac* silvestre bajo el control del promotor *tac* y el gen *lacI<sup>q</sup>*.

### **Efecto del oxígeno disuelto**

El oxígeno disuelto (OD) puede afectar el resultado de la fermentación. Se ha observado que el efecto negativo de su limitación sobre el crecimiento y la concentración celular máxima sigue una cinética tipo Monod (De León, 2003). De la información disponible sobre el efecto del OD en la producción de proteínas recombinantes por *E. coli*, no se pueden derivar reglas generales ya que los diversos sistemas/huésped y proteínas reportados muestran

comportamientos diferentes. Así pues, la limitación del OD puede favorecer, no favorecer o no afectar la producción de diferentes proteínas recombinantes (Qoronfleh, 1999).

La producción de algunas enzimas como la proteasa alfa-lílica, la ciclohexanona monoxigenasa, las proteínas p24Gag y Env41, la beta-lactamasa y la penicilino acilasa, se ha visto favorecida a OD bajos (Unutmaz y col., 1997; Doing y col., 2001; Qoronfleh, 1999; Ryan y col., 1989, De León 1996); mientras que lo contrario se ha observado para otras. Un efecto negativo se observó sobre la producción de una proteína de la influenza (C13), y ningún efecto tuvo sobre la producción de la proteína p55Gag (Qoronfleh, 1999). Por otro lado, la producción de la glucosa oxidasa en *Aspergillus niger*, se favoreció por niveles altos de OD (100%, con respecto a la saturación del aire). La velocidad de producción del ácido glucónico está fuertemente influenciada por la concentración de OD en el medio (Träger y col., 1992). La concentración de OD es un factor importante también en la producción por lote de glutatión por *Candida utilis* WSH-02-08. Un aumento en la velocidad de agitación (de 250 a más de 300 rpm) incrementó la masa celular y la producción de glutatión hasta un 20 y 25%.

Vojtisek y Slezak (1975) reportaron el efecto del OD sobre la síntesis de PA, encontraron que la síntesis de la enzima era favorecida en medio definido pero completamente reprimida a concentraciones altas de oxígeno disuelto.

Gabauer y col. (1987) reportaron para una *E. coli* tipo silvestre o nativa, en un reactor tanque agitado un incremento en la actividad específica de PA desde 15 hasta 75 U g<sup>-1</sup> cuando el OD se redujo de 45 a 5%, aunque la actividad enzimática máxima se obtuvo en un OD intermedio de 40% cuando se empleó un reactor airlift tower-loop.

Se ha observado que el oxígeno disuelto participa en la estabilidad de algunos plásmidos recombinantes, mediante un efecto indirecto de la velocidad de crecimiento (Lee y Hassan, 1987; Hopkings y col., 1987; Impoolsup y col., 1989 y Caunt y col., 1990), además de ser una variable de control conveniente para inducir la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* cuando se emplean

promotores dependientes de oxígeno como *Vhb* y *nar* (Hughes y col., 1989; Han y col., 1998). Stueber y Bujard (1982) reportaron que el contenido de los plásmidos se incrementaba significativamente durante la fase estacionaria en los cultivos por lote.

#### 1.4.4 Efecto de variables ambientales sobre la modificación postraducciona

En cultivos de hibridomas realizados a niveles de OD bajos (10%), Kunkel y col. (2000), observaron una marcada reducción en el nivel de galactosilación de anticuerpos monoclonales. Por el contrario, Donaldson y col. (1999) encontraron que en cultivos de células de insecto, los niveles de OD afectaban el nivel de expresión de la fosfatasa alcalina humana más no su glicosilación.

Sizmann y col. (1990), encontraron que Ser-290 era un residuo involucrado en el procesamiento postraducciona de la PA. Más tarde, Lee y col., 2000, demostraron la participación adicional de Lys-299 en el procesamiento. Este último, es fácilmente ionizable en función del pH, lo cual sugiere al pH, como una variable capaz de afectar la velocidad de la modificación postraducciona.

Guranda y col., (2004) establecen que la conformación de la penicilino acilasa se mantiene por puentes salinos. La destrucción de estos puentes por protonación/deprotonación de los amino ácidos que los forman provoca la inactivación de la enzima. A temperaturas por encima de 35 °C la penicilino acilasa se somete a un cambio conformacional, acompañado de destrucción de uno de estos puentes salinos y cambia las propiedades catalíticas.

Scherrer y col. (1994), observaron que la adición de sacarosa y glicerol en el medio de cultivo de *E. coli* JM109 (pNR29) en un medio LB/peptona aditamentado con AFA como inductor, a 26 °C y 250 rpm por 20 hrs., favorecía la producción de PA. Robas y Branlant (1994), observaron que el procesamiento postraducciona de la PA se inhibe cuando las células crecen a temperaturas mayores de 37 °C.

#### 1.4.5 Papel del oxígeno disuelto en el metabolismo bacteriano

El oxígeno juega un papel muy importante en una de las vías metabólicas para la obtención de energía. Los nucleótidos de flavina y nicotinamida, generados de la oxidación de carbohidratos, son oxidados finalmente por oxígeno molecular ( $O_2$ ) mediante la cadena de transporte de electrones.

Se ha observado que la presión de oxígeno elevada o el rápido incremento en el contenido de oxígeno pueden causar estrés oxidativo dentro de las células, el cual provoca oxidación de secuencias nucleotídicas y proteínas específicas. Por otro lado, condiciones anóxicas estacionarias pueden limitar la producción de aminoácidos y la estabilidad de plásmidos. Konz y col. (1998) revisaron las principales vías y mecanismos de daño oxidativo para proteínas expresadas en bacterias.

De León y col. (1996) obtuvieron incrementos de hasta 4 veces en la actividad enzimática de PA en cultivos realizados a bajos niveles de OD (1-5%), al final de una etapa postfermentativa en presencia de OD. Este incremento es explicado como la maduración posterior de precursor acumulado durante una fase de crecimiento lenta del cultivo.

Los trabajos mencionados, hacen al OD un parámetro clave para aumentar la actividad enzimática de PA. Hasta ahora, se ha determinado el nivel de OD óptimo (1-5%) para la producción de PA por *E. coli* JM101 (pPA102) (De León y col., 1996; De León y col., 2003), más sin embargo, queda por indagar el mecanismo por el cual el oxígeno hace posible tal incremento.

#### 1.5 Cultivos por lote

En un cultivo por lote, el inóculo, y todos los nutrientes necesarios para el crecimiento celular son adicionados desde un inicio (excepto la adición de inductores, ácido o base y antiespumante); se caracteriza por operar a un régimen intermitente o no continuo, las variables de producción (biomasa,

productos y deshechos) cambian con el tiempo; no hay entradas, ni salidas de flujos de volumen y se presenta estabilidad genética. Este tipo de cultivo, es usado ampliamente en laboratorios y a nivel industrial.

### **Cinética y modelo de crecimiento**

Se sabe que las condiciones ambientales afectan de manera importante algunas cinéticas microbianas, por lo tanto, los fermentadores industriales, dado el gran gasto económico implicado en ellos, deben ser cuidadosa y continuamente monitoreados. En la mayoría de los casos es necesario medir no solo el crecimiento y la formación del producto, sino también controlar parámetros ambientales que se van alterando a medida que el proceso transcurre.

En una curva de crecimiento por lote típica, se pueden distinguir 5 fases: lag, logarítmica, desaceleración, estacionaria y de muerte. La fase lag es el período de adaptación de las células al nuevo ambiente. Las condiciones ambientales en un bioreactor las proveen los nutrientes del medio, los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto. En la fase de crecimiento exponencial o logarítmica, la biomasa se incrementa a una velocidad de crecimiento específica constante, descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. (1-1)}$$

Donde

$\mu$  = Velocidad de crecimiento específica ( $\text{h}^{-1}$ )

$X$  = Biomasa (g/L)

$t$  = Tiempo (h)

En la fase de desaceleración, la velocidad de crecimiento disminuye debido a dos causas: 1) el agotamiento de uno de los nutrientes esenciales o 2) la acumulación de subproductos del crecimiento tóxicos. La ecuación de Monod (1942) describe la cinética de crecimiento bacteriano del primer caso,

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \quad \text{Ec. (1-2)}$$

Donde

$\mu_{max}$  = velocidad específica máxima de crecimiento ( $h^{-1}$ )

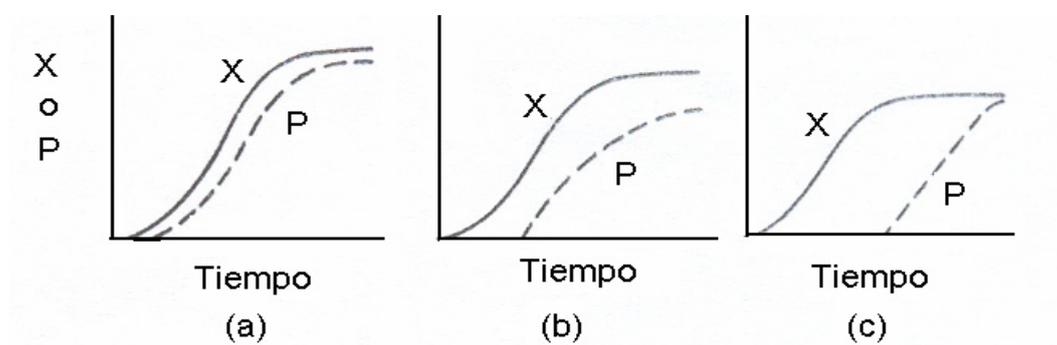
S = Concentración de sustrato limitante (g/L)

$K_s$  = Constante de saturación (g/L)

En la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento neta es cero y las células permanecen metabólicamente activas, puede suceder más de un fenómeno; 1) la masa celular puede permanecer constante, pero disminuir el número de células viables, 2) puede ocurrir lisis celular, disminución de la masa celular viable, y una segunda fase de crecimiento (donde los productos de las células lisadas, sirven de nutriente a las demás células) y 3) la producción de metabolitos secundarios.

### Cinética de producción

La formación del producto, se clasifica en 3 categorías principales (Figura 1-7), (a) producción asociada al crecimiento, (b) producción mixta y (c) producción no asociada al crecimiento.



**Figura 1-7.** Formación del producto. X: biomasa; P: producto.

La velocidad de formación del producto se puede expresar mediante la ecuación de Leudeking- Piret:

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X \quad \text{Ec. (1-3)}$$

Donde

$\alpha$  = coeficiente de producción asociado al crecimiento

$\beta$  = coeficiente de producción no asociado al crecimiento

t = tiempo

En la producción asociada al crecimiento, la velocidad específica de formación del producto es proporcional a la velocidad específica de crecimiento ( $\beta=0$ ). La producción no asociada al crecimiento ocurre durante la fase estacionaria, donde  $\mu$  es cero, por tanto, en este caso, la velocidad específica de formación es constante. Por último, la velocidad específica de producción mixta ocurre durante las fases de crecimiento lento y estacionaria y se representa por la ecuación 1-3.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Analizar el procesamiento post-traducciona l de la penicilino acilasa en *Escherichia coli* bajo diferentes condiciones de oxígeno disuelto.

### **Objetivos específicos**

Estudiar el efecto de oxígeno disuelto sobre el proceso de maduración del precursor de la penicilino acilasa.

Realizar el análisis de la cinética de procesamiento del precursor mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Evaluar inhibidores de diferentes etapas metabólicas sobre el proceso de maduración del precursor de la penicilino acilasa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Sistema del fermentador.

Se utilizó un sistema de fermentación Applikon® ADI 1030; el cual consistió de sensores, actuadores, sistemas control y programas de control supervisorio. El biorreactor está constituido por una jarra de 1 litro (Applikon® ADI 1030) con capacidad máxima de 1.35 L, y con un soporte mediante el cual fue posible manipular la velocidad de agitación y controlar la temperatura del medio de cultivo. El biorreactor es equipado con 2 turbinas Rushton de 6 paletas planas y la aireación fue mediante burbujeo a través de un difusor de 7 orificios, las corrientes de los gases a la entrada del fermentador se filtraron a través de membranas (Millipore) de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro.

El oxígeno disuelto se midió con un electrodo polarográfico (Applikon) y el pH mediante un electrodo de vidrio (Applikon). También se contó con un sensor de nivel de espuma, el cual al detectar un circuito cerrado, activaba la bomba para agregar antiespumante. El oxígeno disuelto en todos los casos se reportó como porcentaje de saturación con respecto al aire en agua a 29°C y aproximadamente 1 atmósfera de presión. La señal de los electrodos se amplificó y se adquirió en una computadora PC (Microsoft Windows) a través de los convertidores análogos/digitales (A/D).

A través de un algoritmo de control, BioXpert, las señales adquiridas se almacenaron en el disco duro y se desplegaron en línea sobre la pantalla de la computadora, en forma gráfica, indicando la última lectura en forma numérica. Los valores así adquiridos fueron procesados y las variables secundarias calculadas, mediante las cuales se tomaba la acción de control para mantener el oxígeno disuelto en el valor deseado. Tal acción de control se tomó a través de los convertidores D/A a uno de los dos rotámetros, el de oxígeno o nitrógeno. Para el control de OD, el programa utilizó un control PID.

El pH se controló a 7.0 mediante una subrutina “On/Off” (encendido/ apagado) usando una solución de NaOH 2N, dosificada a través de una bomba peristáltica conectada a un relevador. La figura 3-1 muestra una imagen del sistema de fermentación.

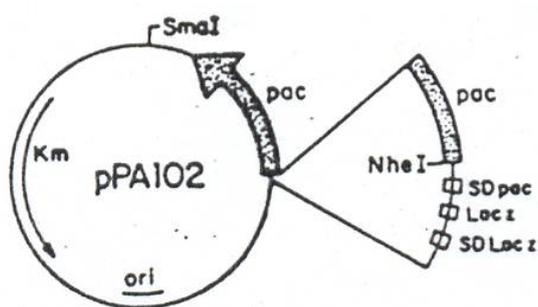
La Bio consola ADI 1035 (Applikon) fue la consola actuadora usada en combinación con el Bio controlador ADI 1035 (Applikon). Este fue capaz de soportar la regulación del flujo del gas mediante rotámetros, el control de la velocidad de agitación y la adición de líquidos con bombas.



**Figura 3-1.** Sistema de fermentación.

### 3.2 Sistema de expresión de PA: *E. coli* JM101/pPA102

Se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* JM101/pPA102 proporcionada por el Dr. O.T. Ramírez (IBT, UNAM, Cuernavaca). Este vehículo molecular, codifica para el gen de resistencia a kanamicina (km) y el gen de la penicilino acilasa (*pac*), regulado por el promotor del gen *Lac Z*. Este permite la inducción exógena, utilizando análogos de la lactosa como el isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) y evita la represión catabólica por glucosa (Figura 3-2) (Merino, 1992).



**Figura 3-2.** Mapa genético del plásmido pPA102 (Merino, 1992).

### 3.3 Medios de cultivo

Los medios para conservación, propagación y cultivo se prepararon como se describe a continuación (tablas 3-1 y 3-2).

**Tabla 3-1.** Medio Luria Bertani (LB).

Reactivos	g/L
NaCl (Baker) . . . . .	10.0
Bactotripton (BD, Becton Dickinson) . . . . .	10.0
Extracto de levadura (Difco) . . . . .	5.0
Solución de kanamicina (Sigma)** . . . . .	35 mg

El agar Luria se prepara agregando 15 g/L de Bacto-Agar (Difco) en el medio Luria.

El medio de cultivo para el preinóculo, se preparó como se menciona en la tabla 3-2 y adicionando 5 g/L de extracto de levadura (Bauer y Shiloach, 1974).

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave (Yamato) a 15 lb de presión durante 20 minutos. Con el fin de evitar la caramelización de la fuente

de carbono, los reactivos marcados con un asterisco (\*), se esterilizaron por separado a las mismas condiciones. Los reactivos marcados con dos asteriscos (\*\*) se prepararon como soluciones stock y se esterilizaron por filtración (Apéndice A), fueron agregados al medio estéril, cuando éste alcanzó una temperatura menor a 40°C. La mezcla se realizó en campo estéril.

**Tabla 3-2.** Medio mínimo (M9).

Reactivos	g/L
NaCl (Baker) . . . . .	0.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Baker) . . . . .	6.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Baker) . . . . .	3.0
NH <sub>4</sub> Cl (Sigma) . . . . .	1.0
Glucosa (Sigma) * . . . . .	5.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Baker) * . . . . .	1.0
CaCl <sub>2</sub> ** . . . . .	100 µM
Kanamicina (Sigma) ** . . . . .	35 mg
Tiamina ** . . . . .	40 µg
IPTG (Sigma) ** . . . . .	50 µM

### 3.4 Conservación de la cepa

Un liofilizado de la cepa *E. coli* JM101/pPA102, fue resuspendido en 100 mL de medio LB suplementado con kanamicina (km) (35 µg/mL) e incubado a 29 °C y 250 rpm (Innova 4230) por aproximadamente 8 horas para su recuperación. Una vez crecida la cepa, se alicuotó en glicerol y se almacenó a -80°C (Revco). A partir de éstos, la cepa se estrió sobre placas de agar Luria/km (cajas Petri) y se incubaron a 29°C durante toda la noche; posteriormente fueron almacenadas a 4°C.

### 3.5 Inóculos

El preinóculo en todos los experimentos realizados, partió del cultivo de una azada de colonias aisladas de una de estas placas en 100 mL de medio M9I, contenidos en un matraz Erlenmeyer (500 mL) durante toda la noche a 29 °C. De este caldo de cultivo preliminar, se adicionó el volumen necesario a los medios de cultivo para obtener una  $DO_{620\text{ nm}}$  inicial de entre 0.2 y 0.3.

### 3.6 Estrategia experimental

Se realizaron varios cultivos por lote utilizando el sistema de biorreactor tanque agitado (Applikon ® ADI 1030) descrito anteriormente. La expresión del gen *pac* fue inducida desde el inicio de la fermentación (IPTG, 50  $\mu\text{M}$ ) (Zamora, 1993).

Para estudiar el efecto del oxígeno disuelto sobre la maduración del precursor de PA, primero se seleccionó la fuente de carbono e inductor más apropiados, enseguida, en base a reportes publicados, se analizó el efecto del oxígeno disuelto a baja y alta tensión de TOD, midiendo actividad enzimática y corriendo electroforesis en gel. Finalmente, con el fin de discernir por qué el oxígeno favorece el incremento de actividad de PA durante la fase post-fermentativa, se probó el efecto de algunos inhibidores de procesos celulares importantes, como la cadena respiratoria, la traducción y la transcripción.

Se realizaron cultivos por lote de células de *E. coli* JM101/pPA102 a bajo y alto nivel de oxígeno disuelto (3, 14 y 50%).

Para los estudios de maduración del precursor de PA en el período post-fermentativo, en todos los cultivos el muestreo se prolongó hasta 12 horas después de alcanzada la fase estacionaria, etapa denominada, como incubación post-fermentativa (De León y col.,1996), misma en donde se ha observado un incremento muy significativo de la actividad de PA.

Al final de la fase de crecimiento exponencial (FFE) de los cultivos a 3% de OD constante, se drenó caldo de cultivo y fracciones de éste se colocaron en matraces de 125 mL. Cada uno de los matraces fue sometido a diferentes condiciones extracelulares (oxígeno disuelto, temperatura, inhibidores de la traducción, transcripción, replicación e inhibidores de la cadena respiratoria), 12 horas después, se muestrearon y procesaron de acuerdo a la sección 3.3.1, con el fin de evaluar su efecto sobre la producción de la enzima recombinante.

Para evaluar el efecto del oxígeno disuelto, fracciones del caldo de cultivo se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 mL. Uno de los matraces se mantuvo con suministro de aire continuo (21% de O<sub>2</sub>) y el otro, se burbujeó por unos minutos con gas nitrógeno, con el fin de erradicar todo el oxígeno del medio posible (cerca de 0% O<sub>2</sub>), el resto del caldo de cultivo permaneció en el bioreactor con un suministro de oxígeno de alrededor de 1%. La temperatura se mantuvo a 29°C. Después de 12 horas a partir del inicio de la incubación, se determinó la biomasa celular, proteínas y la actividad enzimática por ensayo celular *in vivo*.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la maduración, las células cosechadas fueron incubadas a 37 y 29 °C con aireación durante 12 horas; después de este tiempo, se midió biomasa, proteínas y actividad enzimática.

Para determinar el efecto de la inhibición de la cadena respiratoria sobre la maduración de células cosechadas del bioreactor se adicionó la cantidad necesaria de azida de sodio para alcanzar una concentración final de 0.01, 0.1 y 1%.

Para evaluar el efecto de inhibidores de la transcripción, a una muestra de cultivo celular se le agregó rifampicina para alcanzar una concentración final de 150 µg/mL. Después de 12 horas, se midió biomasa, proteínas y actividad enzimática.

Para evaluar el efecto de inhibidores de la traducción, a diferentes muestras de células cosechadas se les agregó cloranfenicol y tetraciclina a una concentración final de 34 y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. Después de 12 horas, se midió biomasa, proteínas y actividad enzimática.

### **3.7 Obtención y procesamiento de muestras**

Para seguir la cinética de los cultivos, cada determinado tiempo se tomó una muestra (4 mL) de caldo de cultivo, se centrifugó a 4185 xg durante 5 minutos, el sobrenadante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un tubo eppendorf para posterior medición de azúcares reductores; el concentrado celular se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M, pH de 7.8 (apéndice A-4) y se refrigeró a  $4^{\circ}\text{C}$ , para posterior medición de proteínas y actividad enzimática.

### **3.8 Métodos analíticos**

#### **3.8.1 Determinación de biomasa**

La determinación de la concentración de biomasa se realizó por el método de la determinación de peso seco celular. Este método, consiste en medir la absorbancia del caldo de cultivo a 620 nm en un espectrofotómetro (Varian). El valor obtenido es interpolado en una curva patrón de absorbancia contra concentración de masa celular (apéndice B-1).

#### **3.8.2 Determinación de azúcares reductores**

El método del ácido dinitrosalisílico (Miller, 1959) se basa en la reducción del ácido 3-5-dinitrosalisílico (DNS) por azúcares reductores como la glucosa o galactosa, para formar un compuesto nitro-aminado de color amarillo. La absorbancia a 550 nm es proporcional a la concentración de azúcares

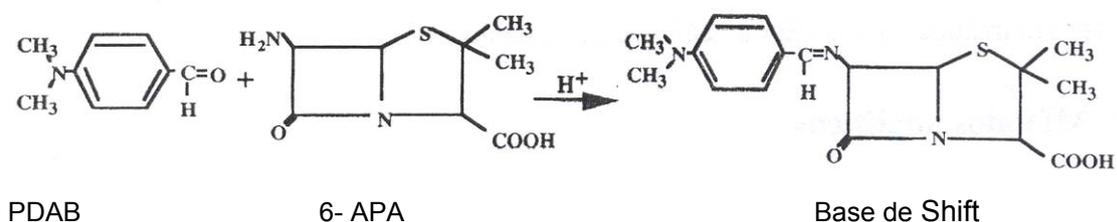
reductores. Se realizó una curva estándar de absorbancia contra concentración de glucosa (apéndice B-2).

#### Procedimiento

1. Tomar 250  $\mu$ l del sobrenadante de las muestras del cultivo tratadas de acuerdo a la sección 3.7 y colocarlo en un tubo de ensayo.
2. Añadir 750  $\mu$ l de la solución de DNS (Apéndice A-5), agitar e incubar a baño maria por 15 minutos.
3. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 4 mL de agua destilada
4. Agitar y leer absorbancia a 550 nm.

#### 3.8.3 Determinación de actividad enzimática

Se empleó el método del p- dimetilaminobenzaldehído (PDAB) (Balasingham y col., 1972), cuyo fundamento yace en medir espectrofotométricamente la intensidad de color del producto formado por la reacción entre el grupo carbonilo del PDAB con el grupo amino del ácido 6- aminopenicilánico (6-APA), producido a su vez por hidrólisis enzimática de la penicilina G.



**Figura 3-3.** Reacción química del 6-APA con PDAB (Balasingham y col., 1972)

#### Procedimiento

1. Tomar 450  $\mu$ L de las muestras tratadas de acuerdo a la sección 3.7 y colocarlos en tubos de ensayo.
2. Incubar a 37°C (Lab tech) por 5 minutos.
3. Añadir 50  $\mu$ L de la solución de penicilina G al 20% (apéndice A-7) y esperar 10 minutos con las mismas condiciones.

4. Tomar 40  $\mu\text{L}$  de la muestra y transferirlos a tubos *ependorf* conteniendo un volumen de 960  $\mu\text{L}$  de etanol al 96 %, para detener la reacción.
5. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  del reactivo PDAB (apéndice A-6), agitar y centrifugar (Biofugue) a 5000 rpm durante 6 minutos.
6. Una vez transcurridos 15 minutos a partir de la adición de PDAB, medir la absorbancia a 415 nm (Varian) utilizando como blanco solución de buffer de fosfatos procesada de la misma manera.

Para la determinación de la actividad enzimática volumétrica (AEV) de la PA en las muestras celulares se realizó el siguiente cálculo:

$$AEV = \frac{(DO-b)(\text{dilución})(1000)}{a(216.238)(10)(0.9)} = \left[ \frac{\mu\text{moles}_{6\text{-APA}}}{(\text{mL})(\text{min})} \right] = \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right]$$

Ec. (3-1)

Donde:

- DO = Densidad óptica a 415 nm
- a = Pendiente de la curva patrón
- b = Ordenada al origen de la curva patrón
- 216.238 = Peso molecular del 6- APA
- 10 = Tiempo de reacción en minutos
- 0.9 = Fracción de la muestra analizada
- U = Unidad de actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de 6- APA por minuto.

### 3.8.4 Determinación de proteínas

Se empleó el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Éste, se basa en la medición de la intensidad del color azul del compuesto producido por la reacción de Biuret entre la proteína y el ión  $\text{Cu}^{+2}$  en condiciones alcalinas y a la reducción del reactivo fosfotúngstico- fosfomolibdico, conocido como Folin Ciocalteu, favorecida por la presencia de tirosina y triptófano en las proteínas.

Procedimiento

1. Tomar 0.1 mL de las muestras tratadas de acuerdo a la sección 3.7 y aforar a 1 mL con agua destilada. Mezclar en vortex.
2. Añadir 5 mL del reactivo E (apéndice A-8), agitar y reposar 10 minutos.
3. Añadir 0.5 mL del reactivo de Folin (apéndice A-9), agitar y reposar por 30 minutos.
4. Leer absorbancia a 590 nm contra un blanco de agua procesado de la misma manera.

Para la conversión de valores de densidad óptica en valores de concentración se utilizó la curva estándar B-4, y los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de proteínas} = \frac{(\text{DO}-b)(\text{Dilución})}{a(0.1)} = \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \quad \text{Ec. (3-2)}$$

Donde:

DO = Densidad óptica a 590 nm  
 0.1 = Volumen de la muestra analizada (mL)

La actividad enzimática específica se calculó dividiendo la AEV entre proteínas totales y biomasa en un tiempo dado y se expresó como unidades de actividad enzimática por mg de proteínas y unidades de actividad enzimática por mg de biomasa, respectivamente.

### **3.9 Análisis del procesamiento *in vivo* del precursor de PA por electroforesis desnaturalizante.**

Para analizar el efecto del oxígeno disuelto sobre el incremento de producción de PA, después de medir biomasa, proteínas y actividad enzimática, se realizaron corridas de electroforesis en geles de poliacrilamida.

El patrón de proteínas se analizó mediante electroforesis en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-

Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli, 1970) según la tabla 3-3. El sistema utilizado fue el Mini-PROTEAN 3 de Bio-Rad. Las muestras fueron tratadas con buffer de carga (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, Glicerol 25%, SDS 2%, 2-β-mercaptoetanol 11% y Azul de bromofenol 0.01%) y calentadas a 100 °C por 5 min. El gel concentrador fue de 4% y la separación de proteínas se realizó en geles de gradientes de 10-12% (Bollag y Edelstein, 1991). El marcador de peso molecular (M) usado fue el de 10 KDa (Gibco). La cantidad de muestra cargada en cada uno de los pozos fue de 20 μg de proteínas. El gel se corrió a 100 Volts constantes por 2.5 horas aproximadamente. Las bandas de las proteínas fueron reveladas por tinción con Azul de Coomassie (apéndice A-14) y lavados con solución desteñidora de metanol-acético en agua (apéndice A-15). Los geles fueron escaneados y las bandas fueron analizadas con el software Quantity-One (BioRad).

**Tabla 3-3.** Preparación del Gel de Laemmli.

Reactivos	Gel			
	Concentrador	Separador		
	4%	10%	12%	X%
<b>Acrilamida</b> (μL)	264	660	800	$3.3(X\%)=(A)*\text{mL}$
<b>Tris-HCl</b> 0.5M, pH 6.8 (μL)	504μL	-	-	-
<b>Tris-HCl</b> 1.5M, pH 8.8 (μL)	-	500	500	500
<b>SDS</b> al 10% (μL)	20	20	20	20
<b>H2O</b> (μL)	1200	810	670	$1.47- (A)^*$
<b>TEMED</b> (μL)	2	1	1	1
<b>PSA</b> al 10% (μL)	10	10	10	10
<b>Volumen total</b> (mL)	2	2	2	2

\* La letra A representa el volumen de Acrilamida 30%-Bis 37.5:1 requerida para obtener el gel con el porcentaje especificado (X%). En el apéndice A (A.10-A.13), se describe la preparación de las soluciones empleadas.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una de las ventajas de trabajar con medio de cultivo definido, es que se pueden comparar resultados de 2 ó más cultivos independientes, ya que se puede fijar la concentración del nutriente limitante. En un estudio previo, se observó, que los cultivos de *E. coli* JM101/pPA102 crecidos en medio mínimo, M9, proporcionan un rendimiento celular y producción de la enzima mayor que en otros más complejos (Breceda, 2001, Ignatova y col., 2003).

Cultivos por lote en matraz de JM101(pPA102) usando diferente fuente de carbono e inductor (galactosa, glucosa e IPTG) mostraron cinéticas de crecimiento exponencial similares. Sin embargo, a diferencia del cultivo con galactosa, el cultivo con glucosa e IPTG mostró una fase lag más corta, además de un ligero incremento en la producción de PA aún después de agotada la fuente de carbono (Breceda, 2001). Estas características resultan importantes en la selección de la fuente de carbono e inductor para el estudio de la modificación postraducciona del precursor de PA. En cultivos a gran escala, por cuestiones económicas y de tiempo, es indispensable contar con fases lag de crecimiento cortas.

##### 4.1 Efecto del oxígeno disuelto sobre la producción de PA.

Una vez seleccionada a la glucosa e IPTG como fuente de carbono e inductor, se realizaron fermentaciones utilizando las condiciones anteriormente descritas, variando solamente el nivel de oxígeno disuelto.

En la figura 4-1, se muestra una cinética de crecimiento y producción de PA a 50% de OD, en donde se prolongó el tiempo de cultivo hasta 23 horas. Durante las primeras 10 horas, las células crecieron exponencialmente a una velocidad de  $0.29 \text{ h}^{-1}$ . A la hora 10.8, la biomasa alcanzó su valor máximo (1.89 g/L) (figura 4-3A), lo cual coincidió con el agotamiento de glucosa y la disminución de la respiración. En cuanto a la producción de PA, durante la fase de crecimiento, la actividad volumétrica, se incrementó de 0.04 hasta 0.30 U/mL;

mientras que la actividad enzimática específica se incrementó de 0.11 a 0.16 U/mg<sub>biom</sub> y de 0.24 a 0.49 U/mg<sub>prot</sub>. Estos valores representaron el final de la etapa fermentativa (actividad residual). El incremento en la actividad de PA al final de la etapa postfermentativa (FEP), después del agotamiento de la glucosa, no fue importante. La actividad de PA volumétrica se incrementó de 0.30 a 0.44 U/mL. Un comportamiento similar se observó con la actividad enzimática específica (de 0.16 a 0.28 U/mg<sub>cel</sub> y 0.49 a 0.66 U/mg<sub>prot</sub>). Sin embargo, después de ese tiempo (17 h) la actividad tendió a disminuir. Un comportamiento similar fue observado por Zhang y col. (1990).

En la figura 4-2, se muestran los resultados analíticos de un cultivo a 3% de OD, en donde se prolongó el tiempo de cultivo hasta 24 horas. Durante las primeras 11 horas, las células crecieron exponencialmente a una velocidad de 0.27 h<sup>-1</sup>. Después de 11 horas, la biomasa alcanzó su valor máximo (1.84 g/L) (figura 4-3A); en ese momento se presentó una perturbación en el control *on line* del OD (figura D-1) y el cambio del apagado/encendido de las válvulas de entrada de gas aire-nitrógeno en el cultivo, lo cual indicó el fin de la fase exponencial.

En cuanto a la producción de PA, durante la fase de crecimiento, la actividad volumétrica, se incrementó de 0.045 hasta 0.225 U/mL; mientras que la actividad enzimática específica se mantuvo relativamente constante en 0.125 U/mg<sub>cel</sub> y 0.315 U/mg<sub>prot</sub>. Estos valores representaron el final de la etapa fermentativa (actividad residual).

El incremento en la actividad de PA observado al final de la etapa postfermentativa (FEP) (después del agotamiento de la glucosa) fue significativo a comparación del obtenido en el cultivo a 50% de OD. La actividad de PA volumétrica continuó un incremento lineal de 0.225 hasta 0.618 U/mL, mientras que la actividad enzimática específica se incrementó de 0.125 a 0.435 U/mg<sub>cel</sub>.

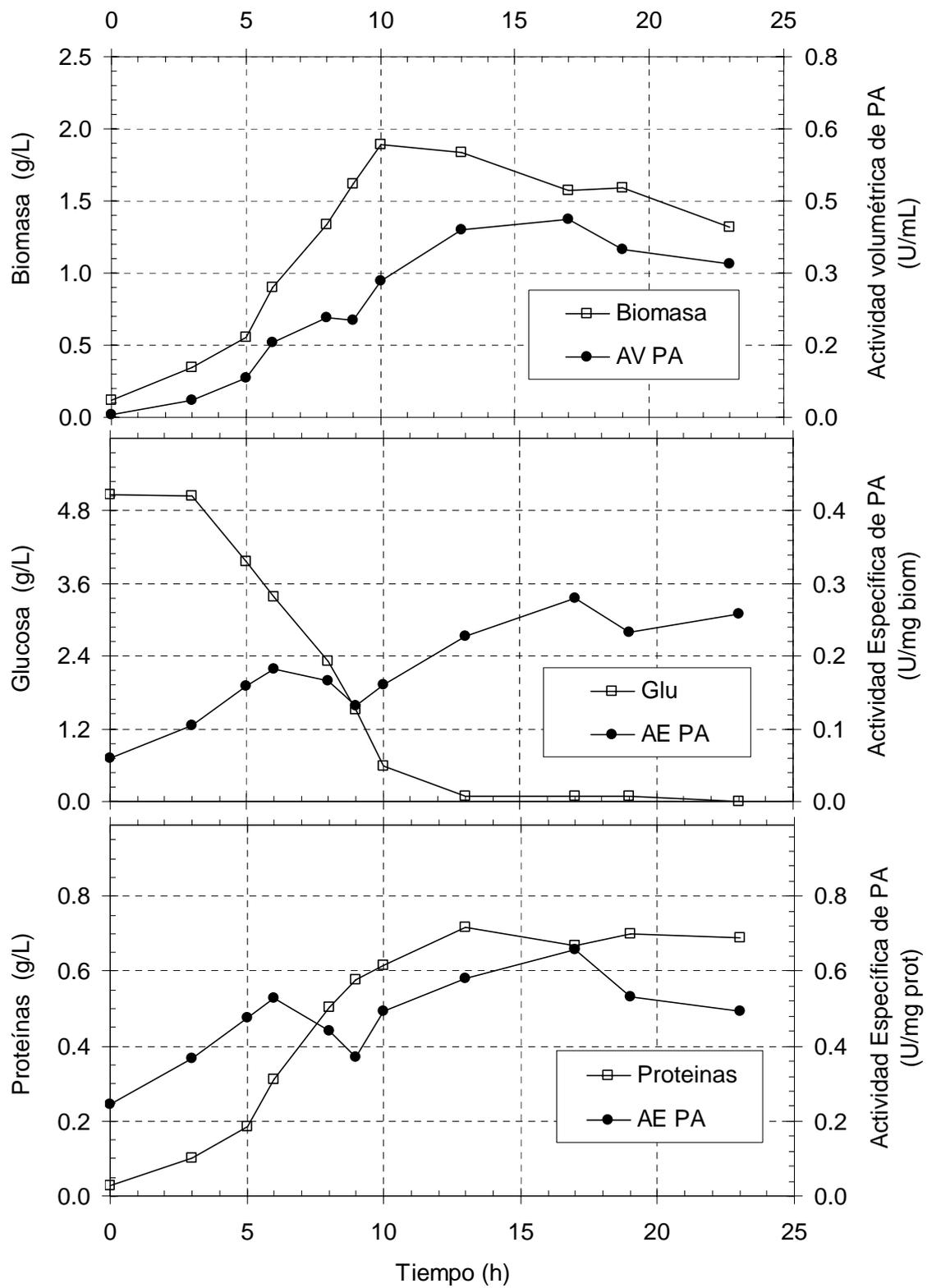


Figura 4-1. Cinética de crecimiento y producción de PA a 50% de OD.

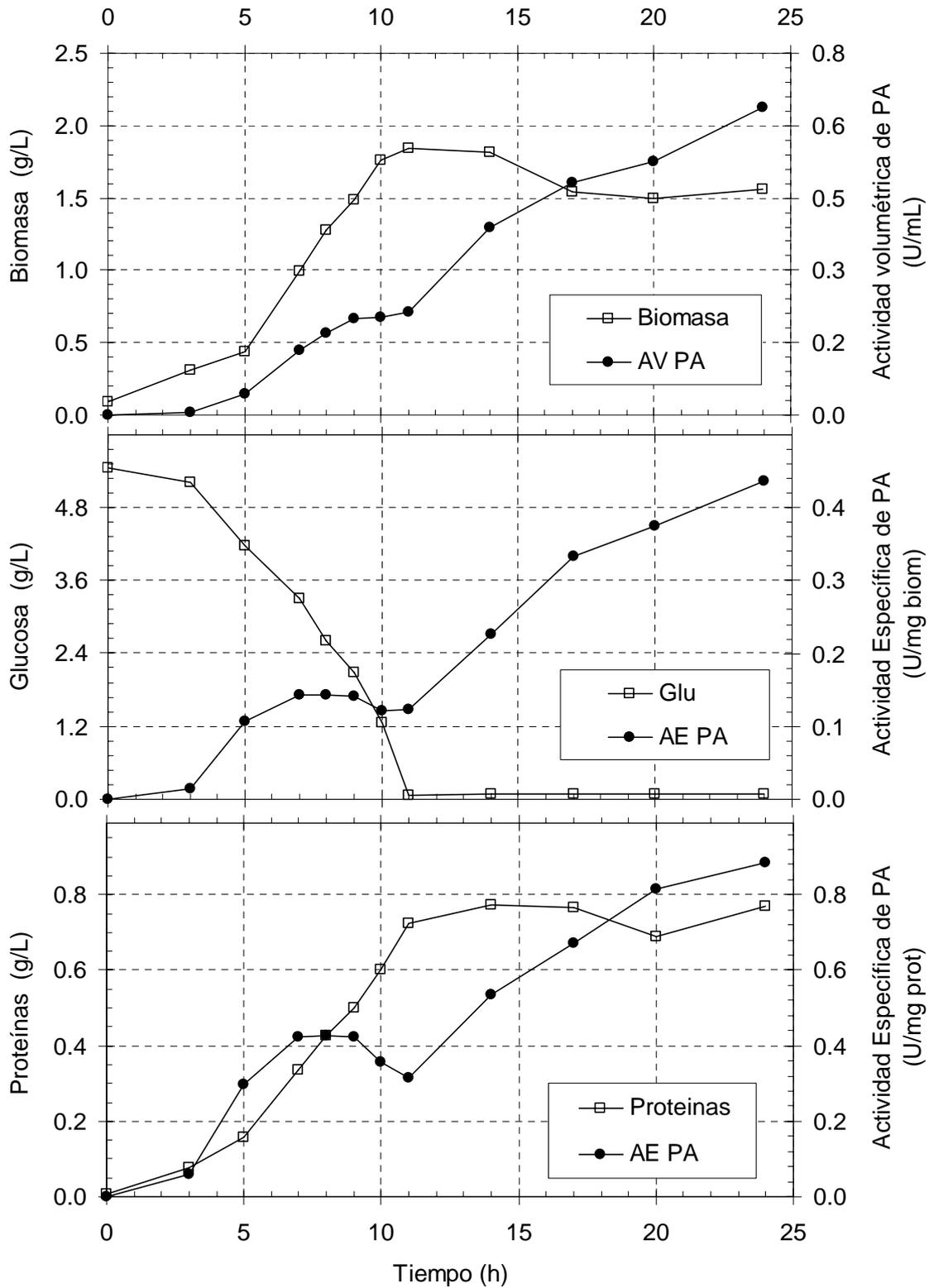


Figura 4-2. Cinética de crecimiento y producción de PA a 3% de OD.

Al final de la fase de crecimiento exponencial de un cultivo por lote, Schömer y col. (1984) alcanzan alrededor del 90% en AEE de PA, del valor máximo obtenido al final de la fase estacionaria. Gabauer y col. (1987) reportaron un aumento en la actividad de PA de 15 a 75 U/mg<sub>cel</sub> en una *E. coli* silvestre, al disminuir la TOD de 45 a 5%. Dicho aumento en la actividad de la PA se debe al efecto de la disminución de la velocidad específica de crecimiento (Ramírez y col., 1994) que a su vez es función del oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

En la tabla 4-1 se enlistan valores de biomasa celular máxima, velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento celular por sustrato ( $Y_{X/S}$ ), rendimiento de producto por sustrato ( $Y_{P/S}$ ) e incrementos en la actividad volumétrica y específica de la PA obtenidos a diferente nivel de oxígeno disuelto durante la etapa postfermentativa ( $\Delta AE$ ). El  $\Delta AE$  observado en la actividad volumétrica y específica del cultivo a oxígeno disuelto limitante fue mayor comparado con el obtenido en el cultivo a 50% de OD, lo cual coincide con lo reportado por De León y col. (1996).

Ramírez y col. (1994) mostraron que el precursor de PA no procesado se acumulaba en gran cantidad durante cultivos por lote de la misma cepa de *E. coli* usada en este trabajo. De León y col. (1996) mostraron que la adición de una etapa postfermentativa mejoraba significativamente el proceso de producción de PA, señalando que probablemente se debía al completo procesamiento del precursor acumulado. Además, reportaron un incremento de 2.5 hasta 3 veces en la actividad específica (U/mg<sub>biom</sub>) cuando tanto la etapa fermentativa como la postfermentativa se mantenían entre 0.8 y 4% de OD.

Ramírez y col. (1994) reportaron que para cultivos por lote de JM101/pPA102 con  $\mu$  menores a 0.4 h<sup>-1</sup>, la velocidad específica de producción de la PA ( $q_p$ ) se incrementa linealmente con  $\mu$ .

**Tabla 4-1.** Parámetros cinéticos de cultivos por lote con glucosa a diferente tensión de oxígeno disuelto.

OD (%)	Biomasa máxima (g/L)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ (g/g <sub>sust</sub> )	$Y_{P/X}$ (U/mg <sub>biom</sub> )	$\Delta AE$ (U/mL)	$\Delta AE$ (U/mg <sub>prot</sub> )	$\Delta AE$ (U/mg <sub>biom</sub> )
50	1.89	0.30±0.002	0.39±0.01	0.15±0.03	1.6±0.22	1.5±0.18	1.6±0.21
14	2.42	0.26	0.48	0.26	1.41	-	1.80
<b>3</b>	1.95±0.10	0.24±0.02	0.38±0.06	0.23±0.03	<b>2.8±0.19</b>	<b>2.2±0.51</b>	<b>3.5±0.35</b>
0-8	1.44	0.21	0.24	0.20	2.7	2.4	3.0

Los valores corresponden a la media de 2 o más cultivos independientes.

#### 4.2 Efecto del OD sobre la modificación postraduccional del precursor de PA.

En la figura 4-2 se observa que la cinética de producción de PA es tipo mixta, durante la fase de crecimiento exponencial la actividad volumétrica de la PA sigue el mismo comportamiento que la curva de crecimiento (biomasa) y entrada la fase estacionaria, esta continúa aumentando de manera lineal, mientras que las células han dejado de crecer. El valor del factor asociado a crecimiento (alfa) y el del factor no asociado a crecimiento (beta) calculados a partir de la ecuación 1-2, del cultivo a 3% de OD (60 y 14 U/mg<sub>biom</sub>) son similares con lo reportado por otros autores (Ramírez y col., 1994; De León y col., 2003). Se dice que el primero representa la síntesis de precursor durante el crecimiento exponencial, y el segundo a la modificación postraduccional durante la fase estacionaria.

Nagalakshimi y Pai (1994), reportaron que la actividad específica de la PA podía duplicarse aumentando la permeabilidad celular, ya fuera por ruptura celular o por la adición de detergentes catiónicos como el bromuro de N-acetiltrimetilamonio (CTAB). Tal incremento se atribuye a que al permeabilizar

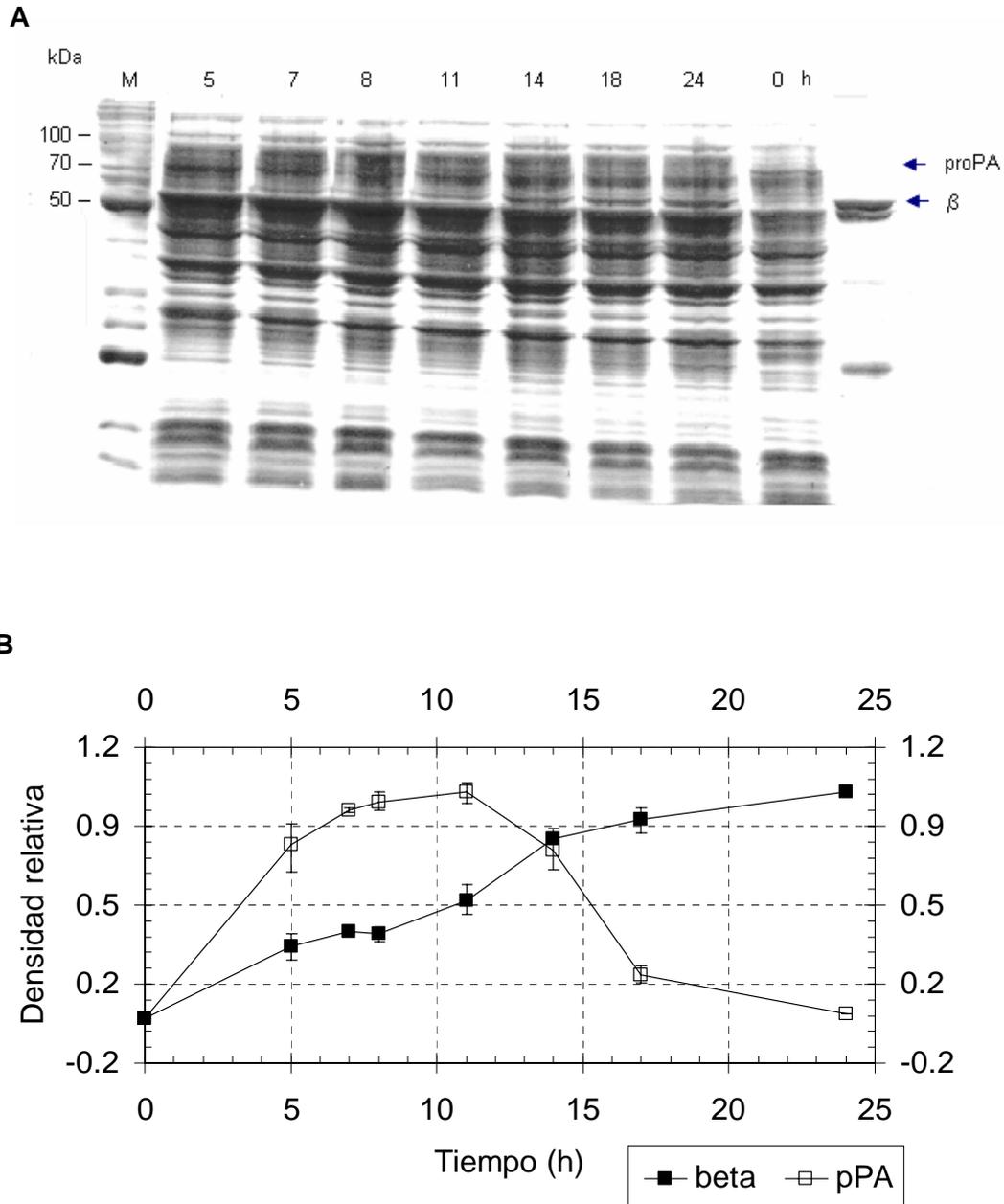
la membrana celular externa, se facilita la difusión del sustrato hacia el espacio periplásmico, lugar mismo, en donde se lleva a cabo la reacción. Sin embargo, De León (1996) sugiere que el incremento en la AEE durante la fase estacionaria se debe al completo procesamiento de precursor acumulado durante la fase de crecimiento exponencial. Con la finalidad de comprobar esta hipótesis, algunas de las muestras de las células del caldo de cultivo tomadas en diferentes tiempos, se procesaron y sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4-3A). Se observa un incremento positivo en la intensidad de la banda de la subunidad beta de la PA (~62 kDa) conforme el tiempo avanza. Se observa también que la intensidad de la banda del precursor de PA (~95 kDa) tiende a incrementarse durante la fase exponencial pero disminuye durante la fase estacionaria. El resultado del análisis de la intensidad de las bandas con el software Quantity-One se muestra en la figura 4-3B.

De León y col., (1996) observaron un incremento significativo (más de 300 %) en la actividad específica solo cuando el cultivo prolongado 12 horas después de agotada la glucosa (etapa postfermentativa) era mantenido a 40 y 100% de OD. Mientras que el incremento obtenido en condiciones anaerobias (0% de OD) fue insignificante comparado con el obtenido en condiciones aerobias. Con el fin de descartar la generación de nuevo precursor a partir de algún metabolito secundario o efecto de éste sobre la maduración del precursor de PA durante la fase estacionaria, se drenó caldo de cultivo del bioreactor una vez que se agotó la fuente de carbono, se centrifugo, decantó y resuspendió en PBS; luego de 17 horas de incubación a 29 °C y aireación (100% OD) constante, la actividad volumétrica y específica de PA se incrementó de 0.21 a 0.85 U/mL y de 0.09 a 0.39 U/mg<sub>biom</sub> respectivamente.

Este incremento fue similar al obtenido en el bioreactor (BR) (Figura 4-4), por lo cual se descarta el consumo de algún metabolito en específico en el procesamiento del precursor de PA.

Se sabe que en condiciones limitantes de oxígeno, el acetato puede alcanzar concentraciones que resultan tóxicas para la célula, para evaluar ese efecto a otra muestra de células se le añadió 1 g de ácido acético y se bombeó con

nitrógeno (0% OD). El incremento en la actividad volumétrica y específica fue solo la mitad con respecto al valor obtenido en el bioreactor durante esa etapa de incubación (Figura 4-4).



**Figura 4-3.** Análisis del procesamiento del precursor de la PA por PAGE:SDS (4-10/12%) a 3% de OD (**A**). El número sobre cada carril indica la hora (h) en que se tomó la muestra del cultivo celular; PA: Penicilino acilasa pura (Sigma); proPA: precursor de PA;  $\beta$ : subunidad beta de la PA; M: Marcador de peso molecular. Análisis de la intensidad de las bandas del precursor (pPA) y la subunidad beta (beta) por el software Quantity-One (**B**). El valor máximo fue normalizado a 1.

### 4.3 Efecto de inhibidores de la transcripción, traducción y cadena respiratoria sobre la maduración de ppPA.

Se pensó que pudieran existir vías o elementos favorecidos por el nivel de oxígeno disuelto que incrementaran la maduración del precursor. Para ello, con la finalidad de indagar sobre el mecanismo real que ejerce el oxígeno sobre el procesamiento del precursor de PA, se drenó caldo de cultivo del bioreactor una vez agotada la fuente de carbono. Las células obtenidas se colocaron en matraces y se incubaron por 12 horas, con diferentes inhibidores del metabolismo (inhibidor de la cadena respiratoria, traducción y transcripción).

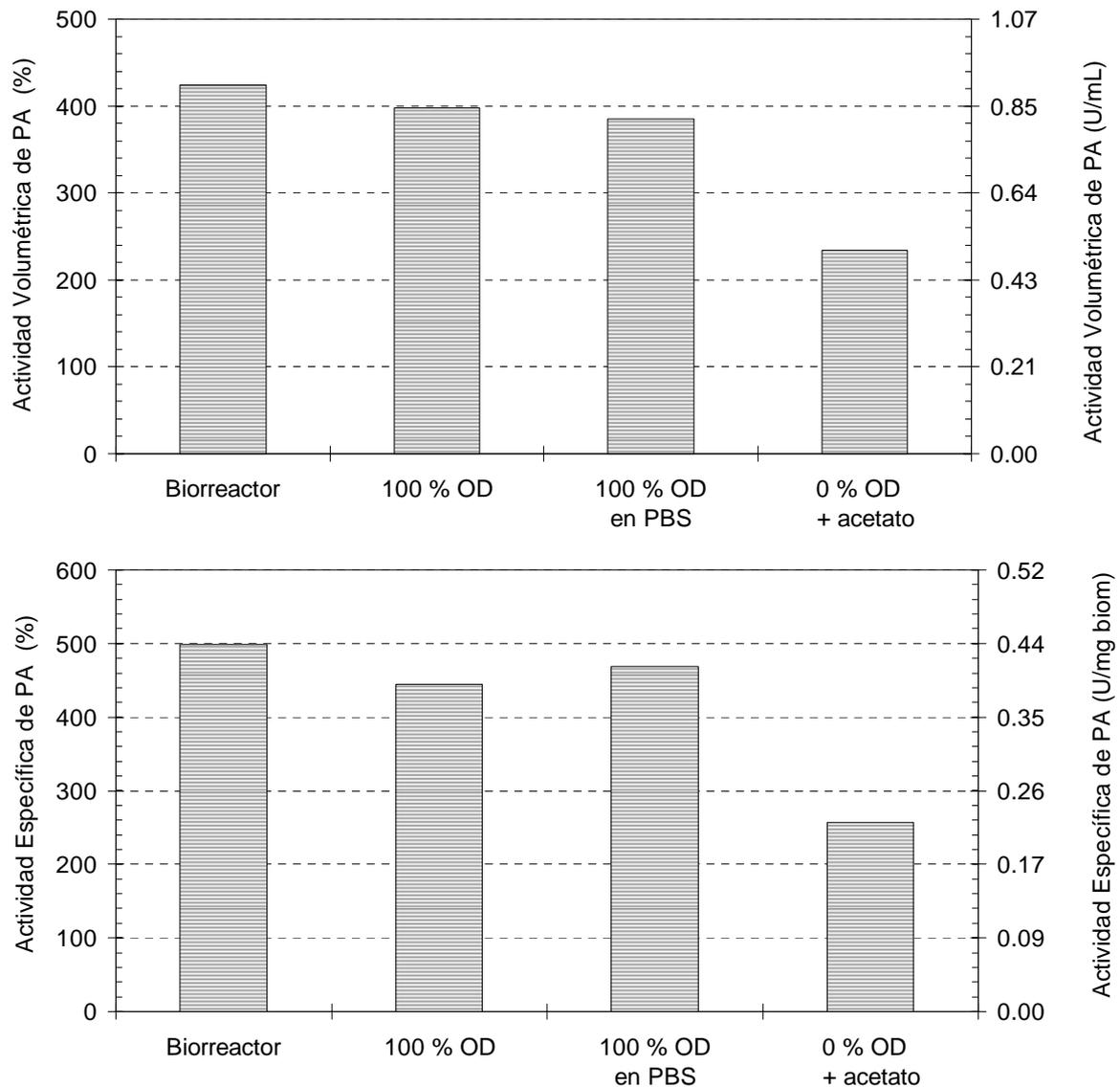
En la figura 4-5, se muestran los valores de actividad enzimática al agotamiento de glucosa (normalizado a 100%) y la actividad obtenida después de la maduración (procesamiento) a diferentes concentraciones de azida de sodio, un inhibidor de la citocromo oxidasa. Se observa, que en ausencia de azida, la actividad aumentó de 0.23 a 0.68 U/mg<sub>cel</sub>. A medida que la concentración de azida se incrementó, el aumento en la actividad específica después de la maduración fue menor, presentándose a 1% de azida de sodio la inhibición completa.

Los resultados sugieren que la inhibición de la cadena respiratoria por azida de sodio repercute en el procesamiento postraduccional del ppPA.

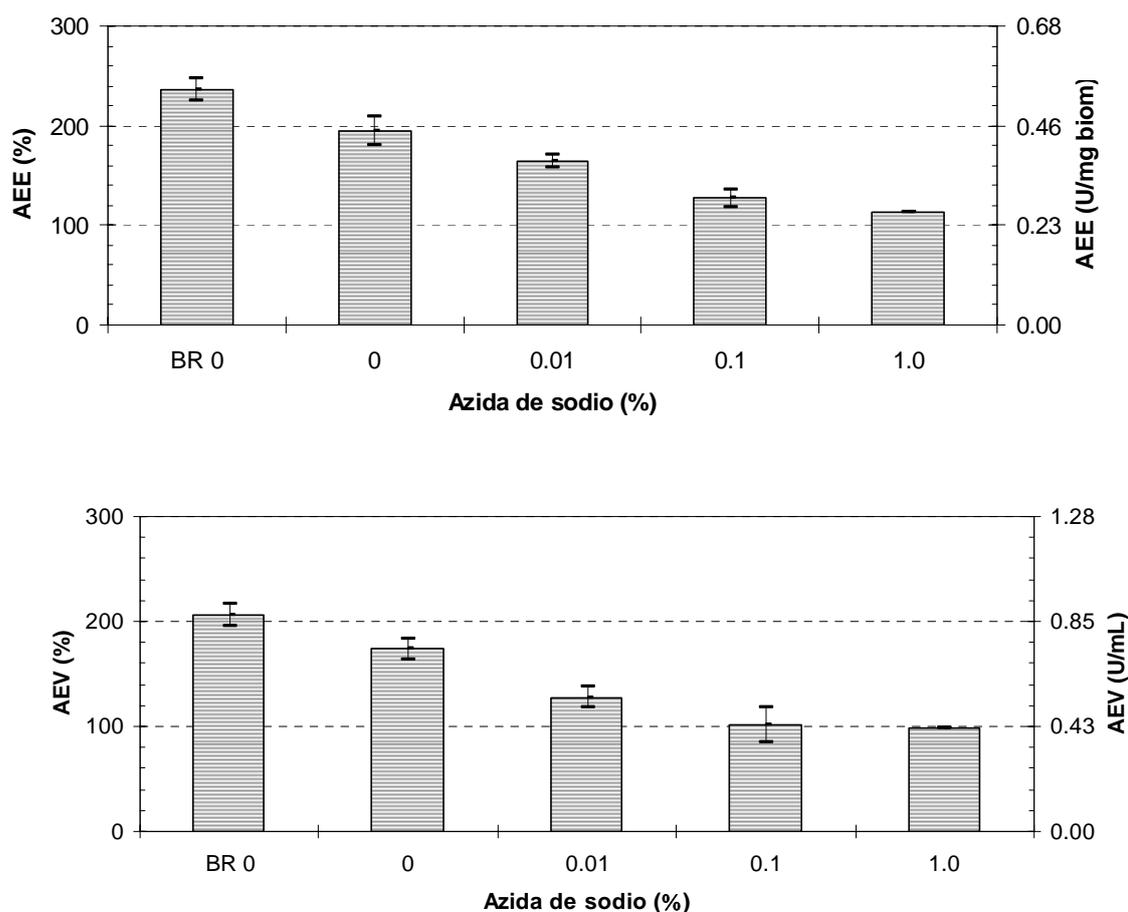
En ausencia de glucosa y oxígeno, la concentración de ATP en las células declina rápidamente. Bajo estas condiciones la traducción y proteólisis son inhibidas (Roskov y Enfors, 1999). Es posible que el procesamiento del precursor de PA requiera energía en alguna etapa de su maduración.

En la figura 4-6, se muestra el efecto en la actividad de PA al final de la etapa de incubación de cultivos con diferentes inhibidores de la traducción (cloranfenicol y tetraciclina). Se observa que en presencia de cloranfenicol y tetraciclina, la actividad específica de la PA se mantuvo igual o ligeramente por debajo de la actividad residual, lo que sugiere que en presencia de éstos antibióticos se inhibe la modificación postraduccional. Probablemente, estos

antibióticos evitan la síntesis de proteínas accesorias necesarias para el transporte del precursor de PA. Deducir el mecanismo de porqué los inhibidores de la traducción evitan la modificación postraduccional del precursor de la PA sería de gran utilidad para comprender mejor este procedimiento.



**Figura 4-4.** Efecto del OD y componentes presentes en el medio sobre la maduración del precursor de PA. Al valor de actividad residual se le asignó como 100%.



**Figura 4-5.** Efecto de la inhibición de la cadena respiratoria sobre la maduración del precursor de PA. Al valor de actividad residual se le asignó como 100%.

Aún con la concentración menor de rifampicina empleada ( $15 \mu\text{g/mL}$ ), se observa un efecto negativo sobre el incremento de actividad de la PA. Este efecto pudo deberse a: 1) la inhibición de la transcripción de proteínas accesorias para el exporte del precursor de PA, o de proteínas importantes para el buen funcionamiento celular, ó 2) la inhibición de la transcripción de *novo* de ARNm *pac* y su disponibilidad para la síntesis de nuevos precursores. En las muestras tratadas con rifampicina, las proteínas y la biomasa disminuyeron drásticamente, hecho que difiere de las muestras tratadas con azida, aumento de temperatura y bajo nivel de oxígeno disuelto. El trabajo de Viegas y col. (2005), en donde observaron una no correlación entre la

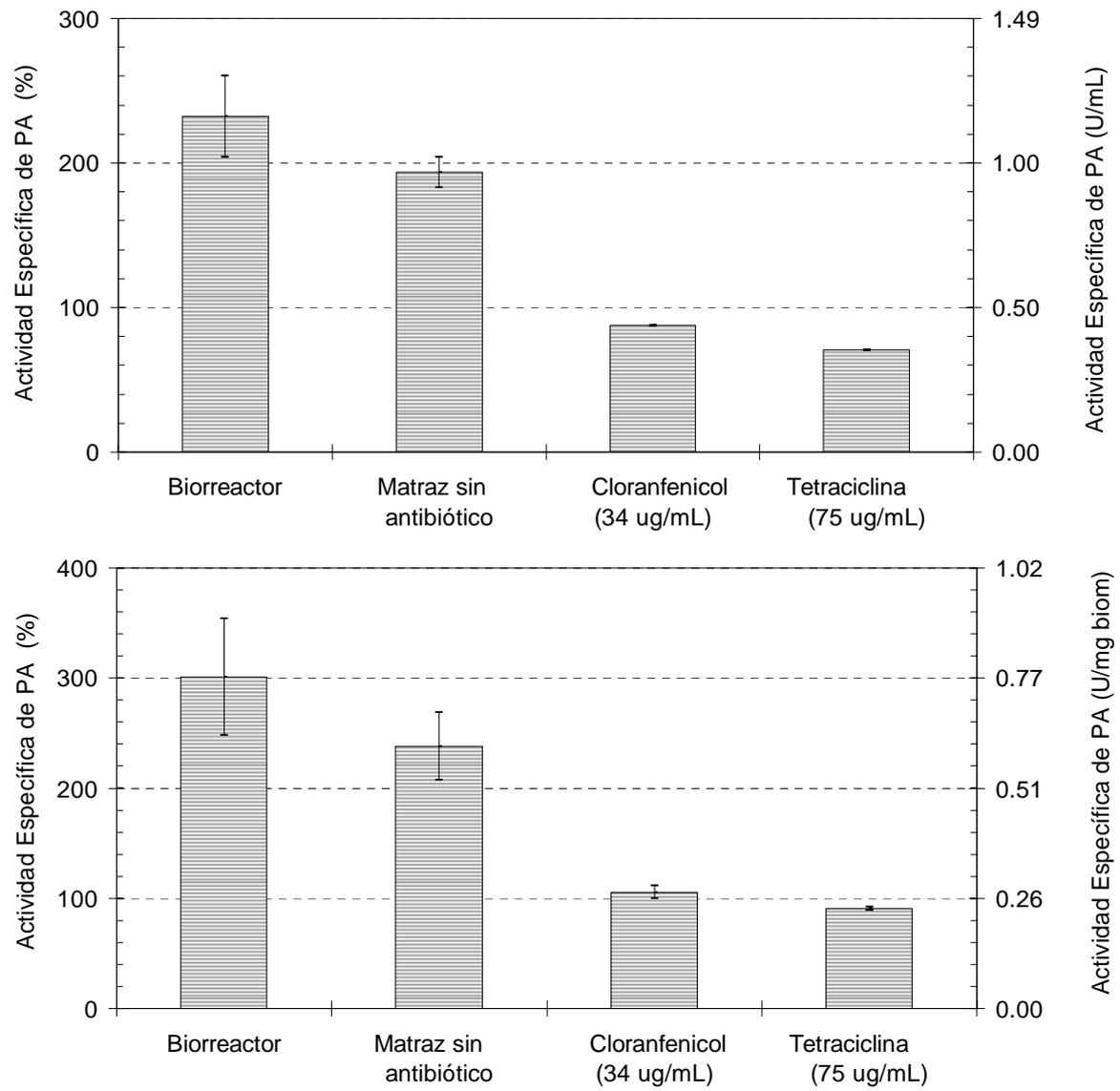
longevidad del ARNm de *pac* y la producción de PA activa, hace a la primera opción como la causa más probable.

La ARN polimerasa T7 a diferencia de la ARN polimerasa bacteriana no es inhibida por rifampicina (Sambrook y col., 2001). Los vectores que acarrean un promotor T7 (pET-3) pueden ser usados para expresar secuencias de ADN clonadas en bacterias. El uso de rifampicina en un sistema en el cual el gen *pac* se regule por un promotor T7, permitiría su transcripción mientras que reprimiría la transcripción en la célula huésped, de esa manera, se podría discernir sobre si el aumento de actividad de PA se debe a la generación de nuevos transcritos del gen *pac* durante la etapa postfermentativa o si es única y exclusivamente debido a la maduración de precursores de PA con participación de proteínas accesorias.

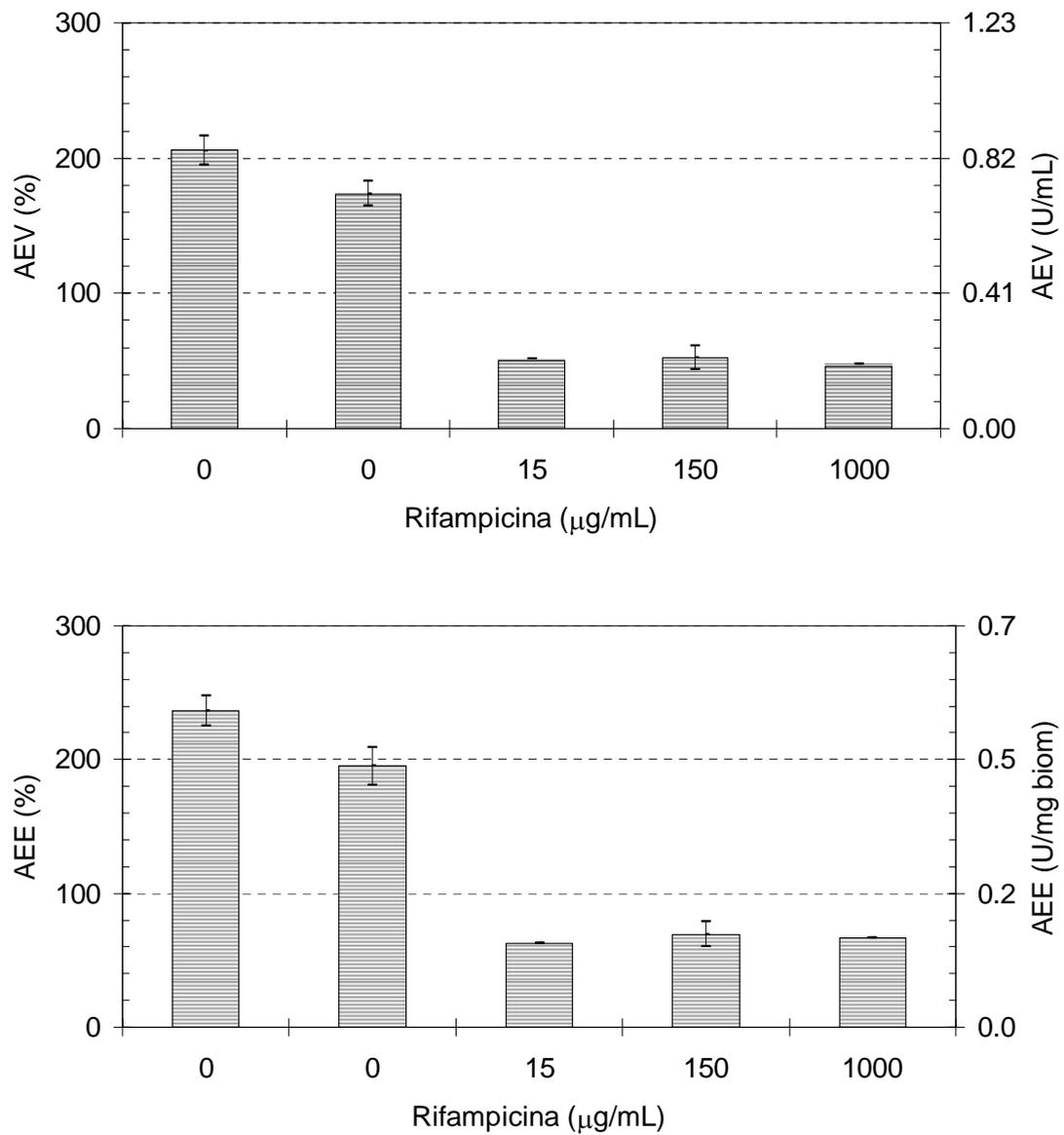
#### 4.4 Efecto de la temperatura sobre la maduración de ppPA

Se sabe que la temperatura es otro de los factores que afecta la producción de PA nativa, siendo a 28°C la que mayor actividad genera. A temperaturas mayores, como 37°C, la actividad tiende a decrecer, hasta desaparecer (Vandame, 1974). Se cree que la termorregulación de la enzima es a nivel de transporte y/o procesamiento del precursor en lugar de inactivación de la enzima. Con el fin de probar esta teoría, una de las muestras se sometió a alta temperatura (37°C) durante la etapa postfermentativa.

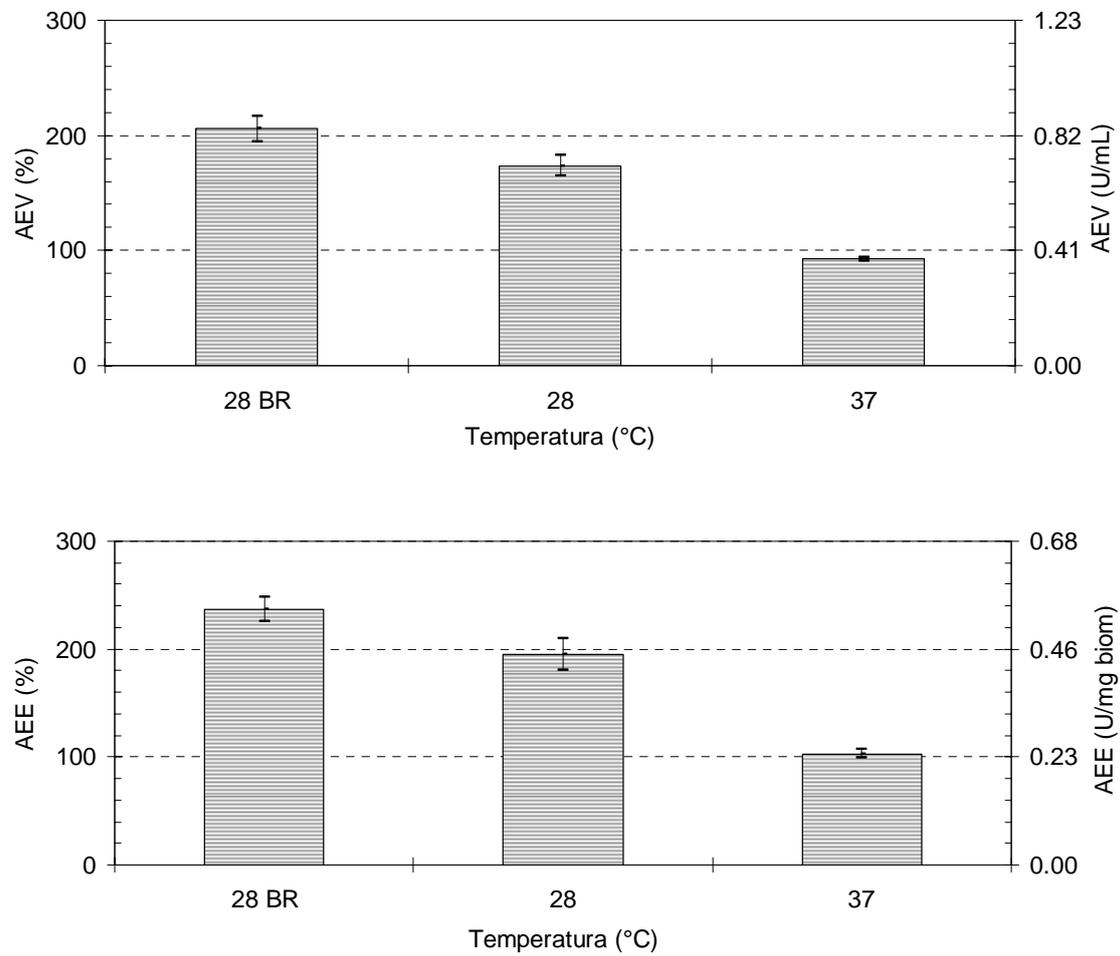
En la figura 4-8, se observa que la actividad de PA se mantiene ligeramente por debajo de la actividad residual, lo cual coincide con lo observado en el gel de electroforesis de la muestra (Figura 4-9).



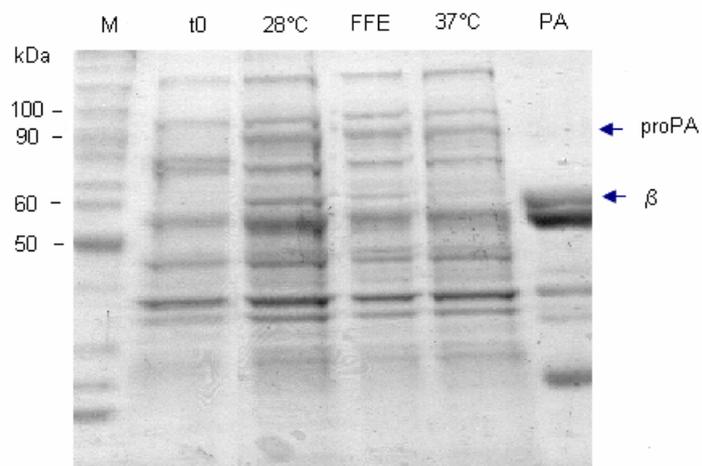
**Figura 4.6.** Efecto de la inhibición de la traducción de proteínas de *novo* sobre la maduración del precursor de PA.



**Figura 4.7.** Efecto de la inhibición de la transcripción de RNAs de *novo* sobre la maduración del precursor de PA.



**Figura 4.8.** Efecto de la temperatura sobre la maduración del precursor de PA.



**Figura 4-9.** Análisis del procesamiento del precursor de PA por PAGE: SDS a diferente temperatura. FFE: muestra tomada al agotamiento de glucosa; 28°C y 37°C: muestra al final de la incubación a 28 y 37°C; t0: muestra tomada al tiempo cero; PA: penicilino acilasa pura (Sigma). proPA: precursor de PA; β: subunidad beta de la PA; M: Marcador de peso molecular.

## 5. CONCLUSIONES

El nivel de oxígeno disuelto en el medio afecta la producción de PA. El incremento en la actividad de PA obtenido durante la fase estacionaria en cultivos por lote limitados por oxígeno (3% de OD), fue mayor que el obtenido en un cultivo no limitado por oxígeno (40% de OD). Esto se explica por la disminución de la velocidad específica de crecimiento a baja tensión de oxígeno disuelto.

A bajos niveles de OD, al igual que la velocidad de crecimiento, la actividad proteolítica es menor, mientras que la replicación de los plásmidos permanece constante, esto podría ser la causa del incremento observado durante la etapa postfermentativa de un cultivo a 3% de OD.

Al agotarse la fuente de carbono la actividad metabólica (transcripción, traducción, respiración) solo disminuye. El efecto de inhibidores del metabolismo sobre el procesamiento de PA, sugiere la participación de proteínas accesorias en el proceso, involucrando de manera indirecta la función del oxígeno para el aporte de energía. Por último, la presencia de oxígeno en el medio de cultivo resulta fundamental para que ocurra el procesamiento y activación de la PA recombinante, concluyendo que la falta de oxígeno o la inactivación de las citocromo oxidases evita completamente la maduración del precursor de PA.

## PERSPECTIVAS

Fundamentar bien el mecanismo por el cual, el oxígeno afecta el procesamiento postraducciona de una de las proteínas Ntn- hidrolasas, abriría la posibilidad de extrapolar el conocimiento generado en este estudio para aplicarse a otros procesos similares, como aquellos que requieren puentes disulfuro (insulina, interleucinas o interferón beta) y otras Ntn- hidrolasas que tienen también importancia en medicina. Se recomienda analizar con mayor detalle el estado del precursor en cultivos a alta y baja tensión de OD, para determinar el mecanismo a mayor profundidad de esta condición ambiental.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, D. 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*. **Biochem Biophys Acta** 276:250-256.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnol.** 22: 1405-1408.
- Bentley, W. E., N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H., Davis, and D. S. Kompala. 1990. The principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. **Biotechnol Bioeng.** 35:668-681.
- Bhattacharya, S., Gupta, V. S, Prabhune, A. A., SivaRaman, H., Debnath, M. and Ranjekar, P. K. 1993. Studies of operational variables in batch mode for genetically engineered *Escherichia coli* cells containing penicillin acylase. **Enzyme Microb Technol.** 15(12):1070-1073.
- Bochtler, M, Ditzel, L, Groll, M, Hartmann, C and Huber, R. 1999. The proteasome. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.** 28:295-317.
- Bock, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. and Buckel, P. 1983. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits. **FEMS Microbiol. Lett.** 20. 135-139.
- Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. 1991. **Protein methods**. Ed. Wiley- Liss. United States of America. Chapter 5: pp. 95-142.
- Bompard-Gilles C, Villeret V, Davies GJ, Fanuel L, Joris B, Frere JM, Van Beeumen J. 2000. A new variant of the Ntn hydrolase fold revealed by the crystal structure of L-aminopeptidase D-ala-esterase/amidase from *Ochrobactrum anthropi*. **Structure Fold Des.** 8(2):153-62.
- Borek D and Jaskolski M. 2000. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a new L-asparaginase encoded by the *Escherichia coli* genome. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** 56 (11):1505-7.
- Bowden, G. A., Paredes, A. M. and Geourgiou, G. 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Bio Technol.** 9:725-730.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggelby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R. and Murzin, A.G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. **Nature.** 378, 416–419.
- Breceda, G. B. 2001. Producción de penicilino acilasa regulada por el promotor lac en cultivos de *Escherichia coli* JM101/pPA102. **Tesis de licenciatura**. Instituto de Celaya.

- Brimer, C. D. and Montie, T. C. 1998. Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. **J Bacteriol.** 180: 3209-3217.
- Caunt, P., Impoolsup, A. and Greenfield, P. F. 1990. A method for the stabilization of recombinant plasmid in yeast. **J Biotechnol.** 14: 311-320.
- Chao, Y. P., Wen, C.S., Chiang, C.J. and Wang, J.J. 2001. Construction of the expression vector based on the growth phase and growth rate-dependent *rnf* promoter: use of cell growth rate to control the expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett.** 2001. 23: 5-11.
- Chou CP, Wang WC, Lin MI. 2000. An approach for enhancing heterologous production of *Providencia rettgeri* penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Biotechnol Prog.** 16(3):315-8.
- Chou, C. P., J.-H. Tseng, B.-Y. Kuo, K.-M. Lai, M.-I. Lin, and H.-K. Lin. 1999. Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Biotechnol Prog.** 15:439–445
- Chou, C. P., J.-H. Tseng, B.-Y. Kuo, K.-M. Lai, M.-I. Lin, and H.-K. Lin. 1999. Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Biotechnol Prog.** 15:439–445
- Dai M, Zhu Y, Yang Y, Wang E, Xie Y, Zhao G, Jiang W. 2001. Expression of penicillin G acylase from the cloned *pac* gene of *Escherichia coli* ATCC11105. Effects of *pacR* and temperature. **Eur J Biochem.** 268(5):1298-303.
- De Leon A., Galindo E. and Ramírez O.T. 1996. A postfermentative stage improves penicillin acylase production by a recombinant *E. coli*. **Biotechnol Lett.** 18:927-932.
- De León, A., Hernández, V., Galindo, E., Ramírez, O. T. (2003). Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Enzyme Microbial Technol.** 33: 689-697.
- Doelle, H. W., Ewings, K. N. and Hollywood, N. W. 1982. Regulation of glucose metabolism in bacterial system. **Adv Biochem Eng.** 23: 1-35.
- Donaldson, M., Wood, H. A., Kulakosky, P. C. and Shuler, M. L. 1999. Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. **Biotechnol Bioeng.** 63(3): 255-262.
- Dong, H., L. Nilsson, and C. G. Kurland. 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. **J Bacteriol.** 177:1497–1504.

- Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G. & Moody, P.C. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. **Nature**. 373, 264–268.
- Gabauer, A., Scheper, T. and Schügerl, K. 1987. Penicillin acylase production by *E. coli*. **Biopr Eng.** 2: 55-58.
- Goodman & Gilman. 1996. **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. 9º edición. Editorial McGraw- Hill Interamericana. Pag. 1141-5
- Grigoryev S, Stewart AE, Kwon YT, Arfin SM, Bradshaw RA, Jenkins NA, Copeland NG, Varshavsky A. 1996. A mouse amidase specific for N-terminal asparagine. The gene, the enzyme, and their function in the N-end rule pathway. **J Biol Chem**. 271(45):28521-32.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. **Nature**. 386(6624):463-71.
- Guan C, Liu, Y., Shao, Y., Cui, T., Liao W, Ewel, A., Whitaker, R. and Paulus, H. 1998. Characterization and functional analysis of the cis-autoproteolysis active center of glycosylasparaginase. **J Biol Chem**. 273:9695–9702.
- Guo H-C, Xu Q, Buckley D, Guan C. 1998. Crystal structures of *Flavobacterium glycosylasparaginase*. An N-terminal nucleophile hydrolase activated by intramolecular proteolysis. **J Biol Chem**. 273:20205–20212.
- Guranda DT, Volovik TS, Svedas VK. 2004. pH Stability of penicillin acylase from *Escherichia coli*. **Biochem**. 69(12):1386-90.
- Han, K., Lim, H. C. and Hong, J. 1992. Acetic acid formation in *E. coli* fermentation. **Biopr. Eng.** 2: 55-58.
- Han, S.J., Chang, H.N. and Lee, J. 1998. Fed-batch cultivation of oxygen-dependent inducible promoter system, the *nar* promoter of *Escherichia coli* with an inactivated *nar* operon. **Biotechnol. Bioeng.** 59: 400-406.
- Hanning, G., and S. C. Makrides. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.** 16:54–60.
- Hopkins, D. J., Betenbaugh, M. J. and Dhurjati, P. 1987. Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *E. coli* containing plasmid pKN401. **Biotechnol. Bioeng.** 29: 85-91.
- Hörnsten, E. G. 1995. On culturing *E. coli* on a mineral salts medium during anaerobic conditions. **Biopr. Eng.** 12: 157-162.
- Hughes, D. E., Curtis, J. E., Khosla, C., Bailey, J. E. 1989. A new oxygen-regulated promoter for the expression of proteins in *Escherichia coli*. **Biotech.** 7: 1026-1028.

- Ignatova, Z., Enfors, S., Hobbie, M., Taruttis, S., Vogt, C. & Kasche, V. (2000) The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. **Enzyme Microb Technol.** 26, 165–170.
- Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A. and Kasche, V. 2002. Unusual Signal Peptide Directs Penicillin Amidase from *Escherichia coli* to the Tat Translocation Machinery. **Biochem Biophys Res Commun.** 291: 146–149.
- Ignatova, Z., Mahsunah, M., Georgieva and V. Kasche. 2003. Improvements of Posttranslational Bottlenecks in the Production of Penicillin Amidase in Recombinant *Escherichia coli* Strains. **Appl Environ Microbiol.** 69:1237–45.
- Ignatova, Z., Wischnewski, F., Notbohm, H. and Kasche, V. 2005. Pro-sequence and Ca<sup>2+</sup>-binding: implications for folding and maturation of Ntn-hydrolase penicillin amidase from *E. coli*. **J Mol Biol.** 348(4):999-1014.
- Illanes, A., Acevedo, F., Gentina, J. C., Reys, I., Tower, R., Cartagena, O., Ruiz, A. and Vásquez M. 1994. **Process Biochem.** 29: 263-270.
- Impoolsup. A., Caunt, P. and Greenfield, P. F. 1989. Stabilization of a recombinant yeast plasmid in non-selective medium by cyclic growth rate changes. **Biotechnol Lett.** 2(9): 605-608.
- Isupov MN, Obmolova G, Butterworth S, Badet-Denisot MA, Badet B, Polikarpov I, Littlechild JA, Teplyakov A. 1996. Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase. **Structure.** 4(7):801-10.
- Jacob, H. E. 1970. Influence of pretreatment of the redoxpotential electrode on the determination of oxygen pressure in bacterial cultures. **Pathol Microbiol.** 36(1):57-62.
- Kasche, V., K. Lummer, A. Nurk, E. Piotraschke, A. Rieks, S. Stoeva, and W. Voelter. 1999. Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Acta** 1433:76–86.
- Kasche V, Ignatova Z, Markl H, Plate W, Punckt N, Schmidt D, Wiegandt K, Ernst B. 2005. Ca<sup>2+</sup> is a cofactor required for membrane transport and maturation and is a yield-determining factor in high cell density penicillin amidase production. **Biotechnol Prog.** 21(2):432-8.
- Keilmann, C., Wanner, G. and Böck, A. 1993. Molecular basis of the exclusive low-temperature synthesis of an enzyme in *E. coli*: penicillin acylase. **Biol Chem Hoppe-Seyler.** 374:983-992.

- Kim Y, Yoon K, Khang Y, Turley S, Hol WG 2000. The 2.0 Å crystal structure of cephalosporin acylase. **Structure Fold Des.** 8(10):1059-68.
- Konz, J. O., King, J. and Cooney, C. L. 1998. Effects of oxygen on recombinant protein expression. **Biotechnol Prog.** 14: 393-409.
- Kuchel, P.W. and Ralston, G.B. 1998. **Biochem.** Second Edition. McGraw-Hill. USA. Chap 17.
- Kunkel, J. P., Jan, D.C., Butler, M. and Jamieson, J.C. 2000. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. **Biotechnol Prog.** 16(3): 462-70.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227, 680–685.
- Lee, F. J. S. and Hassan, H. M. 1987. Effect of oxygen tension on stability and expression of a killer toxin chimeric plasmid in a chemostat culture of *Sacharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 27: 72-74.
- Lee, H., Park, O. K. and Kang, H. S. .2000. Identification of a new active site for autocatalytic processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli* ATCC11105. **Biochem Biophys Res Commun.** 272(1):199-204.
- Lindenthal, C. Elsinghorst, E. A. 1999. Identification of a new glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.** 67: 4084-4091.
- Lorimer, G. H. 1996. A quantitative assessment of the role of the chaperonin protein in protein folding in vivo. **FASEB J.** 10: 5-9.
- Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science.** 268(5210):533-9.
- Lowry, O.H., Rosebrough, W.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193:265-275.
- Lu JY, Lowe DA, Kennedy MD, Low PS. 1999. Folate-targeted enzyme prodrug cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug. **J Drug Target.** 7(1):43-53.
- McDonough MA, Klei HE and Kelly JA. 1999. Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. **Protein Sci.** 8(10):1971-81.
- Meevootisom, V. and Saunders, J.R. 1987. Cloning and expression of penicillin acylase genes from overproducing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 25; 372-378.
- Merino, P.E. 1992. Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gene pac y su producto, la penicilino acilasa de *E. coli*. **Tesis de Doctorado.**

- Instituto de Biotecnología. Posgrado en Biotecnología, CCH-UNAM.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal Chem.** 13:420-428.
- Muchmore CR, Krahn JM, Kim JH, Zalkin H and Smith JL. 1998. Crystal structure of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. **Protein Sci.** 7(1):39-51.
- Nagalakshimi, V. and Pai, J. S. 1994. Permeabilization of *E. coli* cells for enhanced penicillin acylase activity. **Biotechnol Tech.** 8(6): 431-434.
- Oh, M-K and J. C. Liao. 2000. DNA microarray detection of metabolic responses to protein overproduction in *Escherichia coli*. **Met Eng.** 2:201–209.
- Oinonen, C and Rouvinen, J. 2000. Structural comparison of Ntn-hydrolases. **Protein Sci.** 9(12):2329-37.
- Ospina, S. S., Lopez-Munguia, A., Gonzalez, R. L. and Quintero, R. 1992. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. **J Chem Technol Biotechnol.** 53(2):205-14.
- Palmer, T. and Berks, B. C. 2003. Moving folded protein across the bacterial cell membrane. **Microbiol.** 149: 547-556.
- Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, Kennedy JF. 2000. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Biotechnol Adv.** 18(4):289-301.
- Pinotti LM, Silva AF, Silva RG, Giordano RL. 2000. Study of different media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Appl Biochem Biotechnol.** 84-86:655-63.
- Qoronfleh MW. 1999. Dissolved oxygen concentration affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Appl Biochem Biotechnol.** 80(2):107-20.
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolivar, F. and Quintero, R. 1994. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. **Proc Biochem.** 29:197-206.
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolivar, F. and Quintero, R. 1994b. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. **Proc Biochem.** 29:197-206.
- Robas N, Branlant C. 1994. The expression of the penicillin G amidase gene of *Escherichia coli* by primer extension analysis. **Curr Microbiol.** 29(5):263-8.
- Rozkov, A. and Enfors, S-O. 1999. Stabilization of a Proteolytically Sensitive Cytoplasmic Recombinant Protein During Transition to Downstream

- Processing. *Biotechnol Bioengin.* 62(6): 730-738.
- Saarela, J., Laine, M. Tikkanen, R., Oinonen, C., Jalanko, A., Rouvinen, J., Peltonen, L. (1998). Activation and oligomerization of aspartylglucosaminidase. **J Biol Chem.** 273: 25320-25328.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3<sup>rd</sup>. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. Pag. 15.20.
- Sawas C. and Makrides. 1996. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiol reviews.** 60: 512–538.
- Scherrer, S., N. Robas, H. Zouheiry, G. Branlant, and C. Branlant. 1994. Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *Escherichia coli* penicillin G amidase precursor polypeptide. **Appl Microbiol Biotechnol.** 42:85–91
- Schömer, U., Segner, A. and Wagner, F. 1984. Penicillin Acylase from the Hybrid Strain *Escherichia coli* 5K(pHM12): Enzyme Formation and Hydrolysis of 1-Lactam Antibiotics with Whole Cells. **Appl. And Env. Microbiol.** 47(2): 307-312.
- Schumacher, G., Sizmann, D., Hang, H., Buckel, P. & Böck, A.(1986) Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. **Nucleic Acids Res.** 14, 5713–5727.
- Seemuller, E., Lupas, A. and Baumeister, W. 1996. Autocatalytic processing of the 20S proteasome. **Nature.** 382: 468-471.
- Seo, J. H. and Bailey, J. F. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng.** 27: 1668-1674.
- Shewale, J. G., and H. SivaRaman. Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. **Process Biochem.** 24:146– 154.
- Sizmann, D., C. Keilmann, and A. Bock. 1990. Primary structure requirements for the maturation in vivo of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. **Eur J Biochem.** 192:143–151.
- Sriubolmas, N. Panbangred, W. Sriurairatana, S. and Meevootison, V. 1997. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. **Appl Microbiol Biotechnol.** 47: 373-378.
- Suresh CG, Pundle AV, SivaRaman H, Rao KN, Brannigan JA, McVey CE, Verma CS, Dauter Z, Dodson EJ, Dodson GG. 1999. Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members. **Nat Struct Biol.** 6(5):414-6.

- Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. **Appl Biochem Biotechnol.** 66(3):197-238.
- Topgi, RS, Ng, JS, Landis, B, Wang, P, Behling, JR. 1999. Use of enzyme penicillin acylase in selective amidation/amide hydrolysis to resolve ethyl 3-amino-4-pentynoate isomers. **Bioorg Med Chem.** 7(10):2221-9
- Träger, M., Qazi, G. N., Buse, R. and Onken, U. 1992. Influence of constant and oscillating dissolved oxygen concentration of *Aspergillus niger*. **J. Ferm Bioeng.** 74 (5): 282-287.
- Unutmaz y col. 1997. Increased a-lytic protease production from recombinant *Escherichia coli* grown with oxygen limitation. **Biotech Lett.** 19 (8): 731–734.
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E. & Bolivar, F. (1991) The role of the penicillin amidases in nature and industry. **Trends Biochem Sci.** 16, 36–40.
- Viegas SC, Schmidt D, Kasche V, Arraiano CM, Ignatova Z. 2005. Effect of the increased stability of the penicillin amidase mRNA on the protein expression levels. **FEBS Lett.** 579(22):5069-73.
- Virji, M. 1998. Glycosylation of the *Meningococcus pilus* protein. **ASMNews.** 64: 398-405.
- Vojtisek, V., and J. Slezak. 1975. Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. III. Catabolite repression, diauxie, effect of cAMP and nature of the enzyme induction. **Folia Microbiol.** 20:298-306.
- Vrudhula VM, Senter PD, Fischer KJ, Wallace PM. 1993. Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin-G amidase conjugate. **J Med Chem.** 36(7):919-23.
- Yang S, Bergmann T, Veide A, Enfors S-O. 1994. Effects of amino acids insertions on the proteolysis of a staphylococcal protein A in *Escherichia coli*. **Eur J Biochem.** 226:847–52.
- Zamora, M. A. 1993. Cultivos exponencialmente alimentados en la producción de la enzima penicilino acilasa por *E. coli* recombinante. **Tesis de licenciatura.** Escuela de Ingeniería Química. UAP: pp. 44-70.
- Zhang, Q., Zhang, L. Liu, Q., Han, J. and Chen, L. 1990. Construction and hyperproductivity of engineered strain QE79 bearing recombinant plasmid containing penicillin G acylase gene from *E. coli* strain AS1.76. **Biotechnol Lett.** 12: 493-498.

## APÉNDICES

### A. Preparación de soluciones

#### A-1 Kanamicina (35mg/mL)

La kanamicina comercial (Sigma) utilizada fue una mezcla base que contenía 781  $\mu\text{g}$  de kanamicina base por gramo de reactivo. Por lo tanto, para preparar una solución de kanamicina de 35 mg/mL, se pesaron y disolvieron en agua destilada, 0.0450 g del reactivo por cada mL de solución deseada, posteriormente se esterilizó a través de un filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  estéril y se refrigeró a 4 °C<sup>a</sup>. La adición de un  $\mu\text{L}$  de esta solución por mL de medio de cultivo, logra una concentración final de 35mg/L.

#### A-2 IPTG (100 mM)

Pesar 0.2383 g de IPTG (Sigma), aforar a 10 mL con agua destilada y esterilizar con un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  estéril. La adición de 500  $\mu\text{L}$  por litro de medio de cultivo genera una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ .

#### A-3 Tiamina (0.1 %)

Pesar 0.0100 g de tiamina (Sigma) y aforar a 10 mL con agua destilada, esterilizar con filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  estéril. La adición de 40  $\mu\text{L}$  por litro de medio de cultivo genera una concentración final de 40  $\mu\text{g/L}$ .

#### A-4 Solución buffer de fosfatos (PBS) (0.1 M, pH de 7.8)

Mezclar 42.5 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M y 457 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M y aforar a un litro con agua destilada. Checar y ajustar el pH con ácido fosfórico.

---

<sup>a</sup> Las soluciones stock refrigeradas, después de un mes deben ser desechadas y preparadas nuevamente.

**A-5 Solución de DNS**

Disolver todos los reactivos de la tabla A-1, a excepción del DNS, en 60 mL de agua destilada. Una vez disueltos, agregar el DNS, mezclar y aforar a 100 mL. Para su almacenamiento cubrir con papel aluminio y refrigerar a 4°C.

**Tabla A-1.** Composición de la solución del DNS.

Reactivos	g/100 mL
NaOH . . . . .	1.00
Tartrato de sodio y potasio	20.00
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . . . . .	0.05
Fenol. . . . .	0.20
DNS (Sigma)* . . . . .	1.00

**A-6 Solución de PDAB**

Disolver 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 20 mL del etanol al 60%, luego agregar lentamente 500 µL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 100 mL.

**A-7 Penicilina al 20%.**

Pesar 0.2 g de penicilina G (Sigma) y disolver en 1 mL de PBS, pH 7.8.

**A-8 Reactivo E**

500 mL de reactivo E, resultan de la mezcla de 5 mL de la solución A y 5 mL de la solución B en 490 mL de la solución C. Se cubre con papel aluminio y se conserva a 4°C por hasta 3 meses. La composición de cada una de estas soluciones se muestra en la tabla A-2.

**Tabla A-2.** Composición del reactivo E.

Solución A	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O al 0.5%
Solución B	Tartrato de Na y K.4H <sub>2</sub> O al 1%
Solución C	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1N

**A-10 Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8**

Pesar 18.2 g de Tris base y disolverlos en 50 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl concentrado, y aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.

**A-11 Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8**

Pesar 1.5 g de Tris base y disolverlos en 15 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl concentrado, y aforar a 25 mL. Almacenar a 4°C.

**A-12 SDS al 10%**

Disolver 2 g de SDS en 20 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

**A-13 Persulfato de amonio (PSA) al 10%**

Disolver 20 mg de PSA en 200  $\mu$ L de agua destilada. De preferencia, prepararlo al momento de utilizarlo.

**A-14 Solución para teñir (100 mL)**

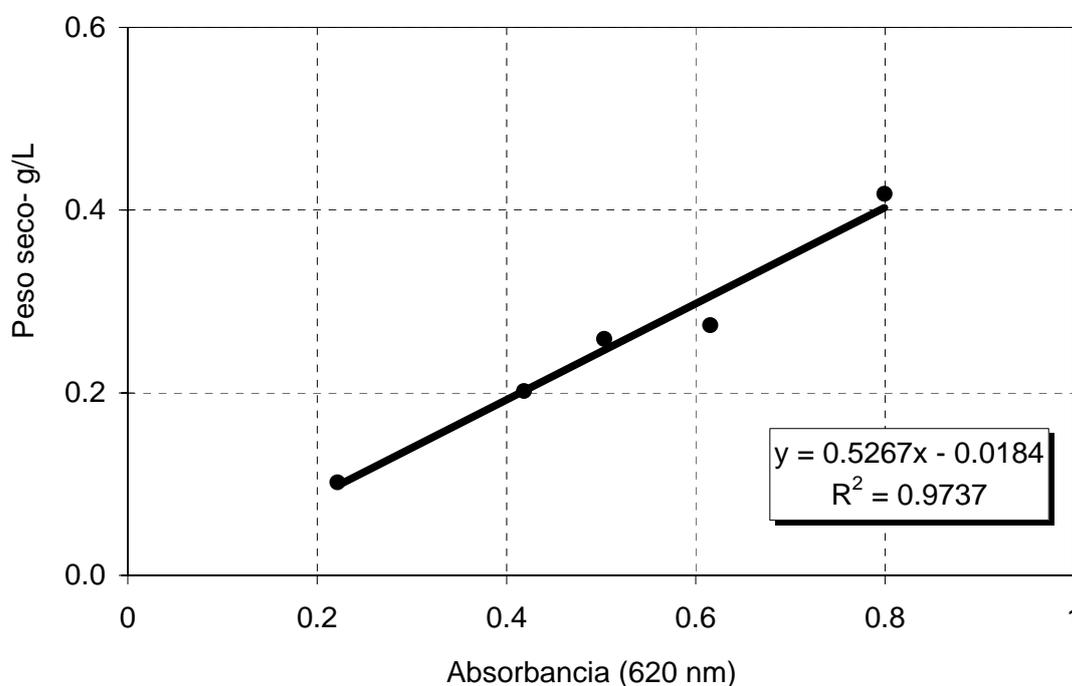
Disolver 0.05 g de azul de coomasie en 50 mL metanol, agregar 10 mL de ácido acético y adicionar 40 mL de agua destilada.

**A-15 Solución para desteñir (200 mL)**

Mezclar 50 mL de metanol, 135 mL de agua destilada y 15 mL de ácido acético.

**B. Curvas estándar.****B-1 Curva estándar de peso seco.**

Se inoculan 100 mL de medio M9I con células y se incuban a 28 °C. 12 horas después, se toma una muestra de este caldo de cultivo, y se hace una serie de diluciones con agua destilada, de tal manera que se obtengan diferentes suspensiones celulares con densidad óptica entre 0.1 y 0.8. La absorbancia de las muestras es leída a 620 nm. Después, las suspensiones celulares son centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos y resuspendidas en solución salina 0.9%, posteriormente son filtradas en membranas Millipore de 0.22 µm, previamente desecadas y pesadas. Finalmente, los filtros con células se deshidratan a 60 °C hasta peso constante. La curva estándar de peso seco utilizada se muestra en la figura B-1.

**Figura B-1.** Curva estándar de peso seco.

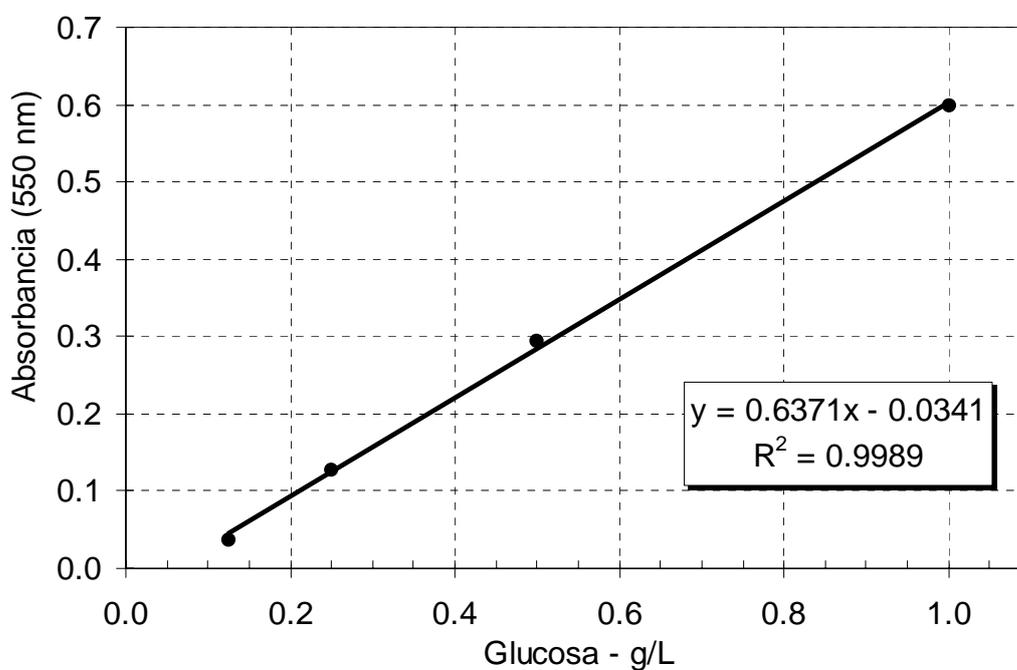
**B-2 Curva estándar de azúcares reductores.**

Cada vez que se preparan soluciones nuevas debe realizarse una nueva curva patrón usando una solución de Glucosa (Sigma) de 1 mg/mL en agua destilada, a partir de la cual se preparan diferentes estándares, como se muestra en la tabla B-2.

**Tabla B-2.** Curva estándar para determinación de azúcares reductores.

Número de tubo	1	2	3	4	5
<b>Glucosa dilución</b>	1:1	1:2	1:4	1:8	-
<b>Glucosa (mg/mL)</b>	1	0.5	0.25	0.125	0
Baño maria (min)	15	15	15	15	15
Enfriar a Temperatura ambiente					
<b>H<sub>2</sub>O destilada (mL)</b>	4	4	4	4	4
<b>DNS (μL)</b>	750	750	750	750	750

Una curva de calibración típica se muestra en la figura B-2.

**Figura B-2.** Curva estándar de azúcares reductores.

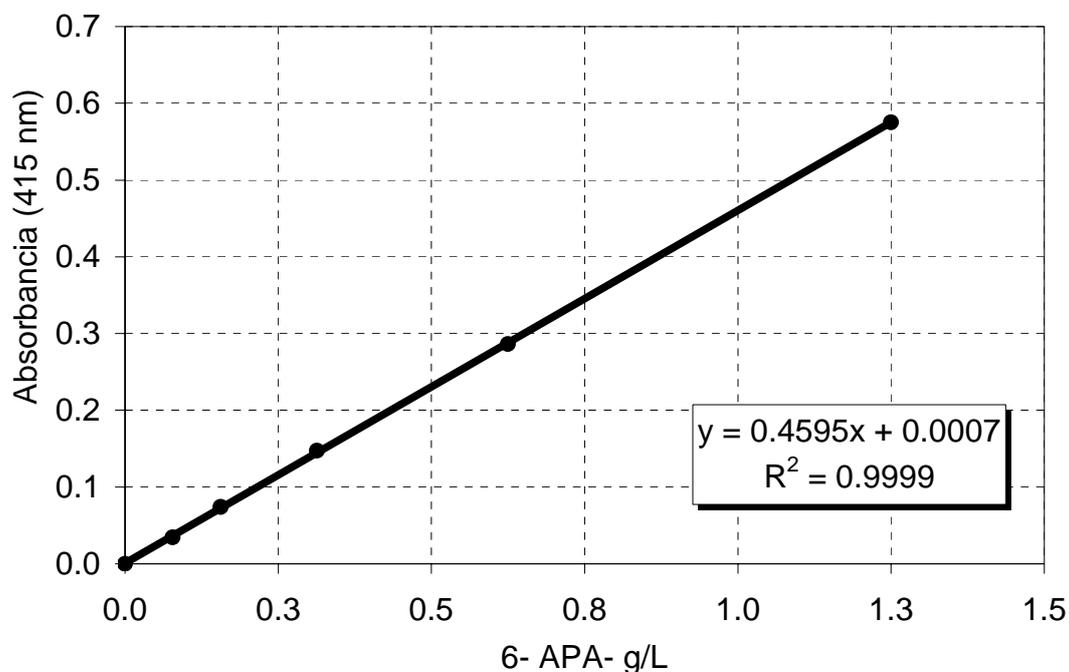
**B-3 Curva estándar de actividad enzimática de PA.**

Cada vez que se preparan soluciones nuevas debe realizarse una nueva curva patrón usando una solución de 6-APA (Sigma) de 2.5 g/L en PBS, pH de 7.8, para ello, se efectúan diluciones seriadas como se muestra en la tabla B-3.

**Tabla B-3.** Curva estándar para determinación de actividad enzimática.

Número de tubo	1	2	3	4	5	6
<b>6-APA dilución</b>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	-
<b>6-APA (mg/mL)</b>	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	-
<b>Alícuotas (μL)</b>	40	40	40	40	40	40
<b>Etanol (μL)</b>	960	960	960	960	960	960
<b>PDAB (μL)</b>	500	500	500	500	500	500
<b>Buffer, pH 7.8 (μL)</b>	-	-	-	-	-	40

Una curva de calibración típica se muestra en la figura B-3.

**Figura B-3.** Curva estándar de actividad enzimática.

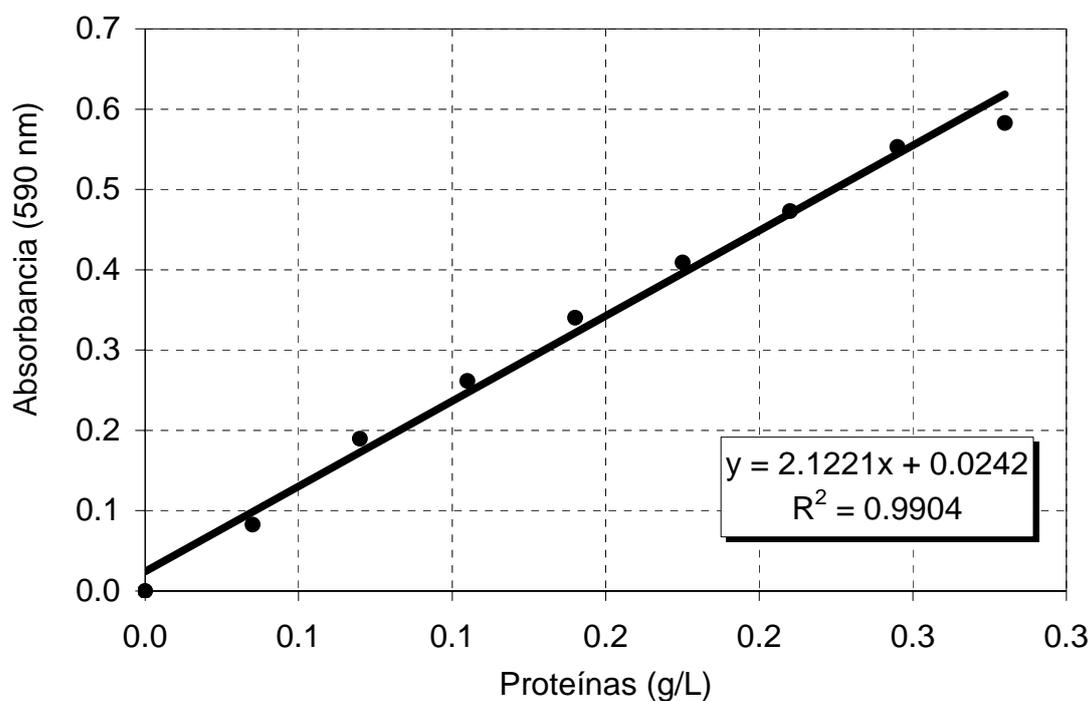
#### B-4 Curva estándar de proteínas

Se preparó una solución patrón de albúmina bovina sérica (BSA) de 1.4 mg/mL, a partir de la cual, se prepararon y procesaron diferentes estándares, tal como se indica en la tabla B-4.

**Tabla B-4.** Curva estándar para determinación de proteínas.

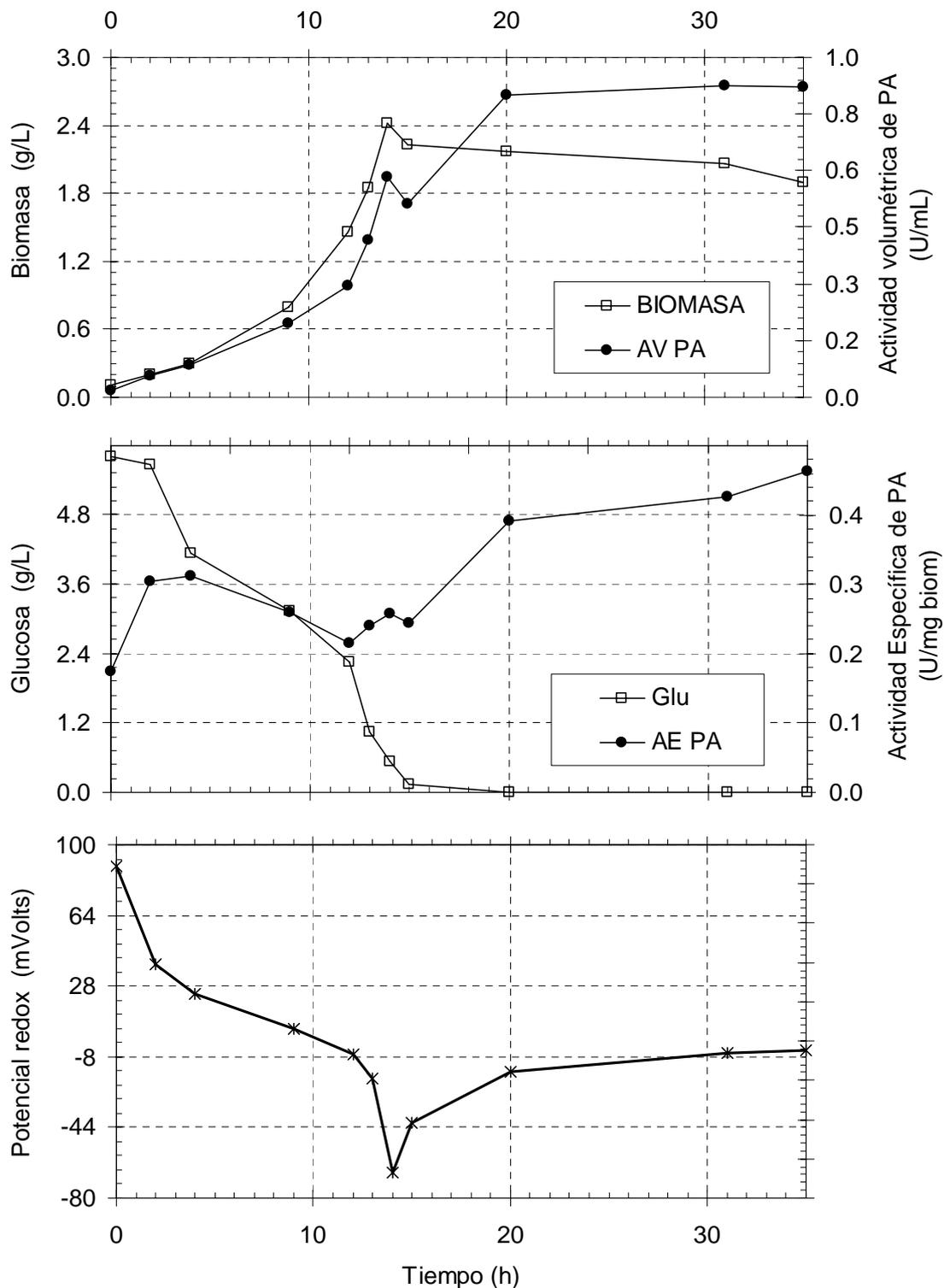
Número de tubo	1	2	3	4	5	6
<b>BSA</b> (μL)	0	25	50	75	100	125
<b>H<sub>2</sub>O</b> destilada (μL)	1000	975	950	925	900	875
Reposar (min)	10	10	10	10	10	10
<b>Reactivo E</b> (mL)	5	5	5	5	5	5
Reposar (min)	30	30	30	30	30	30
<b>Reactivo de folin</b> (μL)	500	500	500	500	500	500

Una curva de calibración típica se muestra en la figura B-4.



**Figura B-4.** Curva estándar de proteínas totales.

**C. Cinéticas de crecimiento y producción de PA a diferentes niveles de OD.**



**Figura C-1.** Cinética de crecimiento y producción de PA de un cultivo a 14% de OD.

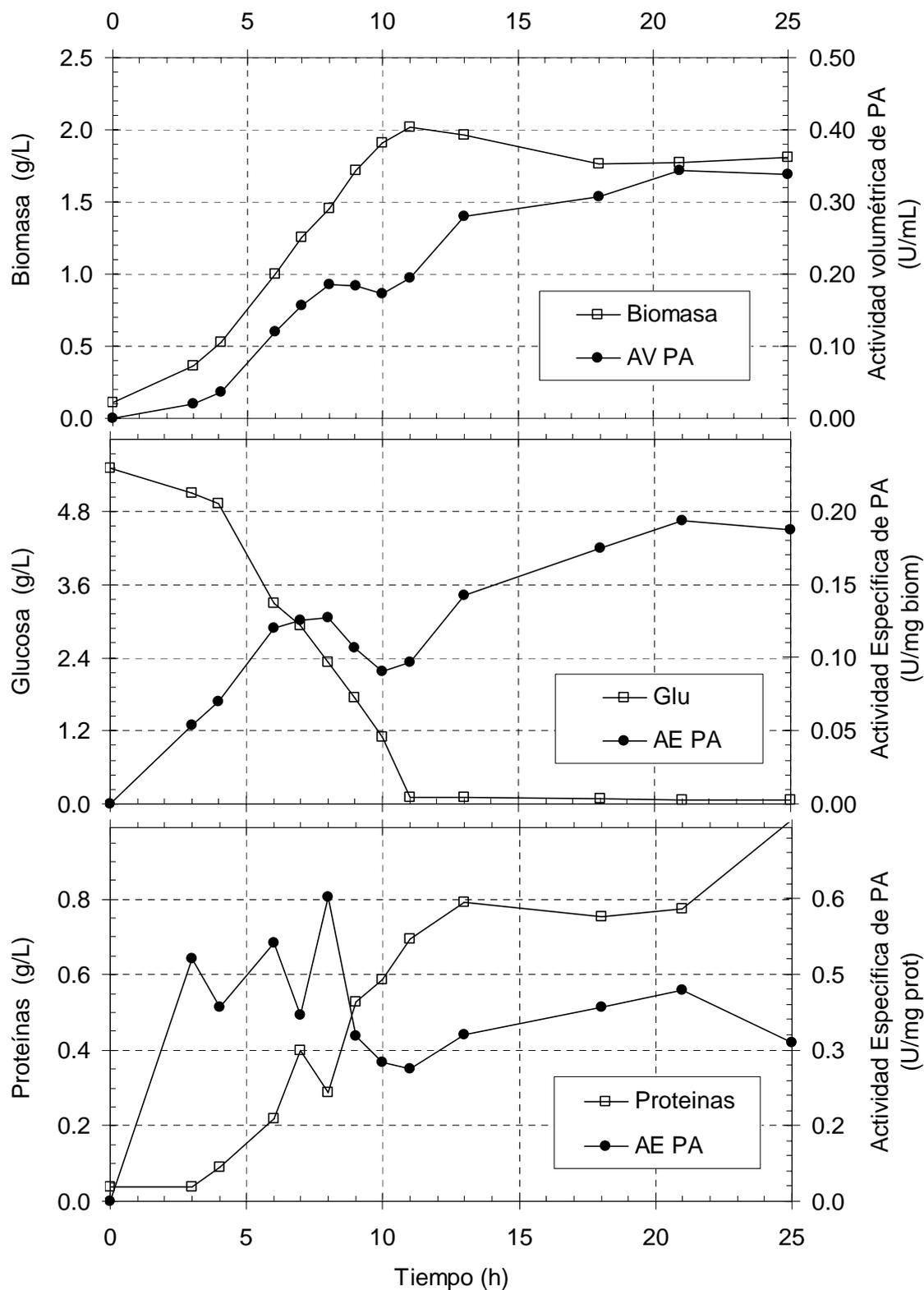


Figura C-2. Cinética de crecimiento y producción de PA de un cultivo a 40% de OD.

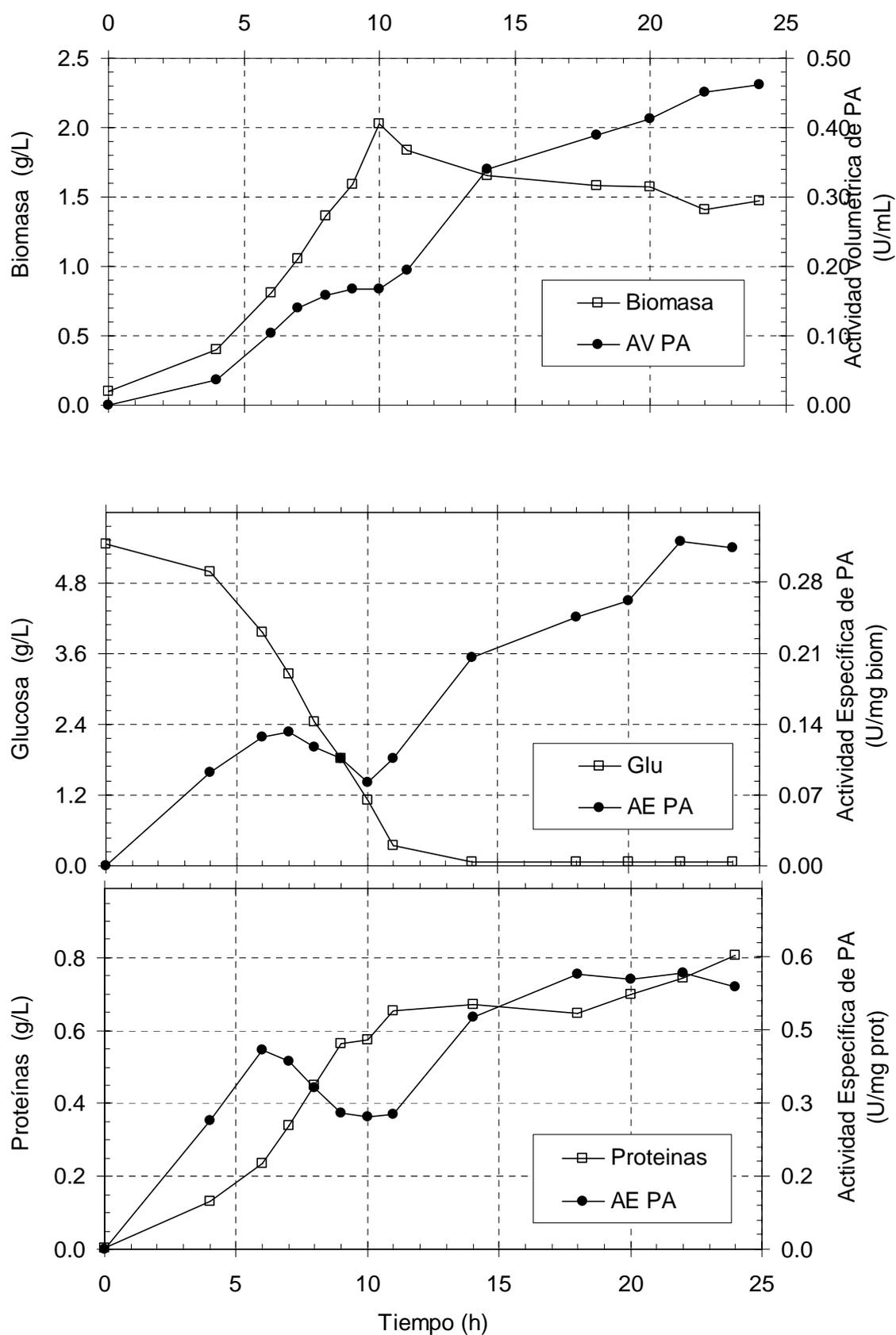


Figura C-3. Cinética de crecimiento y producción de PA de un cultivo a 3% de OD.

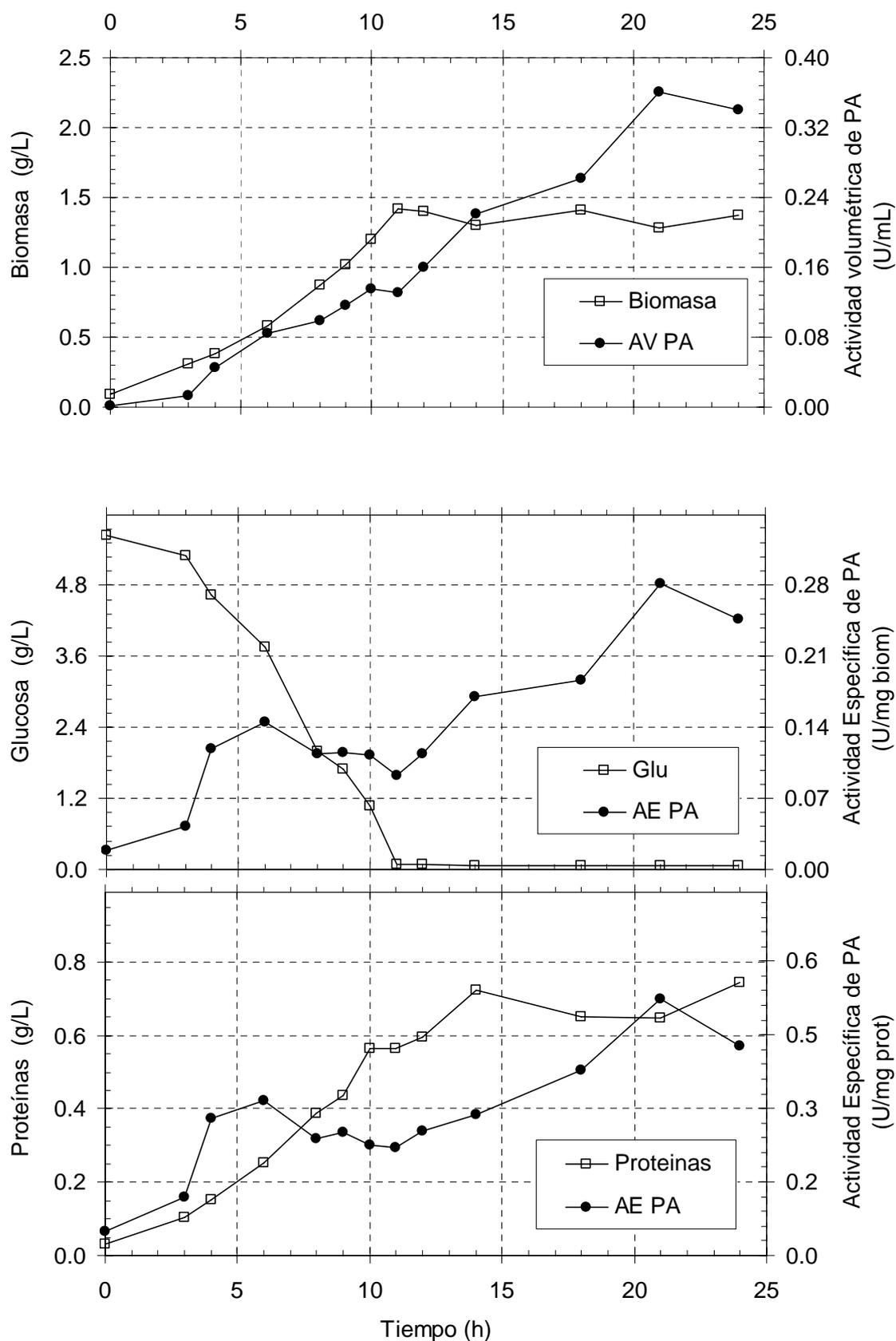
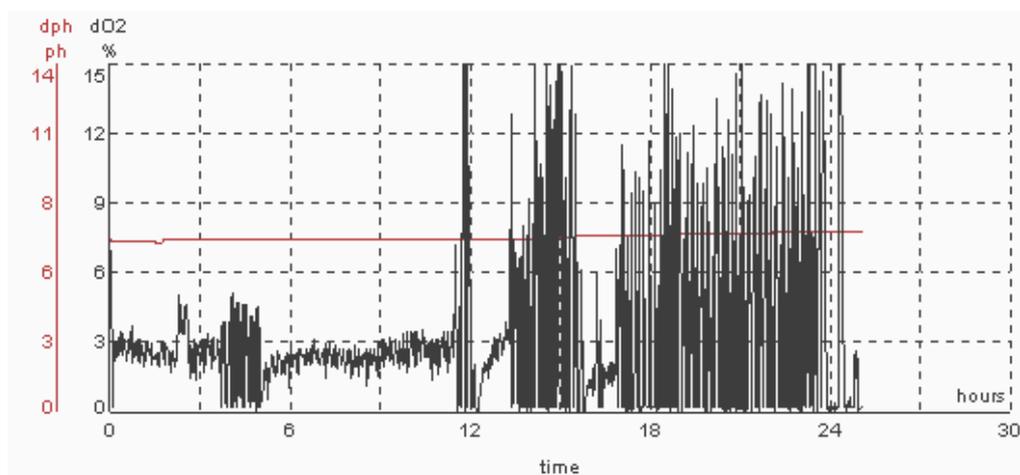
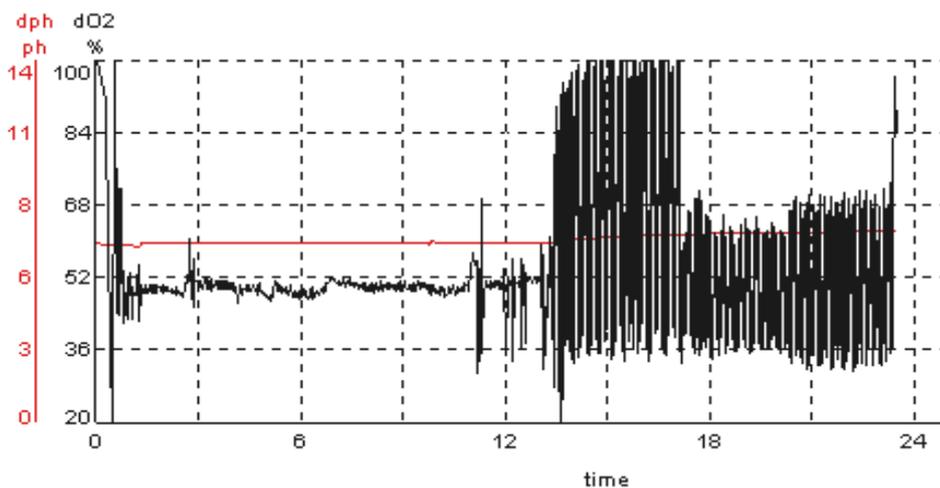


Figura C-4. Cinética de crecimiento y producción de PA de un cultivo a 0-8% de OD.

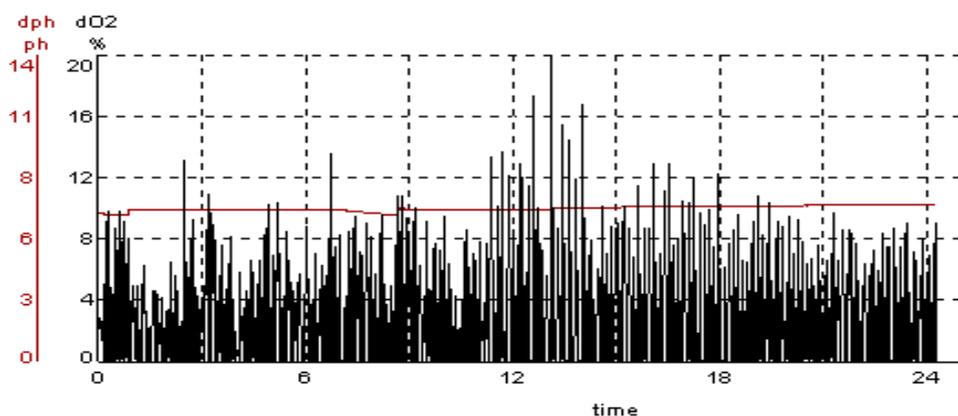
**D. Perfil del OD y pH durante las fermentaciones.**



**Figura D-1.** Perfil del OD y pH durante un cultivo a 3% de OD.

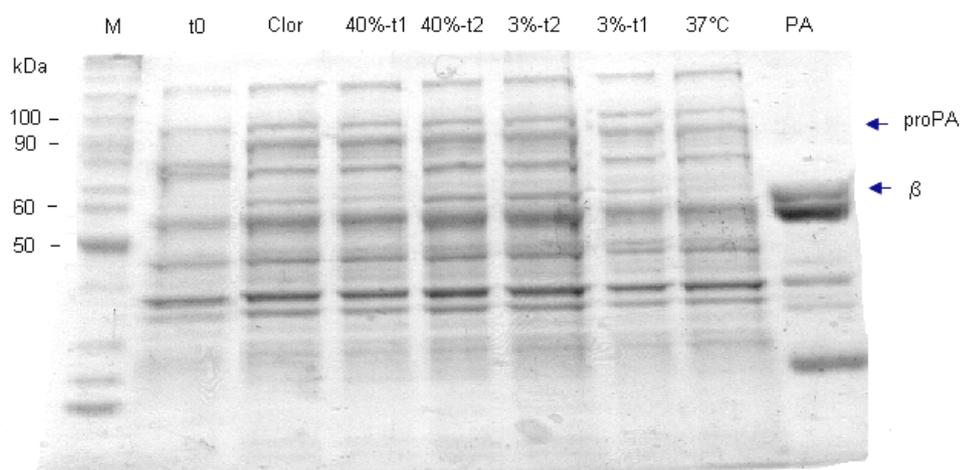


**Figura D-2.** Perfil del OD y pH durante un cultivo a 50 % de OD.

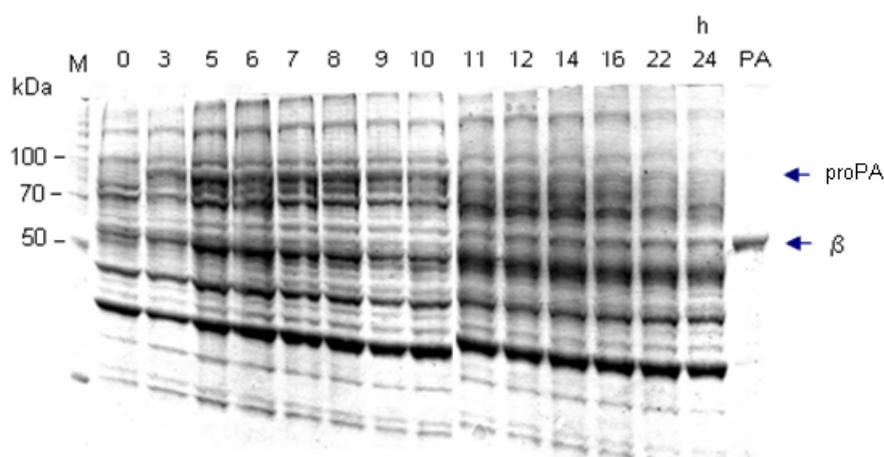


**Figura D-3.** Perfil del OD y pH durante un cultivo a 0-8% de OD.

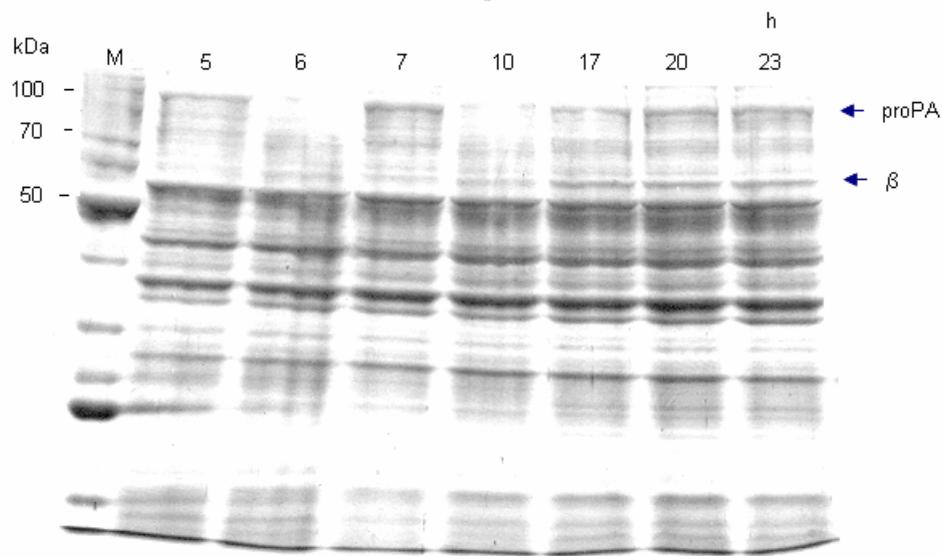
### Apéndice E. Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS.



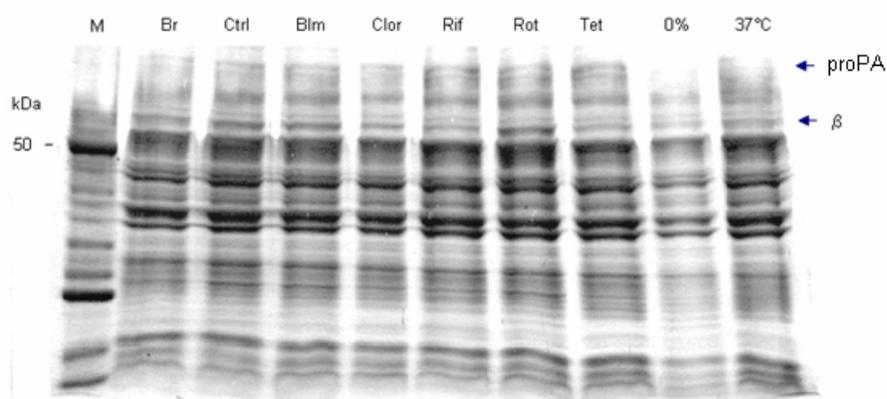
**Figura E-1.** Expresión electroforética en condiciones desnaturalizantes de la cepa recombinante JM101/pPA102 en algunos cultivos realizados en este trabajo. M: Marcador de peso molecular; t0: muestra tomada al tiempo cero; Clor: muestra con cloranfenicol; 40%-t1: muestra de un cultivo a 40% de OD tomada al final de la fase de crecimiento exponencial; 40%-t2: muestra de un cultivo a 40% de OD tomada al final de la etapa de maduración; 3%-t2: muestra de un cultivo a 3% de OD tomada al final de la etapa de maduración; 3%-t1: muestra de un cultivo a 3% de OD tomada al final de la fase de crecimiento exponencial; 37°C: muestra madurada a 37 °C; PA: penicilino acilasa pura (Sigma); proPA: precursor de PA; β: subunidad beta de la PA.



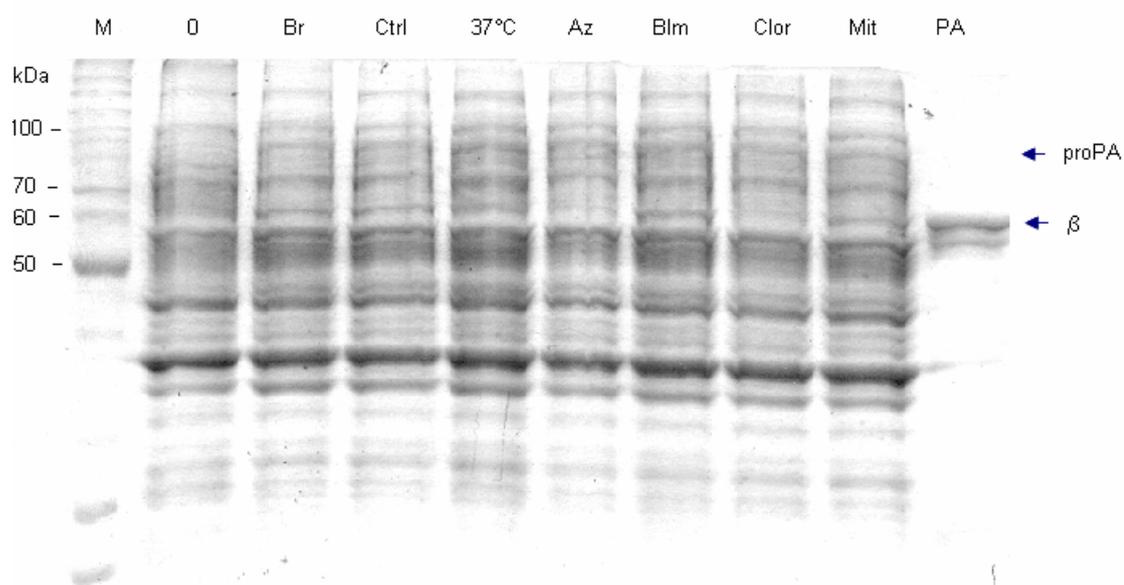
**Figura E-2.** Maduración del precursor de la PA en un cultivo con glucosa e IPTG (50 μM) a 3% de OD. SDS:PAGE (4-10/12%). El número sobre cada carril indica la hora (h) en que se tomó la muestra del cultivo celular; PA: Penicilino acilasa pura (Sigma); proPA: precursor de PA; β: subunidad beta de la PA; M: Marcador de peso molecular.



**Figura E-3.** Maduración del precursor de la PA en un cultivo con glucosa e IPTG ( $50 \mu\text{M}$ ) a 50% de OD. SDS:PAGE (4-10/12%). El número sobre cada carril indica la hora (h) en que se tomó la muestra del cultivo celular; PA: Penicilino acilasa pura (Sigma); proPA: precursor de PA;  $\beta$ : subunidad beta de la PA; M: Marcador de peso molecular.



**Figura E-4.** Maduración del precursor de la PA ( $28^\circ\text{C}$  y 180 rpm) en un cultivo con glucosa e IPTG ( $50 \mu\text{M}$ ) a 3% de OD. SDS:PAGE (4-10/12%). M: Marcador de peso molecular; Br: muestra del bioreactor tomada al final de la etapa de maduración; Ctrl: muestra en matrás (control) sin inhibidor; Blm: muestra madurada con bleomicina; Clor: muestra madurada con cloranfenicol; Rif : muestra madurada con rifampicina; Rot: muestra madurada con rotenona; Tet: muestra madurada con tetraciclina; 0%: muestra madurada a 0% de OD;  $37^\circ\text{C}$ : muestra madurada a  $37^\circ\text{C}$ ; proPA: precursor de PA;  $\beta$ : subunidad beta de la PA.



**Figura E-5.** Maduración del precursor de la PA (28°C y 180 rpm) en un cultivo con glucosa e IPTG (50  $\mu$ M) a 3% de OD. SDS:PAGE (4-10/12%). M: Marcador de peso molecular; 0: muestra tomada al tiempo cero del cultivo; Br: muestra del bioreactor tomada al final de la etapa de maduración; Ctrl: muestra en matr az (control) sin inhibidor; 37°C: muestra madurada a 37°C; Az: muestra madurada con azida de sodio; Blm: muestra madurada con bleomicina; Clor: muestra madurada con cloranfenicol; Mit : muestra madurada con mitomicina; PA: penicilino acilasa pura (Sigma); proPA: precursor de PA;  $\beta$ : subunidad beta de la PA.