



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Producción de Penicilino Acilasa en E. Coli  
Recombinante a Partir de Suero de Leche Bovino**

Tesis que presenta

**Dulce María Rivera Pastrana**

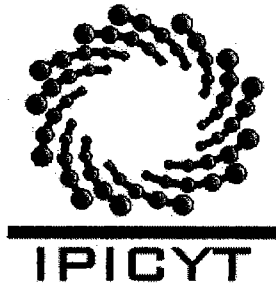
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Antonio de León Rodríguez**

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



# 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 013 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 14 días del mes de octubre del año 2005, se reunió a las 18:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Jorge Alberto Ramírez Téllez</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</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.

**Dulce María Rivera Pastrana**

sobre la Tesis intitulada:

*Producción de Penicilino Acilasa en E. Coli Recombinante a Partir de Suero de Leche Bovino*

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 19:40 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 14 días del mes octubre de 2005.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

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



San Luis Potosí, S.L.P. a 09 de Septiembre del 2005

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.  
Coordinador Académico de la  
División de Biología Molecular.  
IPICYT

PRESENTE.

Por medio de la presente le informamos que, después de haber revisado el trabajo de Tesis de Maestría de la estudiante Dulce María Rivera Pastrana, no encontramos inconveniente alguno para que pueda llevarse a cabo el Examen de Grado ante un jurado.

Atentamente,

**Comité Tutorial**

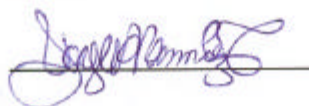
Dr. Antonio De León Rodríguez.  
Prof. Investigador de la División de Biología Molecular.  
IPICYT



Dr. Elías Razo Flores.  
Jefe de la División de Ingeniería Ambiental y  
Manejo de Recursos Naturales Renovables, IPICYT.



Dr. Jorge Alberto Ramírez Téllez.  
Catedrático de la Lic. en Ingeniería en Alimentos.  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la asesoría 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) a través del financiamiento de investigación básica 39639/A-1(2003-2006). De manera personal se contó con la beca 185800 del CONACyT.

# CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE ECUACIONES	v
NOMENCLATURA	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Tratamiento del suero de leche	1
1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones	2
1.3. Fermentaciones de suero de leche con organismos genéticamente modificados	5
1.4. Penicilino Acilasa como modelo de estudio	7
1.4.1. Penicilino Acilasa	7
1.4.2. Acción catalítica de la Penicilino Acilasa	7
1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en <i>E. coli</i> .	8
1.5. Efecto de las condiciones del proceso en la producción de penicilino acilasa en <i>E.coli</i> recombinante	9
1.6. Metabolismo de lactosa	10
1.7. Operón <i>lac</i>	11
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	12
2.1. Cultivo tipo lote	12
2.2. Velocidad específica de crecimiento	12
2.3. Definición de rendimiento	13
2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato	13
2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa	14
3. OBJETIVOS	15

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. Sistema de Fermentación	16
4.2. Cepas Bacterianas	18
4.3. Medios de cultivo	18
4.3.1. Medio mínimo M9	18
4.4. Inóculos	19
4.5. Conservación de las cepas	19
4.6. Vector de expresión de PA (pPA102) en <i>E.coli</i>	20
4.7. Aislamiento del plásmido pPA102	20
4.8. Transformación de la cepa de expresión	20
4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA.	21
4.10. Estrategia Experimental	21
4.11. Diseño experimental	23
4.12. Métodos analíticos	24
4.12.1. Tratamiento de las muestras	24
4.12.2. Determinación de concentración celular	24
4.12.3. Determinación de lactosa	24
4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA	25
4.12.5. Determinación de proteína total	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo	28
5.2. Selección de la cepa de expresión	28
5.3. Selección de clona sobreproductora de PA	30
5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos	31
5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental	34
5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA	37
5.7. Eficiencia del suero de leche en la expresión de enzimas recombinates en <i>E. coli</i>	38

5.8. Efecto de la velocidad específica de crecimiento y OD en la producción de PA	38
5.9. Análisis de varianza	40
5.9.1. ANOVA del rendimiento $Y_{P/X}$	40
5.9.2. ANOVA del rendimiento $Y_{X/S}$	42
5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células)	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7. REFERENCIAS	48
APÉNDICES	55
Apéndice A. Preparación de soluciones	55
Apéndice B. Curvas Estándar	57
B.1. Curva estándar para la determinación de la concentración celular	57
B.2. Curva estándar para la determinación de lactosa	58
B.3. Curva estándar para la determinación de actividad enzimática de PA	59
B.4. Curva estándar para la determinación de proteína total	60
Apéndice C. Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor	61
Apéndice D. Cinéticas de los cultivos en reactor	64

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Fig. 1.1. Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA</b>	<b>7</b>
<b>Fig. 1.2. Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA</b>	<b>8</b>
<b>Fig. 1.3. Reacción de degradación del disacárido lactosa</b>	<b>10</b>
<b>Fig. 1.4. Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón lac por el represor I</b>	<b>11</b>
<b>Fig. 4.1. Sistema de fermentación</b>	<b>17</b>
<b>Fig. 4.2. Representación del vector de expresión pPA102</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 4.3 Estrategia experimental</b>	<b>22</b>
<b>Fig. 5.1. Curva de crecimiento de la cepa W3110/pPA102</b>	<b>29</b>
<b>Fig. 5.2. Gel de electroforesis de ADN plasmídico de posibles transformantes</b>	<b>30</b>
<b>Fig. 5.3. Actividad específica máxima en las clonas 21,23,24 y 14 de W3110/pPA102</b>	<b>31</b>
<b>Fig. 5.4. Valores máximos promedio de actividad en diferentes fuentes de carbono</b>	<b>33</b>
<b>Fig. 5.5. Cinética de cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD</b>	<b>35</b>
<b>Fig. 5.6. Superficie de respuesta del rendimiento de producto por biomasa</b>	<b>41</b>
<b>Fig. 5.7. Superficie de respuesta del rendimiento de sustrato por biomasa</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 5.8. Superficie de respuesta de la actividad enzimática específica de PA</b>	<b>45</b>
<b>Fig. B.1. Curva estándar de concentración celular</b>	<b>57</b>
<b>Fig. B.2. Curva estándar de concentración de lactosa</b>	<b>58</b>
<b>Fig. B.3. Curva estándar de actividad enzimática</b>	<b>59</b>
<b>Fig. B.4. Curva estándar de proteína total</b>	<b>60</b>



<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
Tabla 1.1. Fermentaciones donde se ha utilizado el SLB	4
Tabla 1.2. Fermentaciones a partir de SLB con organismos genéticamente modificados	6
Tabla 4.1. Composición del medio mínimo M9	18
Tabla 4.2. Composición del medio LB kanamicina	19
Tabla 4.3. Variables y niveles del diseño experimental	23
Tabla 5.1. Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo	28
Tabla 5.2. Genotipo de la cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	29
Tabla 5.3. Actividad máxima promedio de PA con diferente fuente de carbono	33
Tabla 5.4. Resumen de rendimientos y actividad de PA obtenidos en los experimentos en reactor	39
Tabla 5.5. Análisis de varianza de $Y_{P/X}$	40
Tabla 5.6. Análisis de varianza de $Y_{X/S}$	42
Tabla 5.7. Análisis de varianza de actividad específica	44
Tabla B.1. Elaboración de curva estándar para la determinación de biomasa	57
Tabla B.2. Elaboración de curva estándar para la determinación de lactosa	58
Tabla B.3. Elaboración de curva estándar de actividad enzimática de PA	59
Tabla B.4. Elaboración de curva estándar para la determinación de proteína	60
<b>INDICE DE ECUACIONES</b>	
(2-1) Ecuación de velocidad de crecimiento	12
(2-2) Ecuación de rendimiento biomasa por sustrato	13
(2-3) Ecuación de rendimiento producto por biomasa	14
(4-1) Cálculo de actividad enzimática volumétrica de PA	26
(5-1) Ecuación de mejor ajuste para $Y_{P/X}$	40
(5-2) Ecuación de mejor ajuste para $Y_{X/S}$	42
(5-3) Ecuación de mejor ajuste para actividad específica de PA (U/mg células)	44

## NOMENCLATURA

<b>6-APA</b>	<b>Ácido 6-aminopenicilánico</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>AFA</b>	<b>Ácido fenilacético</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina de suero bovina</b>
<b>DQO</b>	<b>Demanda química de oxígeno</b>
<b>DNS</b>	<b>Ácido dinitrosalicílico</b>
<b><i>Gal</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de cepa capaz de metabolizar galactosa</b>
<b>I</b>	<b>Represor del operón <i>lac</i></b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropil tio-β-D-galactopiranosido</b>
<b>KB</b>	<b>Kilopares de bases de ADN</b>
<b>K<sub>m</sub></b>	<b>Kanamicina</b>
<b>LB</b>	<b>Medio de cultivo ampliamente utilizado</b>
<b><i>Lac</i></b>	<b>operón o conjunto de genes para el metabolismo de lactosa</b>
<b><i>Lac</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de una cepa capaz de metabolizar lactosa</b>
<b>M9</b>	<b>Medio mínimo de cultivo frecuentemente utilizado</b>
<b>OD</b>	<b>Oxígeno disuelto</b>
<b>PA</b>	<b>Penicilino acilasa</b>
<b><i>pac</i></b>	<b>Gen que codifica a la enzima penicilino acilasa</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer de fosfatos</b>
<b>PDAB</b>	<b>p-dimetilaminobenzaldehido</b>
<b>pPA102</b>	<b>Plásmido para la expresión de penicilino acilasa</b>
<b>SLB</b>	<b>Suero de leche bovino</b>
<b>sppac</b>	<b>Péptido señal de penicilino acilasa</b>
<b>X</b>	<b>Concentración celular o biomasa</b>
<b>Y<sub>P/S</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por sustrato</b>
<b>Y<sub>P/X</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por biomasa</b>
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	<b>Rendimiento de biomasa por sustrato</b>
<b>μ</b>	<b>Velocidad específica de crecimiento</b>

## RESUMEN

El suero de leche bovino (SLB) es un residuo industrial rico en lactosa, proteínas y minerales, debido a su alta carga orgánica se considera un efluente contaminante de cuerpos de agua.

Actualmente se han propuesto diversas alternativas para el tratamiento del SLB para reducir su potencial contaminante mediante la separación de proteínas y evaporación para obtener concentrados empleados como suplementos en alimentación humana y animal. Otra alternativa consiste en utilizar el suero de leche como sustrato en fermentaciones para producir etanol, ácidos orgánicos, enzimas, polímeros etc.

Las herramientas de ingeniería genética y la biotecnología permiten modificar microorganismos para su aplicación en la producción de metabolitos de interés comercial con alto valor agregado. El promotor *lac* es uno de los más utilizados para el control de expresión de productos génicos en bacterias y se induce por la presencia de lactosa o por el análogo sintético isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) el cual resulta costoso en procesos de escala industrial. La enzima penicilino acilasa se seleccionó como modelo de estudio por que se emplea a gran escala en la producción de antibióticos de nueva generación como las penicilinas semisintéticas.

Este trabajo propone la utilización del suero de leche como sustrato e inductor de la producción de penicilino acilasa como una alternativa de uso. Se seleccionó la cepa *E.coli* W3110/pPA102 para la expresión de la enzima recombinante en un medio a base de suero de leche. Se planteó un diseño experimental de bloques completos considerando dos factores concentración de suero y % oxígeno disuelto (OD) a tres niveles para evaluar la eficiencia del suero de leche (SLB) como sustrato en la producción de la enzima. Los experimentos se realizaron en un reactor de 1 L tipo lote instrumentado a 29 °C y pH 7.0. Se determinaron las condiciones óptimas para alcanzar el máximo de producción de PA (0.613 U/mg células) a 5 g/L de concentración inicial de SLB y 3 % OD de acuerdo con el análisis estadístico. Se observó inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones de sustrato (SLB). Se demostró que el SLB es utilizado de manera eficiente como sustrato e inductor en la producción de PA.

Palabras clave: proteínas recombinantes, optimización, biorreactor.

## ABSTRACT

Bovine milk whey (BMW) is an industrial disposal rich in lactose, proteins and minerals. Due to its high organic content it is considered a contaminant effluent of water bodies. Recently, several alternatives have been proposed for the treatment of BMW conducted to reduce its pollutant potential by separating proteins or by evaporation to obtain concentrates used as nutritional supplements in human and animal diets. Another alternative consist on using bovine whey as substrate in fermentations to produce ethanol, organic acids, enzymes, polymers etc.

Genetic engineering techniques and biotechnology allows modifying microorganisms for its application on the production of commercial interesting metabolites with additional market value. The *lac* promoter is one of the most employed to control the expression of gene products in bacteria and it is induced by the presence of lactose or the synthetic analogue isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) which results expensive in processes at industrial scale. The penicillin acylase (PA) enzyme has been selected as study model because it is employed on the production of new generation antibiotics at large scale such as semisynthetic penicillins.

This work suggests the application of bovine whey as substrate and inducer in the production of penicillin acylase as an alternative of use. The *E. coli* strain W3110/pPA102 was selected for the expression of the recombinant enzyme on whey based medium. A complete blocks experimental design was proposed considering two factors (BMW concentration and dissolved oxygen) at three levels to evaluate bovine whey efficiency as substrate on the production of the recombinant enzyme. The experiments were carried out in a 1L instrumented batch reactor at 29 ° C and 7.0 pH. A cellular growth inhibition effect was observed at high BMW concentrations. The optimal conditions to achieve a maximum of PA production (0.613 U/mg cells) were 5 g/L of initial concentration of BMW and 3 % oxygen concentration according to the statistical analysis. It was proved that the BMW works efficiently as substrate and inducer on the PA production and that limited oxygen conditions improve the enzyme activity.

Keywords: recombinant proteins, optimization, bioreactor

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Tratamiento del suero de leche**

El suero de leche bovino (SLB) que se produce como residuo durante elaboración industrial del queso representa del 80 al 90 % del volumen total de leche procesada y su descarga al medio ambiente se convierte en un problema de contaminación del subsuelo y mantos acuíferos debido a su alta carga orgánica (32000 mg/L DQO) susceptible a fermentación por microorganismos patógenos y ubicuos (Marshall, 1982). A pesar de los numerosos esfuerzos para encontrar aplicaciones del SLB en cualquiera de sus formas, se calcula que entre un 40 y un 50 % del total de SLB producido se desecha y el resto se emplea principalmente en suplementos de alimentación animal y humana.

En los últimos años se ha propuesto la reutilización de desechos industriales orgánicos que se generan en gran volumen y de manera continua, como el suero de leche. Para resolver el problema de contaminación generado por el SLB se ha empleado tratamientos biológicos y químicos para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) antes de desechar el suero (Fang, 1991; Rossano y col. 2001). Fang (1991), propuso un proceso de tratamiento del SLB empleando lodos activados y procesos anaerobios logrando disminuir la DQO en un 99 %.

Ghaly y Kamal (2004), emplearon el suero de leche como sustrato para la producción de proteína unicelular. Para esto utilizaron la levadura *Kluyveromyces fragilis* logrando reducir la DQO del medio en un 43 % y el contenido de lactosa en un 99 %. Al remover la biomasa por ultrafiltración la DQO se redujo en un 98 % del valor inicial cuantificado en el suero.

## 1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones

Se han reportado trabajos que utilizan el SLB como sustrato de fermentaciones para la producción de etanol, por *S. cerevisie* y *K. fragilis* con buen rendimiento de producción (0.46 g producto/g lactosa) (Varela y col. 1992, Porro y col. 1992, y Terrel y col.1984).

El-Samragy y col (1996), obtuvieron ácido cítrico a partir de suero de leche adicionado con metanol y sal, con un porcentaje de conversión del 28.24 % después de 9 días de fermentación con dos cepas de *Aspergillus niger*. Ambas cepas mostraron buena capacidad para convertir lactosa de suero de leche en ácido cítrico.

Huang y Yang (1998) desarrollaron un proceso de producción de ácido acético a partir de la fermentación de SLB suplementado con hidrolizado de caseína, hidrolizado de levadura y licor de maíz, en células inmovilizadas de *Clostridium formicoaceticum* y *Lactococcus lactis* en un reactor de columna empacado.

Roukas, (1999) desarrolló un proceso de producción del polisacárido pululana en la fermentación de SLB desproteinizado con *Aurobasidium pullulans*. Alcanzando el máximo en concentración del polisacárido (11 g/L) y en rendimiento (47.2 %) al hidrolizar la lactosa del suero desproteinizado por la vía enzimática.

Lee y col. (2000a) obtuvieron ácido succínico en fermentaciones con *Anaerobiospirillum succiniciproducens* tipo lote y continuo de suero de leche adicionado con extracto de levadura y peptona con un rendimiento de producción máximo del 96 % y una productividad de 0.46 g/L h.

El-Holi y Al-Delaimy (2003) obtuvieron ácido cítrico de la fermentación con *Aspergillus niger* ATCC9642 a partir de suero de leche suplementado con diferentes fuentes de carbono, vitaminas, fosfatos y metanol. En una fermentación de 20 días lograron la máxima producción de ácido cítrico (106.5 g/L) con el medio de suero de leche suplementado con 15 % p/v de sacarosa y 1 % de metanol.

Qureshi y Maddox (2003), emplearon como medio de cultivo un filtrado de suero de leche suplementado con lactosa para la producción de acetona-butanol-etanol (ABE) con una cepa de *Clostridium acetobutylicum* en un reactor tipo lote acoplado a una remoción de ABE por perstracción. Reportaron un rendimiento bajo de consumo de lactosa (0.31g producto/g lactosa) ya que no se consumió por completo en la fermentación y la producción de ABE alcanzó un máximo de 87.2 g/L.

Ramírez y col. (2003) demostraron que la levadura *Kluyveromyces lactis* fue capaz de producir la enzima  $\beta$ galactosidasa empleando como medio de cultivo suero de leche desproteínizado por termocoagulación. Optimizaron condiciones de temperatura, pH, velocidad de agitación y tiempo de fermentación del proceso por el método de superficie de respuesta y un diseño de experimento ortogonal central compuesto. La producción máxima de enzima alcanzada a las condiciones óptimas fue de 8.3 U /mL.

El suero de leche también se ha empleado como sustrato en la producción simultánea de nisina y ácido láctico por *Lactococcus lactis*. Liu y col. (2004) determinaron que los nutrientes extracto de levadura,  $MgSO_4$  y  $KH_2PO_4$  afectaban significativamente la formación de ambos compuestos. Al optimizar estos dos factores con un modelo polinomial de segundo orden obtuvieron el máximo de producción de nisina (92.9 mg/L) y ácido láctico (19.3 g/L).

En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los productos de fermentación de suero de leche por diferentes microorganismos entre los cuales predominan alcoholes y ácidos orgánicos ya que tienen una aplicación directa como producto.

**Tabla 1.1.** Ejemplo de fermentaciones donde se utiliza el SLB como sustrato.

<b>Compuesto producido</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
2,3 butilenglicol	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Barret y col. (1983)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Terrel y col. (1984)
Etanol	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Valera y col. (1992)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Porro y col. (1992)
Acido propiónico	<i>Propionibacterium sp.</i>	Lewis y Yang (1992)
Galactiol	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Izumori y col. (1994)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Samragy y col. (1996)
Acido acético	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	Huang y Yang (1998)
Acido succínico	<i>A .succiniciproducens</i>	Lee y col. (2000a)
1,2 propanediol	<i>T .themosaccharolyticum</i>	Altaras y col. (2001)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Holi y col. (2003)
$\beta$ -galactosidasa	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ramírez y col. (2003)
Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Qureshi y Maddox (2003)
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)
Ácido láctico	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)



### **1.3 Fermentaciones de suero de leche con microorganismos genéticamente modificados**

Existen pocos trabajos donde se utiliza suero de leche como fuente de carbono para producir compuestos en *E.coli*. Konicek y col. (1994), estudiaron la producción del polisacárido extracelular goma xantana por una cepa de *X. campestris* recombinante capaz de metabolizar lactosa (*lac*<sup>+</sup>) en la fermentación de un medio con suero de leche. El rendimiento de producción promedio del polisacárido (1.4 %) de la fermentación del suero de leche resultó comparable al obtenido en un medio definido con lactosa .

Kumar y col. (1992) desarrollaron un sistema de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* en *Sacharomyces cerevisiae* empleando como medio de producción suero de leche filtrado donde el 40 % de la actividad de la enzima total fue secretada al medio por la levadura y el producto resultó altamente glicosilado.

Compagno y col. (1995) obtuvieron etanol y biomasa de levadura en un proceso biotecnológico de fermentación de suero de leche y almidón con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con un plásmido episomal concluyendo que la composición del medio modulaba la productividad del sistema.

Maullu y col. (1999) demostraron que era posible producir lisozima humana recombinante en una cepa genéticamente modificada de *K. lactis* cultivada en suero de leche de la producción de queso cottage con un alto nivel de producción de la proteína heteróloga (125  $\mu$ g/mL). Además los experimentos realizados a escala laboratorio mostraron una eficiencia de producción de la proteína recombinante aún mayor a la reportada con un medio de cultivo sintético o definido.

Leite y col. (2000) utilizaron una cepa de *E. coli* recombinante para la producción de etanol a partir de suero de leche con un rendimiento menor al esperado. Observaron que la adición de metales en trazas, extracto de levadura y componentes de medio LB mejoraron la producción notablemente y se redujo el tiempo de fermentación.

Beom y col. (2000) y Anh y col. (2000) fueron capaces de obtener el polímero biodegradable polihidroxibutirato (PHB), a partir de suero de leche empleando cepas de *E. coli* genéticamente modificadas. Los autores encontraron que la limitación de oxígeno en el proceso de fermentación incrementa la producción de PHB en cultivos de lote alimentado.

Viitanen y col. (2003) desarrollaron un sistema de expresión en *E.coli* recombinante de las enzimas alcohol deshidrogenasa y murimidasa de *Lactobacillus* empleando suero de leche desproteinizado por ultrafiltración como sustrato. Demostraron la eficiencia de la lactosa del suero de leche como sustrato e inductor de la expresión de ambas enzimas en *E.coli* recombinante bajo el control del promotor *lac*. También estudiaron la expresión de ambas enzimas en presencia de diferente fuente de carbono encontrando que tanto en los cultivos con lactosa y lactosa con glicerol, la producción de las enzimas recombinantes fue favorecida.

En los trabajos mas recientes se emplean microorganismos genéticamente modificados como sistema para aumentar la producción de una amplia gama de metabolitos de interés comercial como es el caso de enzimas, alcoholes y polímeros biodegradables entre otros (Tabla 1.2).

**Tabla.1.2.** Productos obtenidos con microorganismos recombinantes en fermentaciones utilizando suero de leche como sustrato. \*Se utilizó suero de leche como inductor y glucosa como sustrato.

Producto	Microorganismo recombinante	Referencia
Goma xantana	<i>Xanthomona campestris</i>	Konicek y col. (1994)
$\beta$ -galactosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kumar y col. (1992)
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Compagno y col. (1995)
Lisozima humana	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Maullu y col. (1999)
Etanol	<i>Escherichia coli</i>	Leite y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Ahn y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Beom Soo K. (2000)
Alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)
Muramidasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)

## 1.4. Penicilino Acilasa como Modelo de Estudio

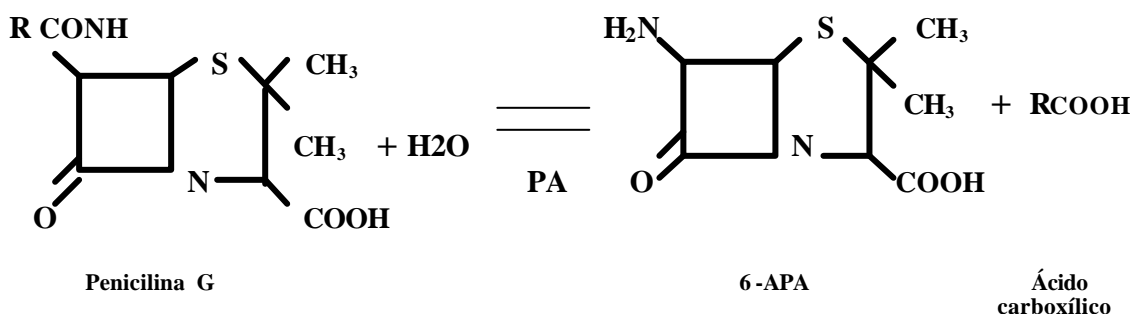
### 1.4.1. Penicilino Acilasa

La enzima penicilino acilasa (PA) o penicilino amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.11) se encuentra distribuida ampliamente en los microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras, y hongos filamentosos (Duggleby, 1995). Es utilizada principalmente a escala industrial para la producción del ácido 6-aminopenicilánico, la materia prima para la síntesis de penicilinas semi-sintéticas (Terreni y col. 2001; Youshko y col. 2001).

Las penicilinas semisintéticas surgen de modificaciones del compuesto ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que dan lugar a cambios en la cadena lateral de la penicilina al ser sintetizada, esto sirve como protección al ataque de las enzimas  $\beta$ -lactamasas que han desarrollado algunos microorganismos como resistencia a los antibióticos (Valle y col. 1991; Ospina y col. 1992). La PA también se utiliza en la producción de agentes antiplaquetarios y en la activación de profármacos contra el cáncer (Vrudhula y col. 1993; Lu y col. 1999). No está claro la función *in vivo* de PA de *E. coli*, sin embargo se cree que la enzima puede estar involucrada en la asimilación de compuestos aromáticos como fuente de carbono en el modo libre de vida de los microorganismos (Burlingame y col. 1983).

### 1.4.2 Acción catalítica de la Penicilino Acilasa

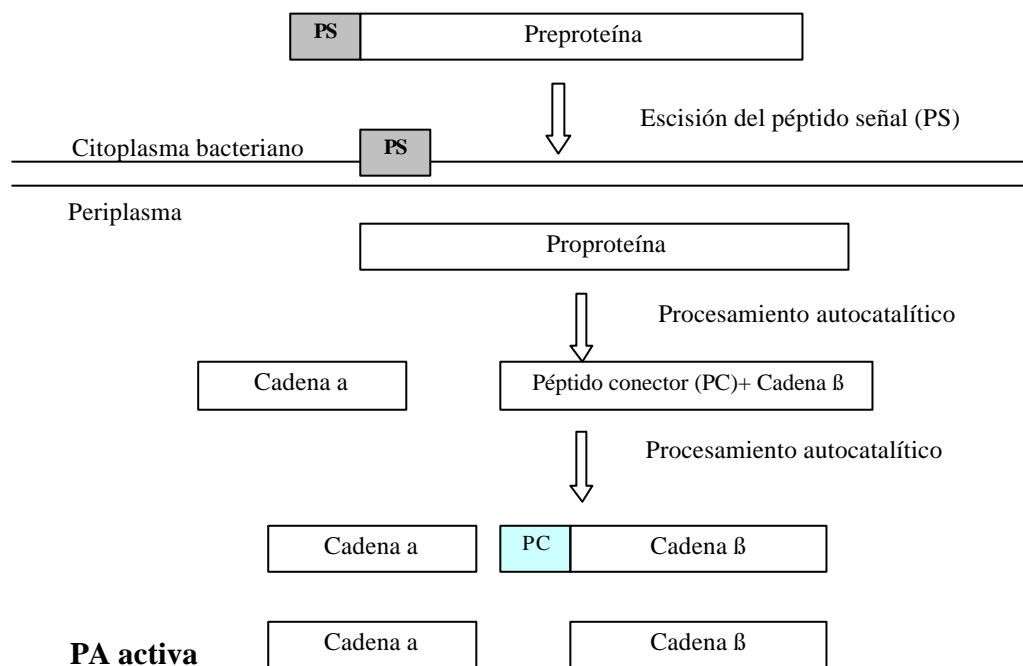
El substrato (penicilina G) es hidrolizado por la penicilino acilasa en el enlace amida para formar ácido 6-aminopenicilico y ácido fenilacético (Fig.1.1).



**Fig.1.1.** Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA.

### 1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en *E. coli*

La PA pertenece a la familia de las N terminal nucleofílico (Ntn)-hidrolasas donde todos los miembros de esta familia comparten una estructura tridimensional similar y llevan a cabo un autoprosesamiento proteolítico. El procesamiento postraduccional de la PA inicia con el transporte de la preproteína de 95 kDa al espacio periplásmico al efectuar una translocación se elimina el péptido señal dando lugar a lo que se conoce como pro-proteína la cual sufre un procesamiento autocatalítico que separa la cadena  $\alpha$  (209 a.a.) de la cadena  $\beta$  (566 a.a.) unida a un péptido conector (54 a.a.) el cual participa en el plegamiento final de las cadenas (Sizmann y col., 1990) y también es escindido por un corte auto-proteolítico. Ambas cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$  ahora libres se unen para formar la enzima activa (Duggleby y col. 1995). La enzima madura de *E.coli* es un heterodímero periplásmico de 80kDa.



**Fig.1.2.** Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA (Duggleby y col. 1995).

## **1.5 Efecto de las condiciones del proceso de producción de penicilina acilasa en *E.coli* recombinante**

La expresión del gen de PA en *E.coli* está regulada por diferentes factores como temperatura (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001; Yang y col.,1988), concentración de oxígeno (De León y col., 1996, 2003) la concentración de la fuente de carbono (Shömer y col., 1984) y en cepas nativas por la adición de ácido fenilacético como inductor (Robas y col., 1993).

La producción de PA es influenciada negativamente durante la etapa postraduccional por altas temperaturas de cultivo. A temperaturas por encima de los 37 ° C, el precursor de la enzima PA no puede ser procesado y tiende a formar cuerpos de inclusión dentro de la bacteria. La temperatura óptima para la expresión de la enzima se encuentra alrededor de los 22-29 ° C (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001).

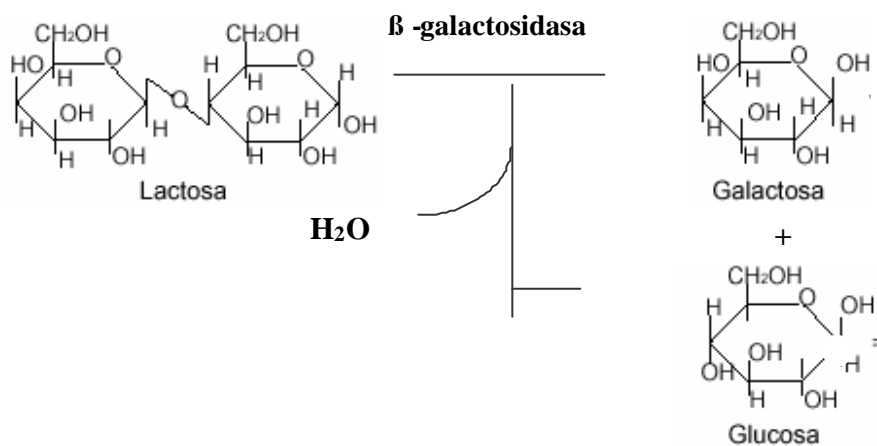
El efecto del oxígeno sobre la producción de enzimas recombinantes ha sido evaluado por varios autores. La limitación de oxígeno disminuye la velocidad específica de crecimiento en los cultivos pero favorece la producción y procesamiento de la enzima PA (Ramírez y col., 1994a, De León, 1996, De León y col., 2003). En condiciones no limitantes de oxígeno, el metabolismo de *E. coli* produce acetato por hidrólisis de piruvato, un efecto conocido como “*efecto Pasteur*” (Doelle y col., 1982).

La concentración de la fuente de carbono también afecta la velocidad de crecimiento en cultivos bacterianos. Se ha observado que una alta concentración de fuente de carbono en el medio de cultivo puede reprimir catabólicamente el crecimiento microbiano mientras que una concentración muy baja de sustrato puede también limitar el crecimiento de la bacteria y de la producción del metabolito de interés al emplear toda la fuente de carbono disponible para llevar a cabo sus funciones metabólicas básicas (Ramírez y col. 1994a).

## 1.6 Metabolismo de lactosa

La lactosa es degradada por la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, produciendo  $\beta$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-galactosa. Ésta enzima también puede catalizar la conversión de lactosa a alolactosa ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-6)-D-glucopiranososa) por transglucosilación, y puede hidrolizar alolactosa (Huber y col. 1980).

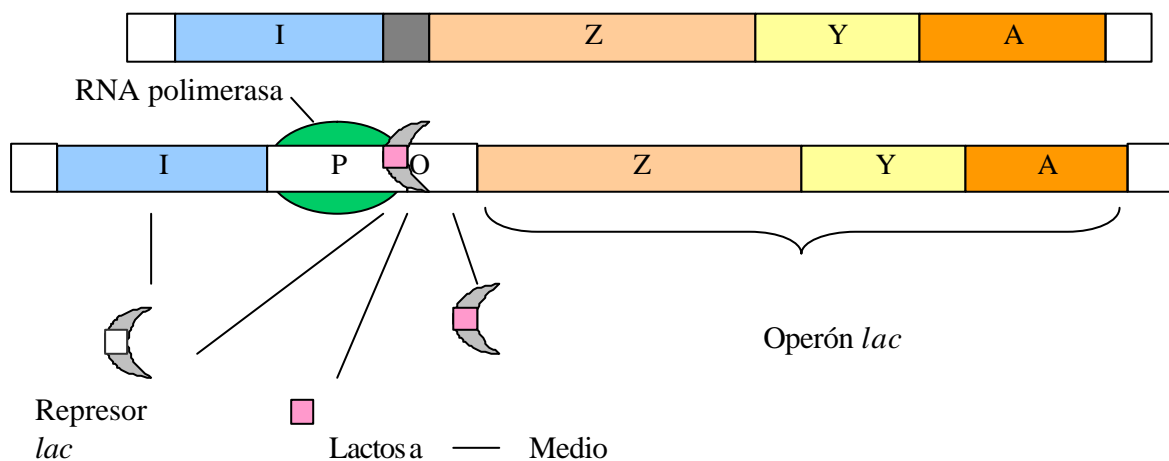
Las enzimas necesarias para metabolizar el disacárido lactosa son codificadas por el operón *lac* que incluye tres genes Z, Y y A. El gen *lac* Z codifica a  $\beta$ -galactosidasa, que escinde al disacárido en glucosa y galactosa. El gen *lac* Y codifica la enzima lactosa permeasa la cual se encarga del transporte de lactosa del medio hacia el interior de la célula. El gen *lac* A codifica a tiogalactósido transacetilasa una enzima cuya función aún no se conoce bien pero se cree que actúa como un mecanismo de protección contra la congestión metabólica por  $\beta$ -galactósidos no metabolizables y de potencial tóxico que pueden ser importados a la célula.



**Fig.1.3.** Reacción de degradación de la lactosa.

## 1.7 Operón *lac*

La síntesis de las tres enzimas del operón *lac* es inducida rápidamente cuando las células de *E. coli* se colocan en un medio con lactosa como única fuente de carbono y se reprime de igual manera cuando las células se transfieren a un medio sin lactosa. Por lo tanto los tres genes del operón *lac* son regulados coordinadamente (Fig. 1.4). La alolactosa es el inductor fisiológico de esta vía metabólica. Se ha demostrado que cuando la lactosa se añade a un cultivo o medio de crecimiento de *E. coli*, se alcanzan altos niveles de galactosa, glucosa y alolactosa dentro de las células y son rápidamente expulsados al medio (Huber y col. 1980). Algunas moléculas de estructura similar a la de la lactosa pueden inducir la expresión de los genes del operón *lac*, aunque no puedan ser hidrolizadas por la  $\beta$ -galactosidasa. Uno de estos inductores, el  $\beta$ -D-tiogalactósido de isopropilo (IPTG) puede difundirse hacia el interior de las células y debido a que no se metaboliza, su concentración permanece constante. Las moléculas de IPTG se unen a la proteína del represor I permitiendo la transcripción de  $\beta$ -galactosidasa y permeasa funcionales gracias a un aumento en la síntesis de mRNA de *lac* (Lodish y col. 2003). El disacárido lactosa se ha probado en procesos biotecnológicos como inductor de sistemas de expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor *lac* con una eficiencia comparable a la del inductor IPTG (Donovan y col. 1996).



**Fig.1.4.** Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón *lac* por el represor I.

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

### 2.1. Cultivo tipo Lote

Muchos de los procesos bioquímicos involucran el uso de reactores tipo lote para el crecimiento de poblaciones celulares. En este tipo de proceso después de que se inocula un medio líquido con células vivas, no se adiciona o se remueve fuente de carbono, excepto por algunos gases del medio de cultivo durante todo el transcurso del proceso. La concentración de nutrientes, células y productos cambia con el tiempo del cultivo.

### 2.2. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

En los procesos tipo lote, el crecimiento exponencial se alcanza después de una fase de retardo (lag) donde la célula se prepara para un crecimiento exponencial sintetizando metabolitos y duplicando su ADN para duplicarse. La velocidad de crecimiento en esta etapa se define como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{? X}{? t} \quad (2-1)$$

Donde:

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$X$  = biomasa (g/L).



## 2.3. DEFINICIÓN DE RENDIMIENTO

La razón entre la cantidad de células producidas o productos celulares y el sustrato consumido se denomina rendimiento (Y) y tiene un papel muy importante en el diseño y en la viabilidad económica de un proceso biotecnológico.

### 2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato

El crecimiento celular involucra el consumo de sustrato el cual proporciona energía y compuestos para la síntesis de componentes estructurales y funcionales de la célula. Este rendimiento es de utilidad como parámetro de eficiencia del sustrato en el crecimiento microbiano. Se denomina rendimiento aparente debido a que no se considera la conversión de sustrato para la energía de mantenimiento.

Se observa frecuentemente que el total de masa formada por crecimiento celular es proporcional a la masa de sustrato (fuente de carbono) utilizada (Bailey J.E., Ollis D.F., 1986).

El factor de rendimiento celular  $Y_{X/S}$  se define como la relación:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_F - X_i)}{(S_F - S_i)} \quad (2-2)$$

Donde:

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/L).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/L).

$S_F$  = Concentración final de sustrato (g/L).

$S_i$  = Concentración inicial de sustrato (g/L).

### 2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ )

El rendimiento de producto por concentración celular generada depende de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto), y del tipo de cultivo (lote o continuo). Este parámetro indica la eficiencia de producción del metabolito por biomasa.

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{(P_F - P_i)}{(X_F - X_i)} \quad (2-3)$$

Donde:

$P_F$  = Concentración final de producto (U/mL).

$P_i$  = Concentración inicial de producto (U/mL).

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/mL).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/mL).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Establecer un proceso de producción de penicilino acilasa en *E.coli* recombinante a partir de un medio mínimo formulado con suero de leche bovino como inductor y única fuente de carbono.

#### **Objetivos particulares**

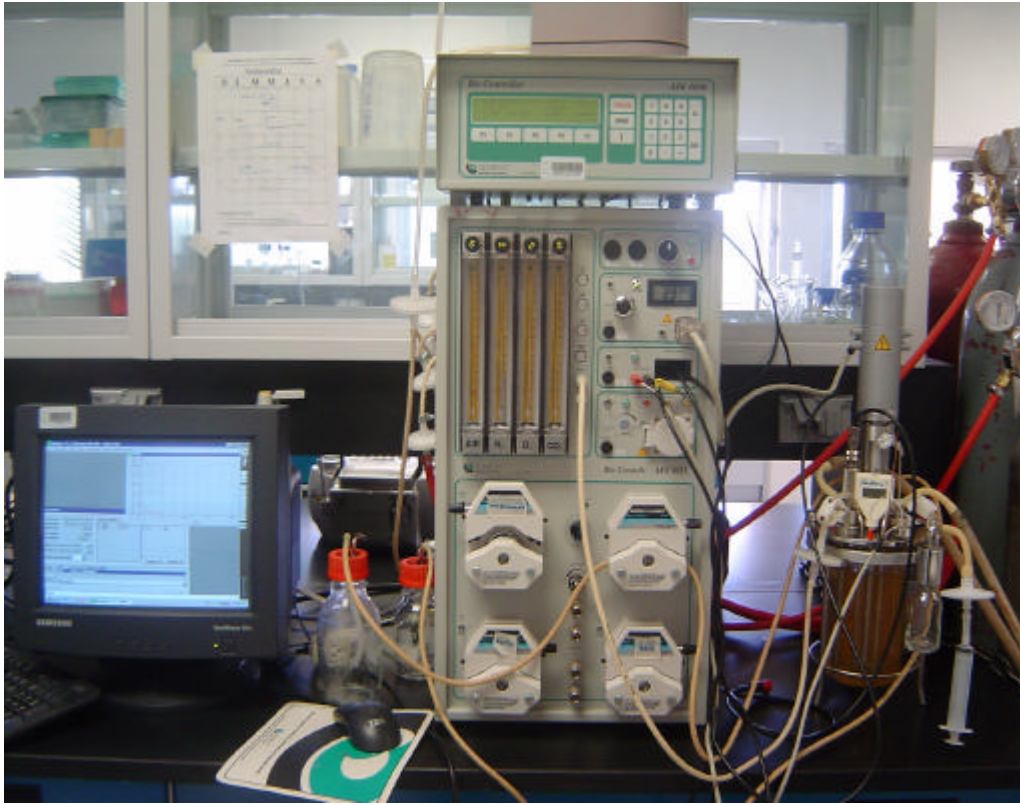
- Desarrollar un medio de cultivo para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* a partir de suero de leche en polvo.
- Seleccionar una cepa de *E. coli* (*gal*<sup>+</sup>, *lac*<sup>+</sup>) capaz de crecer en un medio a base de suero de leche y transformarla con el vector de expresión de PA.
- Evaluar el efecto de la concentración de suero de leche y porcentaje de oxígeno disuelto en la producción de penicilino acilasa recombinante en experimentos en bioreactor tipo lote.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sistema de fermentación

El sistema de fermentación (Fig. 4.1) consiste de un reactor de tanque agitado de 1 Litro (Applikon). El reactor está equipado con 2 turbinas Rushton acopladas a un motor controlado para ajustar la velocidad de agitación necesaria para alcanzar una transferencia de oxígeno adecuada en el bioreactor. Se empleó un electrodo de pH (Applikon), un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Applikon), ambos esterilizables y un sensor de nivel de espuma, así como una línea de entrada para oxígeno, nitrógeno y aire comprimido. La temperatura se controló a 29 °C durante el proceso con un intercambiador de calor sumergido en el medio. El pH se mantuvo a  $7.0 \pm 0.1$  en todos los cultivos adicionando una solución de NaOH, 2 N. Ocasionalmente se adicionó una solución de silicón al 0.1 % (v/v) para disminuir la formación de espuma.

El sistema de control estuvo constituido por una consola automatizada ADI 1035 (Applikon) donde se localizan los actuadores y conexiones de los sensores del sistema que responden a un controlador ADI 1030 (Applikon) programado con un algoritmo de control de lazo cerrado proporcional integral derivativo (PID). Este último compara los valores en un instante de las variables pH y OD medidos por los sensores con el valor deseado (*setpoint*) y se recalcula la respuesta de los actuadores requerida. Los electrodos miden el valor de una variable y transmiten una señal analógica al controlador donde es convertida a una señal digital para tomar una acción que es reenviada en forma analógica a los actuadores.. La adquisición de los datos se realizó por medio de el programa BioXpert versión 1.1x (Applikon) para Windows.



**Fig.4.1** Sistema de fermentación automatizado empleado en este trabajo.

## 4.2. CEPAS BACTERIANAS

En éste trabajo se utilizaron las cepas de *E. coli* JM101/pPA102 proporcionada por el Dr. O.T, Ramírez (IBT,UNAM,Cuernavaca), BL21SI (Gibco), BL21pLysS (Invitrogen) y W3110.

## 4.3. MEDIOS DE CULTIVO

### 4.3.1. Medio Mínimo M9

Es un medio mineral utilizado ampliamente en la industria como medio de producción de proteínas recombinantes (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Medio Mínimo M9.

Reactivo	g/L
Fuente de carbono	5
NaCl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.0
CaCl <sub>2</sub>	0.01
Solución de Kanamicina [35 mg/mL]	1µL/mL
Solución de Tiamina [0.1%]	40 µL/L

**Preparación:** Se disuelven los reactivos de la tabla 5.1 en agua destilada y se esterilizan en autoclave a 15 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos. La fuente de carbono (glucosa, galactosa o lactosa) y el sulfato de magnesio se disuelven y esterilizan por separado del resto de los componentes del medio para evitar la caramelización del azúcar. Una vez que el medio se enfría a una temperatura aproximada de 40 °C, se agrega la solución de kanamicina y la solución de tiamina. Los inóculos se realizaron en medio M9 suplementado con 5 g/L de extracto de levadura (Difco).

Los cultivos en reactor se llevaron a cabo en medio M9 donde se utilizó como fuente de carbono suero de leche en polvo (Land O' Lakes) a 5, 10 ó 15 g/L, se solubilizó por separado en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se separó el exceso de proteína por centrifugación a 13000 rpm por 15 min. Se adicionó la solución estéril como fuente de carbono.

#### 4.4 Inóculos

Para los experimentos de expresión en matraz se tomó una azada de células crecidas en medio LB/kanamicina (Tabla 4.2) para inocular 100 mL de medio M9 glucosa adicionado con extracto de levadura en un matraz Erlenmeyer de 250 mL incubado por 12 h a 29 ° C y 200 rpm.

Para los experimentos en reactor se inocularon 100 mL de medio M9 suero de leche con una azada de las colonias de las placas de agar LB/kanamicina (LB/Km) y se incubaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL por 12-14 h a 29 ° C y 200 rpm. Se adicionó el inóculo necesario en los cultivos en biorreactor para alcanzar una densidad óptica cercana a 0.2.

#### 4.5 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas de este trabajo se realizó en medio LB líquido y sólido. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 30 % y almacenadas a -80° y en placas LB con kanamicina para las diferentes cepas que fueron refrigeradas a 4 ° C por 30 días.

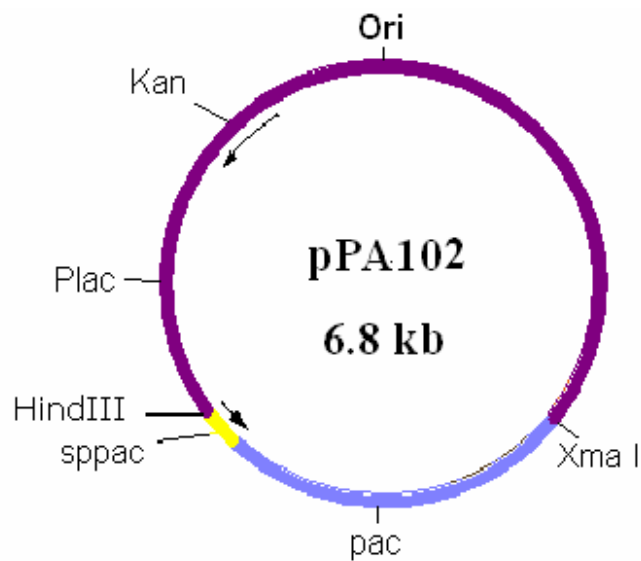
**Tabla 4.2.** Medio LB/Km.

<b>Reactivo</b>	<b>g/L</b>
Bactotripton (peptona)	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
*Agar microbiológico	10
Kanamicina (35 mg/L)	1mL

\* Se agrega sólo para preparar medio sólido.

#### 4.6. Vector de expresión de PA ( pPA102) en *E. coli*

Se utilizó el vector de expresión pPA102 reportado por Merino (1992) el cual contiene el gen de la penicilino acilasa *pac* bajo el control del promotor *lac*, un origen de replicación para *E.coli* y el gene de resistencia a kanamicina (Fig.4.2).



**Fig.4.2.** Representación del Vector de expresión pPA102 (Merino, 1992).

#### 4.7. Aislamiento del plásmido pPA102

Se aisló el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* JM101/pPA102 (Merino, 1992) y se corrieron geles de agarosa al 1% por electroforesis para corroborar la identidad del vector.

#### 4.8. Transformación de la cepa de expresión

Las cepas de *E.coli* BL21SI, BL21pLysS y W3110 se transformaron con el plásmido pPA102 por el método de choque térmico (Sambrook, 1989).

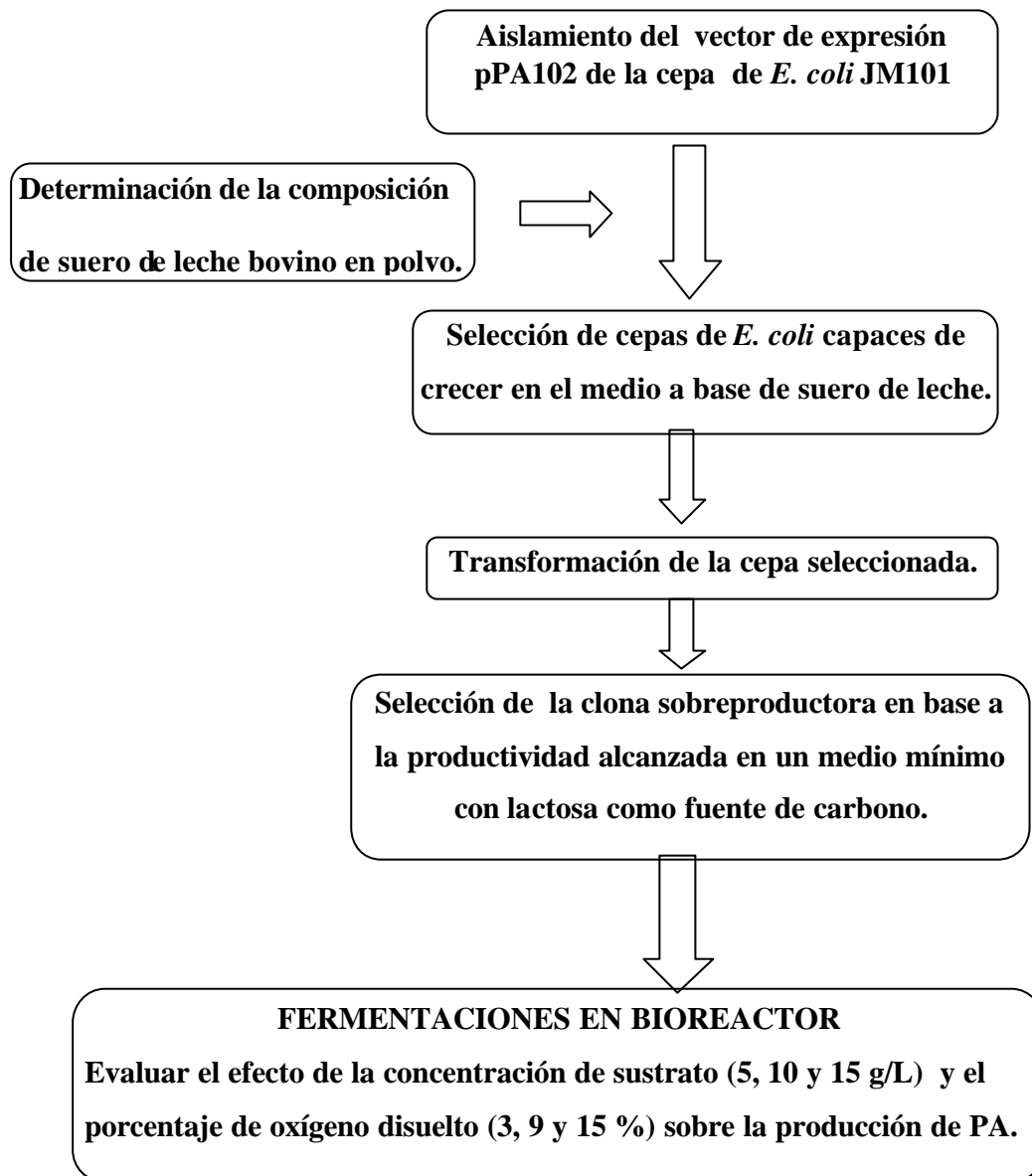


#### **4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA**

Se sembró el volumen total de la reacción de transformación en placas de medio LB/ Km para crecer y seleccionar las clonas transformadas con el gen de la PA capaces de crecer en presencia del antibiótico a 29 ° C. Se realizaron minipreparaciones para 20 colonias seleccionadas al azar, después se linealizó el ADN plasmídico por digestión con la enzima Eco R1 y se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% para comprobar la presencia del plásmido en las probables transformantes.

#### **4.10 Estrategia Experimental**

En la Figura 4.3. se describe la estrategia experimental seguida en este trabajo para la expresión de la enzima penicilino acilasa en cultivos de *E. coli* recombinante en un medio a base de suero de leche bovino. Se probó la capacidad de crecimiento de tres cepas de *E. coli* BL21 pLysS, BL21 SI y W3110 en el medio en base a suero de leche bovino de entre las cuales se seleccionó W3110 por alcanzar la mayor concentración de biomasa (g/L). Una vez obtenidas las clonas transformadas de *E.coli* W3110 se evaluó la actividad específica de la enzima y la productividad para seleccionar la mas adecuada para crecer en el medio con suero de leche. La clona 24 de *E.coli* W3110 fue seleccionada para emplearse en una serie de diez experimentos en biorreactor bajo condiciones controladas de temperatura (29 ° C) y pH (7.0) donde se evaluó el efecto de la concentración inicial de suero de leche y el porcentaje de oxígeno disuelto sobre la producción de la enzima PA. Se realizó un análisis de varianza y de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de la producción de la enzima PA en este sistema.



**Fig. 4.3.** Estrategia experimental.

#### 4.11. Diseño Experimental

Se planteó un diseño experimental de bloques completos incluyendo dos factores concentración de suero de leche bovino (SLB) y % de oxígeno disuelto a tres niveles (Tabla 4.3.). Los experimentos se realizaron de manera aleatoria para disminuir la tendencia de error experimental.

**Tabla. 4.3.** Valores de variables independientes y niveles utilizados en el diseño experimental.

Símbolo	Variables Independientes	Niveles			Unidades
		-1	0	+1	
A	Concentración de SLB	5	10	15	g/L
B	% de Oxígeno Disuelto	3	9	15	%

## **4.12. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.12.1. Tratamiento de muestras**

Se tomaron muestras de 4 mL cada dos horas durante la fermentación para llevar un seguimiento del proceso. Se utilizó 1 mL de muestra para la determinación óptica de biomasa y el volumen restante se centrifugó durante 5 min a 4185 xg para separar la alicuota en dos fracciones: sobrenadante y paquete celular. El sobrenadante se congeló (-20°C) para determinar posteriormente la concentración de lactosa, mientras que la pastilla celular se resuspendió en un buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.8 y fue refrigerado a 4 °C para la determinación de actividad enzimática y proteína total.

### **4.12.2. Determinación de concentración celular**

La concentración celular se determinó mediante la densidad óptica evaluada a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) y se correlacionó con una curva de calibración para convertir la densidad óptica en peso seco (Apéndice B.1).

### **4.12.3. Determinación de lactosa**

Se determinó la concentración de lactosa en el medio de cultivo por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959) basado en la reducción del reactivo DNS por azúcares reductores presentes como la lactosa, formando un compuesto nitroaminado de color amarillo-naranja. La absorbancia medida a 550 nm es directamente proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra. Se construyó una curva estándar (Apéndice B.2) de absorbancia contra concentración de lactosa en g/L para relacionar la absorbancia de las muestras y calcular su concentración de lactosa. Se realizaron diluciones de los sobrenadantes de las muestras para llevarlas a una concentración dentro del rango de la curva estándar (0.1-1.0 g/L).

El procedimiento analítico fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 0.25 mL de las diluciones problema y se agregaron 0.75 mL de reactivo DNS (ácido 1-3 dinitrosalicílico), la mezcla se agitó y fue calentada a baño maría durante 15 minutos. Se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente. Por último se les añadió 4 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia a 550 nm.

#### **4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA**

Se llevó a cabo por el método del *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) reportado por Balasingham y col. (1972), basado en la reacción colorimétrica del grupo carbonilo del PDAB con un grupo amino libre del 6aminopenicilánico (6-APA) producto de la reacción de hidrólisis de la penicilina G por la PA.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 450  $\mu$ L de las muestras almacenadas a 4° C, las cuales se incubaron en tubos de ensayo de vidrio (100 mm X 13 cm) en un baño a 37° C durante 5 minutos. Se añadió 50  $\mu$ L de una solución de penicilina G al 20 % en PBS pH 7.8 y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 37° C. A los 10 minutos se tomaron 40  $\mu$ L de la reacción y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 960  $\mu$ L de etanol absoluto para detener la reacción. Se agregó 500  $\mu$ L del reactivo PDAB, se agitó con un vortex. Se centrifugaron los tubos a 2375 xg durante 6 minutos. Por último se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) después de 15 minutos de adicionado el reactivo PDAB, utilizando como blanco el buffer de fosfatos PBS tratado de la misma manera que a las muestras. Este análisis se realizó dentro de las primeras 48 h posteriores al experimento para evitar degradación o pérdida de actividad de la enzima.

Para realizar los cálculos de actividad enzimática se construyó una curva estándar (Apéndice B.3) a partir de diluciones conocidas del compuesto 6-APA en un buffer de fosfatos (pH 7.8), las cuales se procesaron con el método del PDAB y se leyó su absorbancia para relacionarla a la concentración de 6-APA de la dilución. Una unidad enzimática equivale a la cantidad necesaria de la enzima para hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de penicilina G por minuto a 37 ° C.

La actividad enzimática por mililitro de muestra (U/mL) se calcula de la siguiente manera:

(4-1)

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{(\text{D.O.} - b) \times D \times 1000}{m \times \text{PM}_{6\text{-APA}} \times t(\text{min}) \times (0.45 \text{ mL})} \quad [=] \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Donde:

**D.O.** = Densidad óptica de las muestras a 415 nm.

**b** = Ordenada al origen de la curva estándar.

**m** = Pendiente de la curva estándar.

**D** = Dilución de la muestra.

**PM<sub>6-APA</sub>** = Peso molecular de 6-APA (216.24 mg/mmol).

**t** = Tiempo de reacción muestra-sustrato (10 min).

**U** = Unidad de actividad enzimática.

#### **4.12.5. Determinación de proteína total**

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951) el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade reactivo E (Apéndice A) y reactivo Folin para formar un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. El método se basa en la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con el ión cobre en solución alcalina y la reducción del reactivo de Folin (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) que se reduce a heteropolimolibdeno azul por la oxidación de aminoácidos aromáticos catalizada por cobre.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras refrigeradas a 4 ° C y se les adicionó 900  $\mu\text{L}$  de agua. Se agregaron 5 mL de reactivo E, se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin 1N, se agitaron las muestras y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron lecturas de absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

Se construyó una curva estándar de concentración de proteína total (Apéndice B.4), a partir de diluciones estándar de concentración conocida de una solución patrón de albúmina de suero bovina (BSA stock de concentración 1.4 mg/mL) en agua destilada, las cuales se procesaron igual que las muestras y las lecturas de absorbancia obtenidas se correlacionaron con la concentración conocida de proteína total en las diluciones.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo

Se realizó un análisis bromatológico del suero de leche en polvo (tabla 5.1) donde se determinó el contenido de lactosa en base seca y el contenido de proteína total, mientras que el resto de los componentes (grasas y cenizas) no se cuantificaron por encontrarse en mínima proporción.

**Tabla 5.1.** Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo (Land O'Lakes Inc.)

Componente	%
Lactosa *	87.7
Proteínas	11.7
Otros	< 1

\* Reportado como azúcares reductores totales.

### 5. 2. Selección de la cepa de expresión

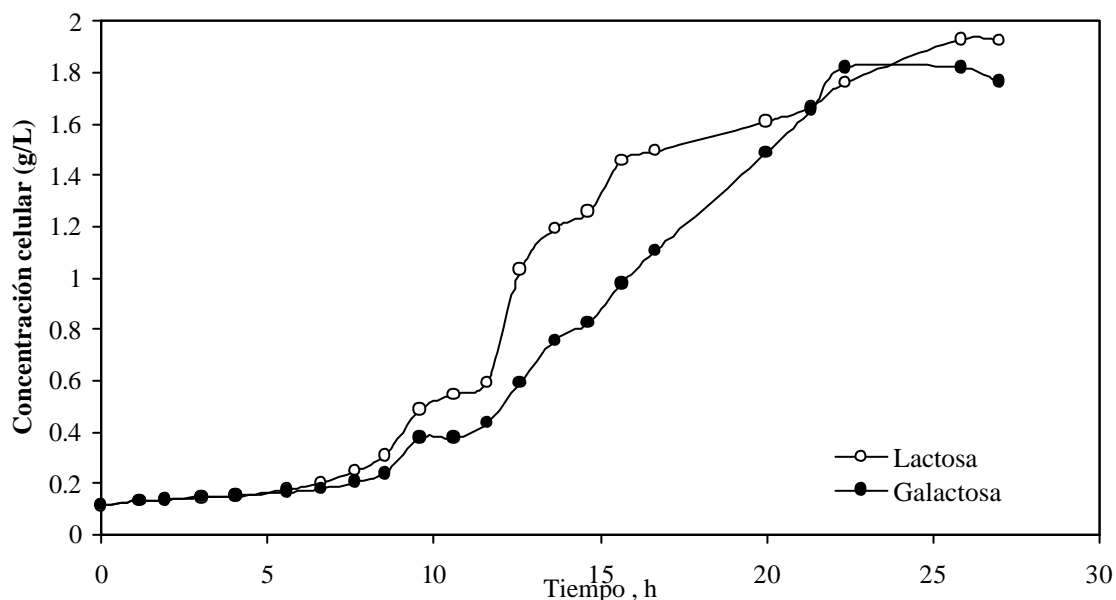
En la tabla 5.2 se muestra el genotipo de las cepas empleadas en este trabajo. Fue necesario cambiar de cepa de *E.coli* para la expresar la enzima PA en el medio a base de SLB ya que *E.coli* JM101 (?lac) es incapaz de metabolizar lactosa. Se probaron dos cepas *E. coli* BL21 pLysS y BL21 SI diseñadas para la expresión de proteínas heterólogas con alta eficiencia por que son deficientes de las proteasas *lon* y *ompT*. Sin embargo con ambas cepas se obtuvieron bajas concentraciones celulares en el medio mínimo con lactosa, mientras que con la cepa *E. coli* W3110 se observó un efecto favorable en la expresión de la enzima PA al utilizar suero de leche como sustrato e inductor.



**Tabla 5.2.** Genotipo de cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
JM101	$\lambda$ <i>lac</i> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , sup E, pro AB <sup>+</sup> , <i>lac Z</i> M15
BL21pLysS	<i>Lac</i> <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3, pLys
BL21 SI	<i>Lac</i> <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3
W3110	<i>Lac</i> <sup>+</sup> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , F <sup>?</sup> IN ( <i>rrnD-rrnE</i> )1

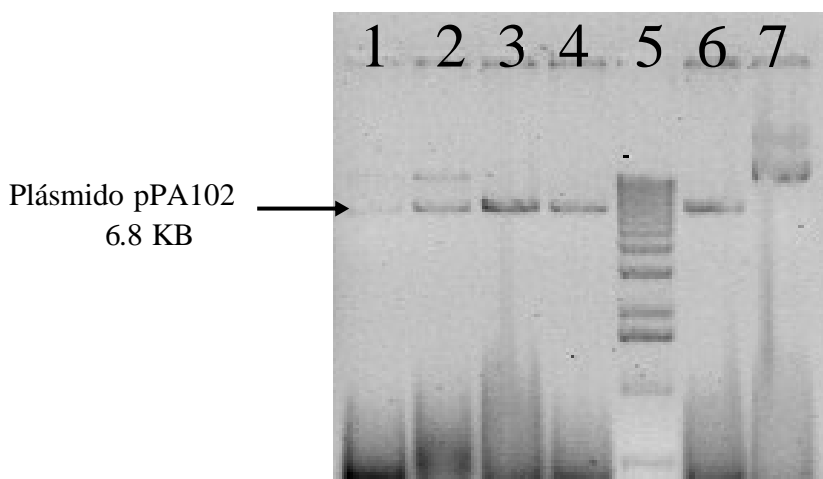
En la figura 5.1. se muestra la cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* W3110 en cultivos en presencia de lactosa o galactosa. Se puede observar que en ambos casos se presentó una fase de retardo del crecimiento de 7 horas la cual termina cuando se alcanza la pendiente de ajuste lineal de la fase exponencial, además la concentración celular final fue muy similar en los dos cultivos. Este resultado corrobora que esta cepa metaboliza de igual manera lactosa y galactosa, característica deseable en la cepa de expresión en un medio con suero de leche.



**Fig.5.1.** Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* W3110 en medio mínimo con lactosa y galactosa como fuente de carbono a 5 g/L.

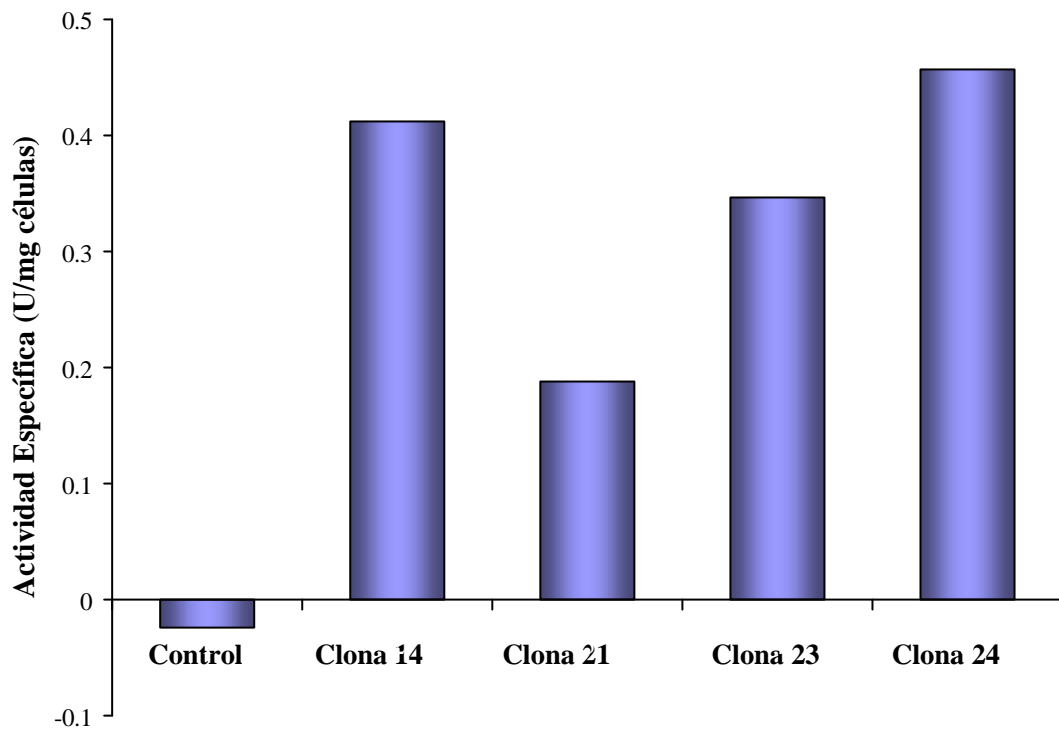
### 5.3 Selección de clona sobreproductora de PA

En la Fig.5.2 se observan 6 muestras de 5 de las colonias de *E.coli* W3110 que fueron seleccionadas al azar, en las cuales se confirmó la presencia del vector pPA102 por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las 6 muestras se observó la presencia de ADN plasmídico linealizado con un peso molecular de aprox. 6.8 KB.



**Fig.5.2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de muestras de ADN plasmídico de posibles transformantes de *E. coli* W3110/pPA102: carril (1) clona 9 digerida con Eco R1, (2) clona 14 digerida con Eco R1, (3) clona 21 digerida con Eco R1, (4) clona 23 digerida con Eco R1, (5) MPM 1KB, (6) clona 24 digerida con Eco R1, (7) clona 24 sin digerir.

Las clonas seleccionadas confirmadas como transformantes positivas se utilizaron en pruebas de expresión. Se observó que las clonas produjeron diferentes niveles de actividad de la enzima en un medio mínimo con lactosa mientras que en la cepa no transformada no hubo producción de la enzima (Fig 5.3). Se seleccionó la clona 24 para la expresión de PA en los siguientes experimentos en reactor por presentar la mayor productividad entre las clonas (0.059 U/mLh) así como el valor máximo de actividad específica (0.458 U/mg células) después de 17 h de cultivo en matraz a 29 °C agitado a 200 rpm. Probablemente estas diferencias en la actividad enzimática se deban al número de copias del plásmido en la célula.



**Fig.5.3.** Actividad específica máxima de PA (U/mg células) en las clonas 21, 23, 24 y 14 después de 17 h de cultivo. El control consiste en la cepa no transformada.

#### **5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos**

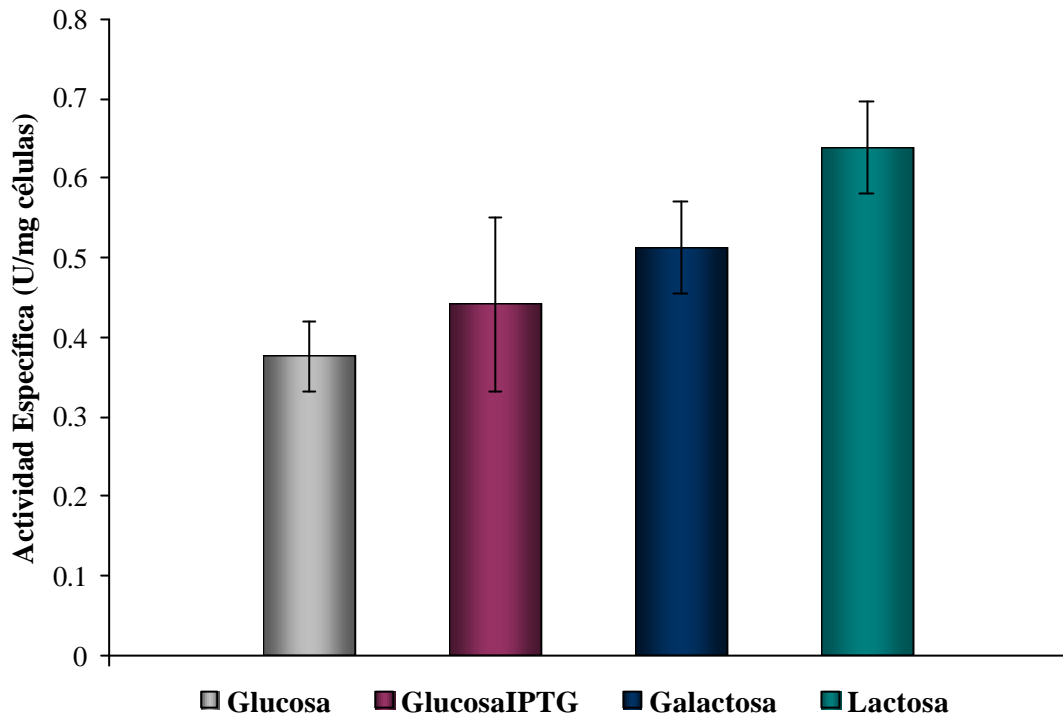
En la figura 5.4 se muestran los valores de actividad enzimática específica de los cultivos con glucosa IPTG, galactosa y lactosa como sustrato y un cultivo control con glucosa. Contrario a lo observado con la cepa JM101 de *E. coli*, en la cepa W3110 se observó una alta producción de la enzima en presencia de glucosa sin inductor sintético IPTG (cultivo control). Este resultado sugiere que el medio con suero de leche es una buena opción para la expresión de la enzima recombinante en la cepa seleccionada ya que se induce la producción de PA con lactosa, galactosa y glucosa sin necesidad de inductores sintéticos.

El uso de lactosa demostró la capacidad de inducción similar a la obtenida con galactosa en la producción de la PA. La actividad específica máxima de PA fue de 0.639 y 0.514 U/mg células para los cultivos que contenían lactosa y galactosa respectivamente y no se observó diferencia significativa entre sí (Fig. 5.4).

En los cultivos inducidos con glucosa y glucosa IPTG, la adición del inductor sintético aumentó la expresión de PA pero no se alcanzó el nivel de actividad obtenido con lactosa o galactosa. Este efecto sugiere que se alcanzó un máximo de expresión de la enzima al inducir con glucosa IPTG, lactosa o galactosa bajo las condiciones de este experimento.

En la Tabla. 5.3 se presenta un resumen de los valores de actividad máximos obtenidos en las pruebas de expresión en medios con diferente fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por duplicado para efecto de reproducibilidad.

La actividad volumétrica máxima fue de 1.05 U/mL y se presentó en el cultivo con lactosa como fuente de carbono e inductor, mientras que en el cultivo con galactosa fue de 0.952 U/mL. Este resultado muestra que la fuente de carbono lactosa resultó igual de eficiente que la galactosa en la producción de PA.



**Fig. 5.4.** Valores máximos promedio de actividad específica de W3110/pPA102 en diferentes fuentes de carbono.

**Tabla.5.3.** Valores máximos promedio de actividad de PA en *E. coli* W3110/pPA102 con diferente fuente de carbono.

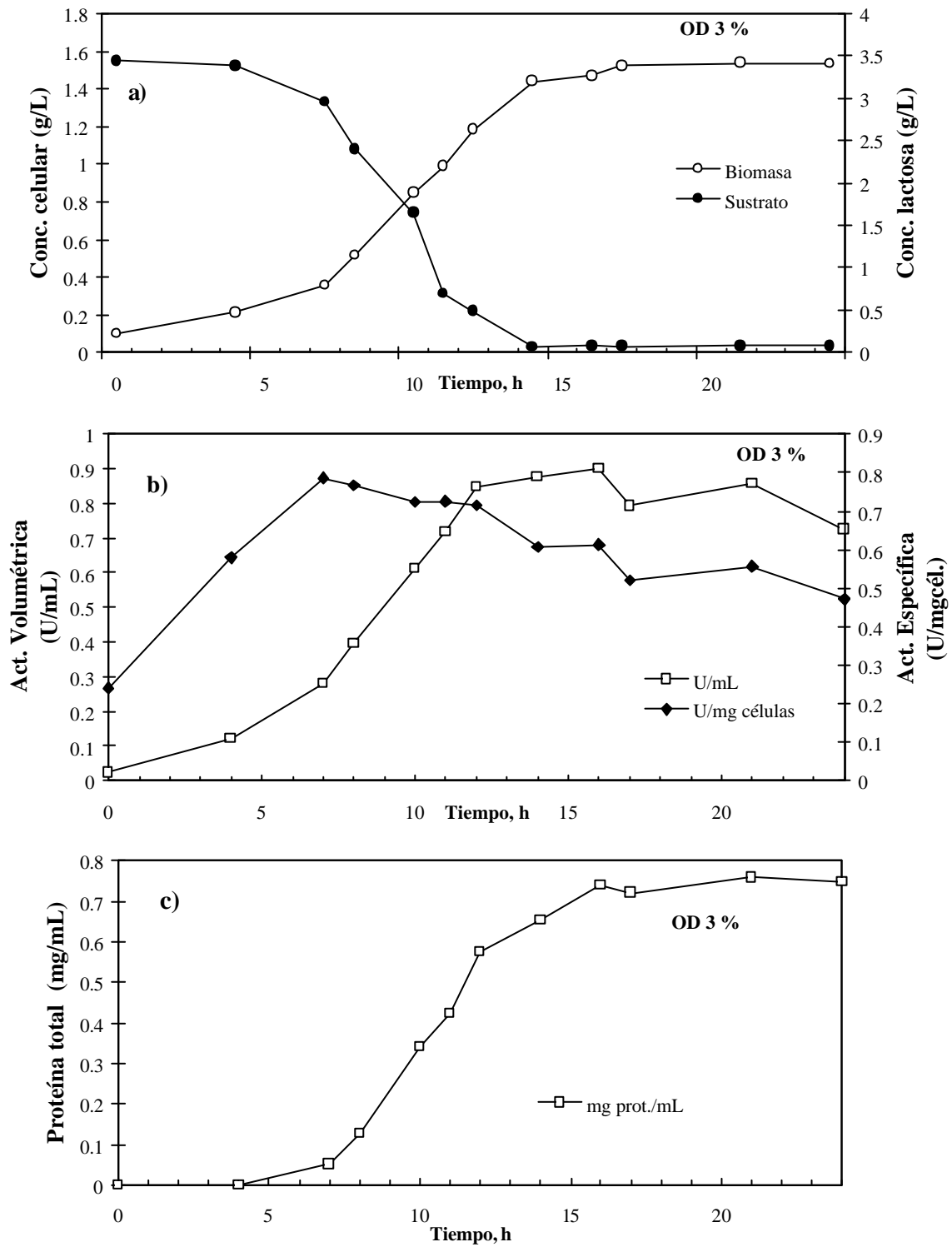
Sustrato	Activ. Máx. Vol. (U/mL)	Activ. Máx. Esp. (U/mg <sub>células</sub> )
Glucosa	0.736± 0.040	0.376 ± 0.044
Glucosa IPTG	0.886± 0.0014	0.441 ± 0.111
Galactosa	0.936± 0.180	0.514 ± 0.058
Lactosa	1.051± 0.166	0.639 ± 0.058

## 5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental

En la Fig. 5.5. se muestra la cinética de cultivo a 5 g/L SLB y 3 % OD, el resto de los cultivos se encuentran en el apéndice D. En la figura 5.5.a se presenta la cinética de crecimiento celular y consumo de lactosa. La concentración celular alcanza un máximo de 1.6 g/L al agotarse la lactosa del medio. La concentración de oxígeno disuelto no afectó de manera significativa la velocidad de crecimiento ni la concentración celular alcanzada en los experimentos con 5 g/L de suero de leche como concentración inicial bajo diferentes condiciones de OD (Ver tabla 5.4). En los gráficos de control de oxígeno disuelto que se encuentran en el apéndice C se puede observar una perturbación en el control de OD al término de la fase exponencial de los cultivos con excepción de aquellos que fueron controlados a 15 % OD donde la perturbación es imperceptible.

Respecto a la producción de PA (Fig.5.5.b), ésta si fue afectada por el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio. En el cultivo a 3 % OD y 5 g/L SLB se obtuvo la mayor actividad volumétrica de PA (0.793 U/mL), mientras que en los cultivos con 9 y 15 % OD, los valores de actividad máxima fueron de 0.61 y 0.57 U/mL respectivamente (Apéndice D). Lo anterior concuerda con lo publicado por Ramírez (1994b) donde reporta que al aumentar la velocidad específica de crecimiento, la actividad enzimática se ve afectada.

En la Fig.5.5b se muestra el perfil de actividad específica para el mismo cultivo. Se puede apreciar un máximo en la actividad específica durante la fase de exponencial (8-15 h). Para una concentración inicial de 5 g/L de SLB la actividad específica máxima fue de 0.613 U/mg células y fue obtenida en el cultivo controlado a 3 % de OD. En los cultivos controlados a una OD de 9 y 15 % las actividades fueron menores al cultivo a 3 % y similares entre sí (0.506 y 0.424 U/mg células respectivamente). En la Fig. 5.5.c se muestra la curva de proteína total durante la fermentación donde el máximo fue de 0.7 mg/mL, y se puede observar un perfil similar al de concentración celular.



**Fig.5.5.** Cinética del cultivo con 5 g/L de SLB controlado a 3 % OD. **a)** Crecimiento celular. **b)** Perfil de actividad volumétrica y específica de PA. **c)** Proteína total.

Las cinéticas generadas de la serie de cultivos con 10 g/L de concentración inicial de suero de leche en el medio, presentaron una tendencia similar a la de cultivos con 5 g/L de concentración de sustrato. La menor velocidad específica de crecimiento en las fermentaciones realizadas a la concentración de 10 g/L de SLB ( $0.1405 \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvo en el cultivo con el nivel más bajo de OD (3 %), mientras que a OD mayores (9 y 15 %) las velocidades de crecimiento alcanzadas son comparables a las obtenidas en los experimentos a 5 g/L de sustrato (Tabla 5.4). La densidad celular final alcanzada en las fermentaciones con 10 g/L de suero a 9 y 15 % OD fue de 2.06 y 2.19 g/L respectivamente, mientras que a una OD de 3% la concentración celular resultó mucho más baja que la obtenida en el resto de las fermentaciones (Apéndice D).

Respecto a la producción de PA se observó una diferencia muy marcada en la actividad volumétrica relacionada con el nivel de OD en el medio. En la fermentación a la condición de OD del 9 % se obtuvo la actividad volumétrica ( $0.65 \text{ U/mL}$ ) y específica ( $0.35 \text{ U/mg}$  de células) máximas entre los cultivos con concentración intermedia de sustrato. También en este cultivo se presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ( $0.235 \text{ h}^{-1}$ ) aunque la diferencia con el cultivo a 15 % de OD y 10 g/L SLB no fue significativa. Los valores de actividad volumétrica y específica de PA en estos cultivos disminuyeron al aumentar el %OD en el medio.

En los cultivos que se realizaron con 15 g/L de suero de leche, la velocidad específica de crecimiento se vio disminuida en los cultivos a 3 y 15 % de OD ( $0.11$  y  $0.145 \text{ h}^{-1}$  respectivamente) con respecto al promedio, mientras que en la fermentación a 9 % de OD se alcanzó una velocidad específica cercana al máximo entre fermentaciones ( $0.236 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual puede indicar que este nivel de concentración de OD se aproxima al óptimo para favorecer el crecimiento de la cepa empleada.



La máxima concentración celular final (2.2 g/L) en los cultivos con 15 g/L de SLB en el medio se obtuvo con la mayor concentración de oxígeno disuelto (15 % OD) con una adecuada reproducibilidad en la réplica. Mientras que a las otras condiciones de OD (3 y 9 %) el crecimiento bacteriano fue equiparable entre ambos cultivos alcanzando una concentración celular promedio de  $1.9 \text{ g/L} \pm 0.02$ .

Entre las fermentaciones con la mayor concentración inicial de fuente de carbono, se puede apreciar que a 9 % OD, el perfil de producción de la enzima difiere de los otros cultivos, resultando en el valor más alto de actividad volumétrica (0.61 U/mL) y específica (0.47 U/mg de células) entre las fermentaciones con 15 g/L de SLB. Este resultado coincide con el aumento de velocidad específica de crecimiento lo cual demuestra que la cinética de producción de la enzima está asociada al crecimiento microbiano. La reproducibilidad de las fermentaciones fue probada realizando una única réplica para la condición 15 g/L de SLB y 15 % OD (Ver Apéndice D).

Con respecto a la actividad específica se obtuvo la producción más alta de PA a 9 % OD (0.47 U/mg células), y a las otras dos condiciones 3 y 15 % OD la producción fue mas baja (0.209 y 0.22 U/mg células respectivamente). A diferencia de lo observado a concentraciones más bajas de sustrato (5 y 10 g/L), el máximo de actividad específica de PA se alcanzó después de 15 h de cultivo.

## **5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA**

En la tabla 5.4. se muestra el resumen de los resultados de actividad enzimática volumétrica, actividad específica y velocidad específica de crecimiento máximas de las fermentaciones en biorreactor, así como los valores calculados de rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ ) y el rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{X/S}$ ) y productividad, cada uno de estos puntos serán discutidos en las secciones siguientes.

### **5.7. Eficiencia de suero de leche en la expresión de enzimas recombinantes en *E. coli***

En los cultivos de *E. coli* W3110 en biorreactor inducidos con suero de leche se alcanzó una actividad específica de PA (0.613 U/mg células) comparable al máximo obtenido en las pruebas de expresión con galactosa, glucosa IPTG y glucosa aunque la producción siguió una cinética más lenta. Lo anterior concuerda con lo reportado por Viitanen y col. (2003) quienes obtuvieron los niveles máximos de actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en cultivos tipo lote alimentado de *E. coli* Rb791 recombinante a 30 ° C con glucosa y glicerol como fuente de carbono y lactosa y suero de leche como inductores. En la expresión de la enzima recombinante murimidasa en cultivos lote alimentado a 37 ° C de *E. coli* BL21(DE3), inducidos con lactosa de suero de leche, Viitanen y col. (2003) observaron una acumulación importante de galactosa formada dentro de las células que no fue metabolizada, lo cual confirma que esta cepa no es capaz de metabolizar eficientemente lactosa tal como se observó en este trabajo. En ambos casos reportados por Viitanen y col. (2003) el suero de leche fue empleado como inductor y no como fuente de carbono, además la concentración de oxígeno disuelto empleada (30%) para la producción de las dos enzimas es mucho mayor que la óptima encontrada para la penicilino acilasa. La eficiencia del suero de leche como sustrato y/o inductor de la expresión de enzimas recombinantes depende de la cepa de *E. coli*, la enzima y las condiciones óptimas de expresión como: pH, temperatura y % OD.

### **5.8 Efecto de la velocidad específica de crecimiento y la OD sobre la producción de PA**

Como se discutió anteriormente, la velocidad de crecimiento afecta significativamente la producción de PA, lo que se ve reflejado en el rendimiento de producción de la enzima en base a la concentración celular. En la serie de experimentos en reactor, el mayor rendimiento de producto por biomasa generada (602.6 U/g células) así como la productividad más alta (0.054 U/mLh) se obtuvieron en el cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD a una velocidad específica de crecimiento de 0.192 h<sup>-1</sup>.

El rendimiento de biomasa por sustrato máximo se alcanzó en el cultivo con 5 g/L de SLB y 15 % OD , pero el rendimiento de producto para estas condiciones es la mitad del obtenido con el cultivo a 3 % OD. El aumento en el % de oxígeno disuelto a la concentración más baja de sustrato (5g/L) favorece la formación de biomasa pero no así la producción de la enzima. Este resultado es congruente con lo observado por De León (2003) quien sugiere que la producción de la enzima mejora al limitar el oxígeno disponible durante la fermentación en un rango entre 1 y 5 % de OD. En la mayoría de las fermentaciones la velocidad específica de crecimiento se mantuvo en un rango limitado a pesar de las condiciones de cultivo diferentes, exceptuando los cultivos a 10 y 15 g/L con 3 %OD (experimentos 4 y 7) donde la limitación de oxígeno disminuyó la velocidad y el crecimiento celular, resultando además en una pobre producción de la enzima recombinante.

**Tabla 5.4.** Resumen de resultados de las fermentaciones realizadas en reactor para evaluar el efecto de la concentración de sustrato y OD en la producción de PA.

EXPERIMENTO	SLB g/L	% OD	Y X/S	Y P/X U/g	Ac.Esp. máx. (U/mgcel)	Act.Vol. máx. (U/mL)	Productividad (U/mLh)	$\mu$ h <sup>-1</sup>
1	5	3	0.361	602.6	0.613	0.793	0.054	0.1919 (r <sup>2</sup> =0.991)
2	5	9	0.285	396.5	0.506	0.609	0.040	0.2136 (r <sup>2</sup> =0.989)
3	5	15	0.468	338.4	0.424	0.573	0.036	0.2182 (r <sup>2</sup> =0.992)
4	10	3	0.252	177.5	0.185	0.229	0.016	0.1405 (r <sup>2</sup> =0.985)
5	10	9	0.398	393.8	0.349	0.651	0.032	0.2355 (r <sup>2</sup> =0.991)
6	10	15	0.305	341.8	0.384	0.524	0.035	0.2154 (r <sup>2</sup> =0.984)
7	15	3	0.186	166.2	0.209	0.311	0.015	0.1115 (r <sup>2</sup> =0.992)
8	15	9	0.215	272.8	0.466	0.611	0.034	0.2209 (r <sup>2</sup> =0.989)
9	15	15	0.232	192.3	0.192	0.326	0.016	0.1368 (r <sup>2</sup> =0.998)
Réplica	15	15	0.236	207.9	0.227	0.467	0.018	0.1525 (r <sup>2</sup> =0.983)

## 5.9. ANÁLISIS DE VARIANZA

### 5.9.1. ANOVA del Rendimiento $Y_{P/X}$

Se realizó el análisis de varianza de las variables concentración de SLB (A) y oxígeno disuelto (B) en una ecuación que describe a la respuesta rendimiento de producto por biomasa con el menor error y que incluye los términos A, B,  $A^2$ , AB,  $A^2B$  y  $AB^2$  con una  $R^2=0.93$  y un coeficiente de variación de 22.88 (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{P/X}$ .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	1.437E10 <sup>5</sup>	6	23954.98	4.461	0.167
Error	1.074E10 <sup>4</sup>	2	5370.38		
Total	1.545E10 <sup>5</sup>	8			

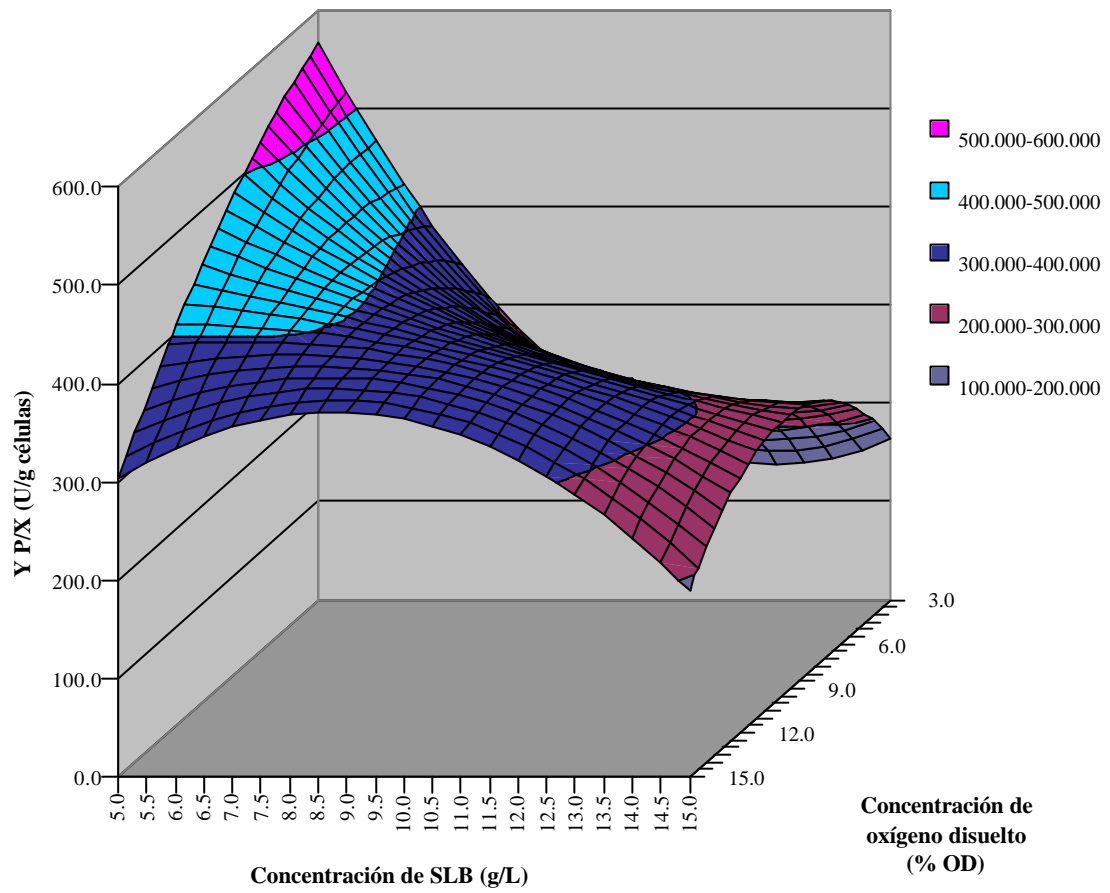
$$R^2=0.9305.$$

La ecuación que describe mejor el rendimiento de producto por biomasa se escribe:

(5-1)

$$Y_{P/X} = 1579.383333 - 245.07875*(A) - 104.95*(B) + 9.451167*(A^2) + 24.701667*(AB) - 0.9445*(A^2B) - 0.188472*(AB^2)$$

El análisis de superficie (Fig. 5.6) muestra que el óptimo de rendimiento de producto por biomasa se presenta con las condiciones 5 g/L de suero de leche y 3 % OD y fue confirmado con la herramienta solver de Excel.



**Fig. 5.6.** Superficie de respuesta para el rendimiento de producto por biomasa (U/gcélulas).

## 5.9.2. ANOVA del Rendimiento $Y_{X/S}$

**Tabla 5.6.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{X/S}$ .

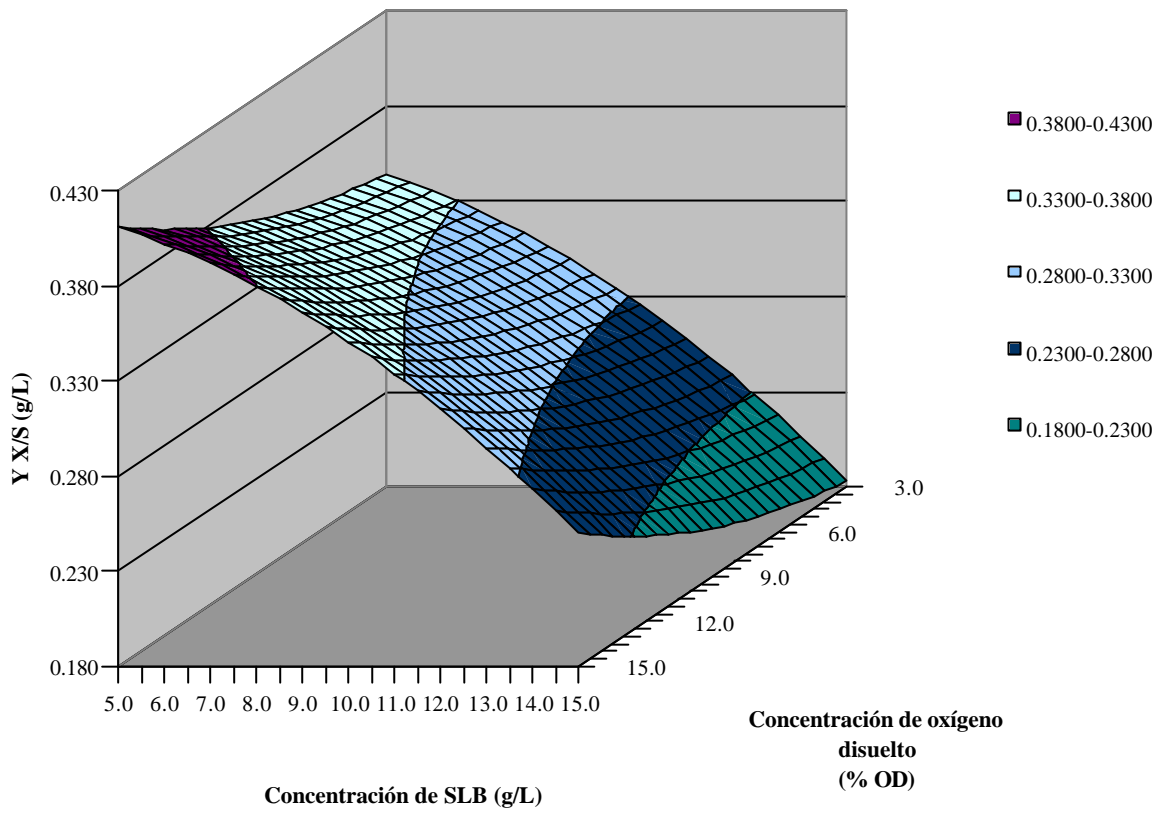
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.04682	2	0.02341	6.346	0.0331
Error	0.02213	6	0.00369		
Total	0.06895	8			

La ecuación de mejor ajuste para los datos de rendimiento de biomasa por sustrato se expresa como:

(5-2)

$$Y_{X/S} = 0.362102 - 0.000807*(A^2) + 0.000308 (B^2)$$

En la figura 5.7. se puede observar la superficie de respuesta para el rendimiento de biomasa por sustrato en función de la concentración de oxígeno y concentración de sustrato. Las condiciones óptimas para alcanzar el máximo rendimiento fueron 5 g/L de SLB y 15 % de OD. El gráfico de superficie muestra un efecto de inhibición del crecimiento microbiano al aumentar la concentración inicial de suero de leche en la fermentación, esto significa que para favorecer la producción de biomasa es mejor trabajar a niveles bajos de SLB y niveles no limitantes de OD.



**Fig.5.7.** Superficie de respuesta para el rendimiento sustrato por biomasa en la producción de PA.

### 5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células).

En la tabla 5.7. se muestra el análisis de varianza del modelo de actividad específica en función de las variables A (concentración de SLB) y B (% OD). Se propuso la ecuación de mejor ajuste para describir la respuesta actividad específica la cual involucra los términos A, B, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, AB, A<sup>2</sup>B y AB<sup>2</sup>.

**Tabla 5.7.** Análisis de varianza para la respuesta Actividad específica (U/mg células).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.26305	7	0.03758	12.498	0.2145
Error	0.00301	1	0.00301		
Total	0.26605	8			

Se propuso la siguiente ecuación para describir la producción de PA en términos de actividad enzimática específica (U/mg células) :

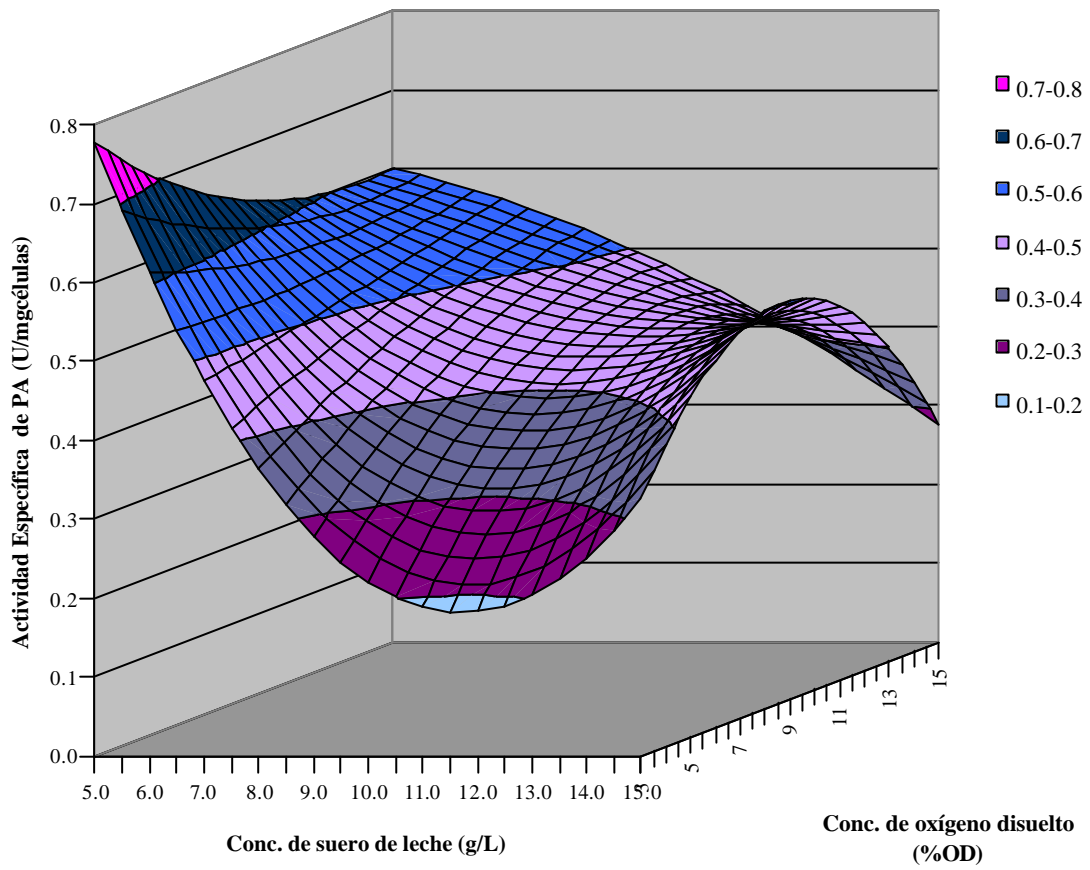
(5-3)

$$\text{Actividad específica} = Y = 2.566653 - 0.419779*(A) - 0.20625*(B) + 0.016938*(A^2) + 0.00519*(B^2) + 0.038883*(AB) - 0.001238*(A^2B) - 0.000726*(AB^2)$$

El modelo propuesto para actividad específica en U/mg células fue el que se ajustó mejor a los datos obtenidos experimentalmente en las fermentaciones para la producción de PA con un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) del modelo de 0.9887.

De acuerdo con el análisis de máximos y mínimos las condiciones óptimas se encuentran a 5 g/L de suero de leche y 3 % de OD como se puede observar en la Fig. 5.8. Aunque el modelo en teoría sugiere que se puede alcanzar una actividad específica mayor por debajo de los niveles probados experimentalmente, en la práctica el disminuir el nivel de oxígeno durante la fermentación afecta de manera considerable el rendimiento de biomasa por sustrato como se observa en la sección 5.9.2.





**Fig. 5.8.** Superficie de respuesta para la actividad enzimática específica de PA (U/mg células).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

La expresión de penicilino acilasa (PA) en *E. coli* W3110/pPA102 se logró en presencia de galactosa, lactosa y glucosa con IPTG en el medio de cultivo, sin embargo hay una expresión basal en ausencia de inductor. El perfil de producción de PA en *E. coli* W3110 fue del tipo asociado a crecimiento. La inducción de PA con el medio adicionado con suero de leche resultó más lenta pero alcanzó los mismos niveles que se obtienen cuando se induce con IPTG o galactosa.

A la concentración más alta de suero de leche (15 g/L) y a todas las condiciones de oxígeno disuelto evaluadas (3, 9 y 15 %), la velocidad específica de crecimiento fue significativamente más baja que el promedio alcanzado en el resto de los cultivos, demostrando que existe un efecto de inhibición por sustrato en las fermentaciones.

Las condiciones de oxígeno disuelto afectan de manera importante la producción de la enzima penicilina acilasa y los valores de actividad volumétrica y específica por igual. En todas las fermentaciones, la actividad específica de PA y la productividad del proceso fueron dependientes de las condiciones de oxígeno y concentración inicial de suero. Las mejores condiciones para la producción de PA de acuerdo con el análisis de superficie de respuesta y la herramienta Solver de Excel son: concentración inicial de 5 g/L de suero de leche y 3 % de oxígeno disuelto constante.

Los resultados generados en este trabajo muestran que el suero de leche puede ser empleado eficientemente como sustrato e inductor en la producción de proteínas recombinantes como la penicilino acilasa, y representa una alternativa a los procesos actuales de tratamiento del suero de leche, que es un efluente altamente contaminante.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar cultivos de tipo lote alimentado, ya que la edad del cultivo influye en la actividad de penicilino acilasa (PA) en *E.coli* W3110/pPA102. Estos experimentos podrían determinar si el efecto observado al final de los cultivos se debe a limitaciones postraduccionales o por presencia de proteasas.

Se demostró que 5 g/L de suero de leche es suficiente para alcanzar valores altos, tanto de crecimiento de la cepa como de producción de PA, por lo que se recomienda utilizar el suero líquido en lugar de suero de leche en polvo procesado, con lo que se evita la necesidad de aplicar tratamientos costosos de concentración como evaporación y ultrafiltración.

Por otra parte se recomienda investigar el mecanismo responsable de la expresión de PA con diferentes fuentes de carbono en la *E.coli* W3110. Este patrón de inducción puede ser el resultado de la fusión del promotor *lac* en la secuencia del promotor *pac* en el vector de expresión pPA102.

## 7. REFERENCIAS

Ahn W. S., Park S. J., Lee S. Y. (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3624-3627.

Altaras, N.E., Etzel, M.R., Cameron, D.C. (2001). Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8. *Biotechnol Prog.* 17(1):52-56.

Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition. McGraw-Hill International Editions; Cap. 7.

Balansingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., y Lilly, D.(1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E.coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 250-256.

Barret, E.L., Collins, E.B., Hall, B.J. y Matoi, S.H. (1983). Production of 2,3-butylene glycol from *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* . *J Dairy Sci.* 66(12):2507-2514.

Beom Soo Kim. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. (2000). *Enzyme Microb Technol.* 27: I. 10, 774-777.

Burlingame, R. and Chapman, P.J. 1983. Catabolism of phenilpropionic acid and its 3-hydroxyderivate by *E. coli*. *J.Bacteriol.* 155 (1): 113-121.

Compagno C, Porro D, Smeraldi C, Ranzi BM. (1995). Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(5):822-825.

Dai, M., Zhu, Y., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G. y 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, 1298-1303.

De León, A. (1996). Tesis de Maestría. Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilina acilasa por *Escherichia coli* recombinante. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

De León, A., Hernández, V., Galindo, E., y Ramírez, O.T. (2003). Effects of dissolved oxygen on the production of recombinant Penicillin Acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 33:689-697.

Doelle, H.W., Ewings, K.N. y Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial system. *Adv. Biochem. Eng.* 23:1-35.

Donovan RS, Robinson CW y Glick BR. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol.* 16:145-154.

Duggleby H. W., Tolley S.P. , Hill C.P., Dodson E.J. , Dodson G. and Moody P.C. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature* 373: 264-268.

El-Holi M.A. y Al-Delaimy K. S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger* . *African J Biotechnol.* 2 (10) 356-359.

El-Samragy Y.A.<sup>1</sup>;Khorshid M.A.; Foda M.I.; Shehata A.E. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger* *International J of Food Microbiol.* 29:2 411-416 .

Ennis, B.M., Maddox, IS. (1987). Butanol production from lactose hydrolysed whey permeate by fermentation with *Clostridium acetobutylicum*: comparison with non hydrolysed whey permeate. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22(1): 75-81.

Fang, H.H.P. (1991). Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated sludge and anaerobic processes. *J. Dairy Sci.* 74: 2015-2019.

Ghaly A.E., and Kamal M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res.* 38(3):631-44.

Huang Y., y Yang ST. (1998). Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol.Bioeng* 60(4):498-507.

Huber R.E., Lytton J., y Fung E.B. (1980). Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141(2):528-33.

Jacob F, Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56.

Konicek, J., Konickova-Radochova, M. (1994). Use of whey for production of exopolysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiol.(Praga)*. 37(2):102-104.

Kumar V., Ramakrishnan S., Teeri TT., Knowles JK., Hartley BS.(1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grow on whey permeate. *Bioæchnol (NY)*. (1):82-5.

Lee PC, Lee WG, Kwon S, Lee SY, Chang HN. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54(1):23-7.

Leite A. R., Guimarães W. V., De Araujo E. F., Silva D. O. (2000). Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian J of Microbiol* . 31:212-215.

Liu C, Liu Y, Liao W, Wen Z, Chen S. (2004). Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. *Appl Biochem Biotechnol*. 113-116:627-38.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. España. Cap.10, 342-345.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193(1): 265-275.

Lu, J.Y., Lowe, D.A., Kennedy, M.D. y Low, P.S. (1999). Folate-targeted enzyme produg cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug. *J. of Drug Targeting*. 7: (1), 43-53.

Marshall, K. R. (1982). Industrial isolation of milk proteins: Whey proteins. *Developments in Dairy Chemistry*. 1: 339-373.

Maullu C., Lampis G., Desogus A., Ingianni A., Rossolini G. M., y Pompei R. (1999). High-Level Production of Heterologous Protein by Engineered Yeasts Grown in Cottage Cheese Whey . *Applied and Environmental Microbiol*. Vol. 65: (6), 2745-2747.

Merino P. (1992). Tesis Doctoral. Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gen *pac* y su producto, la enzima penicilino acilasa de *Escherichia coli*. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem*. 13:420-428.

Ospina, S.S., López-Mungía, A., González, R.L. y Quintero, R. (1992). Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53:205-214.

Porro, D.; Martegani, E.; Ranzi, B. M. (1992). Lactose\ whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 799-805.

Quintero R. (1987). Ingeniería Bioquímica .Teoría y aplicaciones. Editorial Alambra Mexicana; Cap. 3.

Qureshi, N., Maddox, I.S.(2003). Production of butanol from concentrated lactose/whey permeate using *Clostridium acetobutylicum* and removal by perstraction. 25th Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals. Paper No. 3-10.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. y Quintero, R. (1994a). Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Proc. Biochem.* 29: 197-206.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. y López-Munguía, A. (1994b). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16:895-903.

Ramírez MA.O., Rivas N. (2003). Production and partial characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Arch Latinoam Nutr.* 53(2):194-201.

Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G. y Branlant, C. (1993). Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC11105. *Biotech. Bioeng.* 41, 14-24. *Current Microbiol.* 29, 263-268.



Rossano R, D'Elia A, Riccio P. (2001). One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite--a flexible procedure suitable for small- and medium-scale preparations. *Protein Expr Purif.* 21(1):165-9.

Roukas, T., (1999). Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22(6):617-621.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Shömer, U., Segner, A. y Wagner, F. (1984). Penicillin acylase from the hybrid strain *E. coli* 5K(pHM12): enzyme formation and hydrolysis of  $\beta$ lactam antibiotics with whole cells. *Appl. Environ. Microbiol* 41: 307-312.

Sizmann D., Keilman C., and Böck A. (1990). Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *E. coli*. ATCC 11105. *Eur.J.Biochem.* 192: 143-151.

Terrel, S. L.; Bernard, A.; Bailey, R. B. (1984). Ethanol from whey: continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 577-580.

Terreni, M., Pagani, G., Ubiali, D., Fernandez-Lafuente, R., Mateo, C., Guisan, J.M.(2001). Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic síntesis of cephamandole form cephalosporin C. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2429-2432.

Varela, H., Ferrari, M.D., Loperena, L. Y Lareo, C. (1992). Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiol.* 8(1):14 – 20.

Valle, F., Balbás, P., Merino, E. y Bolívar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature and industry. *Trends in Biochem Sci.* 16: 36-40.

Vrudhula, V.M., Senter, P.D., Fisher, K.J., Wallace, P.M. (1993). Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate. *J. Med. Chem.* 2: 919-923.

Viitanen M., Vasala A., Neubauer P. y Alatosava T. (2003). Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbiol C. Factories*. [www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2](http://www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2).

Yang, S.L., Wu, R.P., Wang, J.X., He, J.S. y Zhang, S.B. (1988). Cloning and expression of the penicillin acylase gene. III. Temperature regulates the expression of the penicillin acylase gene at transcriptional level. *Chin. J. Biotechnol.* 4: 32-37.

Youshko, M.I., Van Langen, L.M., Vroom, E., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K. (2001). Highly efficient synthesis of ampicillin in a aqueous solution precipitate system: repetitive addition of substrates in a semicontinuous process. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 426-430.

## APÉNDICES

### Apéndice A

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

##### **A.1 Kanamicina (35 mg/μL).**

Se disuelven 0.0448 g de kanamicina (Sigma) en 1 mL de agua destilada. La solución se esteriliza en frío a través de un filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. La solución estéril se almacena en refrigeración a 4 ° C y se reemplaza cada mes.

##### **A.2 PDAB (p-dimetil-aminobenzaldehído)**

Se disuelven 10 g de reactivo PDAB en 50 mL de etanol al 60 % (v/v), luego agregar 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y aforar a 1 L con etanol al 60 % (v/v).

##### **A.3 Penicilina G al 20%.**

Disolver 0.2 g de penicilina G (Sigma) en 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.8.

##### **A.4 6-APA (ácido 6-aminopenicilánico).**

Se disuelven 2.5 g de reactivo 6-APA por L de buffer de fosfatos a pH 7.8.

##### **A.5 Buffer de fosfatos a pH 7.8.**

Mezclar 42.5 mL de una solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M y 457.5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M. Ajustar pH con ácido fosfórico y aforar a 1 L .

##### **A.6 Reactivo DNS**

Se disuelve 1 g de NaOH (Baker), 20 g de tartrato de sodio y potasio, 0.05 g de metabisulfito de sodio y 0.2 g de fenol en 60 mL de agua destilada. Se agrega 1 g de ácido 3-5-dinitrosalicílico (Sigma) a la solución y se afora a 100 mL. Se mantiene en refrigeración y protegido de la luz.

### **Reactivo E**

Se prepara por separado las siguientes soluciones:

- A) Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en agua destilada.
- B) Solución de tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada.
- C) Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N

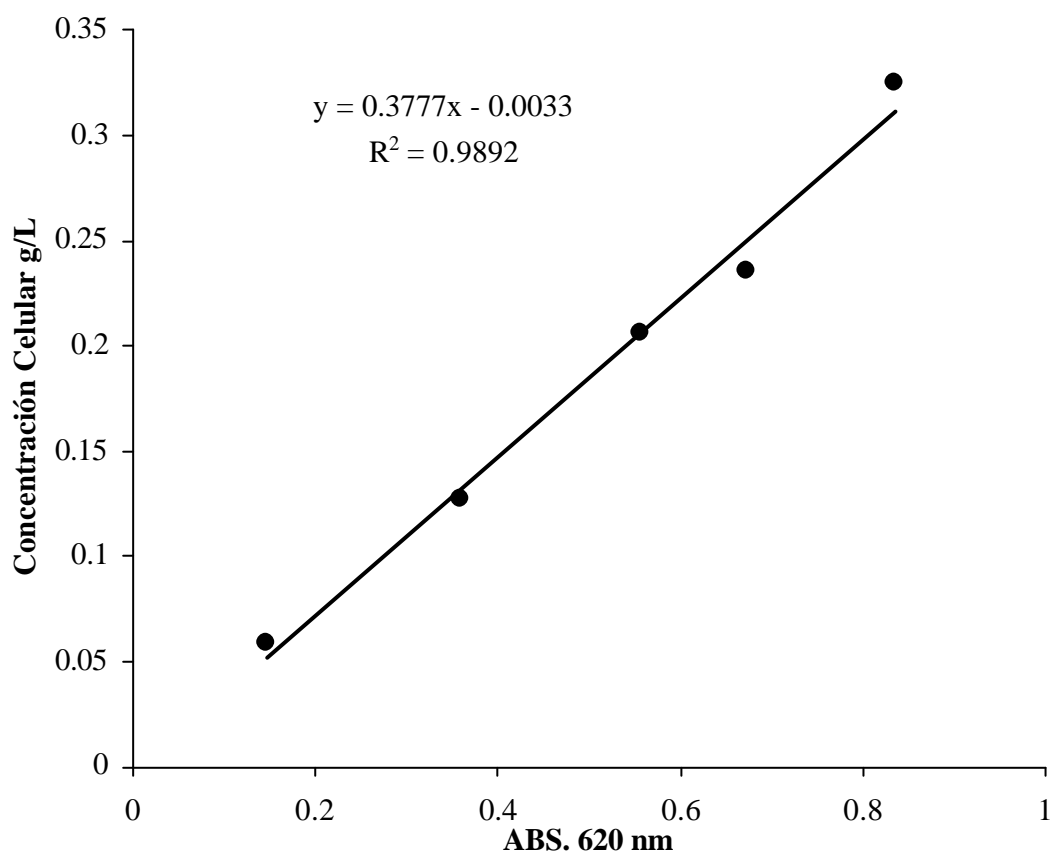
Para preparar 100 mL de reactivo E se mezcla 1 mL de la solución A), 1 mL de la solución B y 98 mL de la solución C. El reactivo se almacena a 4 ° C y protegido de la luz.

## Apéndice B

### B .1. Curva estándar de concentración celular (peso seco)

**Tabla. B.1.** Datos para la construcción de la curva peso seco

Muestra	1	2	3	4	5
Vol. de muestra (L)	0.2	0.098	0.1	0.05	0.048
Peso seco (g)	0.0126	0.0112	0.0207	0.0119	0.01568
Abs. 620 nm.	0.1469	0.3578	0.5566	0.6723	0.8346
Conc. celular (g/L)	0.063	0.1143	0.207	0.238	0.3266

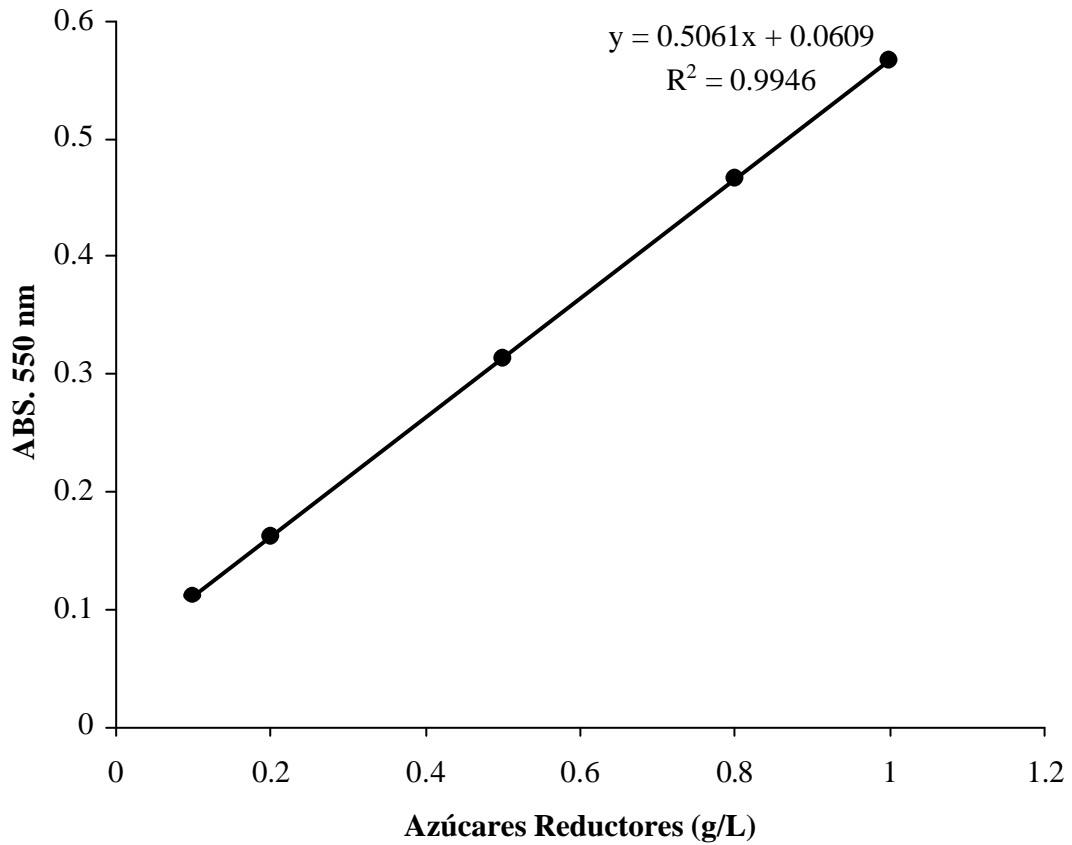


**Fig.B.1.** Determinación de concentración celular.

**B.2 Curva estándar de azúcares reductores por el método del ácido di-nitrosalicílico (DNS).**

**Tabla.B.2.** Datos para la construcción de la curva.

TUBO		1	2	3	4	5
Estd. lactosa (g/L)	0	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0
Conc. Lactosa (g/L)	----	0.0837	0.13081	0.4315	0.76276	0.96815
Vol. de muestra (µL)	----	250	250	250	250	250
Reactivo DNS (µL)	500	500	500	500	500	500
Agua (mL)	4.25	4	4	4	4	4
Abs. 550 nm	---	0.0116	0.0354	0.1876	0.35525	0.4592



**Fig.B.2.** Determinación de lactosa.

### B.3 Curva Estándar para la Determinación de Actividad Enzimática de PA.

Tabla B.3. Datos de construcción de la curva.

TUBO	6-APA(mg/mL)	Alícuota	Etanol abs.	PDAB	PBS pH 7.8	d.o.415 nm
(BCO)1	0	0	0.96	0.5	0.04	0
2	0.078	0.04	0.96	0.5	0	0.0345
3	0.1562	0.04	0.96	0.5	0	0.074
4	0.3135	0.04	0.96	0.5	0	0.1475
5	0.625	0.04	0.96	0.5	0	0.2865
6	1.25	0.04	0.96	0.5	0	0.575

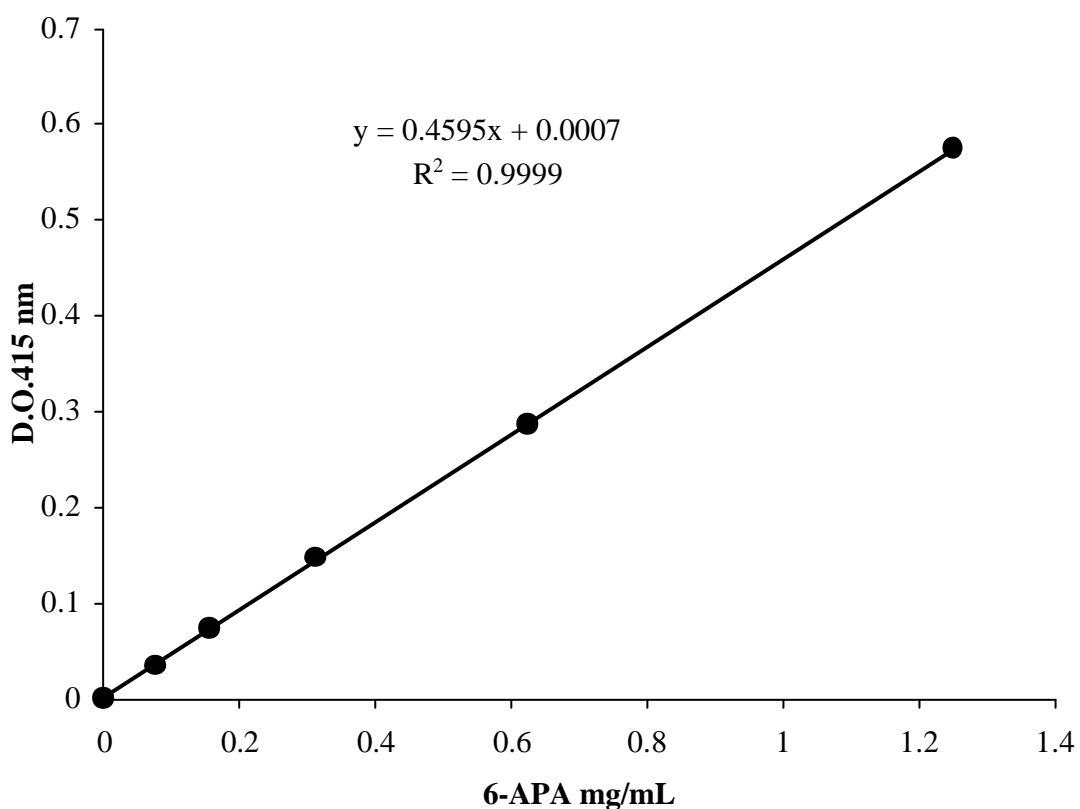
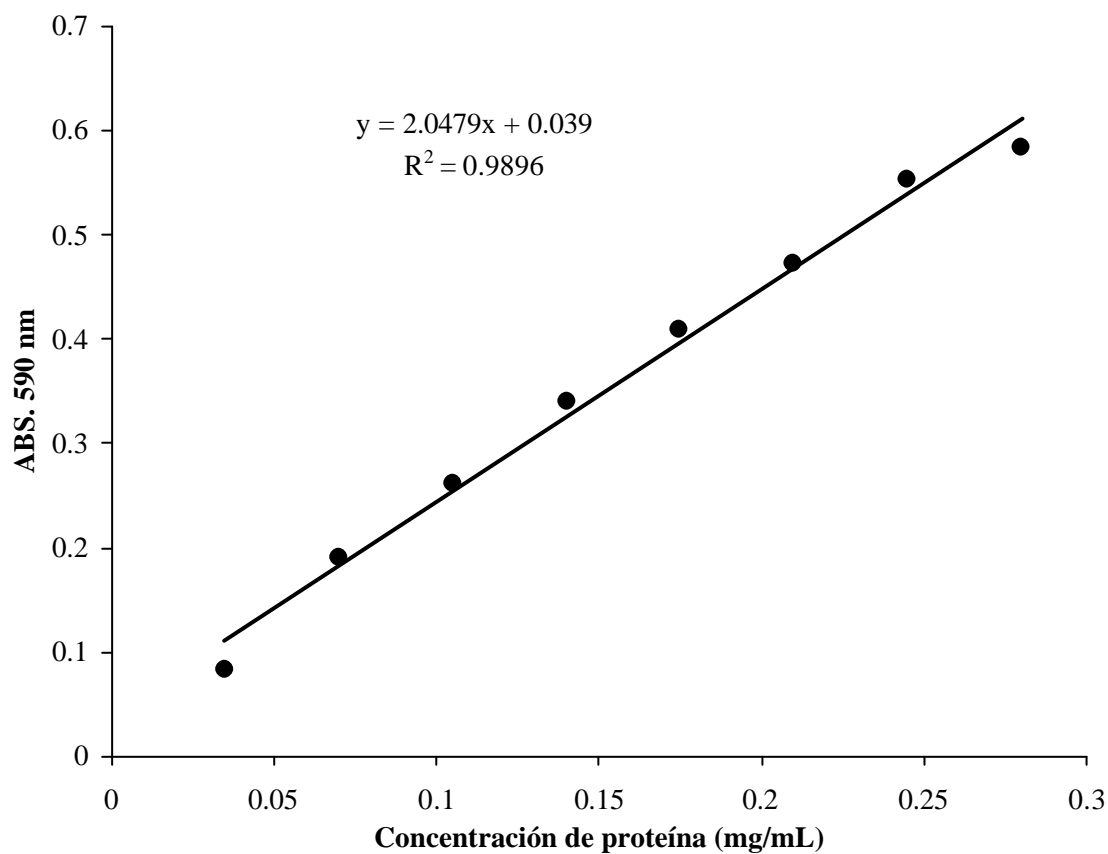


Fig. B.3 Determinación de actividad enzimática de PA.

#### B.4 Curva estándar para la determinación de proteína total.

**Tabla.B.4.** Datos para la construcción de la curva.

TUBO		1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (μL)	----	25	50	75	100	125	150	175	200
Agua (μL)	1000	975	950	925	900	875	850	825	800
Reactivo E (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Reactivo Folin (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Conc. Prot.( mg/mL)	----	0.035	0.07	0.105	0.14	0.175	0.21	0.245	0.28
Abs. 590 nm	----	0.083	0.190	0.261	0.340	0.410	0.473	0.553	0.583

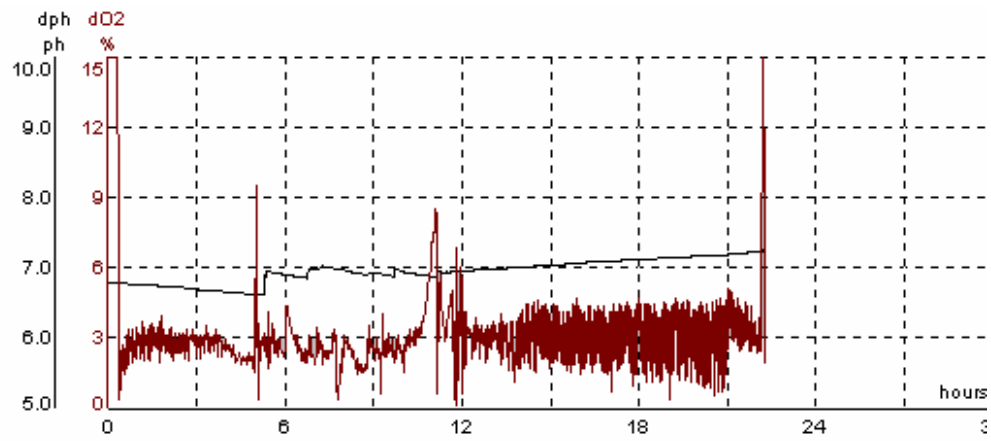


**Fig.B.4.** Determinación de proteína total.

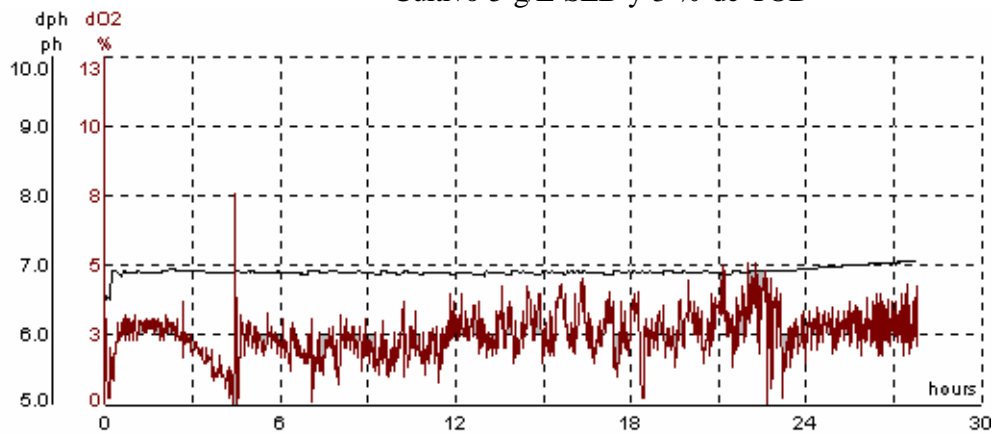


## Apéndice C

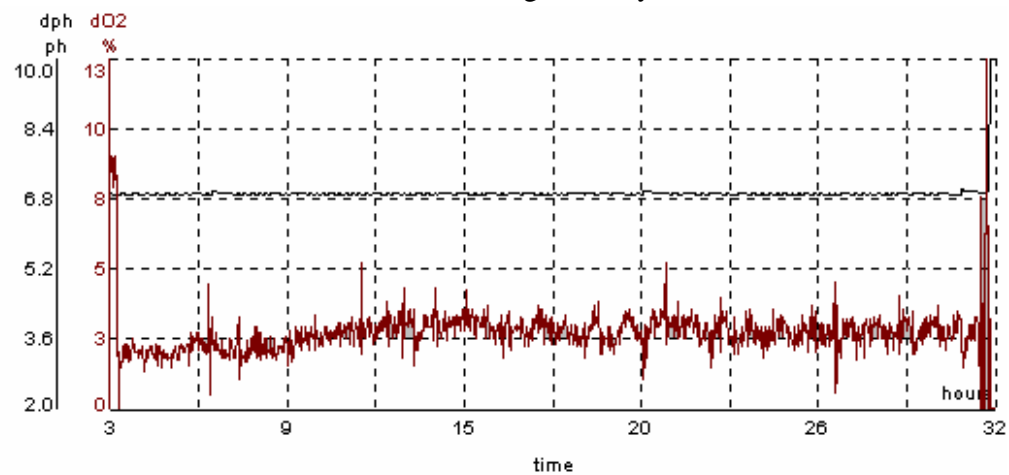
### Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor.



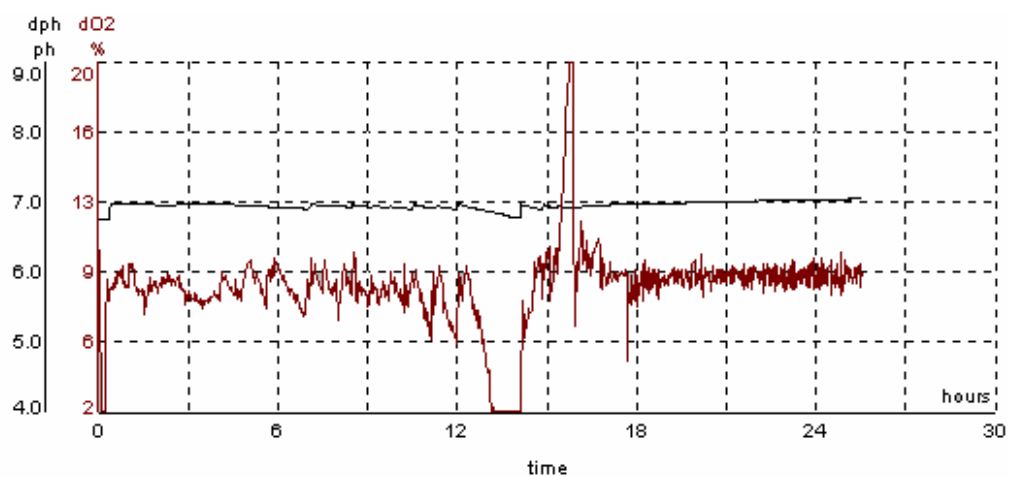
Cultivo 5 g/L SLB y 3 % de TOD



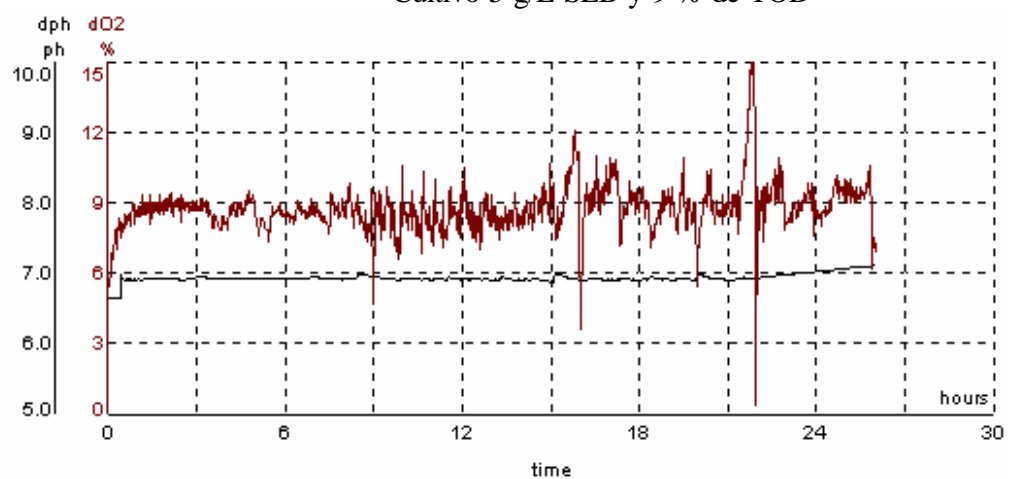
Cultivo 10 g/L SLB y 3 % de TOD



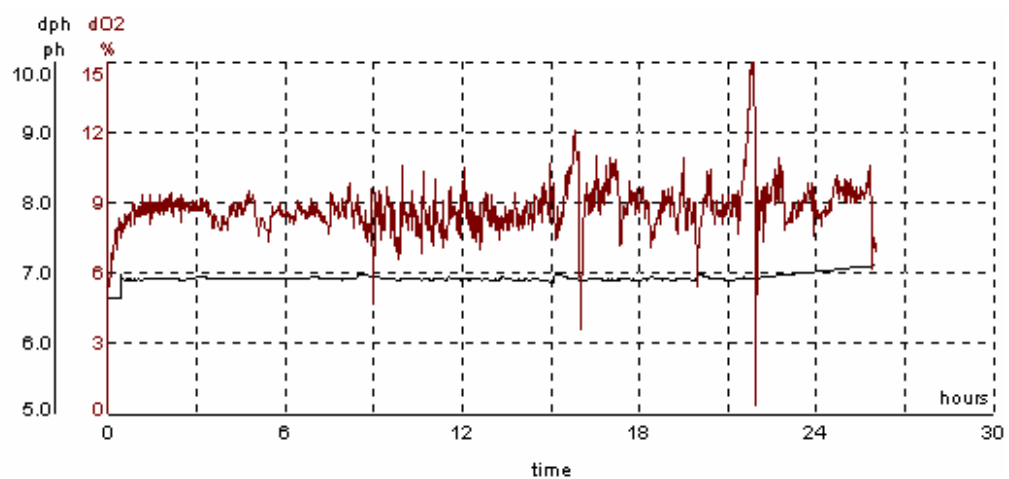
Cultivo 15 g/L SLB y 3 % de TOD



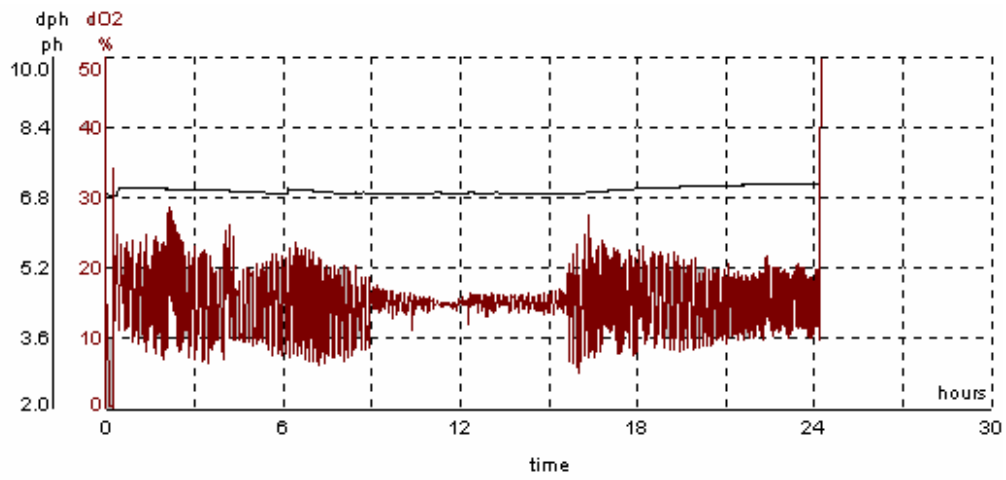
Cultivo 5 g/L SLB y 9 % de TOD



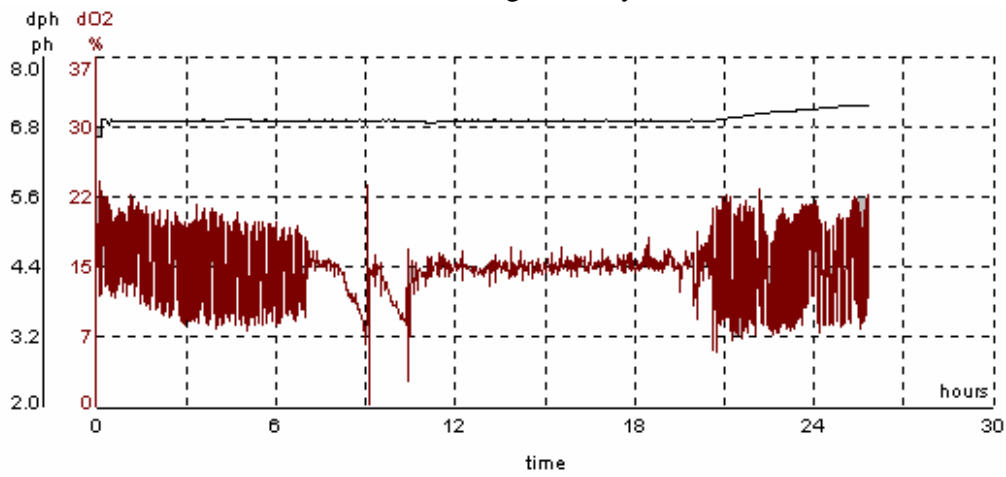
Cultivo 10 g/L SLB y 9 % de TOD



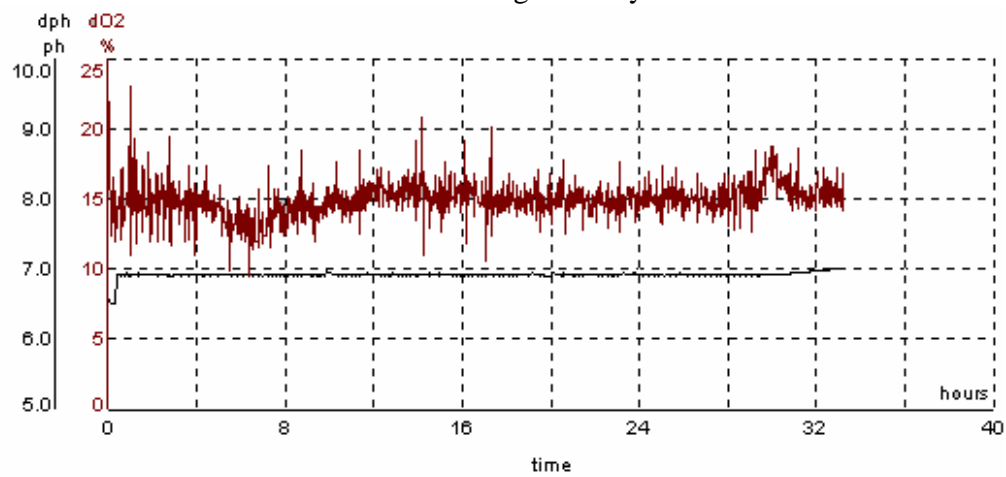
Cultivo 15 g/L SLB y 9 % de TOD



Cultivo 5 g/L SLB y 15 % de TOD

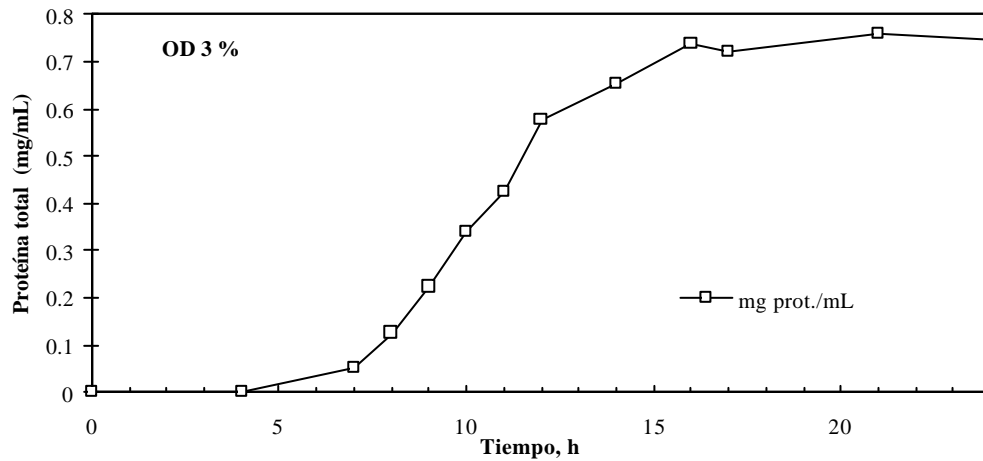
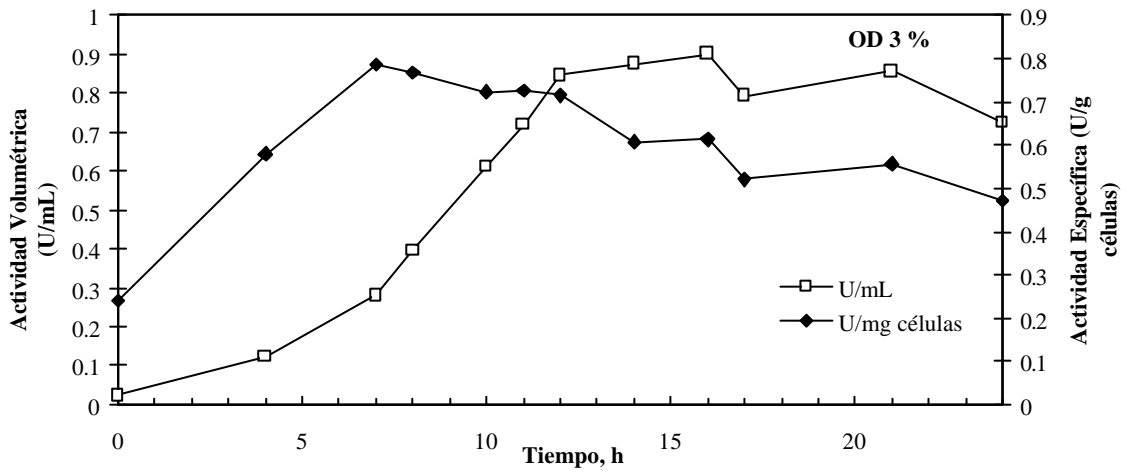
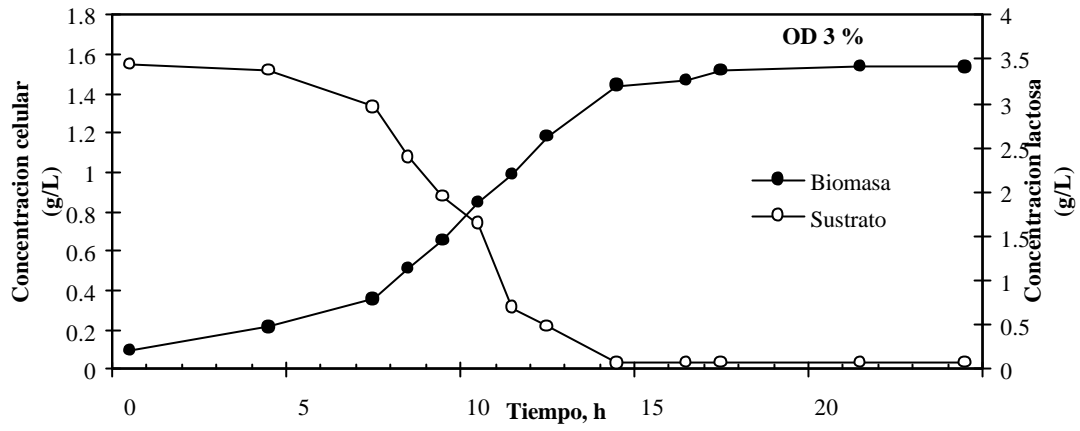


Cultivo 10 g/L SLB y 15 % de TOD

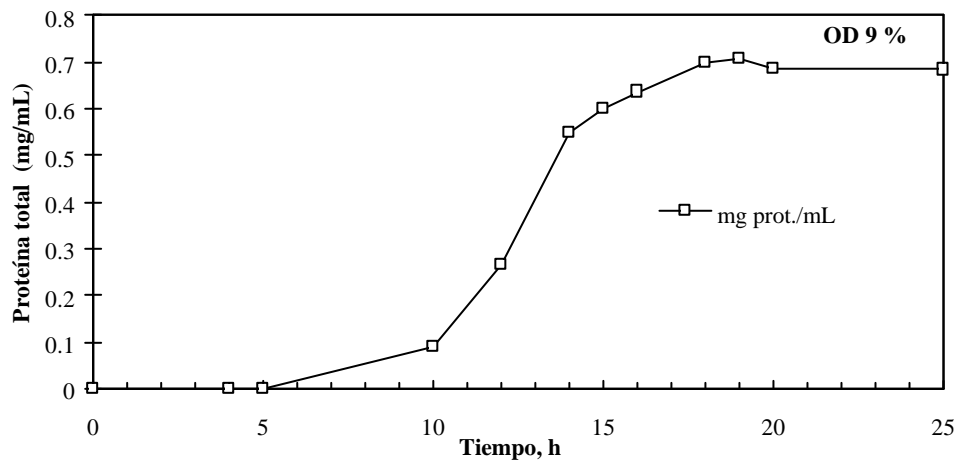
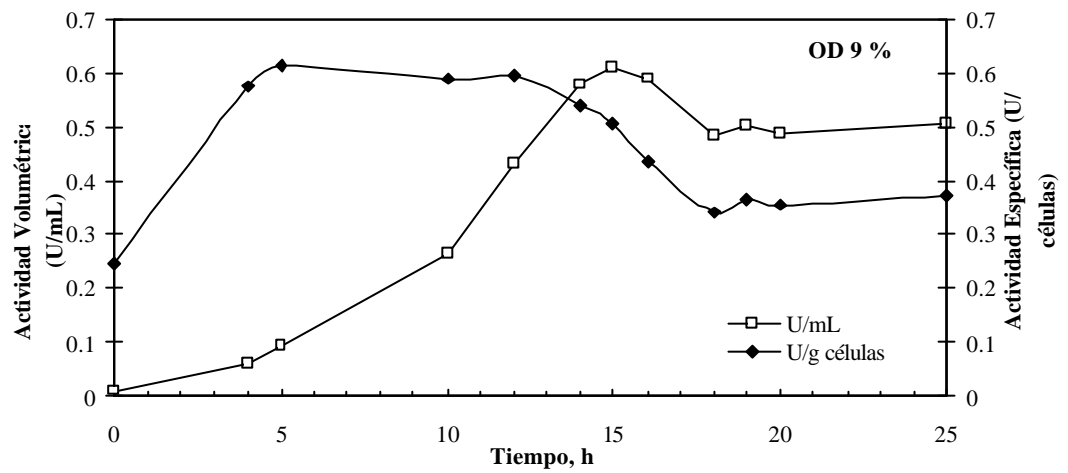
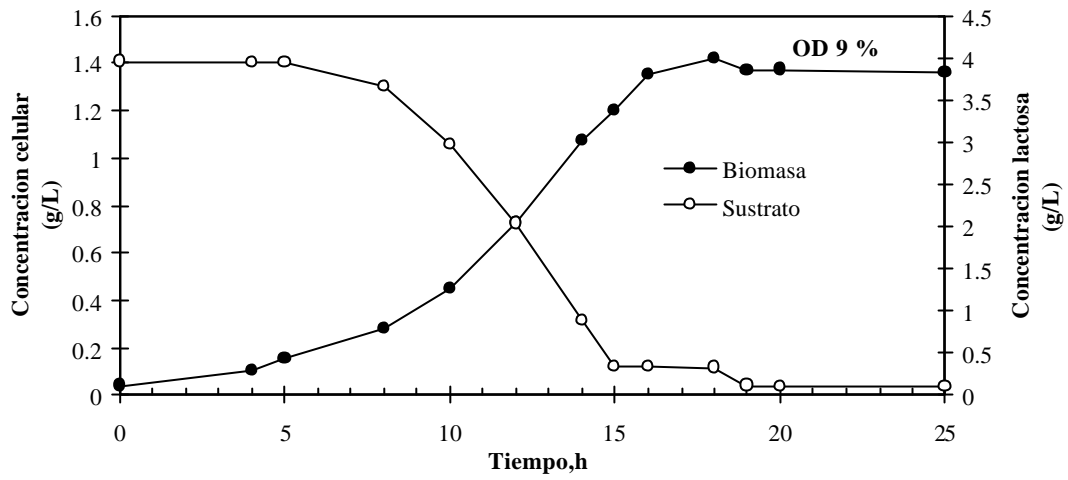


Cultivo 15 g/L SLB y 15 % de TOD

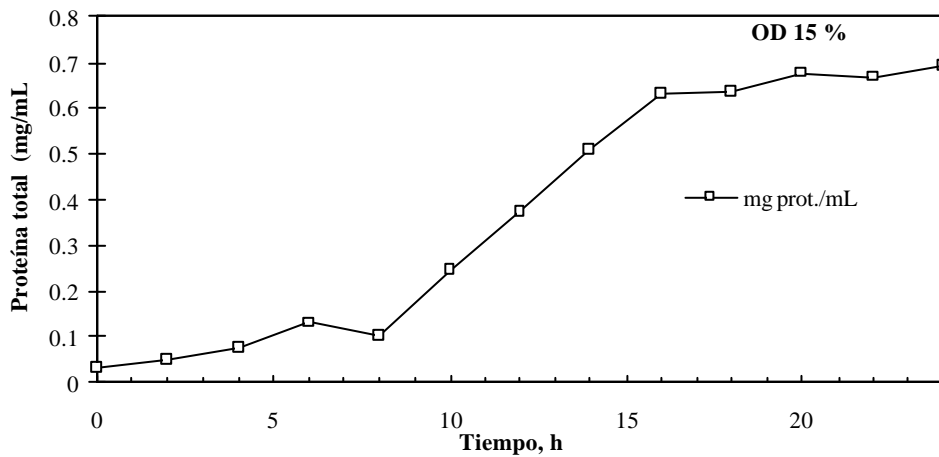
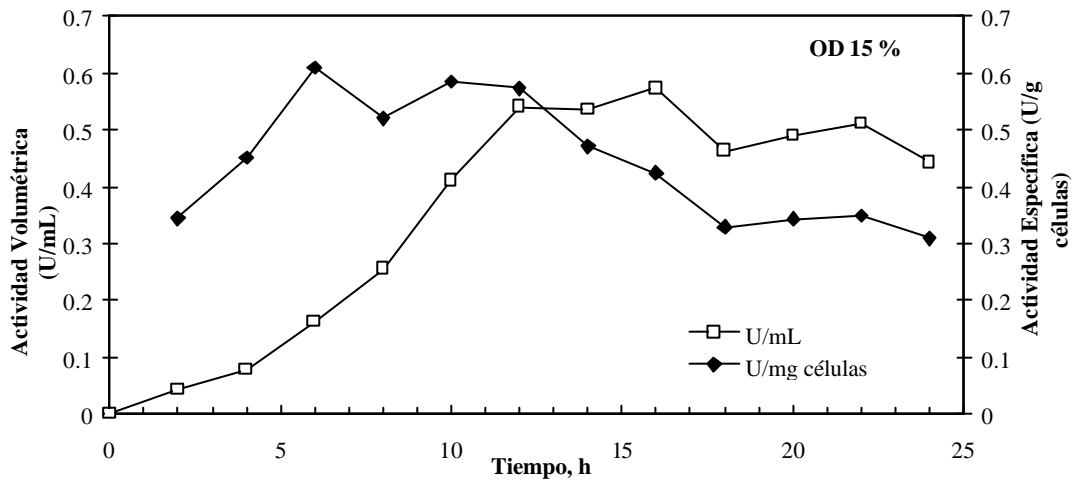
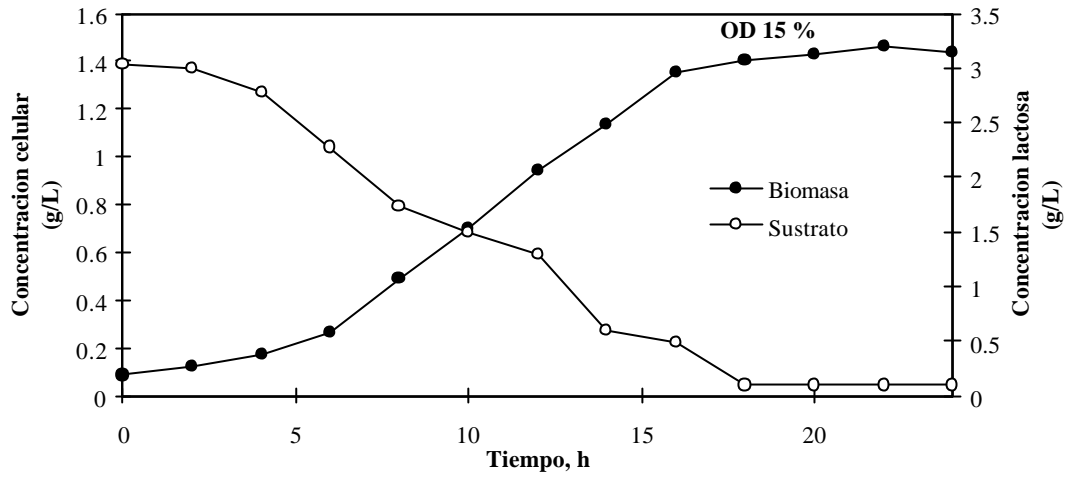
## APÉNDICE D



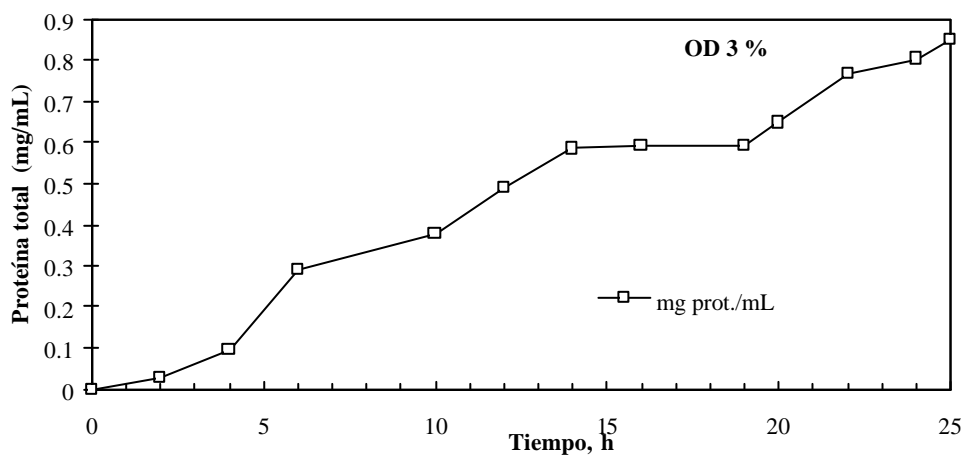
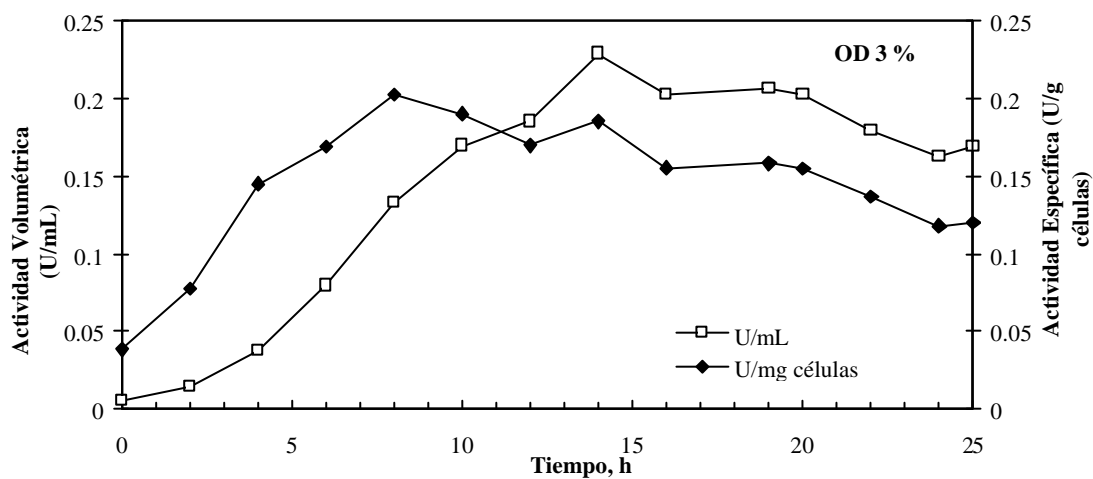
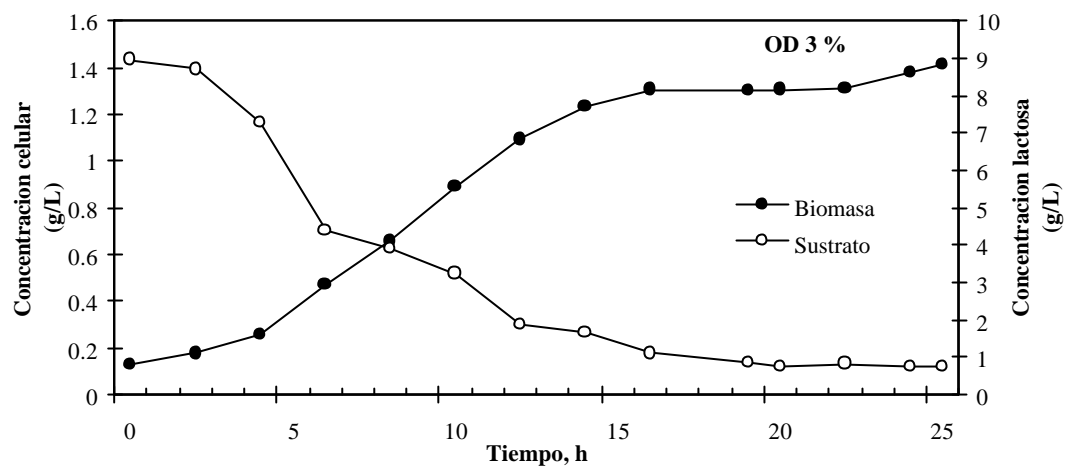
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



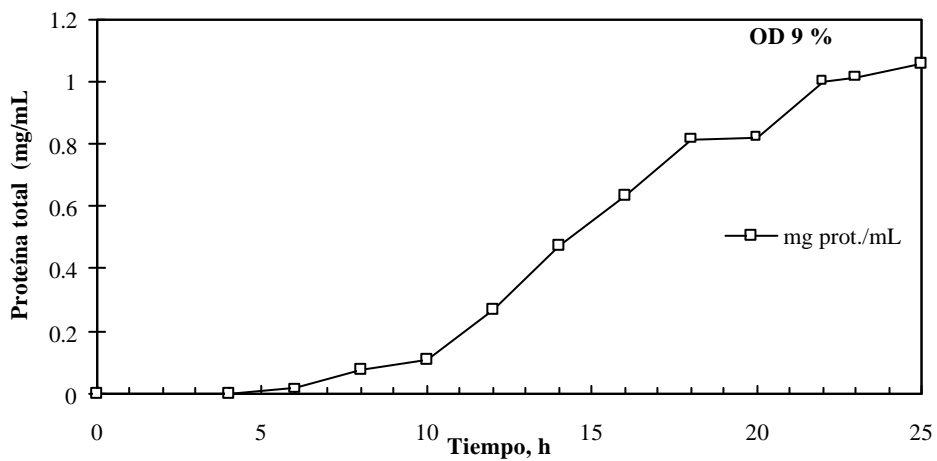
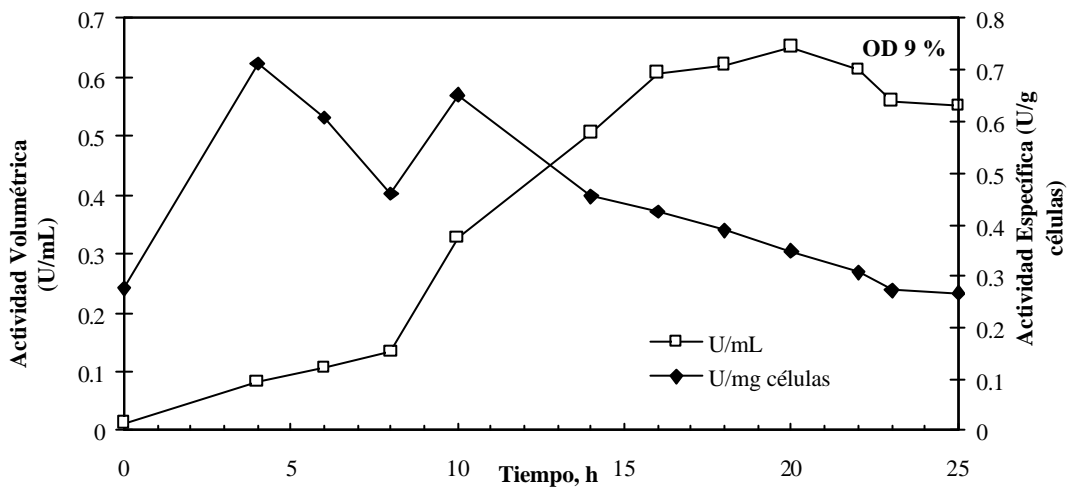
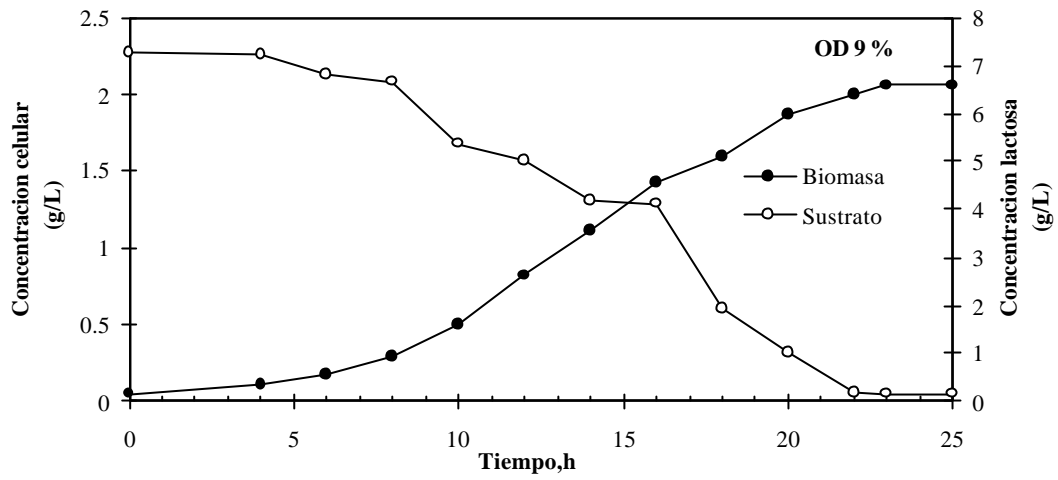
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**

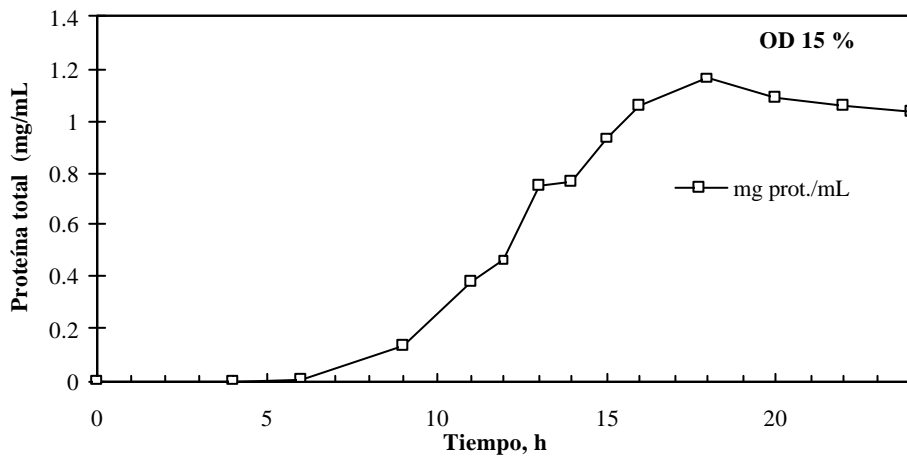
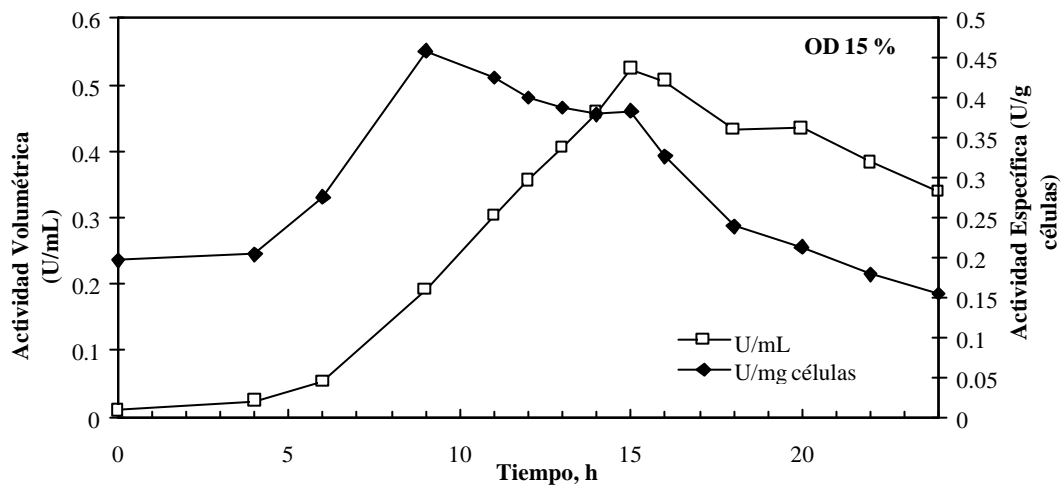
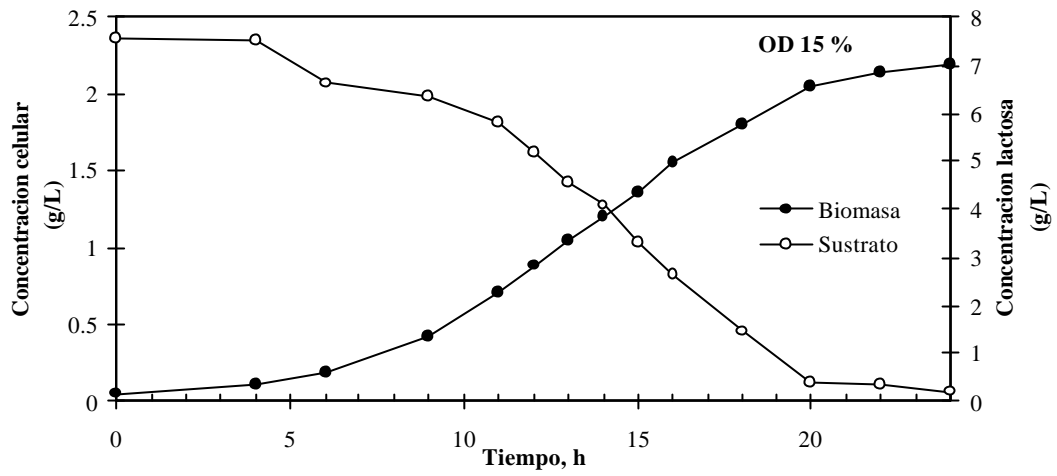


**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**

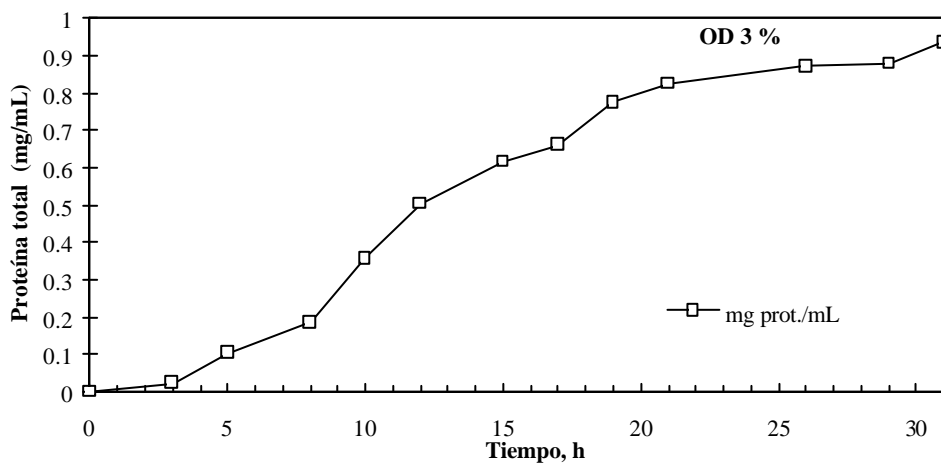
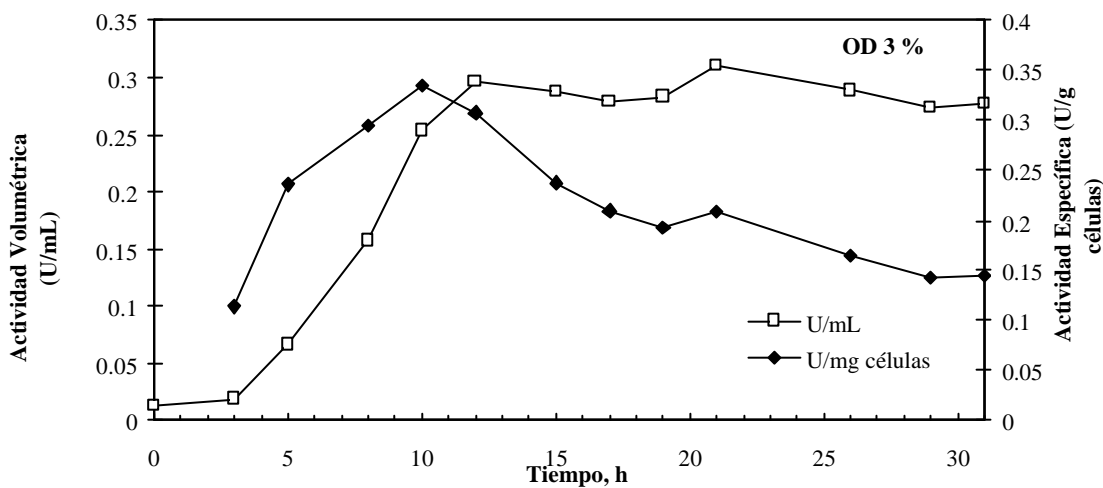
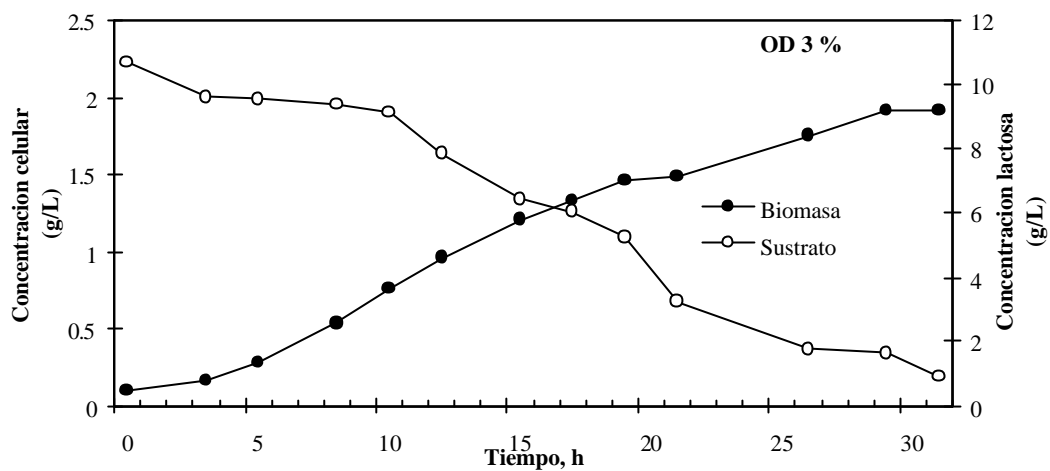


**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**

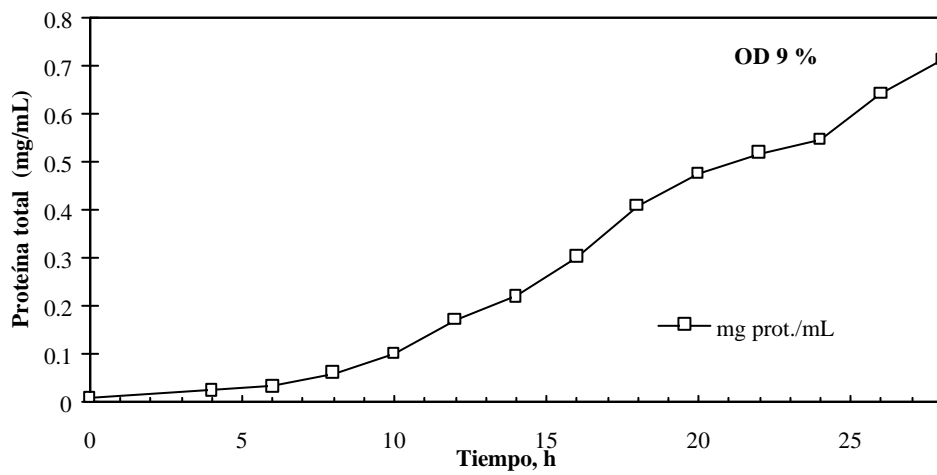
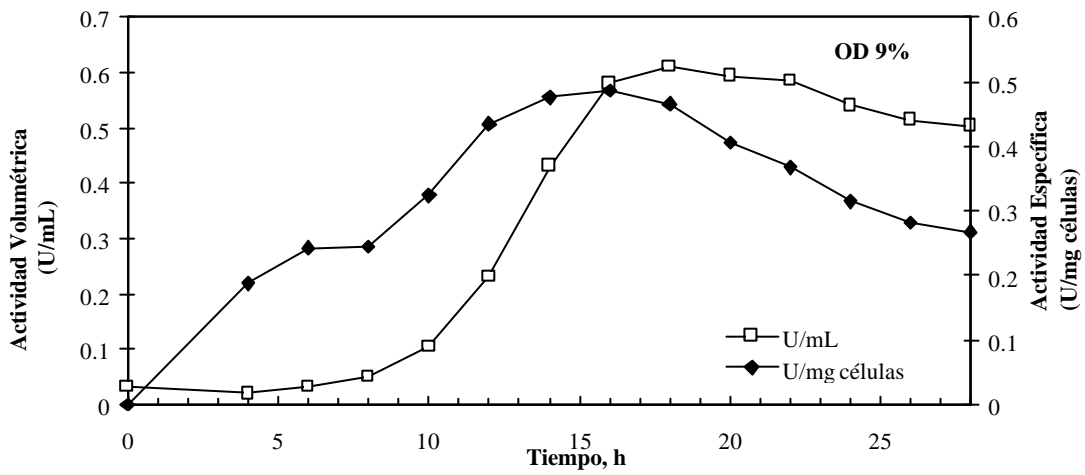
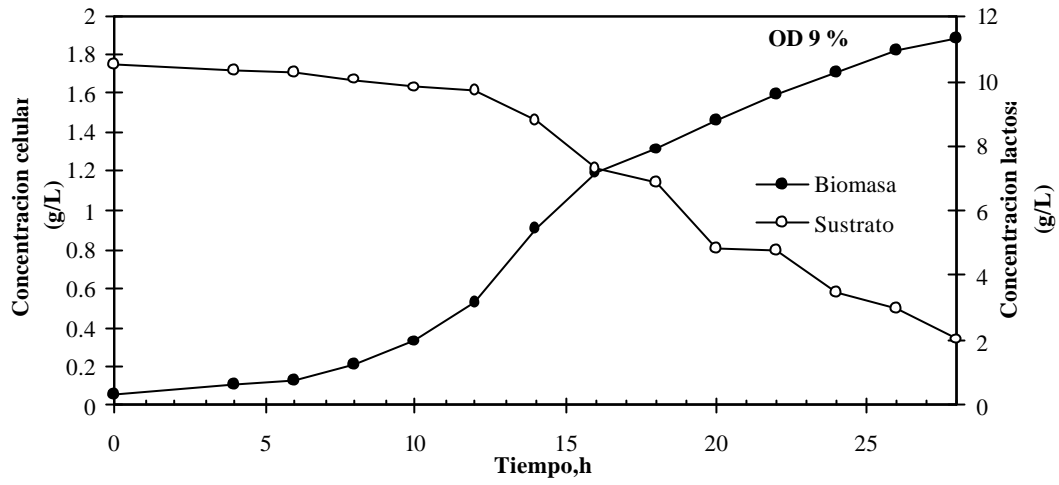




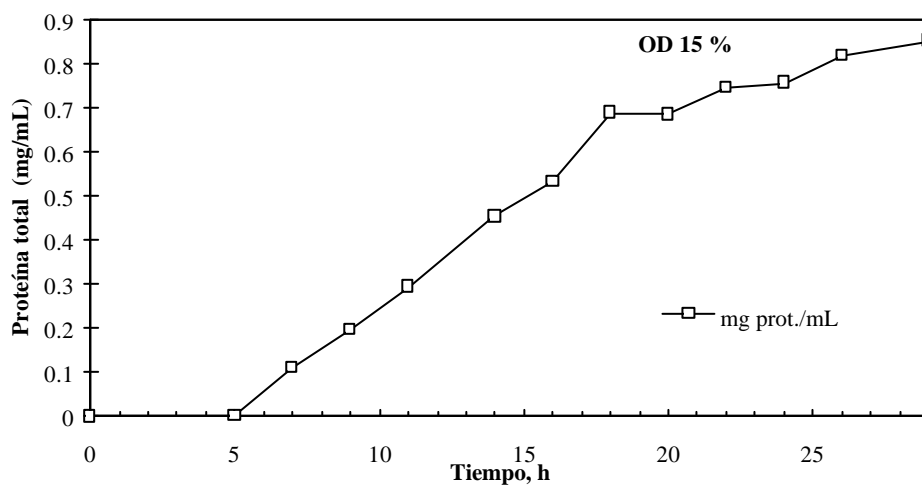
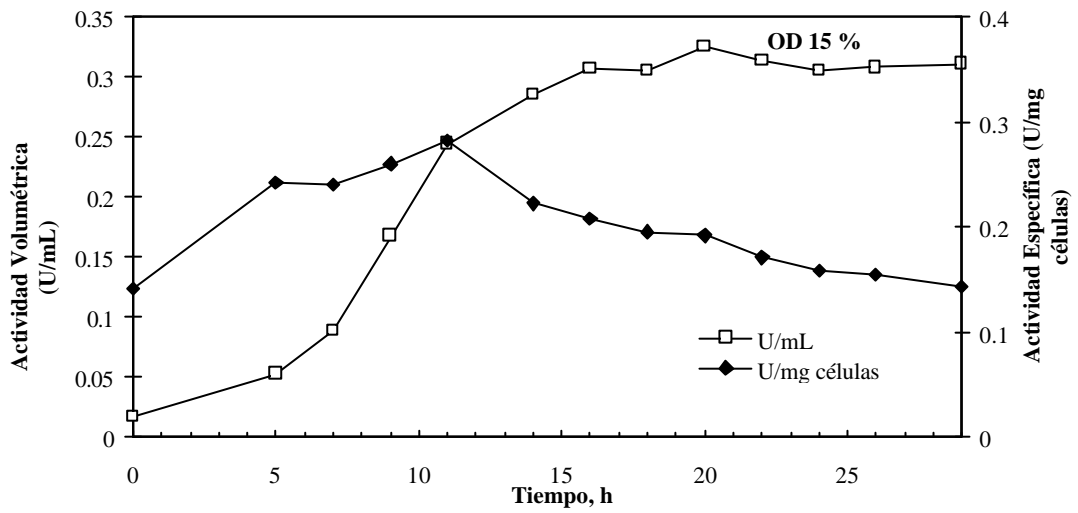
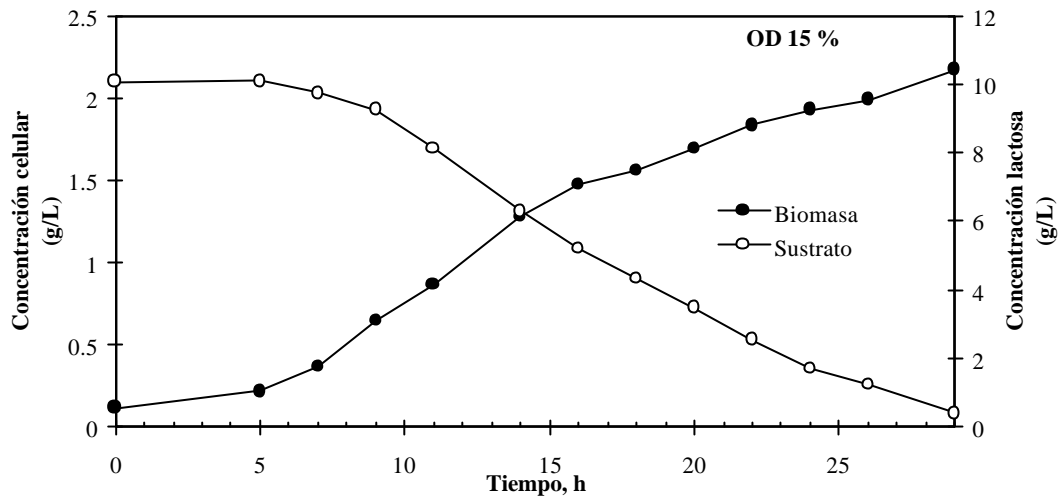
**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



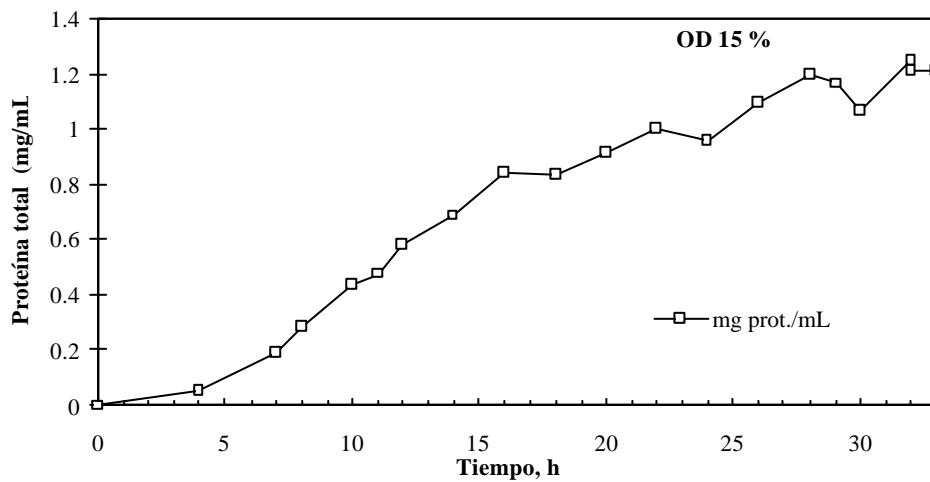
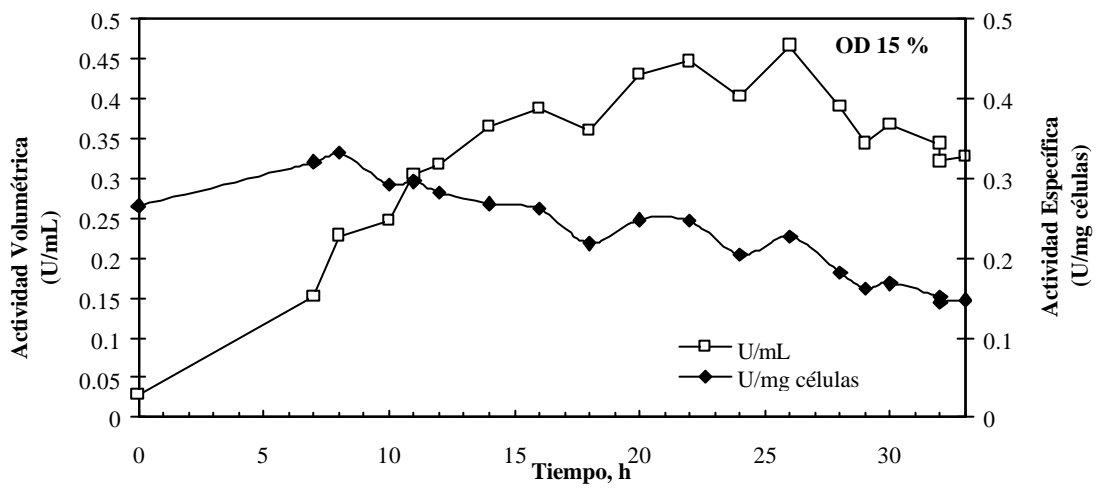
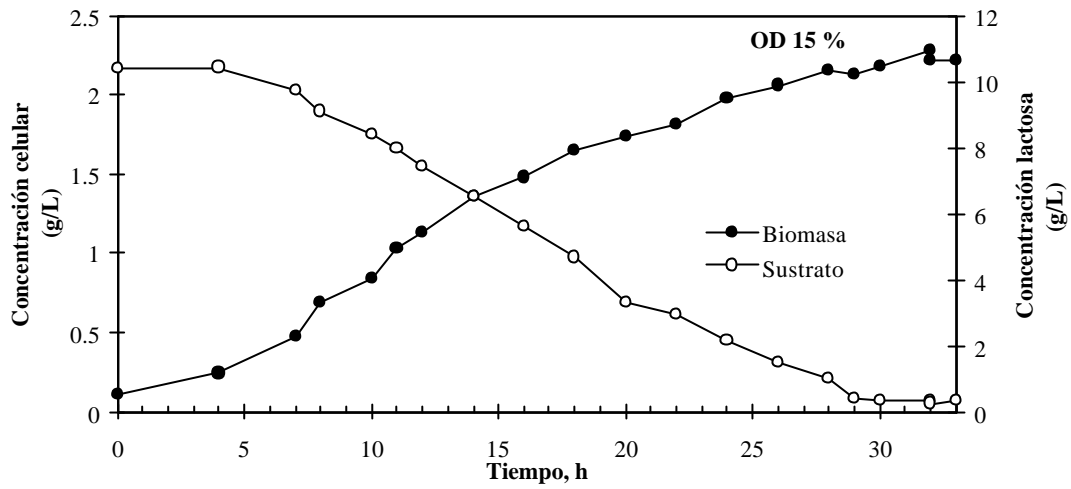
**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE (RÉPLICA)**

San Luis Potosí, S.L.P. a 09 de Septiembre del 2005

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.  
Coordinador Académico de la  
División de Biología Molecular.  
IPICYT

PRESENTE.

Por medio de la presente le informamos que, después de haber revisado el trabajo de Tesis de Maestría de la estudiante Dulce María Rivera Pastrana, no encontramos inconveniente alguno para que pueda llevarse a cabo el Examen de Grado ante un jurado.

Atentamente,

**Comité Tutorial**


Dr. Antonio De León Rodríguez.  
Prof. Investigador de la División de Biología Molecular.  
IPICYT



Dr. Elías Razo Flores.  
Jefe de la División de Ingeniería Ambiental y  
Manejo de Recursos Naturales Renovables, IPICYT.



Dr. Jorge Alberto Ramírez Téllez.  
Catedrático de la Lic. en Ingeniería en Alimentos.  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la asesoría 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) a través del financiamiento de investigación básica 39639/A-1(2003-2006). De manera personal se contó con la beca 185800 del CONACyT.

# CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE ECUACIONES	v
NOMENCLATURA	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Tratamiento del suero de leche	1
1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones	2
1.3. Fermentaciones de suero de leche con organismos genéticamente modificados	5
1.4. Penicilino Acilasa como modelo de estudio	7
1.4.1. Penicilino Acilasa	7
1.4.2. Acción catalítica de la Penicilino Acilasa	7
1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en <i>E. coli</i> .	8
1.5. Efecto de las condiciones del proceso en la producción de penicilino acilasa en <i>E.coli</i> recombinante	9
1.6. Metabolismo de lactosa	10
1.7. Operón <i>lac</i>	11
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	12
2.1. Cultivo tipo lote	12
2.2. Velocidad específica de crecimiento	12
2.3. Definición de rendimiento	13
2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato	13
2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa	14
3. OBJETIVOS	15



<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. Sistema de Fermentación	16
4.2. Cepas Bacterianas	18
4.3. Medios de cultivo	18
4.3.1. Medio mínimo M9	18
4.4. Inóculos	19
4.5. Conservación de las cepas	19
4.6. Vector de expresión de PA (pPA102) en <i>E.coli</i>	20
4.7. Aislamiento del plásmido pPA102	20
4.8. Transformación de la cepa de expresión	20
4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA.	21
4.10. Estrategia Experimental	21
4.11. Diseño experimental	23
4.12. Métodos analíticos	24
4.12.1. Tratamiento de las muestras	24
4.12.2. Determinación de concentración celular	24
4.12.3. Determinación de lactosa	24
4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA	25
4.12.5. Determinación de proteína total	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo	28
5.2. Selección de la cepa de expresión	28
5.3. Selección de clona sobreproductora de PA	30
5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos	31
5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental	34
5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA	37
5.7. Eficiencia del suero de leche en la expresión de enzimas recombinates en <i>E. coli</i>	38

5.8. Efecto de la velocidad específica de crecimiento y OD en la producción de PA	38
5.9. Análisis de varianza	40
5.9.1. ANOVA del rendimiento $Y_{P/X}$	40
5.9.2. ANOVA del rendimiento $Y_{X/S}$	42
5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células)	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7. REFERENCIAS	48
APÉNDICES	55
Apéndice A. Preparación de soluciones	55
Apéndice B. Curvas Estándar	57
B.1. Curva estándar para la determinación de la concentración celular	57
B.2. Curva estándar para la determinación de lactosa	58
B.3. Curva estándar para la determinación de actividad enzimática de PA	59
B.4. Curva estándar para la determinación de proteína total	60
Apéndice C. Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor	61
Apéndice D. Cinéticas de los cultivos en reactor	64

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Fig. 1.1. Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA</b>	<b>7</b>
<b>Fig. 1.2. Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA</b>	<b>8</b>
<b>Fig. 1.3. Reacción de degradación del disacárido lactosa</b>	<b>10</b>
<b>Fig. 1.4. Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón lac por el represor I</b>	<b>11</b>
<b>Fig. 4.1. Sistema de fermentación</b>	<b>17</b>
<b>Fig. 4.2. Representación del vector de expresión pPA102</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 4.3 Estrategia experimental</b>	<b>22</b>
<b>Fig. 5.1. Curva de crecimiento de la cepa W3110/pPA102</b>	<b>29</b>
<b>Fig. 5.2. Gel de electroforesis de ADN plasmídico de posibles transformantes</b>	<b>30</b>
<b>Fig. 5.3. Actividad específica máxima en las clonas 21,23,24 y 14 de W3110/pPA102</b>	<b>31</b>
<b>Fig. 5.4. Valores máximos promedio de actividad en diferentes fuentes de carbono</b>	<b>33</b>
<b>Fig. 5.5. Cinética de cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD</b>	<b>35</b>
<b>Fig. 5.6. Superficie de respuesta del rendimiento de producto por biomasa</b>	<b>41</b>
<b>Fig. 5.7. Superficie de respuesta del rendimiento de sustrato por biomasa</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 5.8. Superficie de respuesta de la actividad enzimática específica de PA</b>	<b>45</b>
<b>Fig. B.1. Curva estándar de concentración celular</b>	<b>57</b>
<b>Fig. B.2. Curva estándar de concentración de lactosa</b>	<b>58</b>
<b>Fig. B.3. Curva estándar de actividad enzimática</b>	<b>59</b>
<b>Fig. B.4. Curva estándar de proteína total</b>	<b>60</b>

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1. Fermentaciones donde se ha utilizado el SLB</b>	<b>4</b>
<b>Tabla 1.2. Fermentaciones a partir de SLB con organismos genéticamente modificados</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 4.1. Composición del medio mínimo M9</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 4.2. Composición del medio LB kanamicina</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 4.3. Variables y niveles del diseño experimental</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 5.1. Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5.2. Genotipo de la cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5.3. Actividad máxima promedio de PA con diferente fuente de carbono</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 5.4. Resumen de rendimientos y actividad de PA obtenidos en los experimentos en reactor</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 5.5. Análisis de varianza de <math>Y_{P/X}</math></b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5.6. Análisis de varianza de <math>Y_{X/S}</math></b>	<b>42</b>
<b>Tabla 5.7. Análisis de varianza de actividad específica</b>	<b>44</b>
<b>Tabla B.1. Elaboración de curva estándar para la determinación de biomasa</b>	<b>57</b>
<b>Tabla B.2. Elaboración de curva estándar para la determinación de lactosa</b>	<b>58</b>
<b>Tabla B.3. Elaboración de curva estándar de actividad enzimática de PA</b>	<b>59</b>
<b>Tabla B.4. Elaboración de curva estándar para la determinación de proteína</b>	<b>60</b>
 <b>INDICE DE ECUACIONES</b>	
<b>(2-1) Ecuación de velocidad de crecimiento</b>	<b>12</b>
<b>(2-2) Ecuación de rendimiento biomasa por sustrato</b>	<b>13</b>
<b>(2-3) Ecuación de rendimiento producto por biomasa</b>	<b>14</b>
<b>(4-1) Cálculo de actividad enzimática volumétrica de PA</b>	<b>26</b>
<b>(5-1) Ecuación de mejor ajuste para <math>Y_{P/X}</math></b>	<b>40</b>
<b>(5-2) Ecuación de mejor ajuste para <math>Y_{X/S}</math></b>	<b>42</b>
<b>(5-3) Ecuación de mejor ajuste para actividad específica de PA (U/mg células)</b>	<b>44</b>

## NOMENCLATURA

<b>6-APA</b>	<b>Ácido 6-aminopenicilánico</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>AFA</b>	<b>Ácido fenilacético</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina de suero bovina</b>
<b>DQO</b>	<b>Demanda química de oxígeno</b>
<b>DNS</b>	<b>Ácido dinitrosalicílico</b>
<b><i>Gal</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de cepa capaz de metabolizar galactosa</b>
<b>I</b>	<b>Represor del operón <i>lac</i></b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropil tio-β-D-galactopiranosido</b>
<b>KB</b>	<b>Kilopares de bases de ADN</b>
<b>K<sub>m</sub></b>	<b>Kanamicina</b>
<b>LB</b>	<b>Medio de cultivo ampliamente utilizado</b>
<b><i>Lac</i></b>	<b>operón o conjunto de genes para el metabolismo de lactosa</b>
<b><i>Lac</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de una cepa capaz de metabolizar lactosa</b>
<b>M9</b>	<b>Medio mínimo de cultivo frecuentemente utilizado</b>
<b>OD</b>	<b>Oxígeno disuelto</b>
<b>PA</b>	<b>Penicilino acilasa</b>
<b><i>pac</i></b>	<b>Gen que codifica a la enzima penicilino acilasa</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer de fosfatos</b>
<b>PDAB</b>	<b>p-dimetilaminobenzaldehido</b>
<b>pPA102</b>	<b>Plásmido para la expresión de penicilino acilasa</b>
<b>SLB</b>	<b>Suero de leche bovino</b>
<b>sppac</b>	<b>Péptido señal de penicilino acilasa</b>
<b>X</b>	<b>Concentración celular o biomasa</b>
<b>Y<sub>P/S</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por sustrato</b>
<b>Y<sub>P/X</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por biomasa</b>
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	<b>Rendimiento de biomasa por sustrato</b>
<b>μ</b>	<b>Velocidad específica de crecimiento</b>

## RESUMEN

El suero de leche bovino (SLB) es un residuo industrial rico en lactosa, proteínas y minerales, debido a su alta carga orgánica se considera un efluente contaminante de cuerpos de agua.

Actualmente se han propuesto diversas alternativas para el tratamiento del SLB para reducir su potencial contaminante mediante la separación de proteínas y evaporación para obtener concentrados empleados como suplementos en alimentación humana y animal. Otra alternativa consiste en utilizar el suero de leche como sustrato en fermentaciones para producir etanol, ácidos orgánicos, enzimas, polímeros etc.

Las herramientas de ingeniería genética y la biotecnología permiten modificar microorganismos para su aplicación en la producción de metabolitos de interés comercial con alto valor agregado. El promotor *lac* es uno de los más utilizados para el control de expresión de productos génicos en bacterias y se induce por la presencia de lactosa o por el análogo sintético isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) el cual resulta costoso en procesos de escala industrial. La enzima penicilino acilasa se seleccionó como modelo de estudio por que se emplea a gran escala en la producción de antibióticos de nueva generación como las penicilinas semisintéticas.

Este trabajo propone la utilización del suero de leche como sustrato e inductor de la producción de penicilino acilasa como una alternativa de uso. Se seleccionó la cepa *E.coli* W3110/pPA102 para la expresión de la enzima recombinante en un medio a base de suero de leche. Se planteó un diseño experimental de bloques completos considerando dos factores concentración de suero y % oxígeno disuelto (OD) a tres niveles para evaluar la eficiencia del suero de leche (SLB) como sustrato en la producción de la enzima. Los experimentos se realizaron en un reactor de 1 L tipo lote instrumentado a 29 °C y pH 7.0. Se determinaron las condiciones óptimas para alcanzar el máximo de producción de PA (0.613 U/mg células) a 5 g/L de concentración inicial de SLB y 3 % OD de acuerdo con el análisis estadístico. Se observó inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones de sustrato (SLB). Se demostró que el SLB es utilizado de manera eficiente como sustrato e inductor en la producción de PA.

Palabras clave: proteínas recombinantes, optimización, biorreactor.

## ABSTRACT

Bovine milk whey (BMW) is an industrial disposal rich in lactose, proteins and minerals. Due to its high organic content it is considered a contaminant effluent of water bodies. Recently, several alternatives have been proposed for the treatment of BMW conducted to reduce its pollutant potential by separating proteins or by evaporation to obtain concentrates used as nutritional supplements in human and animal diets. Another alternative consist on using bovine whey as substrate in fermentations to produce ethanol, organic acids, enzymes, polymers etc.

Genetic engineering techniques and biotechnology allows modifying microorganisms for its application on the production of commercial interesting metabolites with additional market value. The *lac* promoter is one of the most employed to control the expression of gene products in bacteria and it is induced by the presence of lactose or the synthetic analogue isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) which results expensive in processes at industrial scale. The penicillin acylase (PA) enzyme has been selected as study model because it is employed on the production of new generation antibiotics at large scale such as semisynthetic penicillins.

This work suggests the application of bovine whey as substrate and inducer in the production of penicillin acylase as an alternative of use. The *E. coli* strain W3110/pPA102 was selected for the expression of the recombinant enzyme on whey based medium. A complete blocks experimental design was proposed considering two factors (BMW concentration and dissolved oxygen) at three levels to evaluate bovine whey efficiency as substrate on the production of the recombinant enzyme. The experiments were carried out in a 1L instrumented batch reactor at 29 ° C and 7.0 pH. A cellular growth inhibition effect was observed at high BMW concentrations. The optimal conditions to achieve a maximum of PA production (0.613 U/mg cells) were 5 g/L of nitial concentration of BMW and 3 % oxygen concentration according to the statistical analysis. It was proved that the BMW works efficiently as substrate and inducer on the PA production and that limited oxygen conditions improve the enzyme activity.

Keywords: recombinant proteins, optimization, bioreactor

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Tratamiento del suero de leche**

El suero de leche bovino (SLB) que se produce como residuo durante elaboración industrial del queso representa del 80 al 90 % del volumen total de leche procesada y su descarga al medio ambiente se convierte en un problema de contaminación del subsuelo y mantos acuíferos debido a su alta carga orgánica (32000 mg/L DQO) susceptible a fermentación por microorganismos patógenos y ubicuos (Marshall, 1982). A pesar de los numerosos esfuerzos para encontrar aplicaciones del SLB en cualquiera de sus formas, se calcula que entre un 40 y un 50 % del total de SLB producido se desecha y el resto se emplea principalmente en suplementos de alimentación animal y humana.

En los últimos años se ha propuesto la reutilización de desechos industriales orgánicos que se generan en gran volumen y de manera continua, como el suero de leche. Para resolver el problema de contaminación generado por el SLB se ha empleado tratamientos biológicos y químicos para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) antes de desechar el suero (Fang, 1991; Rossano y col. 2001). Fang (1991), propuso un proceso de tratamiento del SLB empleando lodos activados y procesos anaerobios logrando disminuir la DQO en un 99 %.

Ghaly y Kamal (2004), emplearon el suero de leche como sustrato para la producción de proteína unicelular. Para esto utilizaron la levadura *Kluyveromyces fragilis* logrando reducir la DQO del medio en un 43 % y el contenido de lactosa en un 99 %. Al remover la biomasa por ultrafiltración la DQO se redujo en un 98 % del valor inicial cuantificado en el suero.



## 1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones

Se han reportado trabajos que utilizan el SLB como sustrato de fermentaciones para la producción de etanol, por *S. cerevisie* y *K. fragilis* con buen rendimiento de producción (0.46 g producto/g lactosa) (Varela y col. 1992, Porro y col. 1992, y Terrel y col.1984).

El-Samragy y col (1996), obtuvieron ácido cítrico a partir de suero de leche adicionado con metanol y sal, con un porcentaje de conversión del 28.24 % después de 9 días de fermentación con dos cepas de *Aspergillus niger*. Ambas cepas mostraron buena capacidad para convertir lactosa de suero de leche en ácido cítrico.

Huang y Yang (1998) desarrollaron un proceso de producción de ácido acético a partir de la fermentación de SLB suplementado con hidrolizado de caseína, hidrolizado de levadura y licor de maíz, en células inmovilizadas de *Clostridium formicoaceticum* y *Lactococcus lactis* en un reactor de columna empacado.

Roukas, (1999) desarrolló un proceso de producción del polisacárido pululana en la fermentación de SLB desproteinizado con *Aurobasidium pullulans*. Alcanzando el máximo en concentración del polisacárido (11 g/L) y en rendimiento (47.2 %) al hidrolizar la lactosa del suero desproteinizado por la vía enzimática.

Lee y col. (2000a) obtuvieron ácido succínico en fermentaciones con *Anaerobiospirillum succiniciproducens* tipo lote y continuo de suero de leche adicionado con extracto de levadura y peptona con un rendimiento de producción máximo del 96 % y una productividad de 0.46 g/L h.

El-Holi y Al-Delaimy (2003) obtuvieron ácido cítrico de la fermentación con *Aspergillus niger* ATCC9642 a partir de suero de leche suplementado con diferentes fuentes de carbono, vitaminas, fosfatos y metanol. En una fermentación de 20 días lograron la máxima producción de ácido cítrico (106.5 g/L) con el medio de suero de leche suplementado con 15 % p/v de sacarosa y 1 % de metanol.

Qureshi y Maddox (2003), emplearon como medio de cultivo un filtrado de suero de leche suplementado con lactosa para la producción de acetona-butanol-etanol (ABE) con una cepa de *Clostridium acetobutylicum* en un reactor tipo lote acoplado a una remoción de ABE por perstracción. Reportaron un rendimiento bajo de consumo de lactosa (0.31g producto/g lactosa) ya que no se consumió por completo en la fermentación y la producción de ABE alcanzó un máximo de 87.2 g/L.

Ramírez y col. (2003) demostraron que la levadura *Kluyveromyces lactis* fue capaz de producir la enzima  $\beta$ galactosidasa empleando como medio de cultivo suero de leche desproteinizado por termocoagulación. Optimizaron condiciones de temperatura, pH, velocidad de agitación y tiempo de fermentación del proceso por el método de superficie de respuesta y un diseño de experimento ortogonal central compuesto. La producción máxima de enzima alcanzada a las condiciones óptimas fue de 8.3 U /mL.

El suero de leche también se ha empleado como sustrato en la producción simultánea de nisina y ácido láctico por *Lactococcus lactis*. Liu y col. (2004) determinaron que los nutrientes extracto de levadura,  $MgSO_4$  y  $KH_2PO_4$  afectaban significativamente la formación de ambos compuestos. Al optimizar estos dos factores con un modelo polinomial de segundo orden obtuvieron el máximo de producción de nisina (92.9 mg/L) y ácido láctico (19.3 g/L).

En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los productos de fermentación de suero de leche por diferentes microorganismos entre los cuales predominan alcoholes y ácidos orgánicos ya que tienen una aplicación directa como producto.

**Tabla 1.1.** Ejemplo de fermentaciones donde se utiliza el SLB como sustrato.

<b>Compuesto producido</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
2,3 butilenglicol	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Barret y col. (1983)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Terrel y col. (1984)
Etanol	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Valera y col. (1992)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Porro y col. (1992)
Acido propiónico	<i>Propionibacterium sp.</i>	Lewis y Yang (1992)
Galactiol	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Izumori y col. (1994)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Samragy y col. (1996)
Acido acético	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	Huang y Yang (1998)
Acido succínico	<i>A .succiniciproducens</i>	Lee y col. (2000a)
1,2 propanediol	<i>T .themosaccharolyticum</i>	Altaras y col. (2001)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Holi y col. (2003)
β-galactosidasa	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ramírez y col. (2003)
Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Qureshi y Maddox (2003)
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)
Ácido láctico	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)

### **1.3 Fermentaciones de suero de leche con microorganismos genéticamente modificados**

Existen pocos trabajos donde se utiliza suero de leche como fuente de carbono para producir compuestos en *E.coli*. Konicek y col. (1994), estudiaron la producción del polisacárido extracelular goma xantana por una cepa de *X. campestris* recombinante capaz de metabolizar lactosa (*lac*<sup>+</sup>) en la fermentación de un medio con suero de leche. El rendimiento de producción promedio del polisacárido (1.4 %) de la fermentación del suero de leche resultó comparable al obtenido en un medio definido con lactosa .

Kumar y col. (1992) desarrollaron un sistema de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* en *Sacharomyces cerevisiae* empleando como medio de producción suero de leche filtrado donde el 40 % de la actividad de la enzima total fue secretada al medio por la levadura y el producto resultó altamente glicosilado.

Compagno y col. (1995) obtuvieron etanol y biomasa de levadura en un proceso biotecnológico de fermentación de suero de leche y almidón con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con un plásmido episomal concluyendo que la composición del medio modulaba la productividad del sistema.

Maullu y col. (1999) demostraron que era posible producir lisozima humana recombinante en una cepa genéticamente modificada de *K. lactis* cultivada en suero de leche de la producción de queso cottage con un alto nivel de producción de la proteína heteróloga (125  $\mu$ g/mL). Además los experimentos realizados a escala laboratorio mostraron una eficiencia de producción de la proteína recombinante aún mayor a la reportada con un medio de cultivo sintético o definido.

Leite y col. (2000) utilizaron una cepa de *E. coli* recombinante para la producción de etanol a partir de suero de leche con un rendimiento menor al esperado. Observaron que la adición de metales en trazas, extracto de levadura y componentes de medio LB mejoraron la producción notablemente y se redujo el tiempo de fermentación.

Beom y col. (2000) y Anh y col. (2000) fueron capaces de obtener el polímero biodegradable polihidroxibutirato (PHB), a partir de suero de leche empleando cepas de *E. coli* genéticamente modificadas. Los autores encontraron que la limitación de oxígeno en el proceso de fermentación incrementa la producción de PHB en cultivos de lote alimentado.

Viitanen y col. (2003) desarrollaron un sistema de expresión en *E.coli* recombinante de las enzimas alcohol deshidrogenasa y muramidasa de *Lactobacillus* empleando suero de leche desproteinizado por ultrafiltración como sustrato. Demostraron la eficiencia de la lactosa del suero de leche como sustrato e inductor de la expresión de ambas enzimas en *E.coli* recombinante bajo el control del promotor *lac*. También estudiaron la expresión de ambas enzimas en presencia de diferente fuente de carbono encontrando que tanto en los cultivos con lactosa y lactosa con glicerol, la producción de las enzimas recombinantes fue favorecida.

En los trabajos mas recientes se emplean microorganismos genéticamente modificados como sistema para aumentar la producción de una amplia gama de metabolitos de interés comercial como es el caso de enzimas, alcoholes y polímeros biodegradables entre otros (Tabla 1.2).

**Tabla.1.2.** Productos obtenidos con microorganismos recombinantes en fermentaciones utilizando suero de leche como sustrato. \*Se utilizó suero de leche como inductor y glucosa como sustrato.

Producto	Microorganismo recombinante	Referencia
Goma xantana	<i>Xanthomona campestris</i>	Konicek y col. (1994)
$\beta$ -galactosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kumar y col. (1992)
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Compagno y col. (1995)
Lisozima humana	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Maullu y col. (1999)
Etanol	<i>Escherichia coli</i>	Leite y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Ahn y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Beom Soo K. (2000)
Alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)
Muramidasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)

## 1.4. Penicilino Acilasa como Modelo de Estudio

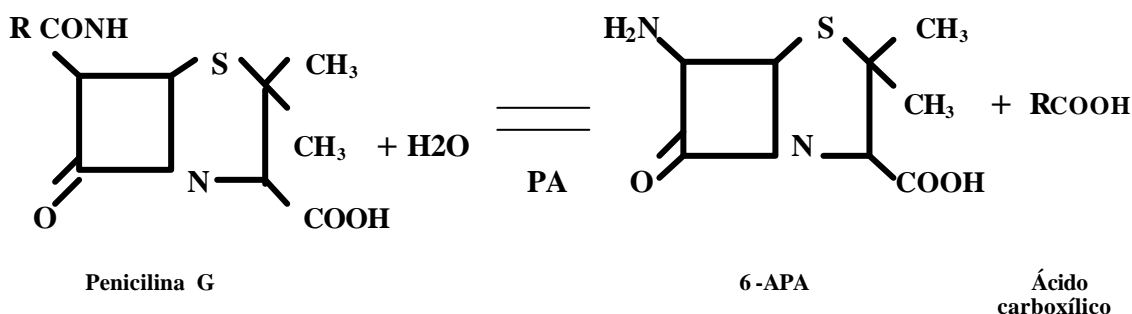
### 1.4.1. Penicilino Acilasa

La enzima penicilino acilasa (PA) o penicilino amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.11) se encuentra distribuida ampliamente en los microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras, y hongos filamentosos (Duggleby, 1995). Es utilizada principalmente a escala industrial para la producción del ácido 6-aminopenicilánico, la materia prima para la síntesis de penicilinas semi-sintéticas (Terreni y col. 2001; Youshko y col. 2001).

Las penicilinas semisintéticas surgen de modificaciones del compuesto ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que dan lugar a cambios en la cadena lateral de la penicilina al ser sintetizada, esto sirve como protección al ataque de las enzimas  $\beta$ -lactamasas que han desarrollado algunos microorganismos como resistencia a los antibióticos (Valle y col. 1991; Ospina y col. 1992). La PA también se utiliza en la producción de agentes antiplaquetarios y en la activación de profármacos contra el cáncer (Vrudhula y col. 1993; Lu y col. 1999). No está claro la función *in vivo* de PA de *E. coli*, sin embargo se cree que la enzima puede estar involucrada en la asimilación de compuestos aromáticos como fuente de carbono en el modo libre de vida de los microorganismos (Burlingame y col. 1983).

### 1.4.2 Acción catalítica de la Penicilino Acilasa

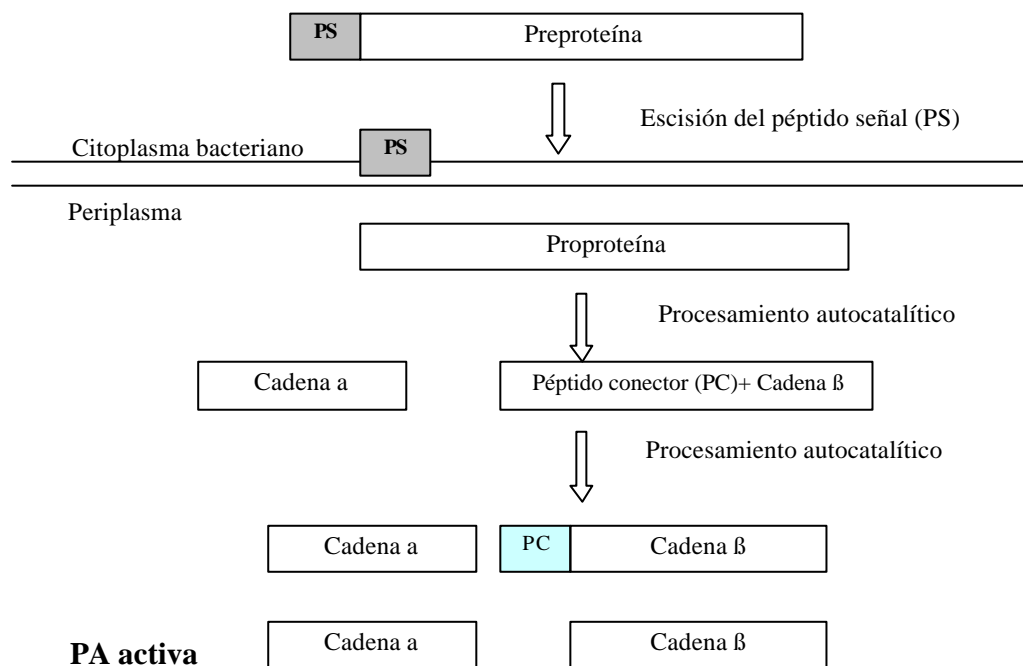
El substrato (penicilina G) es hidrolizado por la penicilina acilasa en el enlace amida para formar ácido 6-aminopenicilico y ácido fenilacético (Fig.1.1).



**Fig.1.1.** Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA.

### 1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en *E. coli*

La PA pertenece a la familia de las N terminal nucleofílico (Ntn)-hidrolasas donde todos los miembros de esta familia comparten una estructura tridimensional similar y llevan a cabo un autoprosesamiento proteolítico. El procesamiento postraduccional de la PA inicia con el transporte de la preproteína de 95 kDa al espacio periplásmico al efectuar una translocación se elimina el péptido señal dando lugar a lo que se conoce como pro-proteína la cual sufre un procesamiento autocatalítico que separa la cadena  $\alpha$  (209 a.a.) de la cadena  $\beta$  (566 a.a.) unida a un péptido conector (54 a.a.) el cual participa en el plegamiento final de las cadenas (Sizmann y col., 1990) y también es escindido por un corte auto-proteolítico. Ambas cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$  ahora libres se unen para formar la enzima activa (Duggleby y col. 1995). La enzima madura de *E.coli* es un heterodímero periplásmico de 80kDa.



**Fig.1.2.** Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA (Duggleby y col. 1995).

## **1.5 Efecto de las condiciones del proceso de producción de penicilina acilasa en *E.coli* recombinante**

La expresión del gen de PA en *E.coli* está regulada por diferentes factores como temperatura (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001; Yang y col.,1988), concentración de oxígeno (De León y col., 1996, 2003) la concentración de la fuente de carbono (Shömer y col., 1984) y en cepas nativas por la adición de ácido fenilacético como inductor (Robas y col., 1993).

La producción de PA es influenciada negativamente durante la etapa postraduccional por altas temperaturas de cultivo. A temperaturas por encima de los 37 ° C, el precursor de la enzima PA no puede ser procesado y tiende a formar cuerpos de inclusión dentro de la bacteria. La temperatura óptima para la expresión de la enzima se encuentra alrededor de los 22-29 ° C (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001).

El efecto del oxígeno sobre la producción de enzimas recombinantes ha sido evaluado por varios autores. La limitación de oxígeno disminuye la velocidad específica de crecimiento en los cultivos pero favorece la producción y procesamiento de la enzima PA (Ramírez y col., 1994a, De León, 1996, De León y col., 2003). En condiciones no limitantes de oxígeno, el metabolismo de *E. coli* produce acetato por hidrólisis de piruvato, un efecto conocido como “*efecto Pasteur*” (Doelle y col., 1982).

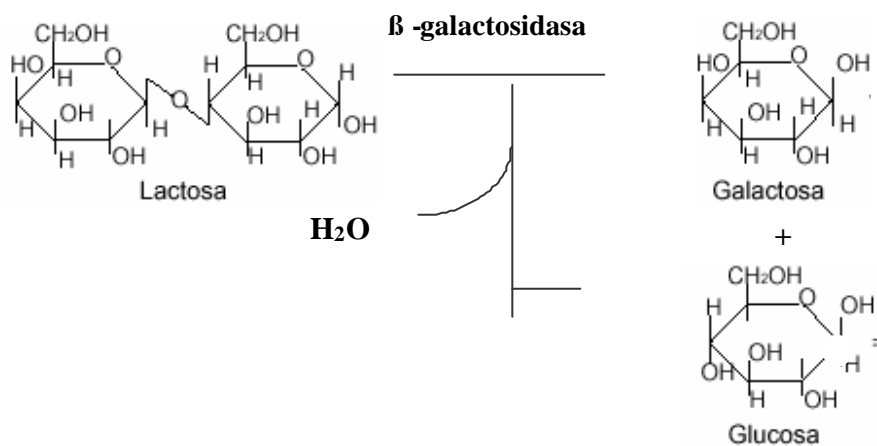
La concentración de la fuente de carbono también afecta la velocidad de crecimiento en cultivos bacterianos. Se ha observado que una alta concentración de fuente de carbono en el medio de cultivo puede reprimir catabólicamente el crecimiento microbiano mientras que una concentración muy baja de sustrato puede también limitar el crecimiento de la bacteria y de la producción del metabolito de interés al emplear toda la fuente de carbono disponible para llevar a cabo sus funciones metabólicas básicas (Ramírez y col. 1994a).



## 1.6 Metabolismo de lactosa

La lactosa es degradada por la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, produciendo  $\beta$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-galactosa. Ésta enzima también puede catalizar la conversión de lactosa a alolactosa ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-6)-D-glucopiranososa) por transglucosilación, y puede hidrolizar alolactosa (Huber y col. 1980).

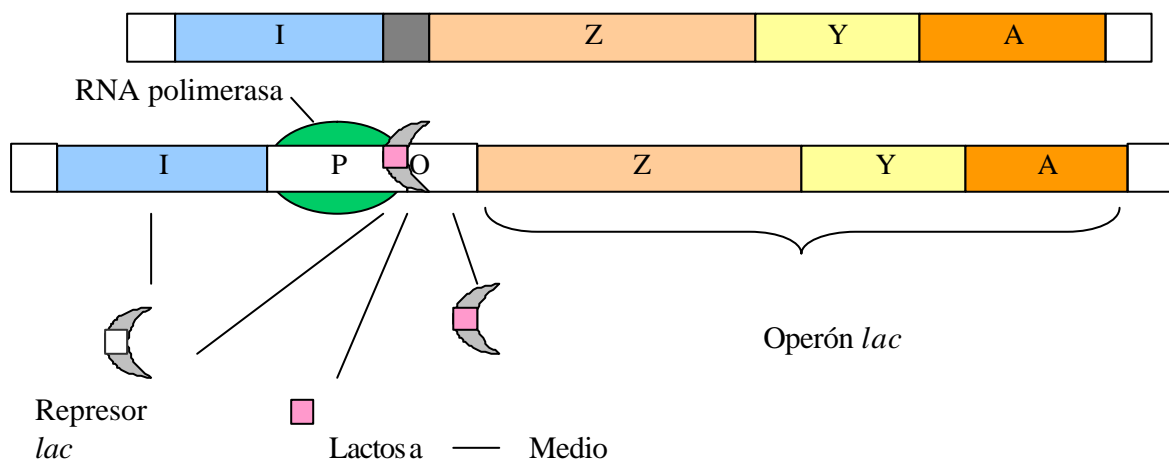
Las enzimas necesarias para metabolizar el disacárido lactosa son codificadas por el operón *lac* que incluye tres genes Z, Y y A. El gen *lac* Z codifica a  $\beta$ -galactosidasa, que escinde al disacárido en glucosa y galactosa. El gen *lac* Y codifica la enzima lactosa permeasa la cual se encarga del transporte de lactosa del medio hacia el interior de la célula. El gen *lac* A codifica a tiogalactósido transacetilasa una enzima cuya función aún no se conoce bien pero se cree que actúa como un mecanismo de protección contra la congestión metabólica por  $\beta$ -galactósidos no metabolizables y de potencial tóxico que pueden ser importados a la célula.



**Fig.1.3.** Reacción de degradación de la lactosa.

## 1.7 Operón *lac*

La síntesis de las tres enzimas del operón *lac* es inducida rápidamente cuando las células de *E. coli* se colocan en un medio con lactosa como única fuente de carbono y se reprime de igual manera cuando las células se transfieren a un medio sin lactosa. Por lo tanto los tres genes del operón *lac* son regulados coordinadamente (Fig. 1.4). La alolactosa es el inductor fisiológico de esta vía metabólica. Se ha demostrado que cuando la lactosa se añade a un cultivo o medio de crecimiento de *E. coli*, se alcanzan altos niveles de galactosa, glucosa y alolactosa dentro de las células y son rápidamente expulsados al medio (Huber y col. 1980). Algunas moléculas de estructura similar a la de la lactosa pueden inducir la expresión de los genes del operón *lac*, aunque no puedan ser hidrolizadas por la  $\beta$ -galactosidasa. Uno de estos inductores, el  $\beta$ -D-tiogalactósido de isopropilo (IPTG) puede difundirse hacia el interior de las células y debido a que no se metaboliza, su concentración permanece constante. Las moléculas de IPTG se unen a la proteína del represor I permitiendo la transcripción de  $\beta$ -galactosidasa y permeasa funcionales gracias a un aumento en la síntesis de mRNA de *lac* (Lodish y col. 2003). El disacárido lactosa se ha probado en procesos biotecnológicos como inductor de sistemas de expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor *lac* con una eficiencia comparable a la del inductor IPTG (Donovan y col. 1996).



**Fig.1.4.** Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón *lac* por el represor I.

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

### 2.1. Cultivo tipo Lote

Muchos de los procesos bioquímicos involucran el uso de reactores tipo lote para el crecimiento de poblaciones celulares. En este tipo de proceso después de que se inocula un medio líquido con células vivas, no se adiciona o se remueve fuente de carbono, excepto por algunos gases del medio de cultivo durante todo el transcurso del proceso. La concentración de nutrientes, células y productos cambia con el tiempo del cultivo.

### 2.2. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

En los procesos tipo lote, el crecimiento exponencial se alcanza después de una fase de retardo (lag) donde la célula se prepara para un crecimiento exponencial sintetizando metabolitos y duplicando su ADN para duplicarse. La velocidad de crecimiento en esta etapa se define como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{? X}{? t} \quad (2-1)$$

Donde:

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$X$  = biomasa (g/L).

## 2.3. DEFINICIÓN DE RENDIMIENTO

La razón entre la cantidad de células producidas o productos celulares y el sustrato consumido se denomina rendimiento (Y) y tiene un papel muy importante en el diseño y en la viabilidad económica de un proceso biotecnológico.

### 2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato

El crecimiento celular involucra el consumo de sustrato el cual proporciona energía y compuestos para la síntesis de componentes estructurales y funcionales de la célula. Este rendimiento es de utilidad como parámetro de eficiencia del sustrato en el crecimiento microbiano. Se denomina rendimiento aparente debido a que no se considera la conversión de sustrato para la energía de mantenimiento.

Se observa frecuentemente que el total de masa formada por crecimiento celular es proporcional a la masa de sustrato (fuente de carbono) utilizada (Bailey J.E., Ollis D.F., 1986).

El factor de rendimiento celular  $Y_{X/S}$  se define como la relación:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_F - X_i)}{(S_F - S_i)} \quad (2-2)$$

Donde:

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/L).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/L).

$S_F$  = Concentración final de sustrato (g/L).

$S_i$  = Concentración inicial de sustrato (g/L).

### 2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ )

El rendimiento de producto por concentración celular generada depende de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto), y del tipo de cultivo (lote o continuo). Este parámetro indica la eficiencia de producción del metabolito por biomasa.

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{(P_F - P_i)}{(X_F - X_i)} \quad (2-3)$$

Donde:

$P_F$  = Concentración final de producto (U/mL).

$P_i$  = Concentración inicial de producto (U/mL).

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/mL).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/mL).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Establecer un proceso de producción de penicilino acilasa en *E.coli* recombinante a partir de un medio mínimo formulado con suero de leche bovino como inductor y única fuente de carbono.

#### **Objetivos particulares**

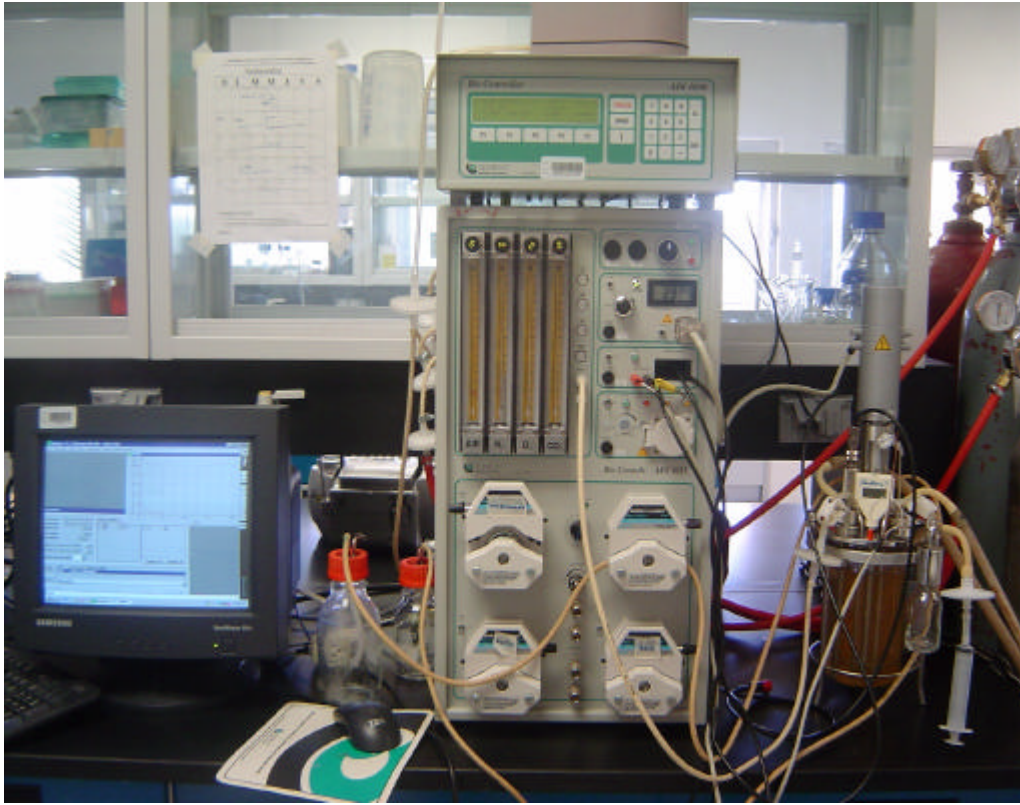
- Desarrollar un medio de cultivo para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* a partir de suero de leche en polvo.
- Seleccionar una cepa de *E. coli* (*gal*<sup>+</sup>, *lac*<sup>+</sup>) capaz de crecer en un medio a base de suero de leche y transformarla con el vector de expresión de PA.
- Evaluar el efecto de la concentración de suero de leche y porcentaje de oxígeno disuelto en la producción de penicilino acilasa recombinante en experimentos en bioreactor tipo lote.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sistema de fermentación

El sistema de fermentación (Fig. 4.1) consiste de un reactor de tanque agitado de 1 Litro (Applikon). El reactor está equipado con 2 turbinas Rushton acopladas a un motor controlado para ajustar la velocidad de agitación necesaria para alcanzar una transferencia de oxígeno adecuada en el bioreactor. Se empleó un electrodo de pH (Applikon), un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Applikon), ambos esterilizables y un sensor de nivel de espuma, así como una línea de entrada para oxígeno, nitrógeno y aire comprimido. La temperatura se controló a 29 °C durante el proceso con un intercambiador de calor sumergido en el medio. El pH se mantuvo a  $7.0 \pm 0.1$  en todos los cultivos adicionando una solución de NaOH, 2 N. Ocasionalmente se adicionó una solución de silicón al 0.1 % (v/v) para disminuir la formación de espuma.

El sistema de control estuvo constituido por una consola automatizada ADI 1035 (Applikon) donde se localizan los actuadores y conexiones de los sensores del sistema que responden a un controlador ADI 1030 (Applikon) programado con un algoritmo de control de lazo cerrado proporcional integral derivativo (PID). Este último compara los valores en un instante de las variables pH y OD medidos por los sensores con el valor deseado (*setpoint*) y se recalcula la respuesta de los actuadores requerida. Los electrodos miden el valor de una variable y transmiten una señal analógica al controlador donde es convertida a una señal digital para tomar una acción que es reenviada en forma analógica a los actuadores.. La adquisición de los datos se realizó por medio de el programa BioXpert versión 1.1x (Applikon) para Windows.



**Fig.4.1** Sistema de fermentación automatizado empleado en este trabajo.



## 4.2. CEPAS BACTERIANAS

En éste trabajo se utilizaron las cepas de *E. coli* JM101/pPA102 proporcionada por el Dr. O.T, Ramírez (IBT,UNAM,Cuernavaca), BL21SI (Gibco), BL21pLysS (Invitrogen) y W3110.

## 4.3. MEDIOS DE CULTIVO

### 4.3.1. Medio Mínimo M9

Es un medio mineral utilizado ampliamente en la industria como medio de producción de proteínas recombinantes (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Medio Mínimo M9.

Reactivo	g/L
Fuente de carbono	5
NaCl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.0
CaCl <sub>2</sub>	0.01
Solución de Kanamicina [35 mg/mL]	1µL/mL
Solución de Tiamina [0.1%]	40 µL/L

**Preparación:** Se disuelven los reactivos de la tabla 5.1 en agua destilada y se esterilizan en autoclave a 15 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos. La fuente de carbono (glucosa, galactosa o lactosa) y el sulfato de magnesio se disuelven y esterilizan por separado del resto de los componentes del medio para evitar la caramelización del azúcar. Una vez que el medio se enfría a una temperatura aproximada de 40 °C, se agrega la solución de kanamicina y la solución de tiamina. Los inóculos se realizaron en medio M9 suplementado con 5 g/L de extracto de levadura (Difco).

Los cultivos en reactor se llevaron a cabo en medio M9 donde se utilizó como fuente de carbono suero de leche en polvo (Land O' Lakes) a 5, 10 ó 15 g/L, se solubilizó por separado en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se separó el exceso de proteína por centrifugación a 13000 rpm por 15 min. Se adicionó la solución estéril como fuente de carbono.

#### 4.4 Inóculos

Para los experimentos de expresión en matraz se tomó una azada de células crecidas en medio LB/kanamicina (Tabla 4.2) para inocular 100 mL de medio M9 glucosa adicionado con extracto de levadura en un matraz Erlenmeyer de 250 mL incubado por 12 h a 29 ° C y 200 rpm.

Para los experimentos en reactor se inocularon 100 mL de medio M9 suero de leche con una azada de las colonias de las placas de agar LB/kanamicina (LB/Km) y se incubaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL por 12-14 h a 29 ° C y 200 rpm. Se adicionó el inóculo necesario en los cultivos en biorreactor para alcanzar una densidad óptica cercana a 0.2.

#### 4.5 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas de este trabajo se realizó en medio LB líquido y sólido. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 30 % y almacenadas a -80° y en placas LB con kanamicina para las diferentes cepas que fueron refrigeradas a 4 ° C por 30 días.

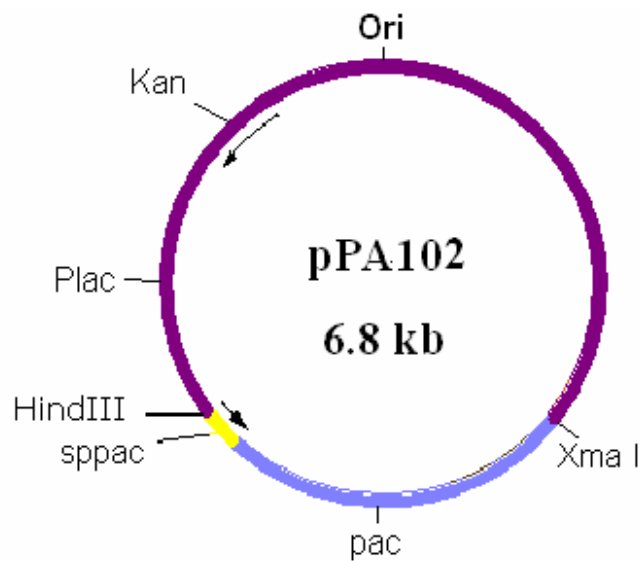
**Tabla 4.2.** Medio LB/Km.

<b>Reactivo</b>	<b>g/L</b>
Bactotripton (peptona)	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
*Agar microbiológico	10
Kanamicina (35 mg/L)	1mL

\* Se agrega sólo para preparar medio sólido.

#### 4.6. Vector de expresión de PA ( pPA102) en *E. coli*

Se utilizó el vector de expresión pPA102 reportado por Merino (1992) el cual contiene el gen de la penicilino acilasa *pac* bajo el control del promotor *lac*, un origen de replicación para *E.coli* y el gene de resistencia a kanamicina (Fig.4.2).



**Fig.4.2.** Representación del Vector de expresión pPA102 (Merino, 1992).

#### 4.7. Aislamiento del plásmido pPA102

Se aisló el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* JM101/pPA102 (Merino, 1992) y se corrieron geles de agarosa al 1% por electroforesis para corroborar la identidad del vector.

#### 4.8. Transformación de la cepa de expresión

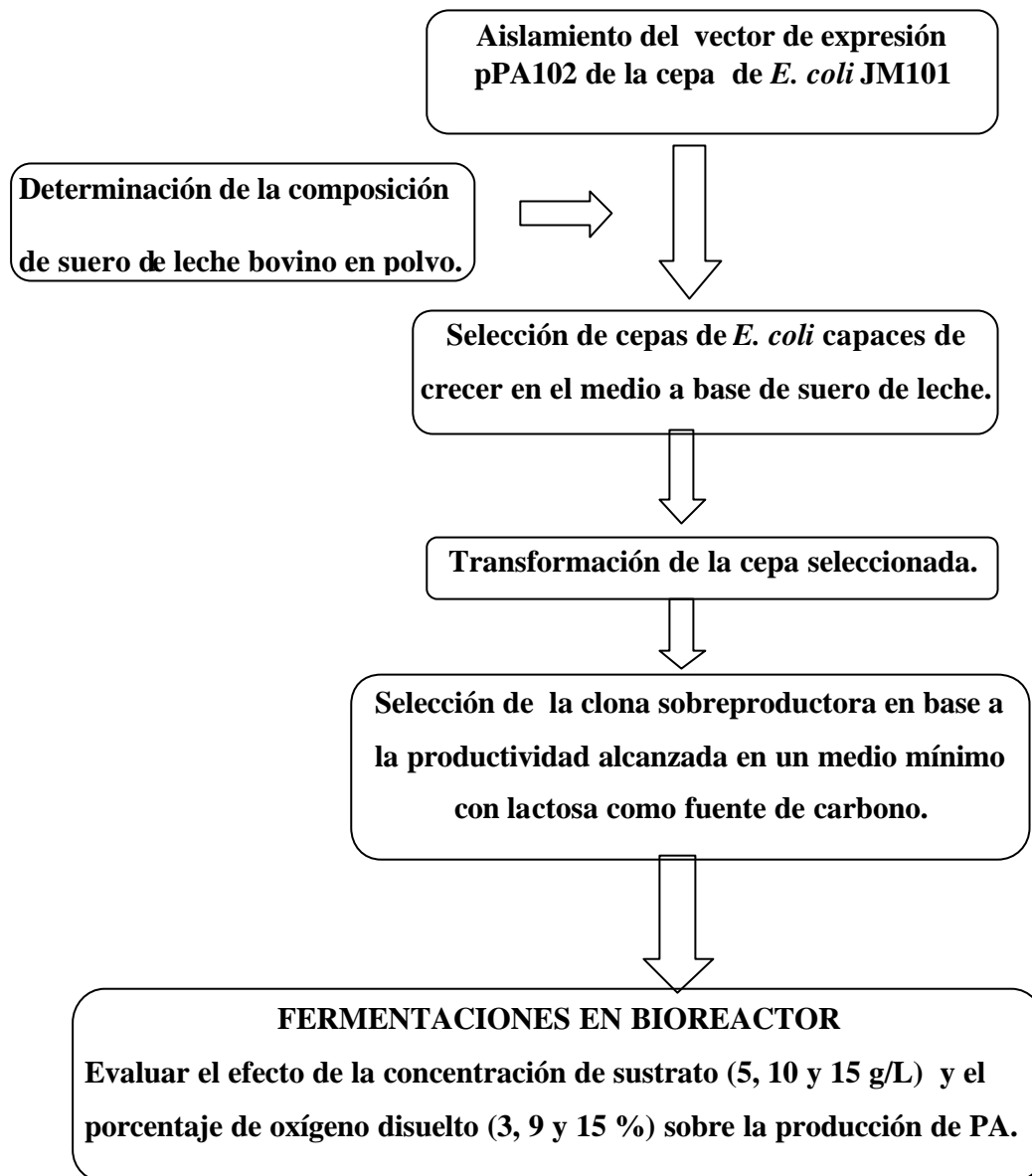
Las cepas de *E.coli* BL21SI, BL21pLysS y W3110 se transformaron con el plásmido pPA102 por el método de choque térmico (Sambrook, 1989).

#### **4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA**

Se sembró el volumen total de la reacción de transformación en placas de medio LB/ Km para crecer y seleccionar las clonas transformadas con el gen de la PA capaces de crecer en presencia del antibiótico a 29 ° C. Se realizaron minipreparaciones para 20 colonias seleccionadas al azar, después se linealizó el ADN plasmídico por digestión con la enzima Eco R1 y se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% para comprobar la presencia del plásmido en las probables transformantes.

#### **4.10 Estrategia Experimental**

En la Figura 4.3. se describe la estrategia experimental seguida en este trabajo para la expresión de la enzima penicilino acilasa en cultivos de *E. coli* recombinante en un medio a base de suero de leche bovino. Se probó la capacidad de crecimiento de tres cepas de *E. coli* BL21 pLysS, BL21 SI y W3110 en el medio en base a suero de leche bovino de entre las cuales se seleccionó W3110 por alcanzar la mayor concentración de biomasa (g/L). Una vez obtenidas las clonas transformadas de *E.coli* W3110 se evaluó la actividad específica de la enzima y la productividad para seleccionar la mas adecuada para crecer en el medio con suero de leche. La clona 24 de *E.coli* W3110 fue seleccionada para emplearse en una serie de diez experimentos en biorreactor bajo condiciones controladas de temperatura (29 ° C) y pH (7.0) donde se evaluó el efecto de la concentración inicial de suero de leche y el porcentaje de oxígeno disuelto sobre la producción de la enzima PA. Se realizó un análisis de varianza y de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de la producción de la enzima PA en este sistema.



**Fig. 4.3.** Estrategia experimental.

#### 4.11. Diseño Experimental

Se planteó un diseño experimental de bloques completos incluyendo dos factores concentración de suero de leche bovino (SLB) y % de oxígeno disuelto a tres niveles (Tabla 4.3.). Los experimentos se realizaron de manera aleatoria para disminuir la tendencia de error experimental.

**Tabla. 4.3.** Valores de variables independientes y niveles utilizados en el diseño experimental.

Símbolo	Variables Independientes	Niveles			Unidades
		-1	0	+1	
A	Concentración de SLB	5	10	15	g/L
B	% de Oxígeno Disuelto	3	9	15	%

## **4.12. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.12.1. Tratamiento de muestras**

Se tomaron muestras de 4 mL cada dos horas durante la fermentación para llevar un seguimiento del proceso. Se utilizó 1 mL de muestra para la determinación óptica de biomasa y el volumen restante se centrifugó durante 5 min a 4185 xg para separar la alicuota en dos fracciones: sobrenadante y paquete celular. El sobrenadante se congeló (-20°C) para determinar posteriormente la concentración de lactosa, mientras que la pastilla celular se resuspendió en un buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.8 y fue refrigerado a 4 °C para la determinación de actividad enzimática y proteína total.

### **4.12.2. Determinación de concentración celular**

La concentración celular se determinó mediante la densidad óptica evaluada a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) y se correlacionó con una curva de calibración para convertir la densidad óptica en peso seco (Apéndice B.1).

### **4.12.3. Determinación de lactosa**

Se determinó la concentración de lactosa en el medio de cultivo por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959) basado en la reducción del reactivo DNS por azúcares reductores presentes como la lactosa, formando un compuesto nitroaminado de color amarillo-naranja. La absorbancia medida a 550 nm es directamente proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra. Se construyó una curva estándar (Apéndice B.2) de absorbancia contra concentración de lactosa en g/L para relacionar la absorbancia de las muestras y calcular su concentración de lactosa. Se realizaron diluciones de los sobrenadantes de las muestras para llevarlas a una concentración dentro del rango de la curva estándar (0.1-1.0 g/L).

El procedimiento analítico fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 0.25 mL de las diluciones problema y se agregaron 0.75 mL de reactivo DNS (ácido 1-3 dinitrosalicílico), la mezcla se agitó y fue calentada a baño maría durante 15 minutos. Se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente. Por último se les añadió 4 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia a 550 nm.

#### **4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA**

Se llevó a cabo por el método del *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) reportado por Balasingham y col. (1972), basado en la reacción colorimétrica del grupo carbonilo del PDAB con un grupo amino libre del 6-aminopenicilánico (6-APA) producto de la reacción de hidrólisis de la penicilina G por la PA.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 450  $\mu$ L de las muestras almacenadas a 4° C, las cuales se incubaron en tubos de ensayo de vidrio (100 mm X 13 cm) en un baño a 37° C durante 5 minutos. Se añadió 50  $\mu$ L de una solución de penicilina G al 20 % en PBS pH 7.8 y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 37° C. A los 10 minutos se tomaron 40  $\mu$ L de la reacción y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 960  $\mu$ L de etanol absoluto para detener la reacción. Se agregó 500  $\mu$ L del reactivo PDAB, se agitó con un vortex. Se centrifugaron los tubos a 2375 xg durante 6 minutos. Por último se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) después de 15 minutos de adicionado el reactivo PDAB, utilizando como blanco el buffer de fosfatos PBS tratado de la misma manera que a las muestras. Este análisis se realizó dentro de las primeras 48 h posteriores al experimento para evitar degradación o pérdida de actividad de la enzima.



Para realizar los cálculos de actividad enzimática se construyó una curva estándar (Apéndice B.3) a partir de diluciones conocidas del compuesto 6-APA en un buffer de fosfatos (pH 7.8), las cuales se procesaron con el método del PDAB y se leyó su absorbancia para relacionarla a la concentración de 6-APA de la dilución. Una unidad enzimática equivale a la cantidad necesaria de la enzima para hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de penicilina G por minuto a 37 ° C.

La actividad enzimática por mililitro de muestra (U/mL) se calcula de la siguiente manera:

(4-1)

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{(\text{D.O.} - b) \times D \times 1000}{m \times \text{PM}_{6\text{-APA}} \times t(\text{min}) \times (0.45 \text{ mL})} \quad [=] \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Donde:

**D.O.** = Densidad óptica de las muestras a 415 nm.

**b** = Ordenada al origen de la curva estándar.

**m** = Pendiente de la curva estándar.

**D** = Dilución de la muestra.

**PM<sub>6-APA</sub>** = Peso molecular de 6-APA (216.24 mg/mmol).

**t** = Tiempo de reacción muestra-sustrato (10 min).

**U** = Unidad de actividad enzimática.

#### **4.12.5. Determinación de proteína total**

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951) el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade reactivo E (Apéndice A) y reactivo Folin para formar un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. El método se basa en la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con el ión cobre en solución alcalina y la reducción del reactivo de Folin (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) que se reduce a heteropolimolibdeno azul por la oxidación de aminoácidos aromáticos catalizada por cobre.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras refrigeradas a 4 ° C y se les adicionó 900  $\mu\text{L}$  de agua. Se agregaron 5 mL de reactivo E, se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin 1N, se agitaron las muestras y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron lecturas de absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

Se construyó una curva estándar de concentración de proteína total (Apéndice B.4), a partir de diluciones estándar de concentración conocida de una solución patrón de albúmina de suero bovina (BSA stock de concentración 1.4 mg/mL) en agua destilada, las cuales se procesaron igual que las muestras y las lecturas de absorbancia obtenidas se correlacionaron con la concentración conocida de proteína total en las diluciones.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo

Se realizó un análisis bromatológico del suero de leche en polvo (tabla 5.1) donde se determinó el contenido de lactosa en base seca y el contenido de proteína total, mientras que el resto de los componentes (grasas y cenizas) no se cuantificaron por encontrarse en mínima proporción.

**Tabla 5.1.** Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo (Land O'Lakes Inc.)

Componente	%
Lactosa *	87.7
Proteínas	11.7
Otros	< 1

\* Reportado como azúcares reductores totales.

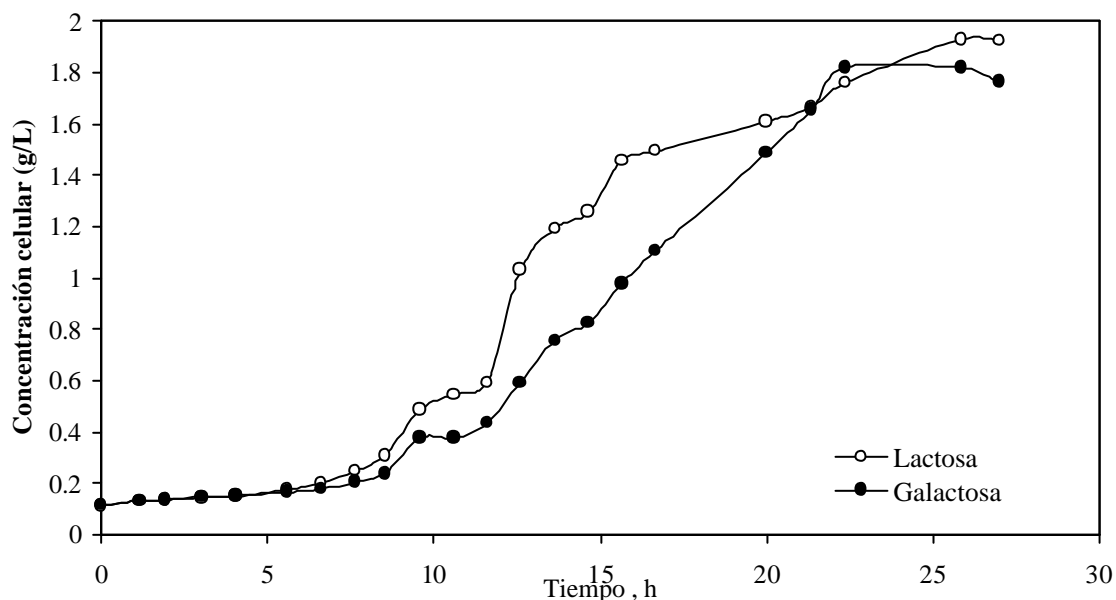
### 5. 2. Selección de la cepa de expresión

En la tabla 5.2 se muestra el genotipo de las cepas empleadas en este trabajo. Fue necesario cambiar de cepa de *E.coli* para la expresar la enzima PA en el medio a base de SLB ya que *E.coli* JM101 (?lac) es incapaz de metabolizar lactosa. Se probaron dos cepas *E. coli* BL21 pLysS y BL21 SI diseñadas para la expresión de proteínas heterólogas con alta eficiencia por que son deficientes de las proteasas *lon* y *ompT*. Sin embargo con ambas cepas se obtuvieron bajas concentraciones celulares en el medio mínimo con lactosa, mientras que con la cepa *E. coli* W3110 se observó un efecto favorable en la expresión de la enzima PA al utilizar suero de leche como sustrato e inductor.

**Tabla 5.2.** Genotipo de cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
JM101	$\lambda$ <i>lac</i> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , sup E, pro AB <sup>+</sup> , <i>lac Z</i> M15
BL21pLysS	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3, pLys
BL21 SI	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3
W3110	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , F <sup>?</sup> IN ( <i>rrnD-rrnE</i> )1

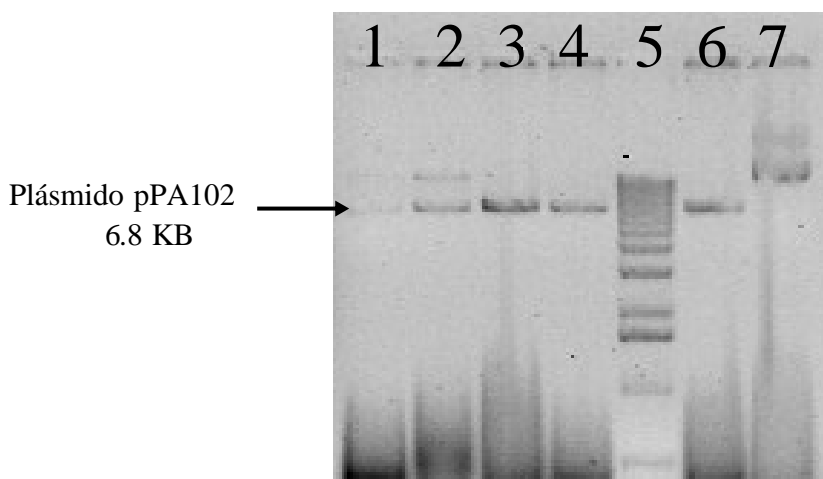
En la figura 5.1. se muestra la cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* W3110 en cultivos en presencia de lactosa o galactosa. Se puede observar que en ambos casos se presentó una fase de retardo del crecimiento de 7 horas la cual termina cuando se alcanza la pendiente de ajuste lineal de la fase exponencial, además la concentración celular final fue muy similar en los dos cultivos. Este resultado corrobora que esta cepa metaboliza de igual manera lactosa y galactosa, característica deseable en la cepa de expresión en un medio con suero de leche.



**Fig.5.1.** Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* W3110 en medio mínimo con lactosa y galactosa como fuente de carbono a 5 g/L.

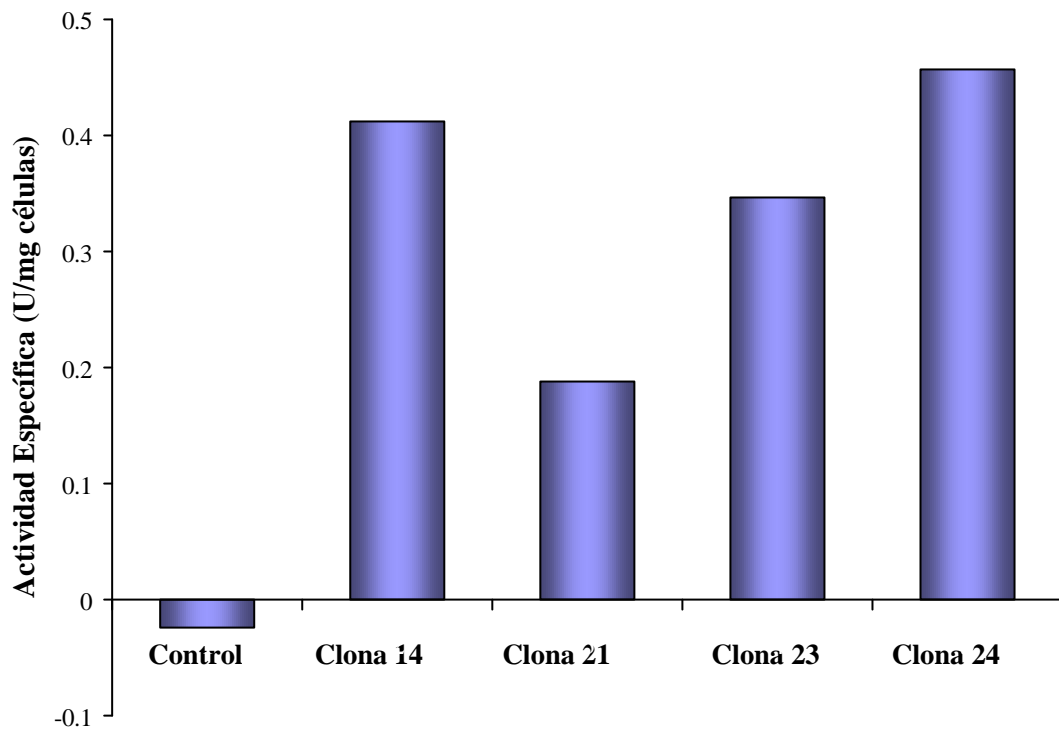
### 5.3 Selección de clona sobreproductora de PA

En la Fig.5.2 se observan 6 muestras de 5 de las colonias de *E.coli* W3110 que fueron seleccionadas al azar, en las cuales se confirmó la presencia del vector pPA102 por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las 6 muestras se observó la presencia de ADN plasmídico linealizado con un peso molecular de aprox. 6.8 KB.



**Fig.5.2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de muestras de ADN plasmídico de posibles transformantes de *E. coli* W3110/pPA102: carril (1) clona 9 digerida con Eco R1, (2) clona 14 digerida con Eco R1, (3) clona 21 digerida con Eco R1, (4) clona 23 digerida con Eco R1, (5) MPM 1KB, (6) clona 24 digerida con Eco R1, (7) clona 24 sin digerir.

Las clonas seleccionadas confirmadas como transformantes positivas se utilizaron en pruebas de expresión. Se observó que las clonas produjeron diferentes niveles de actividad de la enzima en un medio mínimo con lactosa mientras que en la cepa no transformada no hubo producción de la enzima (Fig 5.3). Se seleccionó la clona 24 para la expresión de PA en los siguientes experimentos en reactor por presentar la mayor productividad entre las clonas (0.059 U/mLh) así como el valor máximo de actividad específica (0.458 U/mg células) después de 17 h de cultivo en matraz a 29 °C agitado a 200 rpm. Probablemente estas diferencias en la actividad enzimática se deban al número de copias del plásmido en la célula.



**Fig.5.3.** Actividad específica máxima de PA (U/mg células) en las clonas 21, 23, 24 y 14 después de 17 h de cultivo. El control consiste en la cepa no transformada.

#### 5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos

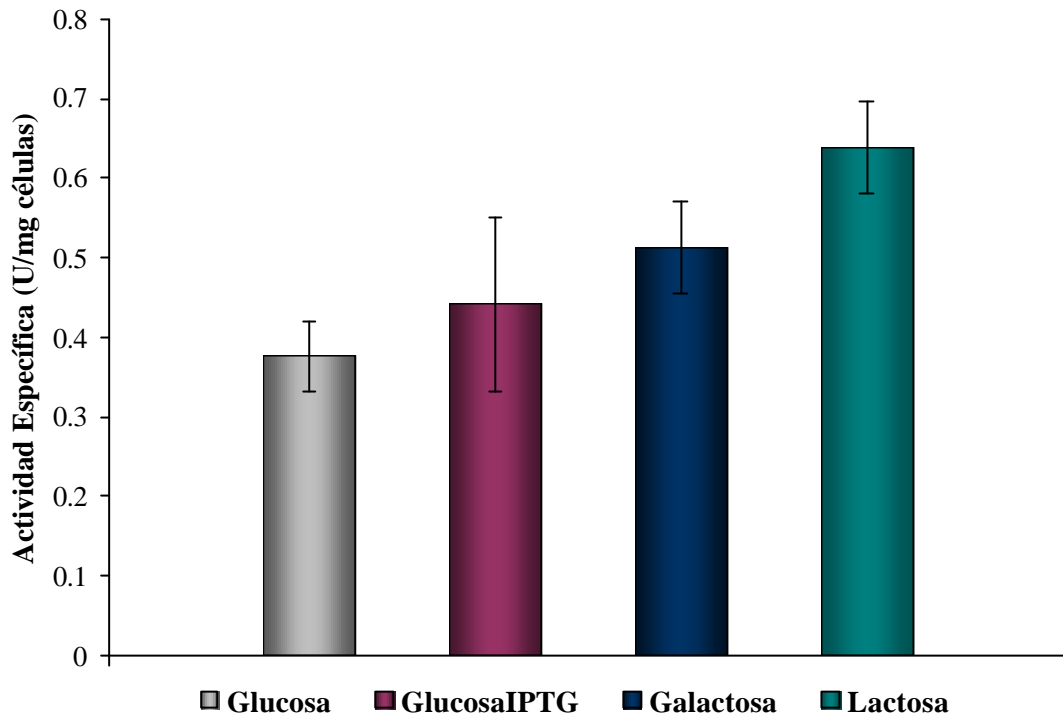
En la figura 5.4 se muestran los valores de actividad enzimática específica de los cultivos con glucosa IPTG, galactosa y lactosa como sustrato y un cultivo control con glucosa. Contrario a lo observado con la cepa JM101 de *E. coli*, en la cepa W3110 se observó una alta producción de la enzima en presencia de glucosa sin inductor sintético IPTG (cultivo control). Este resultado sugiere que el medio con suero de leche es una buena opción para la expresión de la enzima recombinante en la cepa seleccionada ya que se induce la producción de PA con lactosa, galactosa y glucosa sin necesidad de inductores sintéticos.

El uso de lactosa demostró la capacidad de inducción similar a la obtenida con galactosa en la producción de la PA. La actividad específica máxima de PA fue de 0.639 y 0.514 U/mg células para los cultivos que contenían lactosa y galactosa respectivamente y no se observó diferencia significativa entre sí (Fig. 5.4).

En los cultivos inducidos con glucosa y glucosa IPTG, la adición del inductor sintético aumentó la expresión de PA pero no se alcanzó el nivel de actividad obtenido con lactosa o galactosa. Este efecto sugiere que se alcanzó un máximo de expresión de la enzima al inducir con glucosa IPTG, lactosa o galactosa bajo las condiciones de este experimento.

En la Tabla. 5.3 se presenta un resumen de los valores de actividad máximos obtenidos en las pruebas de expresión en medios con diferente fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por duplicado para efecto de reproducibilidad.

La actividad volumétrica máxima fue de 1.05 U/mL y se presentó en el cultivo con lactosa como fuente de carbono e inductor, mientras que en el cultivo con galactosa fue de 0.952 U/mL. Este resultado muestra que la fuente de carbono lactosa resultó igual de eficiente que la galactosa en la producción de PA.



**Fig. 5.4.** Valores máximos promedio de actividad específica de W3110/pPA102 en diferentes fuentes de carbono.

**Tabla.5.3.** Valores máximos promedio de actividad de PA en *E. coli* W3110/pPA102 con diferente fuente de carbono.

Sustrato	Activ. Máx. Vol. (U/mL)	Activ. Máx. Esp. (U/mg <sub>células</sub> )
Glucosa	0.736± 0.040	0.376 ± 0.044
Glucosa IPTG	0.886± 0.0014	0.441 ± 0.111
Galactosa	0.936± 0.180	0.514 ± 0.058
Lactosa	1.051± 0.166	0.639 ± 0.058

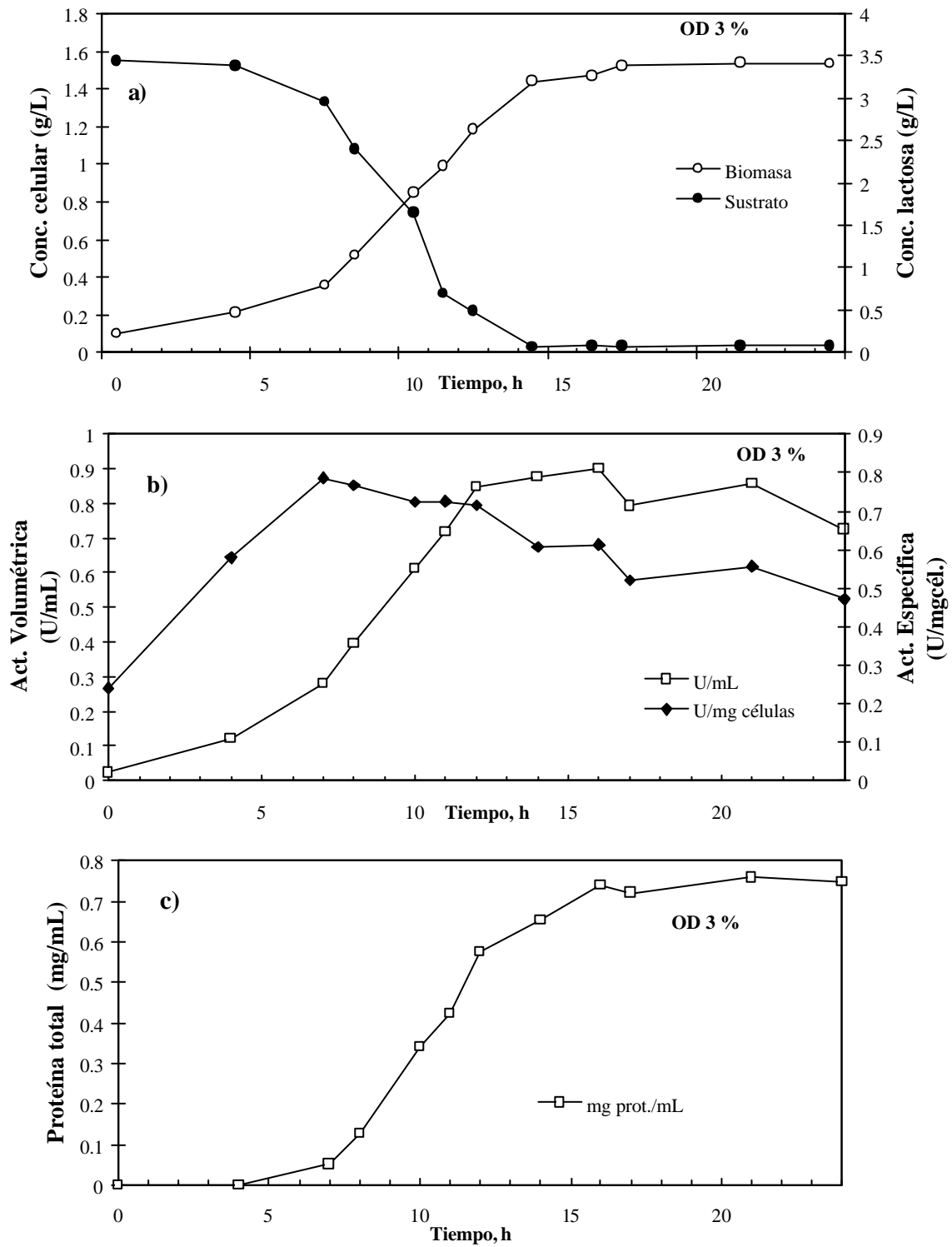


## 5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental

En la Fig. 5.5. se muestra la cinética de cultivo a 5 g/L SLB y 3 % OD, el resto de los cultivos se encuentran en el apéndice D. En la figura 5.5.a se presenta la cinética de crecimiento celular y consumo de lactosa. La concentración celular alcanza un máximo de 1.6 g/L al agotarse la lactosa del medio. La concentración de oxígeno disuelto no afectó de manera significativa la velocidad de crecimiento ni la concentración celular alcanzada en los experimentos con 5 g/L de suero de leche como concentración inicial bajo diferentes condiciones de OD (Ver tabla 5.4). En los gráficos de control de oxígeno disuelto que se encuentran en el apéndice C se puede observar una perturbación en el control de OD al término de la fase exponencial de los cultivos con excepción de aquellos que fueron controlados a 15 % OD donde la perturbación es imperceptible.

Respecto a la producción de PA (Fig.5.5.b), ésta si fue afectada por el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio. En el cultivo a 3 % OD y 5 g/L SLB se obtuvo la mayor actividad volumétrica de PA (0.793 U/mL), mientras que en los cultivos con 9 y 15 % OD, los valores de actividad máxima fueron de 0.61 y 0.57 U/mL respectivamente (Apéndice D). Lo anterior concuerda con lo publicado por Ramírez (1994b) donde reporta que al aumentar la velocidad específica de crecimiento, la actividad enzimática se ve afectada.

En la Fig.5.5b se muestra el perfil de actividad específica para el mismo cultivo. Se puede apreciar un máximo en la actividad específica durante la fase de exponencial (8-15 h). Para una concentración inicial de 5 g/L de SLB la actividad específica máxima fue de 0.613 U/mg células y fue obtenida en el cultivo controlado a 3 % de OD. En los cultivos controlados a una OD de 9 y 15 % las actividades fueron menores al cultivo a 3 % y similares entre sí (0.506 y 0.424 U/mg células respectivamente). En la Fig. 5.5.c se muestra la curva de proteína total durante la fermentación donde el máximo fue de 0.7 mg/mL, y se puede observar un perfil similar al de concentración celular.



**Fig.5.5.** Cinética del cultivo con 5 g/L de SLB controlado a 3 % OD. **a)** Crecimiento celular. **b)** Perfil de actividad volumétrica y específica de PA. **c)** Proteína total.

Las cinéticas generadas de la serie de cultivos con 10 g/L de concentración inicial de suero de leche en el medio, presentaron una tendencia similar a la de cultivos con 5 g/L de concentración de sustrato. La menor velocidad específica de crecimiento en las fermentaciones realizadas a la concentración de 10 g/L de SLB ( $0.1405 \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvo en el cultivo con el nivel más bajo de OD (3 %), mientras que a OD mayores (9 y 15 %) las velocidades de crecimiento alcanzadas son comparables a las obtenidas en los experimentos a 5 g/L de sustrato (Tabla 5.4). La densidad celular final alcanzada en las fermentaciones con 10 g/L de suero a 9 y 15 % OD fue de 2.06 y 2.19 g/L respectivamente, mientras que a una OD de 3% la concentración celular resultó mucho más baja que la obtenida en el resto de las fermentaciones (Apéndice D).

Respecto a la producción de PA se observó una diferencia muy marcada en la actividad volumétrica relacionada con el nivel de OD en el medio. En la fermentación a la condición de OD del 9 % se obtuvo la actividad volumétrica ( $0.65 \text{ U/mL}$ ) y específica ( $0.35 \text{ U/mg}$  de células) máximas entre los cultivos con concentración intermedia de sustrato. También en este cultivo se presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ( $0.235 \text{ h}^{-1}$ ) aunque la diferencia con el cultivo a 15 % de OD y 10 g/L SLB no fue significativa. Los valores de actividad volumétrica y específica de PA en estos cultivos disminuyeron al aumentar el %OD en el medio.

En los cultivos que se realizaron con 15 g/L de suero de leche, la velocidad específica de crecimiento se vio disminuida en los cultivos a 3 y 15 % de OD ( $0.11$  y  $0.145 \text{ h}^{-1}$  respectivamente) con respecto al promedio, mientras que en la fermentación a 9 % de OD se alcanzó una velocidad específica cercana al máximo entre fermentaciones ( $0.236 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual puede indicar que este nivel de concentración de OD se aproxima al óptimo para favorecer el crecimiento de la cepa empleada.

La máxima concentración celular final (2.2 g/L) en los cultivos con 15 g/L de SLB en el medio se obtuvo con la mayor concentración de oxígeno disuelto (15 % OD) con una adecuada reproducibilidad en la réplica. Mientras que a las otras condiciones de OD (3 y 9 %) el crecimiento bacteriano fue equiparable entre ambos cultivos alcanzando una concentración celular promedio de 1.9 g/L  $\pm$  0.02.

Entre las fermentaciones con la mayor concentración inicial de fuente de carbono, se puede apreciar que a 9 % OD, el perfil de producción de la enzima difiere de los otros cultivos, resultando en el valor más alto de actividad volumétrica (0.61 U/mL) y específica (0.47 U/mg de células) entre las fermentaciones con 15 g/L de SLB. Este resultado coincide con el aumento de velocidad específica de crecimiento lo cual demuestra que la cinética de producción de la enzima está asociada al crecimiento microbiano. La reproducibilidad de las fermentaciones fue probada realizando una única réplica para la condición 15 g/L de SLB y 15 % OD (Ver Apéndice D).

Con respecto a la actividad específica se obtuvo la producción más alta de PA a 9 % OD (0.47 U/mg células), y a las otras dos condiciones 3 y 15 % OD la producción fue mas baja (0.209 y 0.22 U/mg células respectivamente). A diferencia de lo observado a concentraciones más bajas de sustrato (5 y 10 g/L), el máximo de actividad específica de PA se alcanzó después de 15 h de cultivo.

## **5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA**

En la tabla 5.4. se muestra el resumen de los resultados de actividad enzimática volumétrica, actividad específica y velocidad específica de crecimiento máximas de las fermentaciones en biorreactor, así como los valores calculados de rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ ) y el rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{X/S}$ ) y productividad, cada uno de estos puntos serán discutidos en las secciones siguientes.

### **5.7. Eficiencia de suero de leche en la expresión de enzimas recombinantes en *E. coli***

En los cultivos de *E. coli* W3110 en biorreactor inducidos con suero de leche se alcanzó una actividad específica de PA (0.613 U/mg células) comparable al máximo obtenido en las pruebas de expresión con galactosa, glucosa IPTG y glucosa aunque la producción siguió una cinética más lenta. Lo anterior concuerda con lo reportado por Viitanen y col. (2003) quienes obtuvieron los niveles máximos de actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en cultivos tipo lote alimentado de *E. coli* Rb791 recombinante a 30 ° C con glucosa y glicerol como fuente de carbono y lactosa y suero de leche como inductores. En la expresión de la enzima recombinante murimidasa en cultivos lote alimentado a 37 ° C de *E. coli* BL21(DE3), inducidos con lactosa de suero de leche, Viitanen y col. (2003) observaron una acumulación importante de galactosa formada dentro de las células que no fue metabolizada, lo cual confirma que esta cepa no es capaz de metabolizar eficientemente lactosa tal como se observó en este trabajo. En ambos casos reportados por Viitanen y col. (2003) el suero de leche fue empleado como inductor y no como fuente de carbono, además la concentración de oxígeno disuelto empleada (30%) para la producción de las dos enzimas es mucho mayor que la óptima encontrada para la penicilino acilasa. La eficiencia del suero de leche como sustrato y/o inductor de la expresión de enzimas recombinantes depende de la cepa de *E. coli*, la enzima y las condiciones óptimas de expresión como: pH, temperatura y % OD.

### **5.8 Efecto de la velocidad específica de crecimiento y la OD sobre la producción de PA**

Como se discutió anteriormente, la velocidad de crecimiento afecta significativamente la producción de PA, lo que se ve reflejado en el rendimiento de producción de la enzima en base a la concentración celular. En la serie de experimentos en reactor, el mayor rendimiento de producto por biomasa generada (602.6 U/g células) así como la productividad más alta (0.054 U/mLh) se obtuvieron en el cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD a una velocidad específica de crecimiento de 0.192 h<sup>-1</sup>.

El rendimiento de biomasa por sustrato máximo se alcanzó en el cultivo con 5 g/L de SLB y 15 % OD , pero el rendimiento de producto para estas condiciones es la mitad del obtenido con el cultivo a 3 % OD. El aumento en el % de oxígeno disuelto a la concentración más baja de sustrato (5g/L) favorece la formación de biomasa pero no así la producción de la enzima. Este resultado es congruente con lo observado por De León (2003) quien sugiere que la producción de la enzima mejora al limitar el oxígeno disponible durante la fermentación en un rango entre 1 y 5 % de OD. En la mayoría de las fermentaciones la velocidad específica de crecimiento se mantuvo en un rango limitado a pesar de las condiciones de cultivo diferentes, exceptuando los cultivos a 10 y 15 g/L con 3 %OD (experimentos 4 y 7) donde la limitación de oxígeno disminuyó la velocidad y el crecimiento celular, resultando además en una pobre producción de la enzima recombinante.

**Tabla 5.4.** Resumen de resultados de las fermentaciones realizadas en reactor para evaluar el efecto de la concentración de sustrato y OD en la producción de PA.

EXPERIMENTO	SLB g/L	% OD	Y X/S	Y P/X U/g	Ac.Esp. máx. (U/mgcel)	Act.Vol. máx. (U/mL)	Productividad (U/mLh)	$\mu$ h <sup>-1</sup>
1	5	3	0.361	602.6	0.613	0.793	0.054	0.1919 (r <sup>2</sup> =0.991)
2	5	9	0.285	396.5	0.506	0.609	0.040	0.2136 (r <sup>2</sup> =0.989)
3	5	15	0.468	338.4	0.424	0.573	0.036	0.2182 (r <sup>2</sup> =0.992)
4	10	3	0.252	177.5	0.185	0.229	0.016	0.1405 (r <sup>2</sup> =0.985)
5	10	9	0.398	393.8	0.349	0.651	0.032	0.2355 (r <sup>2</sup> =0.991)
6	10	15	0.305	341.8	0.384	0.524	0.035	0.2154 (r <sup>2</sup> =0.984)
7	15	3	0.186	166.2	0.209	0.311	0.015	0.1115 (r <sup>2</sup> =0.992)
8	15	9	0.215	272.8	0.466	0.611	0.034	0.2209 (r <sup>2</sup> =0.989)
9	15	15	0.232	192.3	0.192	0.326	0.016	0.1368 (r <sup>2</sup> =0.998)
Réplica	15	15	0.236	207.9	0.227	0.467	0.018	0.1525 (r <sup>2</sup> =0.983)

## 5.9. ANÁLISIS DE VARIANZA

### 5.9.1. ANOVA del Rendimiento $Y_{P/X}$

Se realizó el análisis de varianza de las variables concentración de SLB (A) y oxígeno disuelto (B) en una ecuación que describe a la respuesta rendimiento de producto por biomasa con el menor error y que incluye los términos A, B,  $A^2$ , AB,  $A^2B$  y  $AB^2$  con una  $R^2=0.93$  y un coeficiente de variación de 22.88 (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{P/X}$ .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	1.437E10 <sup>5</sup>	6	23954.98	4.461	0.167
Error	1.074E10 <sup>4</sup>	2	5370.38		
Total	1.545E10 <sup>5</sup>	8			

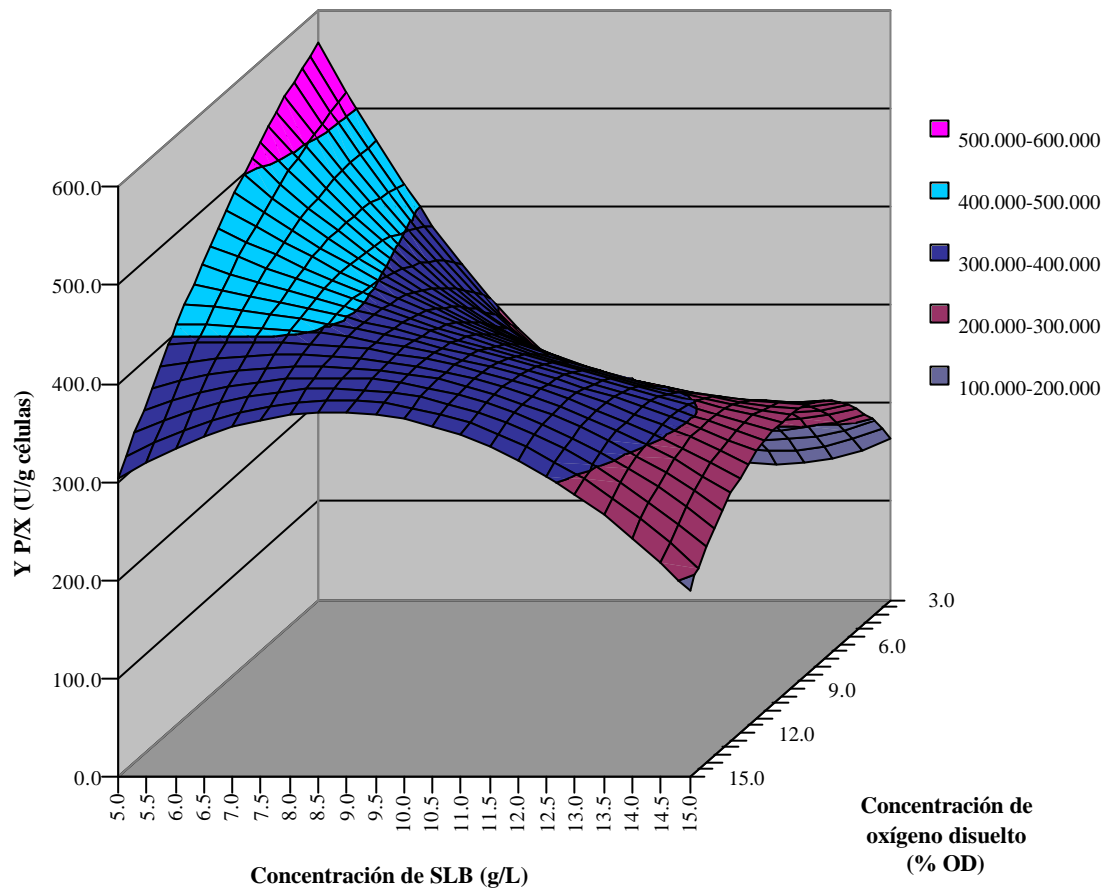
$$R^2=0.9305.$$

La ecuación que describe mejor el rendimiento de producto por biomasa se escribe:

(5-1)

$$Y_{P/X} = 1579.383333 - 245.07875*(A) - 104.95*(B) + 9.451167*(A^2) + 24.701667*(AB) - 0.9445*(A^2B) - 0.188472*(AB^2)$$

El análisis de superficie (Fig. 5.6) muestra que el óptimo de rendimiento de producto por biomasa se presenta con las condiciones 5 g/L de suero de leche y 3 % OD y fue confirmado con la herramienta solver de Excel.



**Fig. 5.6.** Superficie de respuesta para el rendimiento de producto por biomasa (U/gcélulas).



## 5.9.2. ANOVA del Rendimiento $Y_{X/S}$

**Tabla 5.6.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{X/S}$ .

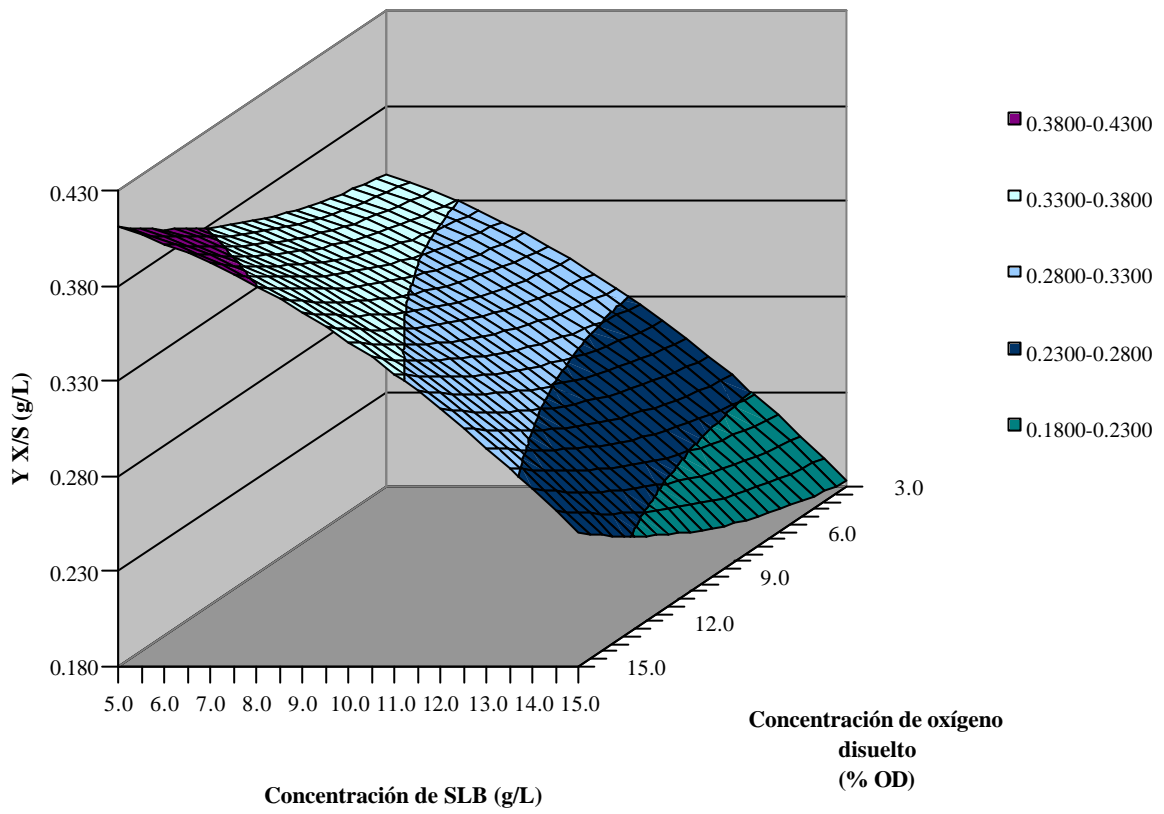
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.04682	2	0.02341	6.346	0.0331
Error	0.02213	6	0.00369		
Total	0.06895	8			

La ecuación de mejor ajuste para los datos de rendimiento de biomasa por sustrato se expresa como:

(5-2)

$$Y_{X/S} = 0.362102 - 0.000807*(A^2) + 0.000308 (B^2)$$

En la figura 5.7. se puede observar la superficie de respuesta para el rendimiento de biomasa por sustrato en función de la concentración de oxígeno y concentración de sustrato. Las condiciones óptimas para alcanzar el máximo rendimiento fueron 5 g/L de SLB y 15 % de OD. El gráfico de superficie muestra un efecto de inhibición del crecimiento microbiano al aumentar la concentración inicial de suero de leche en la fermentación, esto significa que para favorecer la producción de biomasa es mejor trabajar a niveles bajos de SLB y niveles no limitantes de OD.



**Fig.5.7.** Superficie de respuesta para el rendimiento sustrato por biomasa en la producción de PA.

### 5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células).

En la tabla 5.7. se muestra el análisis de varianza del modelo de actividad específica en función de las variables A (concentración de SLB) y B (% OD). Se propuso la ecuación de mejor ajuste para describir la respuesta actividad específica la cual involucra los términos A, B, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, AB, A<sup>2</sup>B y AB<sup>2</sup>.

**Tabla 5.7.** Análisis de varianza para la respuesta Actividad específica (U/mg células).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.26305	7	0.03758	12.498	0.2145
Error	0.00301	1	0.00301		
Total	0.26605	8			

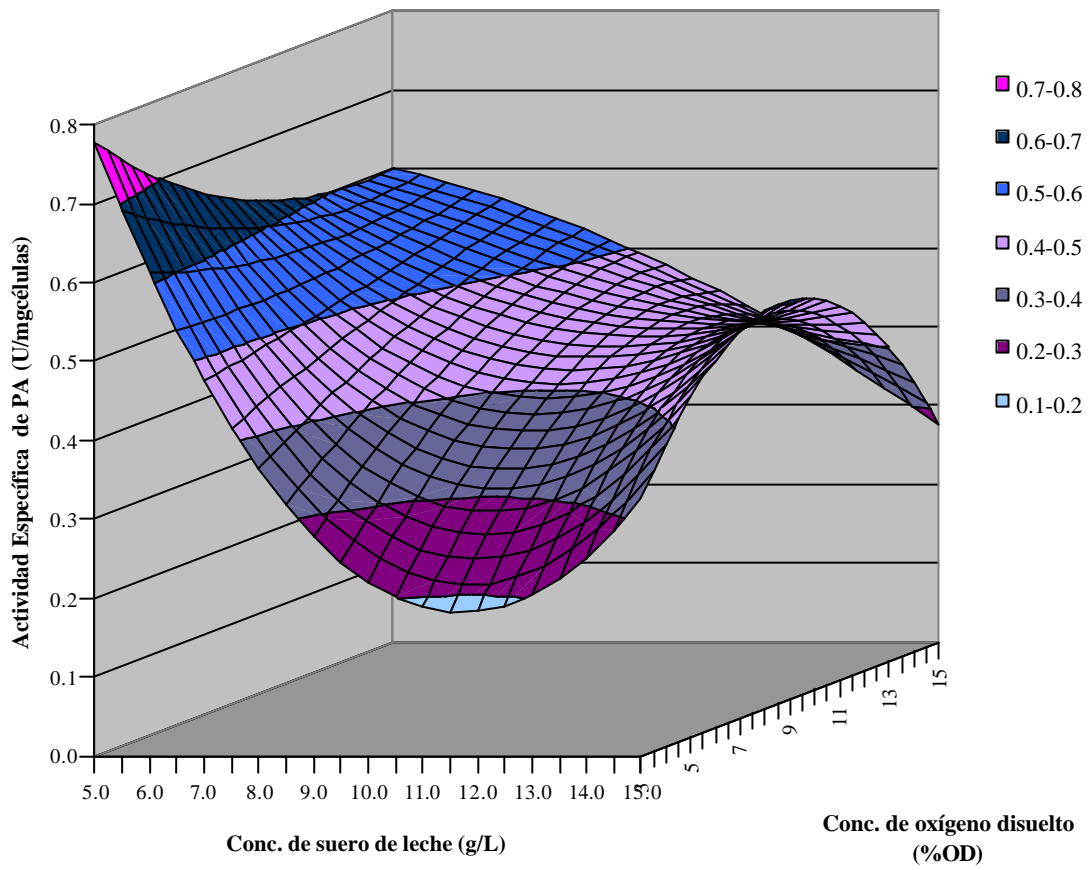
Se propuso la siguiente ecuación para describir la producción de PA en términos de actividad enzimática específica (U/mg células) :

(5-3)

$$\text{Actividad específica} = Y = 2.566653 - 0.419779*(A) - 0.20625*(B) + 0.016938*(A^2) + 0.00519*(B^2) + 0.038883*(AB) - 0.001238*(A^2B) - 0.000726*(AB^2)$$

El modelo propuesto para actividad específica en U/mg células fue el que se ajustó mejor a los datos obtenidos experimentalmente en las fermentaciones para la producción de PA con un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) del modelo de 0.9887.

De acuerdo con el análisis de máximos y mínimos las condiciones óptimas se encuentran a 5 g/L de suero de leche y 3 % de OD como se puede observar en la Fig. 5.8. Aunque el modelo en teoría sugiere que se puede alcanzar una actividad específica mayor por debajo de los niveles probados experimentalmente, en la práctica el disminuir el nivel de oxígeno durante la fermentación afecta de manera considerable el rendimiento de biomasa por sustrato como se observa en la sección 5.9.2.



**Fig. 5.8.** Superficie de respuesta para la actividad enzimática específica de PA (U/mg células).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

La expresión de penicilino acilasa (PA) en *E. coli* W3110/pPA102 se logró en presencia de galactosa, lactosa y glucosa con IPTG en el medio de cultivo, sin embargo hay una expresión basal en ausencia de inductor. El perfil de producción de PA en *E. coli* W3110 fue del tipo asociado a crecimiento. La inducción de PA con el medio adicionado con suero de leche resultó más lenta pero alcanzó los mismos niveles que se obtienen cuando se induce con IPTG o galactosa.

A la concentración más alta de suero de leche (15 g/L) y a todas las condiciones de oxígeno disuelto evaluadas (3, 9 y 15 %), la velocidad específica de crecimiento fue significativamente más baja que el promedio alcanzado en el resto de los cultivos, demostrando que existe un efecto de inhibición por sustrato en las fermentaciones.

Las condiciones de oxígeno disuelto afectan de manera importante la producción de la enzima penicilina acilasa y los valores de actividad volumétrica y específica por igual. En todas las fermentaciones, la actividad específica de PA y la productividad del proceso fueron dependientes de las condiciones de oxígeno y concentración inicial de suero. Las mejores condiciones para la producción de PA de acuerdo con el análisis de superficie de respuesta y la herramienta Solver de Excel son: concentración inicial de 5 g/L de suero de leche y 3 % de oxígeno disuelto constante.

Los resultados generados en este trabajo muestran que el suero de leche puede ser empleado eficientemente como sustrato e inductor en la producción de proteínas recombinantes como la penicilino acilasa, y representa una alternativa a los procesos actuales de tratamiento del suero de leche, que es un efluente altamente contaminante.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar cultivos de tipo lote alimentado, ya que la edad del cultivo influye en la actividad de penicilino acilasa (PA) en *E.coli* W3110/pPA102. Estos experimentos podrían determinar si el efecto observado al final de los cultivos se debe a limitaciones postraduccionales o por presencia de proteasas.

Se demostró que 5 g/L de suero de leche es suficiente para alcanzar valores altos, tanto de crecimiento de la cepa como de producción de PA, por lo que se recomienda utilizar el suero líquido en lugar de suero de leche en polvo procesado, con lo que se evita la necesidad de aplicar tratamientos costosos de concentración como evaporación y ultrafiltración.

Por otra parte se recomienda investigar el mecanismo responsable de la expresión de PA con diferentes fuentes de carbono en la *E.coli* W3110. Este patrón de inducción puede ser el resultado de la fusión del promotor *lac* en la secuencia del promotor *pac* en el vector de expresión pPA102.

## 7. REFERENCIAS

Ahn W. S., Park S. J., Lee S. Y. (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3624-3627.

Altaras, N.E., Etzel, M.R., Cameron, D.C. (2001). Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8. *Biotechnol Prog.* 17(1):52-56.

Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition. McGraw-Hill International Editions; Cap. 7.

Balansingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., y Lilly, D.(1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E.coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 250-256.

Barret, E.L., Collins, E.B., Hall, B.J. y Matoi, S.H. (1983). Production of 2,3-butylene glycol from *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* . *J Dairy Sci.* 66(12):2507-2514.

Beom Soo Kim. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. (2000). *Enzyme Microb Technol.* 27: I. 10, 774-777.

Burlingame, R. and Chapman, P.J. 1983. Catabolism of phenilpropionic acid and its 3-hydroxyderivate by *E. coli*. *J.Bacteriol.* 155 (1): 113-121.

Compagno C, Porro D, Smeraldi C, Ranzi BM. (1995). Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(5):822-825.

Dai, M., Zhu, Y., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G. y 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, 1298-1303.

De León, A. (1996). Tesis de Maestría. Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilina acilasa por *Escherichia coli* recombinante. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

De León, A., Hernández, V., Galindo, E., y Ramírez, O.T. (2003). Effects of dissolved oxygen on the production of recombinant Penicillin Acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 33:689-697.

Doelle, H.W., Ewings, K.N. y Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial system. *Adv. Biochem. Eng.* 23:1-35.

Donovan RS, Robinson CW y Glick BR. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol.* 16:145-154.

Duggleby H. W., Tolley S.P. , Hill C.P., Dodson E.J. , Dodson G. and Moody P.C. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature* 373: 264-268.

El-Holi M.A. y Al-Delaimy K. S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger* . *African J Biotechnol.* 2 (10) 356-359.

El-Samragy Y.A.<sup>1</sup>;Khorshid M.A.; Foda M.I.; Shehata A.E. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger* *International J of Food Microbiol.* 29:2 411-416 .

Ennis, B.M., Maddox, IS. (1987). Butanol production from lactose hydrolysed whey permeate by fermentation with *Clostridium acetobutylicum*: comparison with non hydrolysed whey permeate. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22(1): 75-81.

Fang, H.H.P. (1991). Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated sludge and anaerobic processes. *J. Dairy Sci.* 74: 2015-2019.



Ghaly A.E., and Kamal M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res.* 38(3):631-44.

Huang Y., y Yang ST. (1998). Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol.Bioeng* 60(4):498-507.

Huber R.E., Lytton J., y Fung E.B. (1980). Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141(2):528-33.

Jacob F, Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56.

Konicek, J., Konickova-Radochova, M. (1994). Use of whey for production of exopolysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiol.(Praga)*. 37(2):102-104.

Kumar V., Ramakrishnan S., Teeri TT., Knowles JK., Hartley BS.(1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grow on whey permeate. *Bioæchnol (NY)*. (1):82-5.

Lee PC, Lee WG, Kwon S, Lee SY, Chang HN. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54(1):23-7.

Leite A. R., Guimarães W. V., De Araujo E. F., Silva D. O. (2000). Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian J of Microbiol* . 31:212-215.

Liu C, Liu Y, Liao W, Wen Z, Chen S. (2004). Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. *Appl Biochem Biotechnol*. 113-116:627-38.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. España. Cap.10, 342-345.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.

Lu, J.Y., Lowe, D.A., Kennedy, M.D. y Low, P.S. (1999). Folate-targeted enzyme produg cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug. *J. of Drug Targeting*. 7: (1), 43-53.

Marshall, K. R. (1982). Industrial isolation of milk proteins: Whey proteins. *Developments in Dairy Chemistry*. 1: 339-373.

Maullu C., Lampis G., Desogus A., Ingianni A., Rossolini G. M., y Pompei R. (1999). High-Level Production of Heterologous Protein by Engineered Yeasts Grown in Cottage Cheese Whey . *Applied and Environmental Microbiol*. Vol. 65: (6), 2745-2747.

Merino P. (1992). Tesis Doctoral. Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gen *pac* y su producto, la enzima penicilino acilasa de *Escherichia coli*. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 13:420-428.

Ospina, S.S., López-Mungía, A., González, R.L. y Quintero, R. (1992). Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53:205-214.

Porro, D.; Martegani, E.; Ranzi, B. M. (1992). Lactose\ whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 799-805.

Quintero R. (1987). Ingeniería Bioquímica .Teoría y aplicaciones. Editorial Alambra Mexicana; Cap. 3.

Qureshi, N., Maddox, I.S.(2003). Production of butanol from concentrated lactose/whey permeate using *Clostridium acetobutylicum* and removal by perstraction. 25th Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals. Paper No. 3-10.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. y Quintero, R. (1994a). Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Proc. Biochem.* 29: 197-206.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. y López-Munguía, A. (1994b). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16:895-903.

Ramírez MA.O., Rivas N. (2003). Production and partial characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Arch Latinoam Nutr.* 53(2):194-201.

Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G. y Branlant, C. (1993). Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC11105. *Biotech. Bioeng.* 41, 14-24. *Current Microbiol.* 29, 263-268.

Rossano R, D'Elia A, Riccio P. (2001). One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite--a flexible procedure suitable for small- and medium-scale preparations. *Protein Expr Purif.* 21(1):165-9.

Roukas, T., (1999). Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22(6):617-621.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Shömer, U., Segner, A. y Wagner, F. (1984). Penicillin acylase from the hybrid strain *E. coli* 5K(pHM12): enzyme formation and hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics with whole cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 307-312.

Sizmann D., Keilman C., and Böck A. (1990). Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *E. coli*. ATCC 11105. *Eur.J.Biochem.* 192: 143-151.

Terrel, S. L.; Bernard, A.; Bailey, R. B. (1984). Ethanol from whey: continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 577-580.

Terreni, M., Pagani, G., Ubiali, D., Fernandez-Lafuente, R., Mateo, C., Guisan, J.M.(2001). Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin C. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2429-2432.

Varela, H., Ferrari, M.D., Loperena, L. Y Lareo, C. (1992). Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiol.* 8(1):14 – 20.

Valle, F., Balbás, P., Merino, E. y Bolívar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature and industry. *Trends in Biochem Sci.* 16: 36-40.

Vrudhula, V.M., Senter, P.D., Fisher, K.J., Wallace, P.M. (1993). Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate. *J. Med. Chem.* 2: 919-923.

Viitanen M., Vasala A., Neubauer P. y Alatosava T. (2003). Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbiol C. Factories*. [www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2](http://www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2).

Yang, S.L., Wu, R.P., Wang, J.X., He, J.S. y Zhang, S.B. (1988). Cloning and expression of the penicillin acylase gene. III. Temperature regulates the expression of the penicillin acylase gene at transcriptional level. *Chin. J. Biotechnol.* 4: 32-37.

Youshko, M.I., Van Langen, L.M., Vroom, E., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K. (2001). Highly efficient synthesis of ampicillin in a aqueous solution precipitate system: repetitive addition of substrates in a semicontinuous process. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 426-430.

## APÉNDICES

### Apéndice A

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

##### A.1 Kanamicina (35 mg/μL).

Se disuelven 0.0448 g de kanamicina (Sigma) en 1 mL de agua destilada. La solución se esteriliza en frío a través de un filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. La solución estéril se almacena en refrigeración a 4 ° C y se reemplaza cada mes.

##### A.2 PDAB (p-dimetil-aminobenzaldehído)

Se disuelven 10 g de reactivo PDAB en 50 mL de etanol al 60 % (v/v), luego agregar 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y aforar a 1 L con etanol al 60 % (v/v).

##### A.3 Penicilina G al 20%.

Disolver 0.2 g de penicilina G (Sigma) en 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.8.

##### A.4 6-APA (ácido 6-aminopenicilánico).

Se disuelven 2.5 g de reactivo 6-APA por L de buffer de fosfatos a pH 7.8.

##### A.5 Buffer de fosfatos a pH 7.8.

Mezclar 42.5 mL de una solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M y 457.5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M. Ajustar pH con ácido fosfórico y aforar a 1 L .

##### A.6 Reactivo DNS

Se disuelve 1 g de NaOH (Baker), 20 g de tartrato de sodio y potasio, 0.05 g de metabisulfito de sodio y 0.2 g de fenol en 60 mL de agua destilada. Se agrega 1 g de ácido 3-5-dinitrosalicílico (Sigma) a la solución y se afora a 100 mL. Se mantiene en refrigeración y protegido de la luz.

### **Reactivo E**

Se prepara por separado las siguientes soluciones:

- A) Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en agua destilada.
- B) Solución de tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada.
- C) Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N

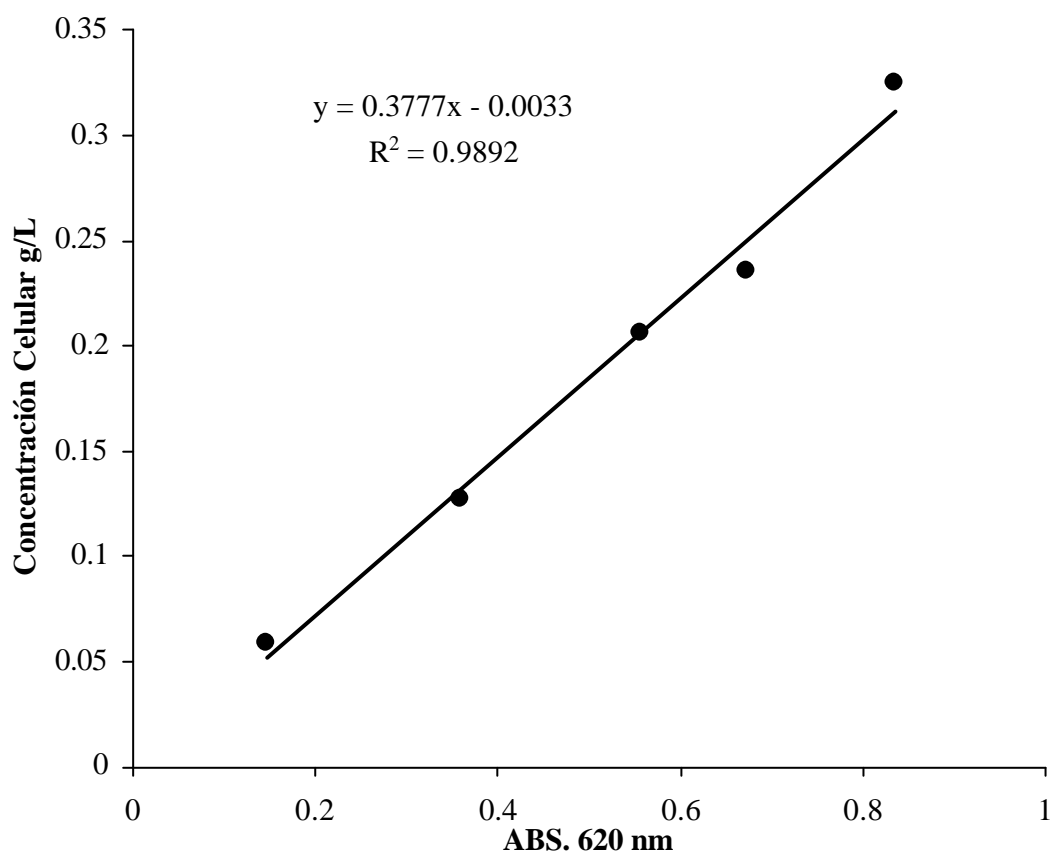
Para preparar 100 mL de reactivo E se mezcla 1 mL de la solución A), 1 mL de la solución B y 98 mL de la solución C. El reactivo se almacena a 4 ° C y protegido de la luz.

## Apéndice B

### B .1. Curva estándar de concentración celular (peso seco)

**Tabla. B.1.** Datos para la construcción de la curva peso seco

Muestra	1	2	3	4	5
Vol. de muestra (L)	0.2	0.098	0.1	0.05	0.048
Peso seco (g)	0.0126	0.0112	0.0207	0.0119	0.01568
Abs. 620 nm.	0.1469	0.3578	0.5566	0.6723	0.8346
Conc. celular (g/L)	0.063	0.1143	0.207	0.238	0.3266



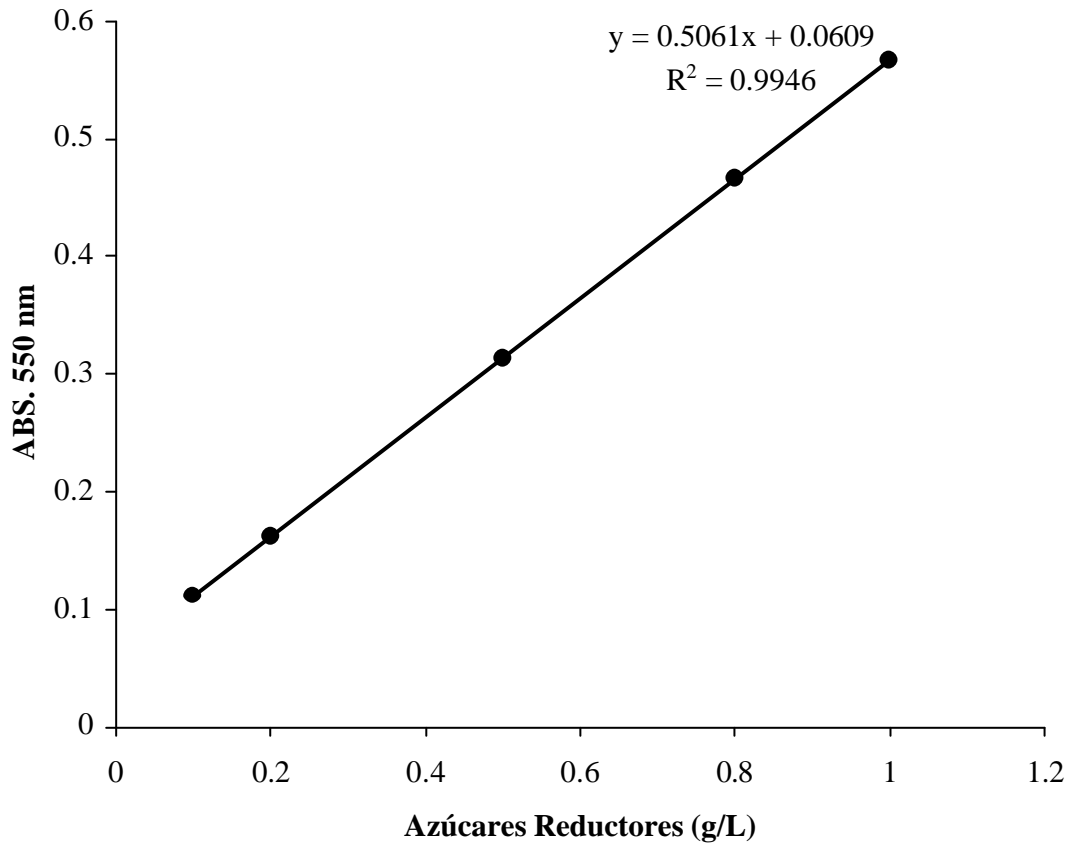
**Fig.B.1.** Determinación de concentración celular.



**B.2 Curva estándar de azúcares reductores por el método del ácido di-nitrosalicílico (DNS).**

**Tabla.B.2.** Datos para la construcción de la curva.

TUBO		1	2	3	4	5
Estd. lactosa (g/L)	0	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0
Conc. Lactosa (g/L)	----	0.0837	0.13081	0.4315	0.76276	0.96815
Vol. de muestra (µL)	----	250	250	250	250	250
Reactivo DNS (µL)	500	500	500	500	500	500
Agua (mL)	4.25	4	4	4	4	4
Abs. 550 nm	---	0.0116	0.0354	0.1876	0.35525	0.4592



**Fig.B.2.** Determinación de lactosa.

### B.3 Curva Estándar para la Determinación de Actividad Enzimática de PA.

Tabla B.3. Datos de construcción de la curva.

TUBO	6-APA(mg/mL)	Alícuota	Etanol abs.	PDAB	PBS pH 7.8	d.o.415 nm
(BCO)1	0	0	0.96	0.5	0.04	0
2	0.078	0.04	0.96	0.5	0	0.0345
3	0.1562	0.04	0.96	0.5	0	0.074
4	0.3135	0.04	0.96	0.5	0	0.1475
5	0.625	0.04	0.96	0.5	0	0.2865
6	1.25	0.04	0.96	0.5	0	0.575

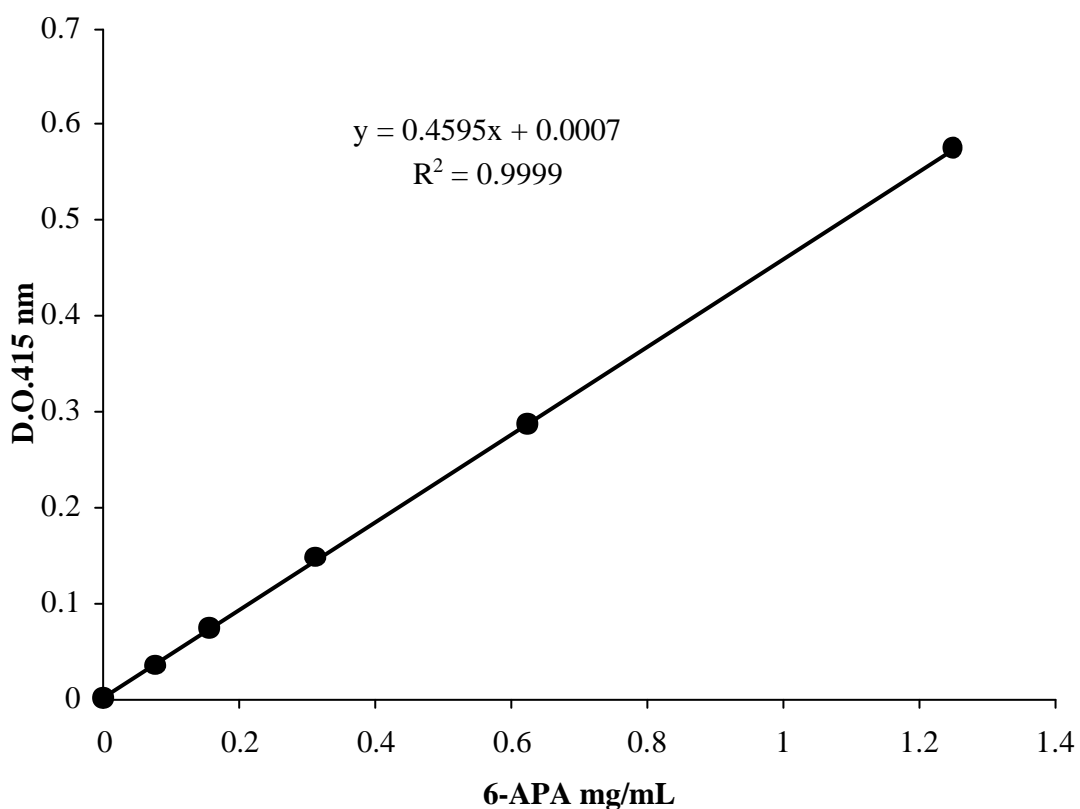
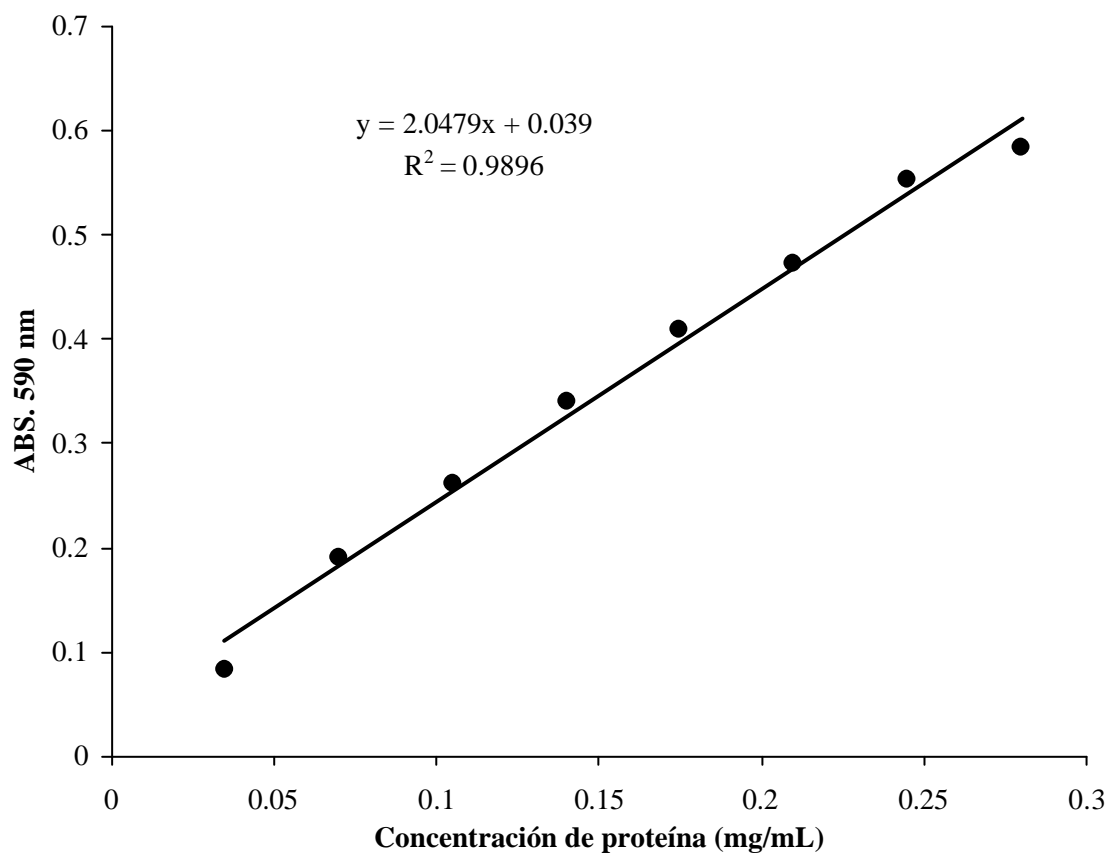


Fig. B.3 Determinación de actividad enzimática de PA.

#### B.4 Curva estándar para la determinación de proteína total.

**Tabla.B.4.** Datos para la construcción de la curva.

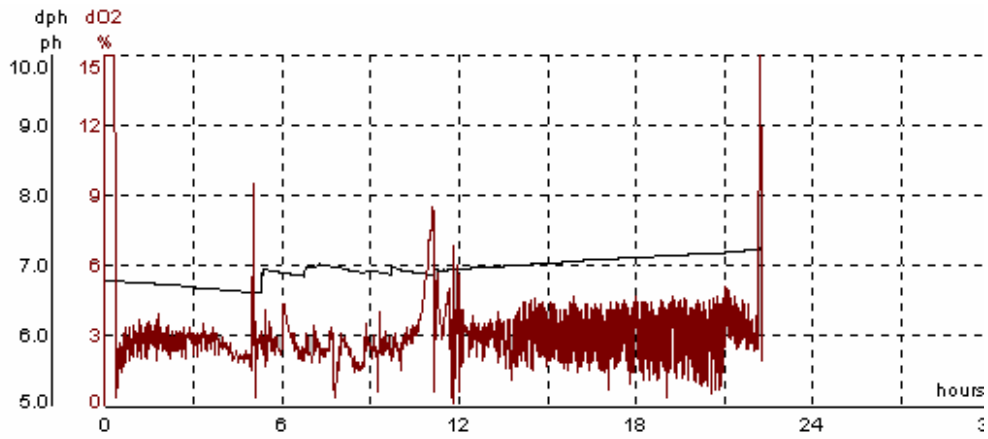
TUBO		1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (μL)	----	25	50	75	100	125	150	175	200
Agua (μL)	1000	975	950	925	900	875	850	825	800
Reactivo E (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Reactivo Folin (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Conc. Prot.( mg/mL)	----	0.035	0.07	0.105	0.14	0.175	0.21	0.245	0.28
Abs. 590 nm	----	0.083	0.190	0.261	0.340	0.410	0.473	0.553	0.583



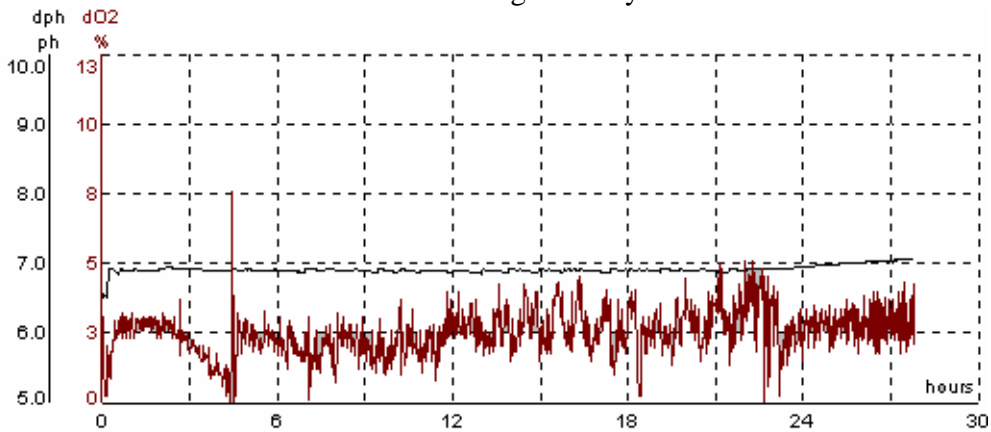
**Fig.B.4.** Determinación de proteína total.

## Apéndice C

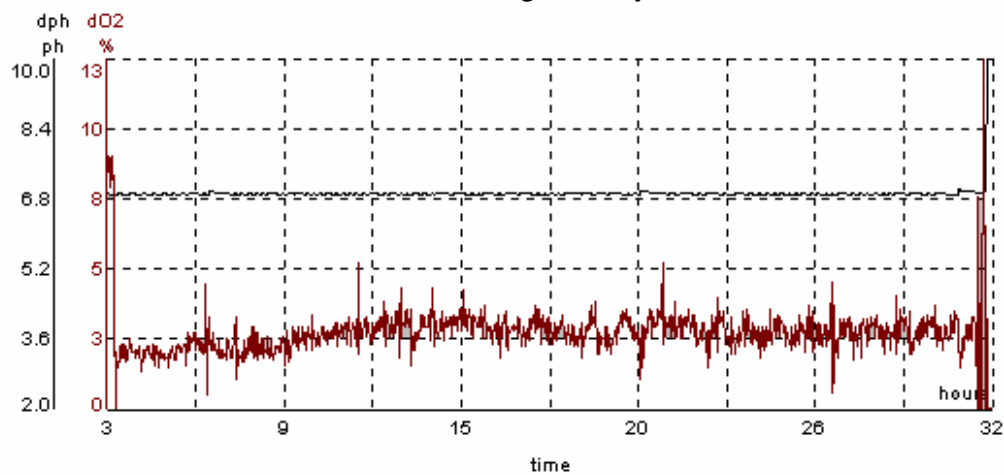
### Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor.



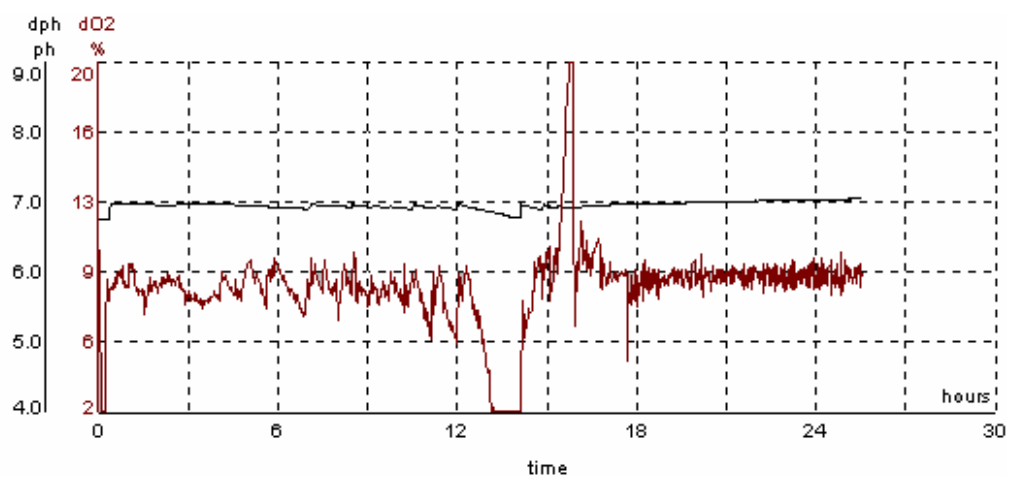
Cultivo 5 g/L SLB y 3 % de TOD



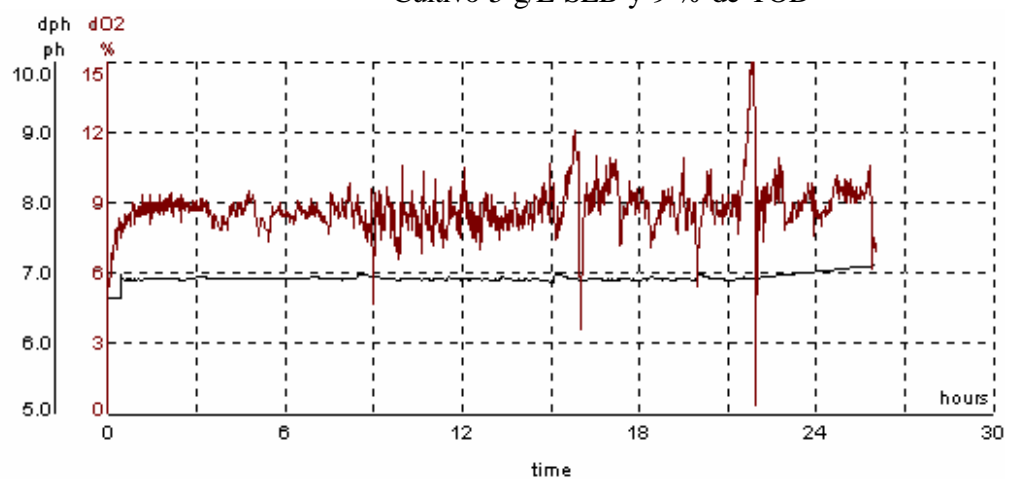
Cultivo 10 g/L SLB y 3 % de TOD



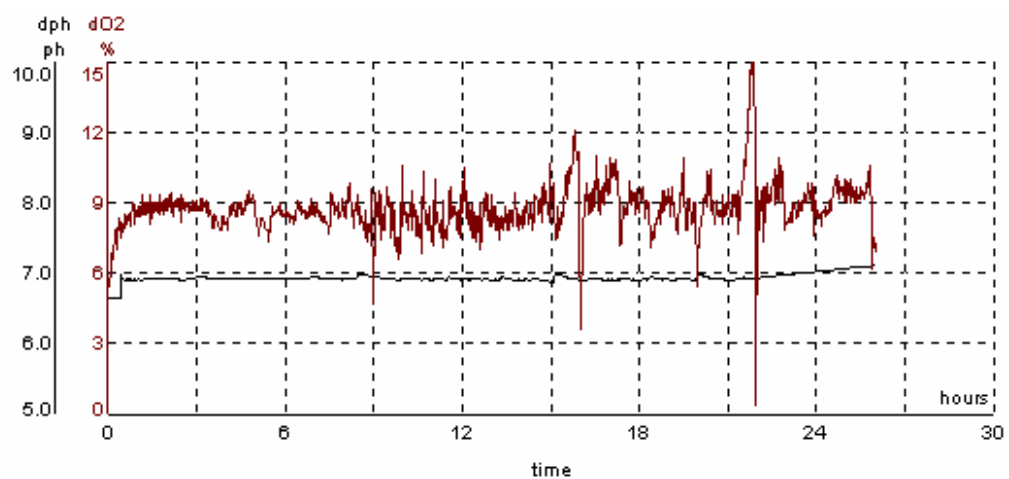
Cultivo 15 g/L SLB y 3 % de TOD



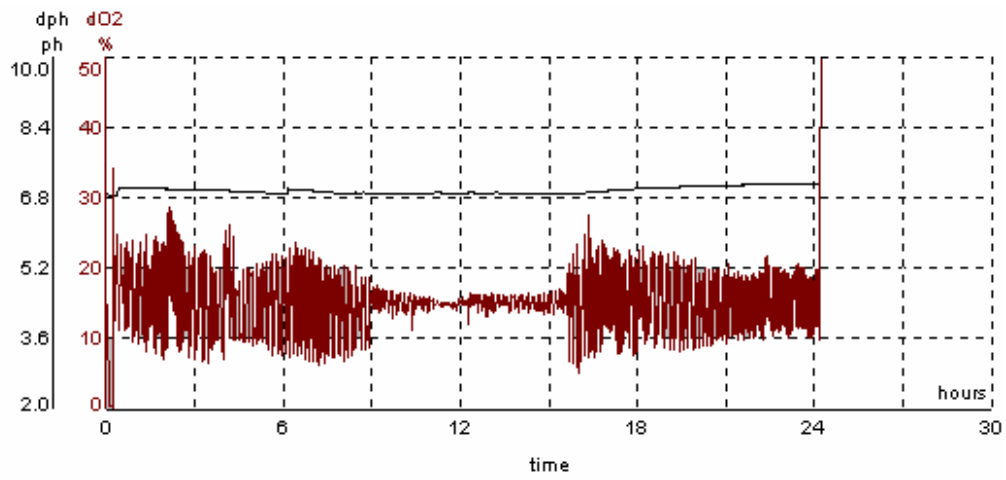
Cultivo 5 g/L SLB y 9 % de TOD



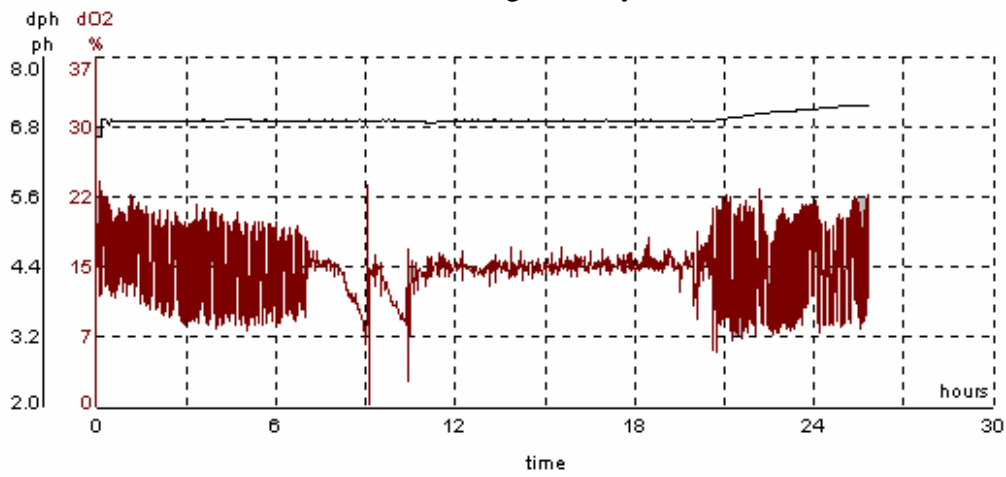
Cultivo 10 g/L SLB y 9 % de TOD



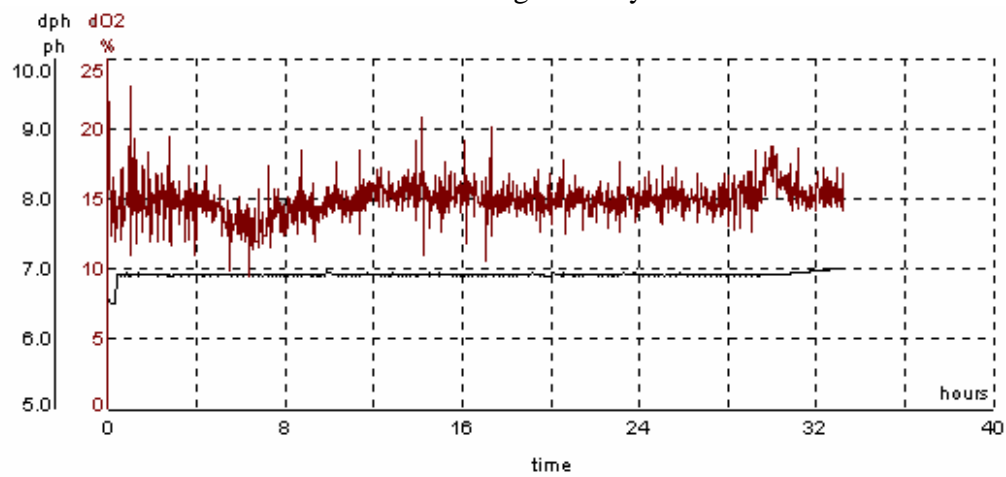
Cultivo 15 g/L SLB y 9 % de TOD



Cultivo 5 g/L SLB y 15 % de TOD

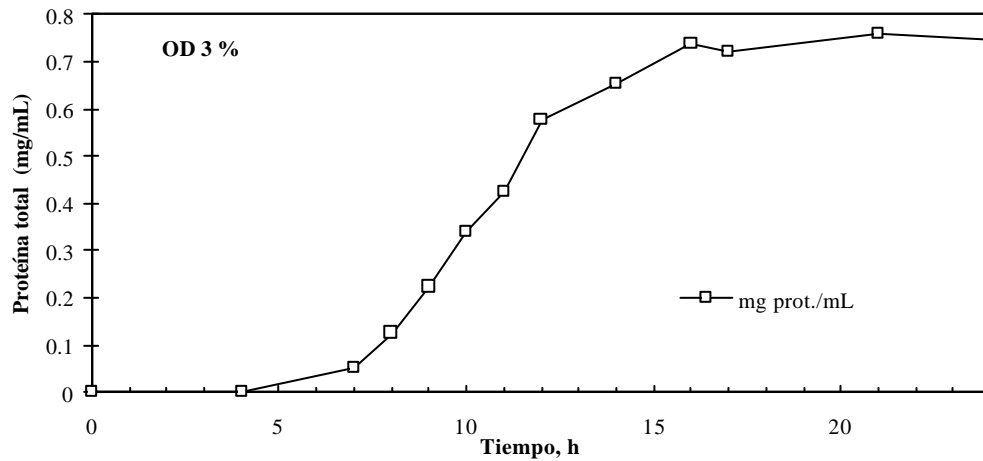
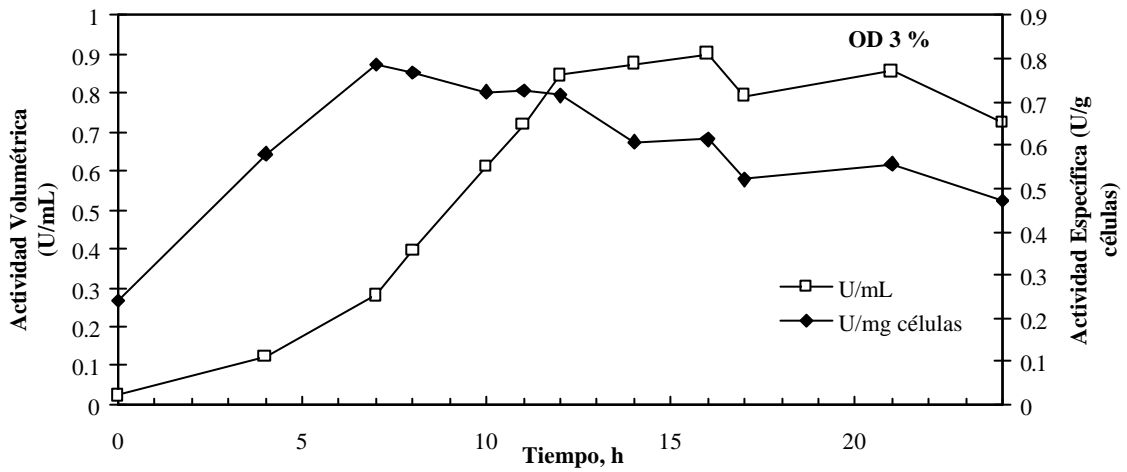
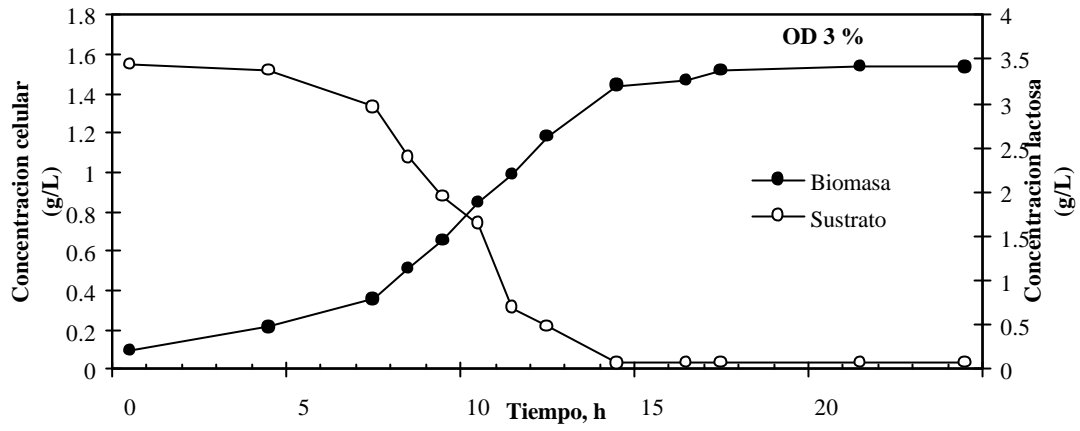


Cultivo 10 g/L SLB y 15 % de TOD

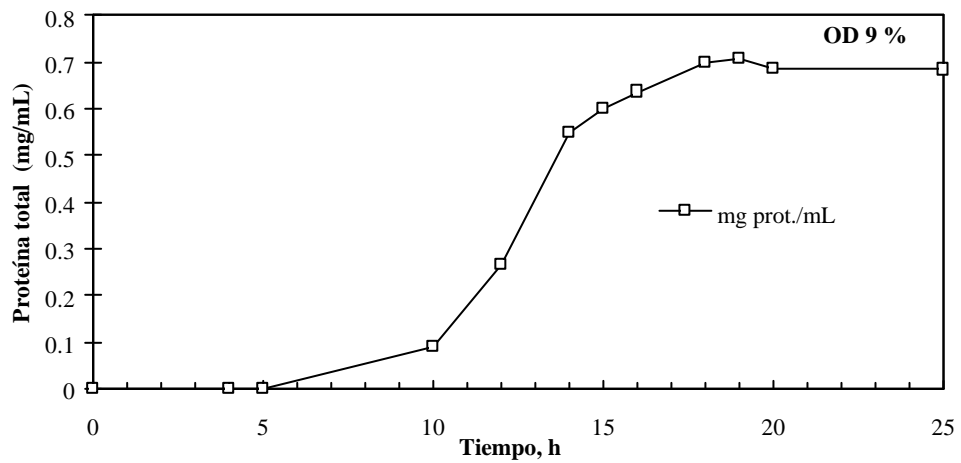
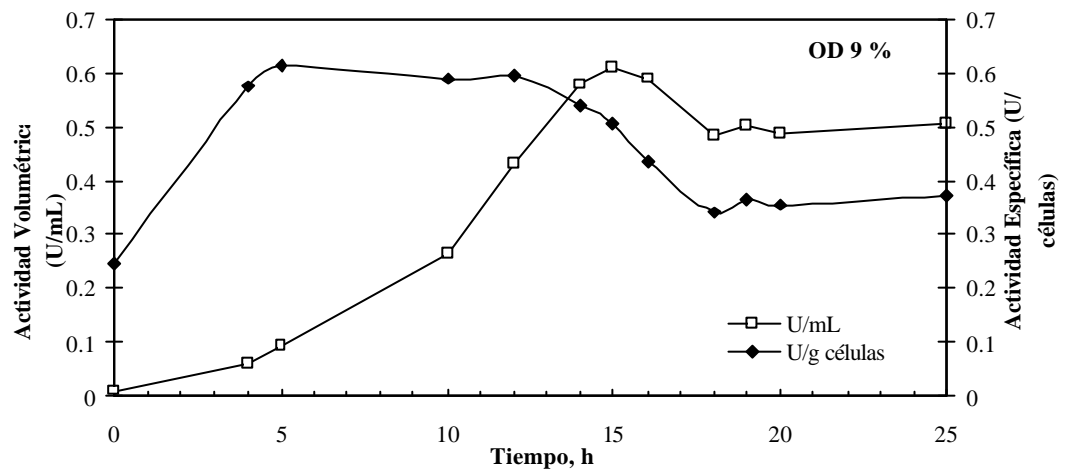
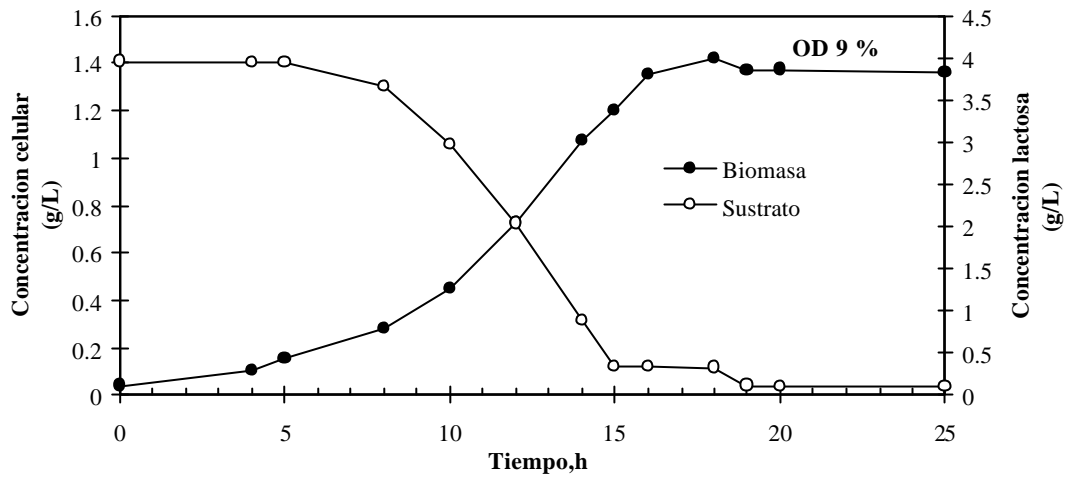


Cultivo 15 g/L SLB y 15 % de TOD

## APÉNDICE D

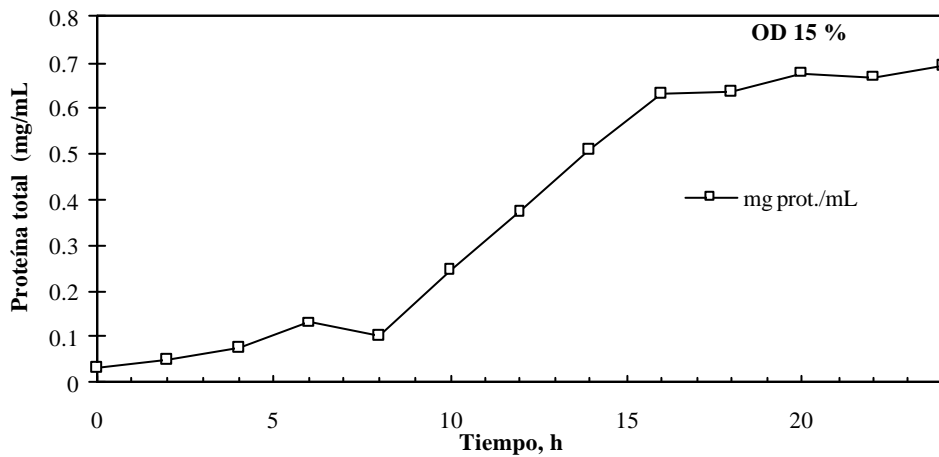
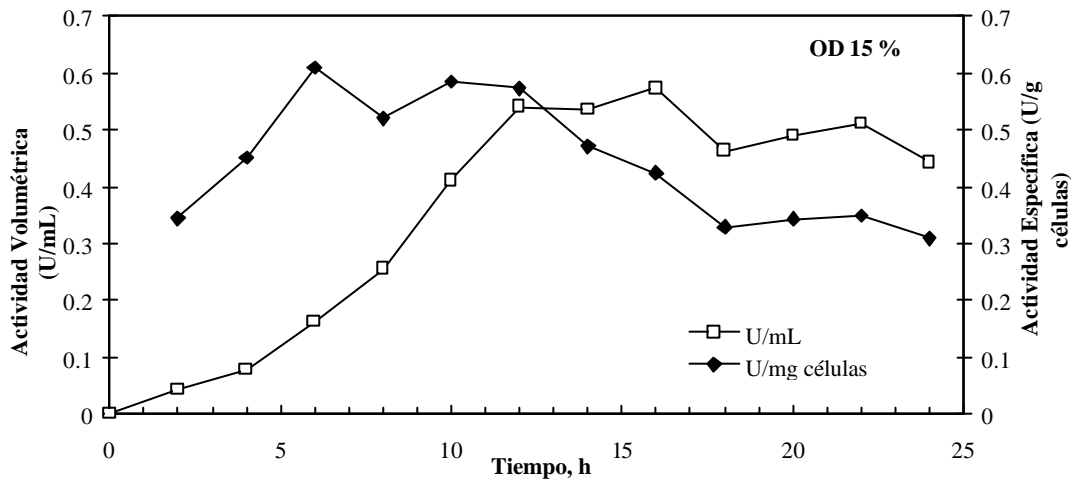
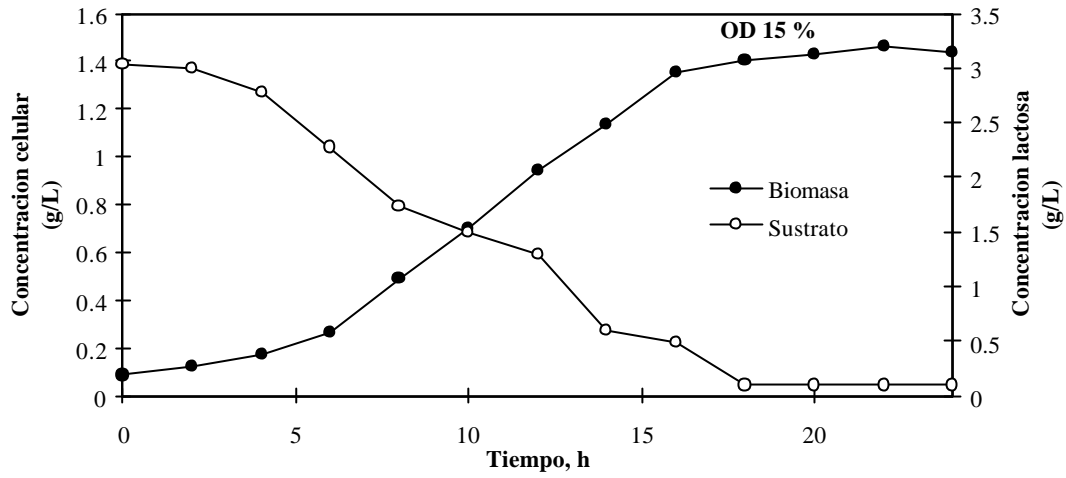


**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**

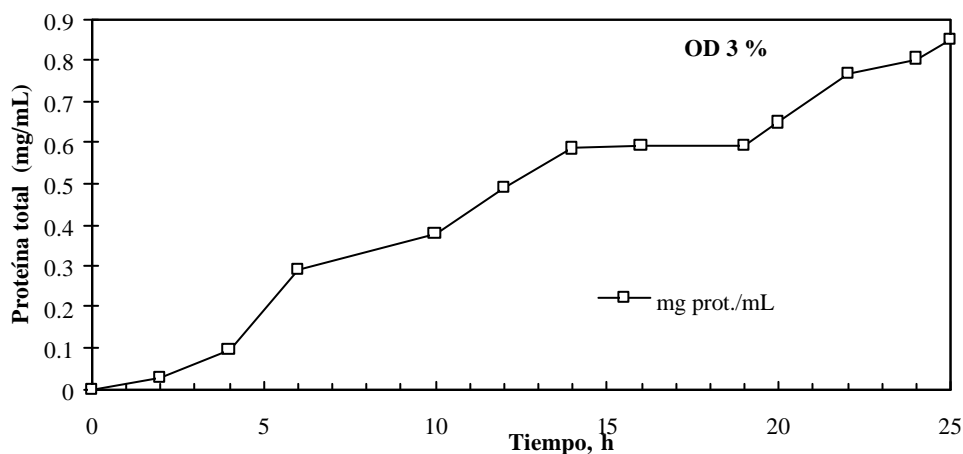
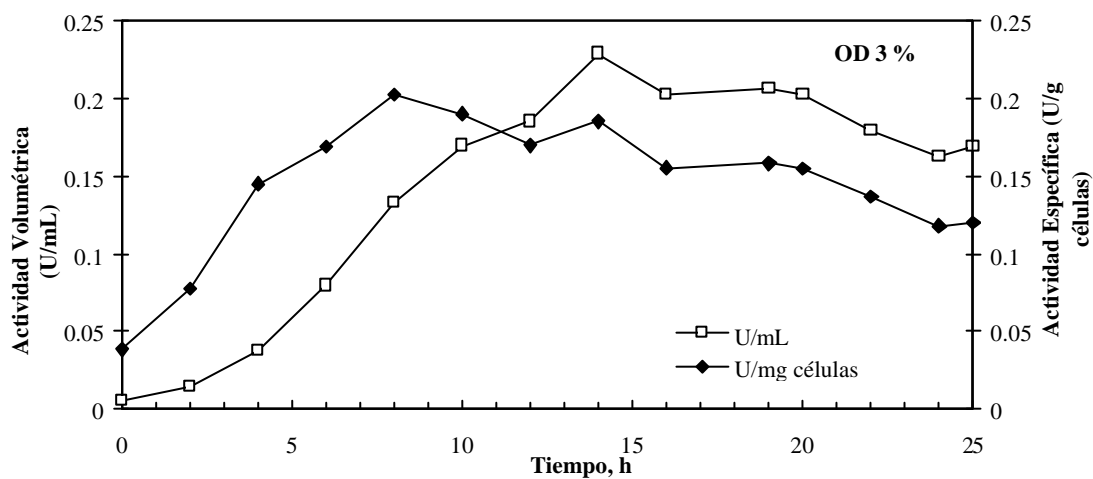
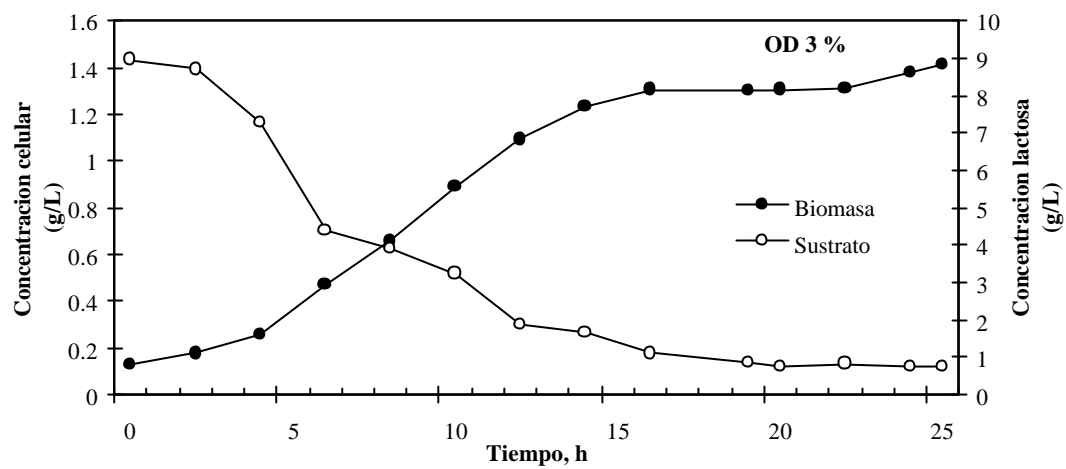


**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**

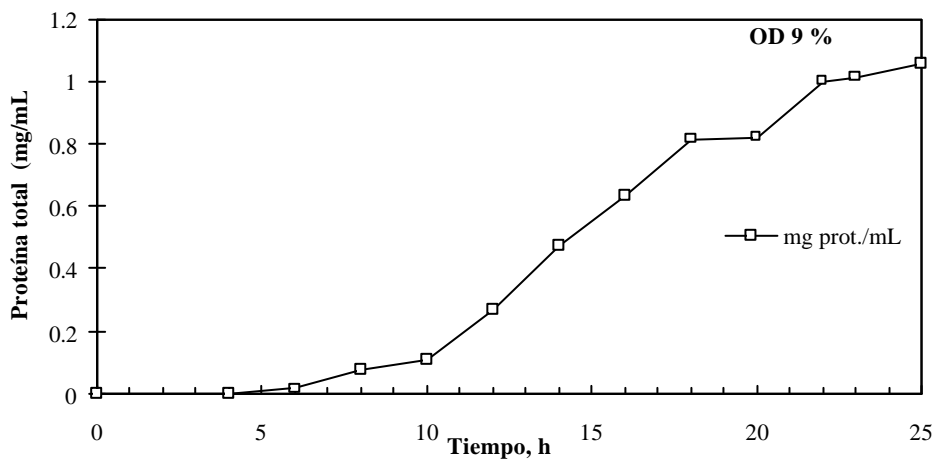
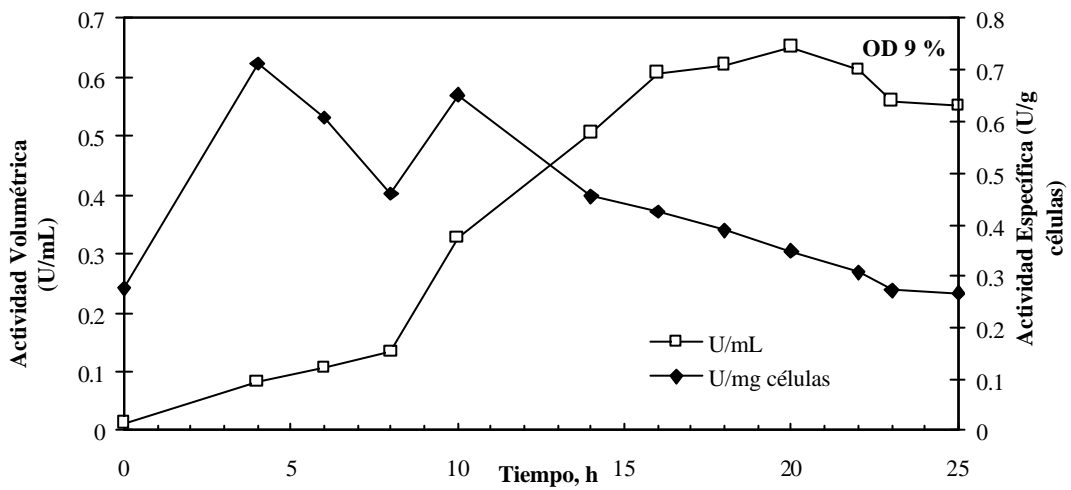
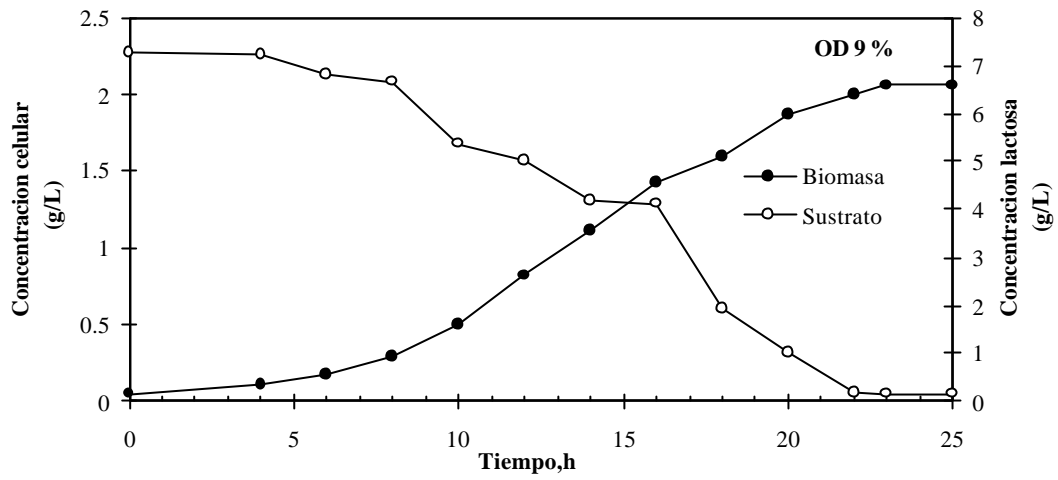




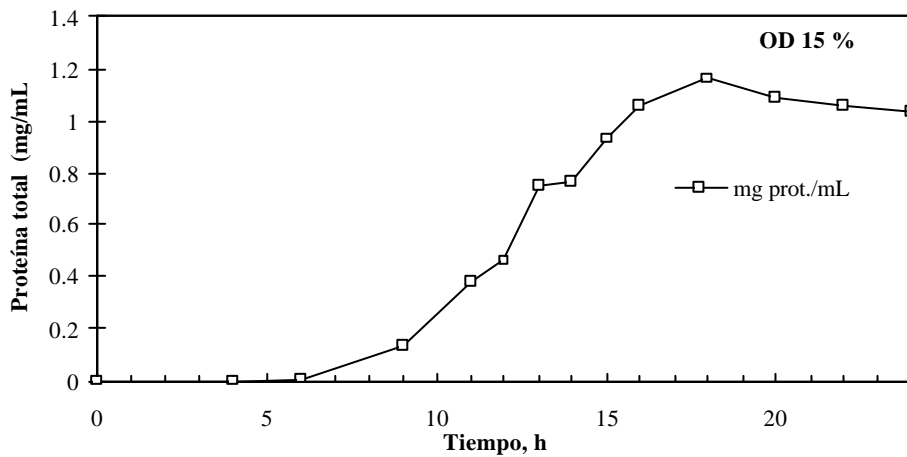
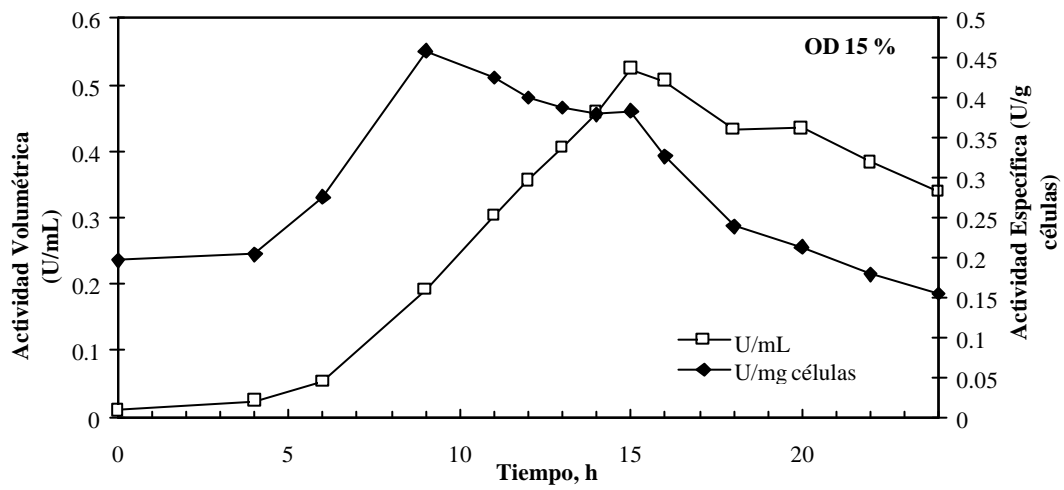
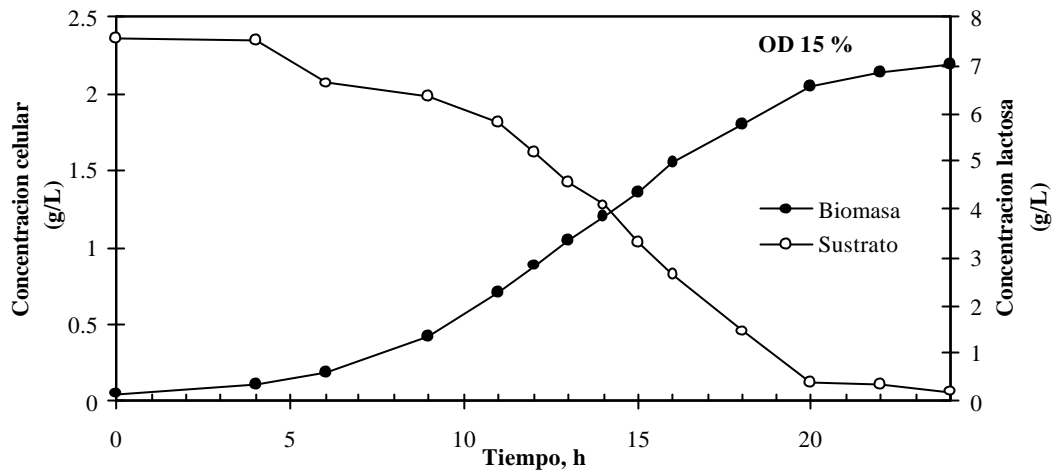
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



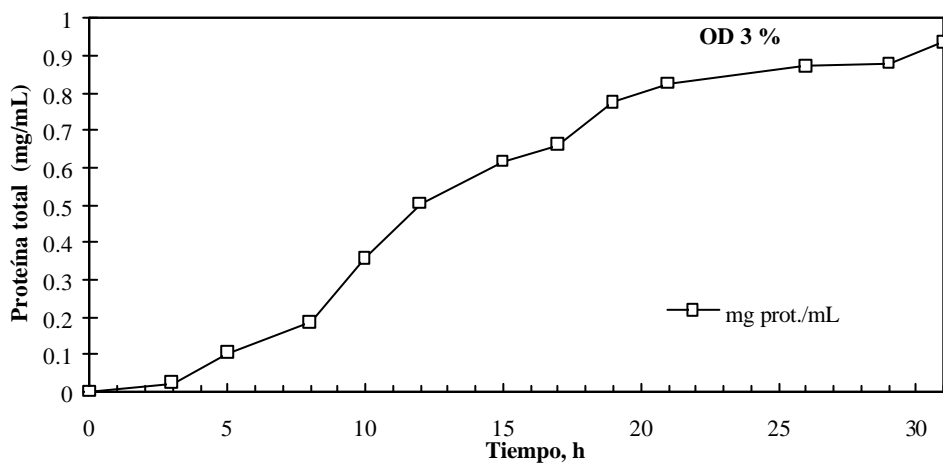
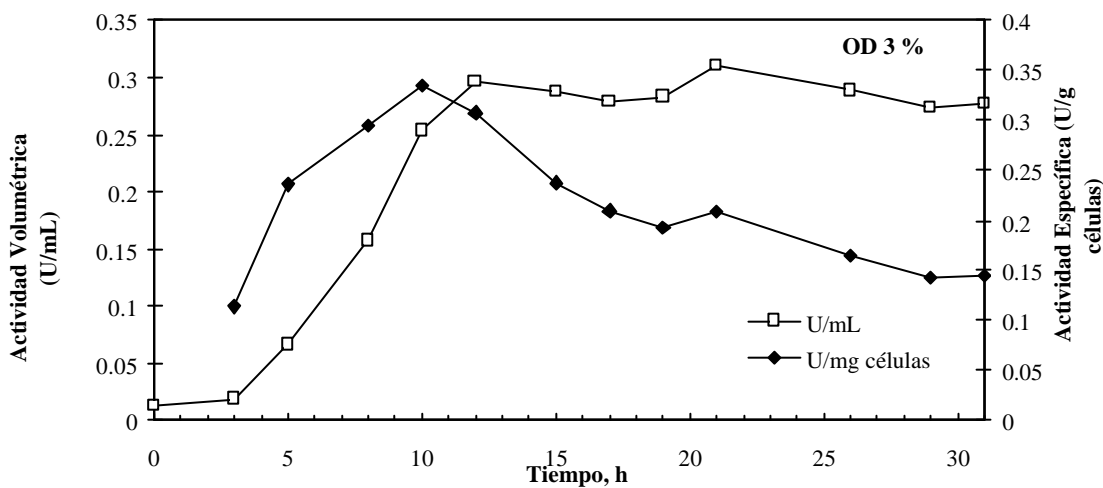
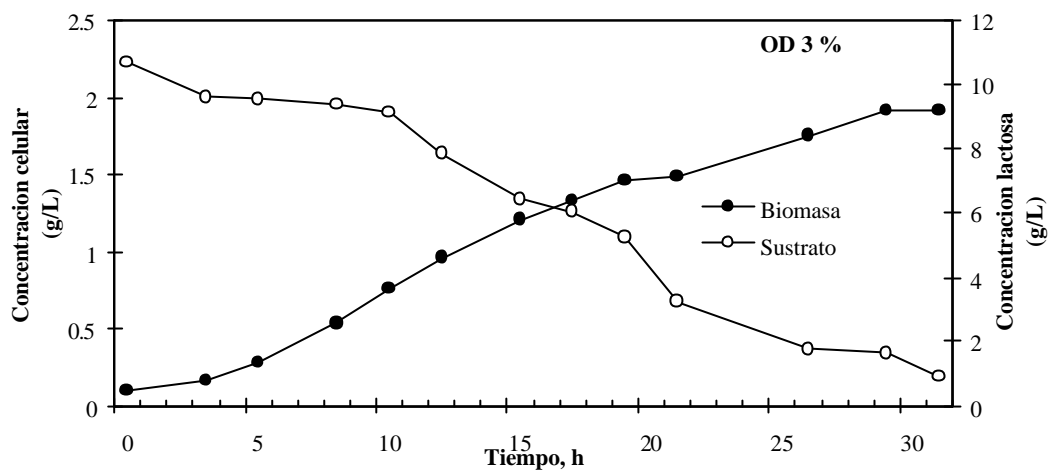
**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



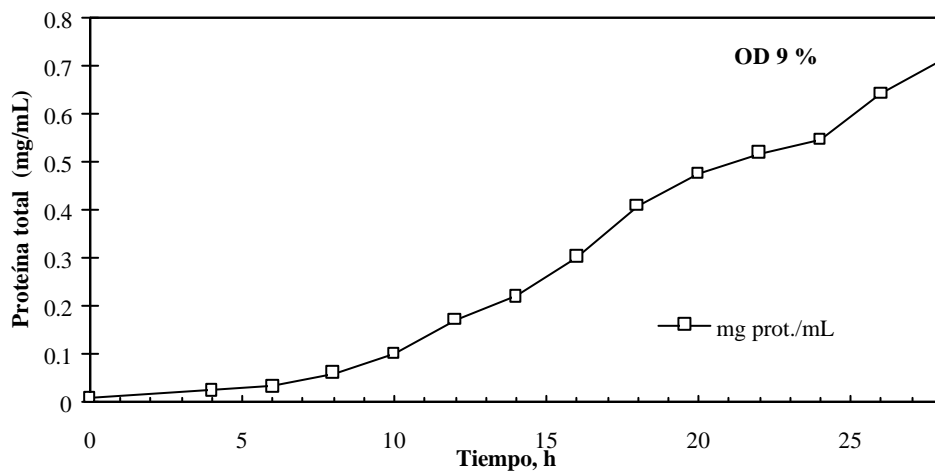
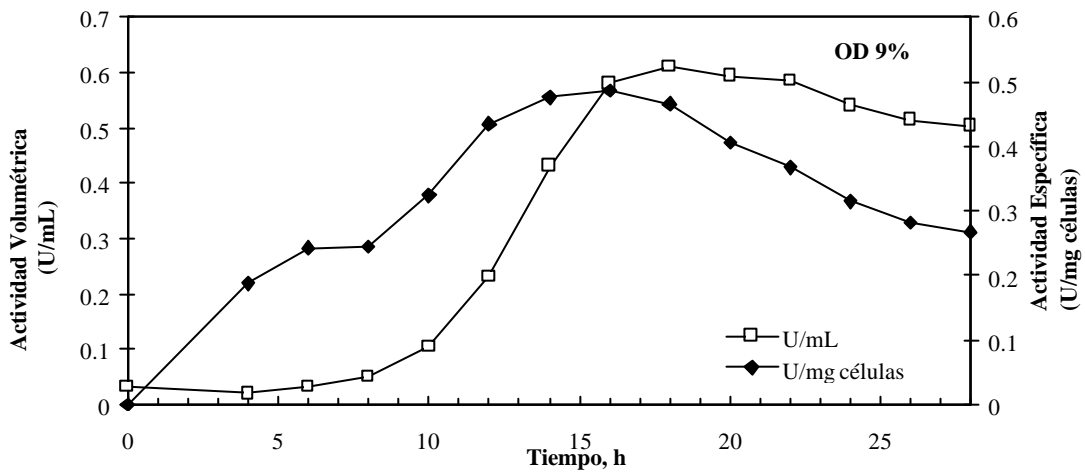
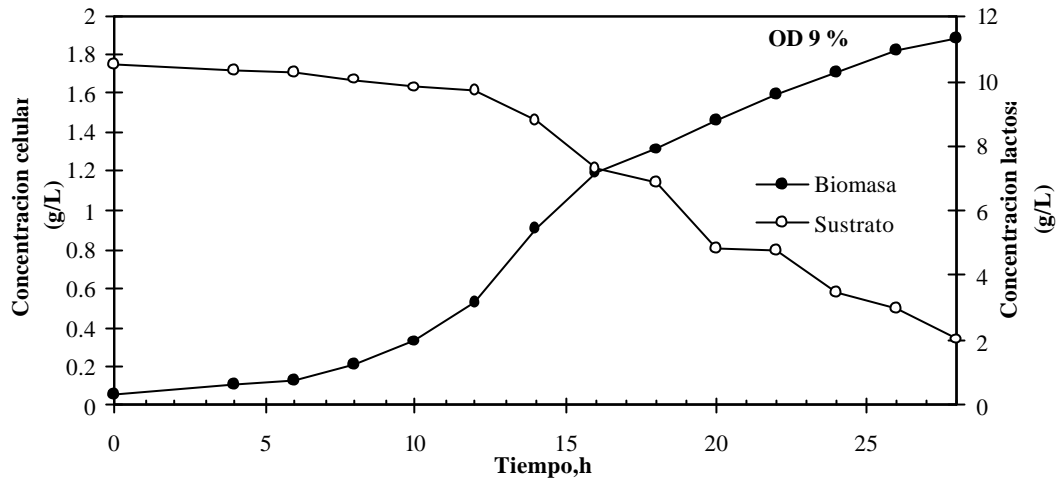
**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



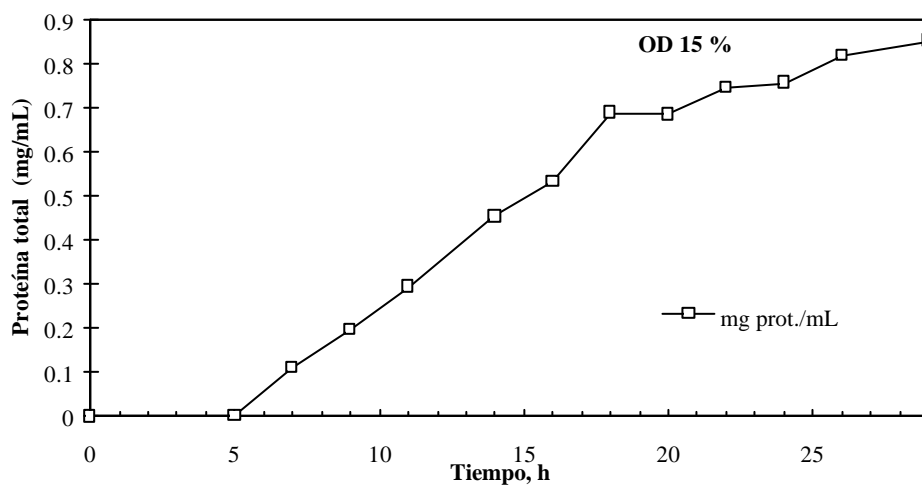
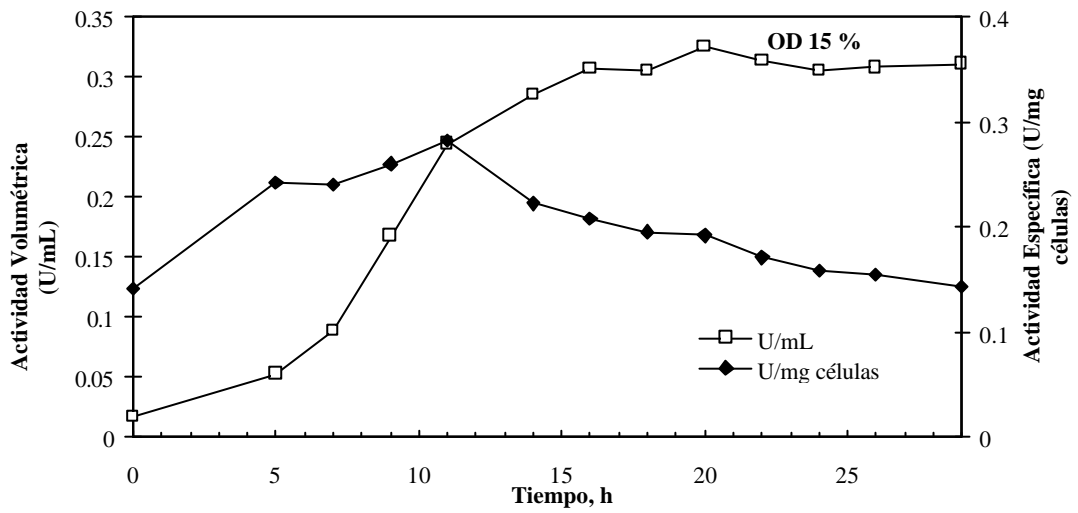
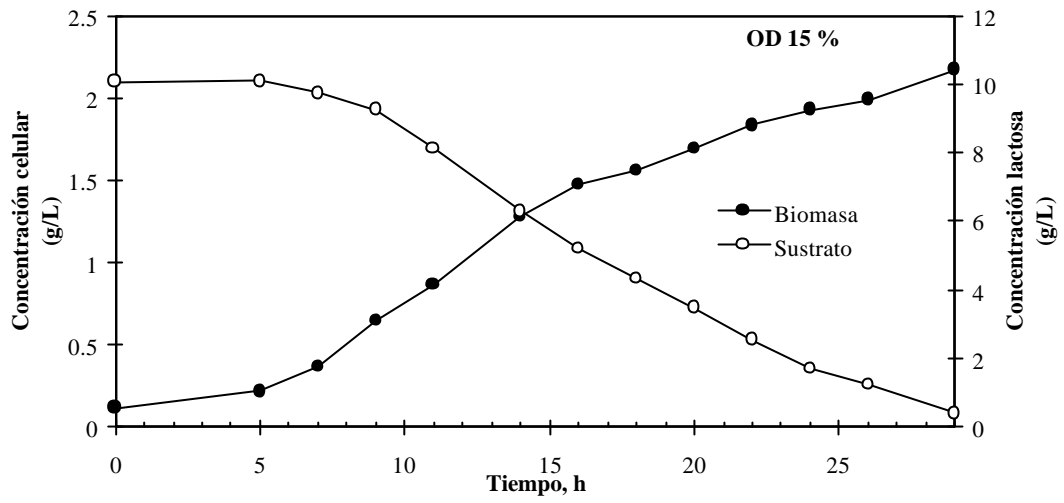
**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



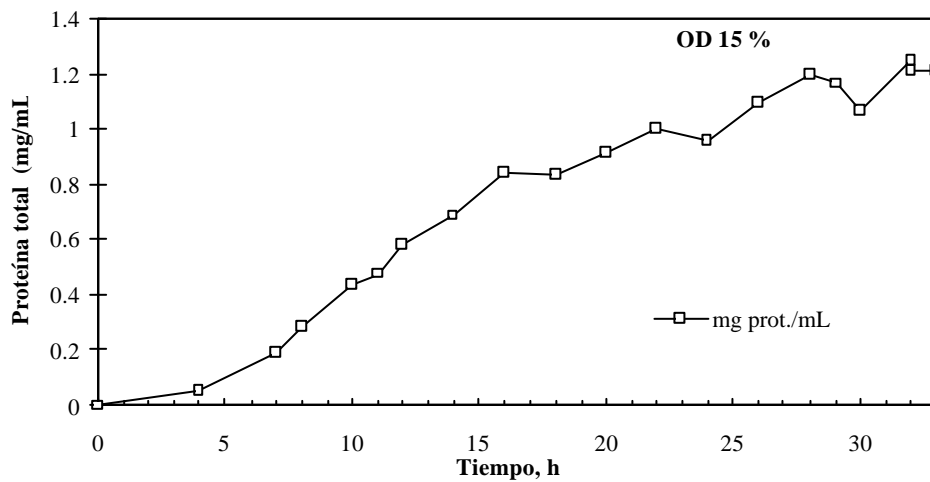
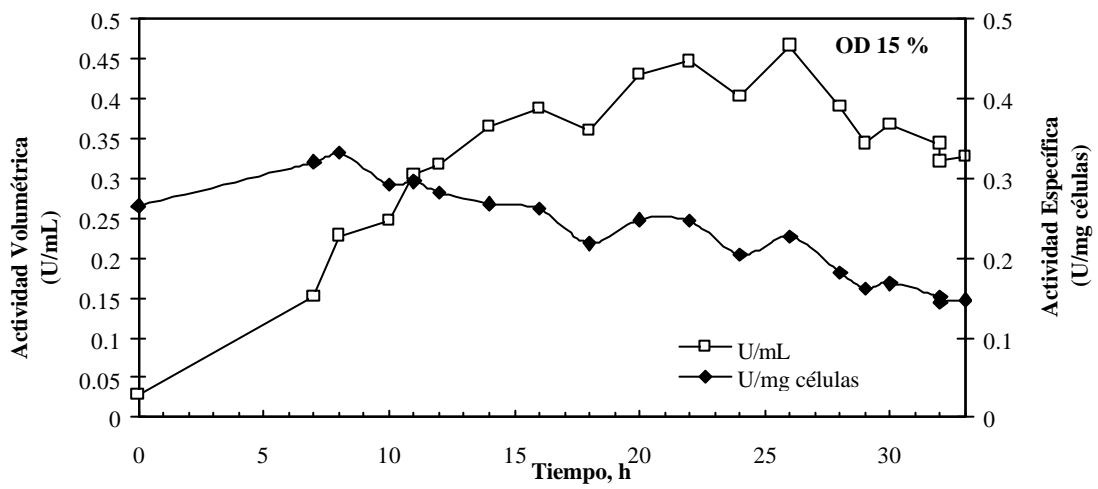
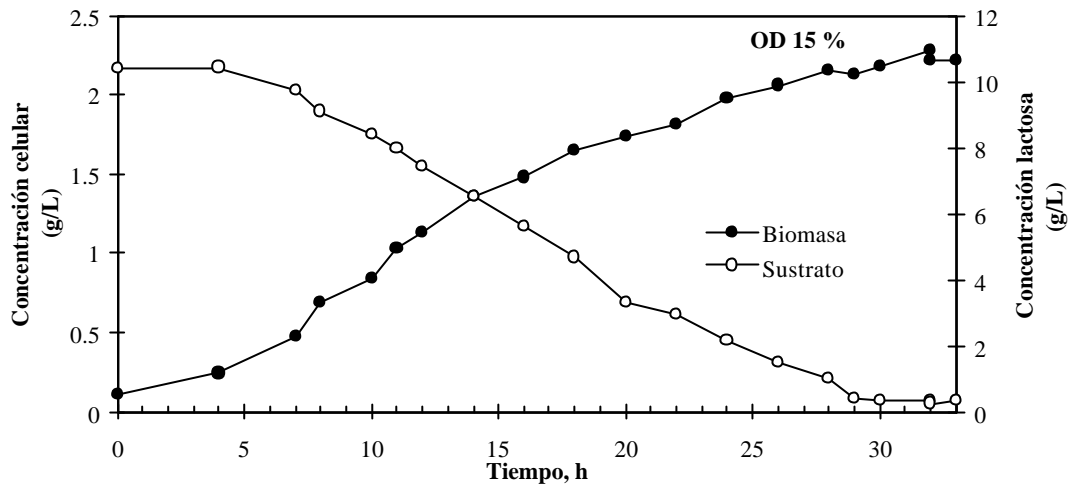
**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE (RÉPLICA)**



San Luis Potosí, S.L.P. a 09 de Septiembre del 2005

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.  
Coordinador Académico de la  
División de Biología Molecular.  
IPICYT

P R E S E N T E.

Por medio de la presente le informamos que, después de haber revisado el trabajo de Tesis de Maestría de la estudiante Dulce María Rivera Pastrana, no encontramos inconveniente alguno para que pueda llevarse a cabo el Examen de Grado ante un jurado.

Atentamente,

**Comité Tutorial**

Dr. Antonio De León Rodríguez.  
Prof. Investigador de la División de Biología Molecular.  
IPICYT



Dr. Elías Razo Flores.  
Jefe de la División de Ingeniería Ambiental y  
Manejo de Recursos Naturales Renovables, IPICYT.



Dr. Jorge Alberto Ramírez Téllez.  
Catedrático de la Lic. en Ingeniería en Alimentos.  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la asesoría 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) a través del financiamiento de investigación básica 39639/A-1(2003-2006). De manera personal se contó con la beca 185800 del CONACyT.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE ECUACIONES</b>	<b>v</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Tratamiento del suero de leche</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Fermentaciones de suero de leche con organismos genéticamente modificados</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Penicilino Acilasa como modelo de estudio</b>	<b>7</b>
<b>1.4.1. Penicilino Acilasa</b>	<b>7</b>
<b>1.4.2. Acción catalítica de la Penicilino Acilasa</b>	<b>7</b>
<b>1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en <i>E. coli</i>.</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Efecto de las condiciones del proceso en la producción de penicilino acilasa en <i>E.coli</i> recombinante</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Metabolismo de lactosa</b>	<b>10</b>
<b>1.7. Operón <i>lac</i></b>	<b>11</b>
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Cultivo tipo lote</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Velocidad específica de crecimiento</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Definición de rendimiento</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. Sistema de Fermentación	16
4.2. Cepas Bacterianas	18
4.3. Medios de cultivo	18
4.3.1. Medio mínimo M9	18
4.4. Inóculos	19
4.5. Conservación de las cepas	19
4.6. Vector de expresión de PA (pPA102) en <i>E.coli</i>	20
4.7. Aislamiento del plásmido pPA102	20
4.8. Transformación de la cepa de expresión	20
4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA.	21
4.10. Estrategia Experimental	21
4.11. Diseño experimental	23
4.12. Métodos analíticos	24
4.12.1. Tratamiento de las muestras	24
4.12.2. Determinación de concentración celular	24
4.12.3. Determinación de lactosa	24
4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA	25
4.12.5. Determinación de proteína total	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo	28
5.2. Selección de la cepa de expresión	28
5.3. Selección de clona sobreproductora de PA	30
5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos	31
5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental	34
5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA	37
5.7. Eficiencia del suero de leche en la expresión de enzimas recombinates en <i>E. coli</i>	38

5.8. Efecto de la velocidad específica de crecimiento y OD en la producción de PA	38
5.9. Análisis de varianza	40
5.9.1. ANOVA del rendimiento $Y_{P/X}$	40
5.9.2. ANOVA del rendimiento $Y_{X/S}$	42
5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células)	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7. REFERENCIAS	48
APÉNDICES	55
Apéndice A. Preparación de soluciones	55
Apéndice B. Curvas Estándar	57
B.1. Curva estándar para la determinación de la concentración celular	57
B.2. Curva estándar para la determinación de lactosa	58
B.3. Curva estándar para la determinación de actividad enzimática de PA	59
B.4. Curva estándar para la determinación de proteína total	60
Apéndice C. Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor	61
Apéndice D. Cinéticas de los cultivos en reactor	64

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Fig. 1.1. Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA</b>	<b>7</b>
<b>Fig. 1.2. Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA</b>	<b>8</b>
<b>Fig. 1.3. Reacción de degradación del disacárido lactosa</b>	<b>10</b>
<b>Fig. 1.4. Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón lac por el represor I</b>	<b>11</b>
<b>Fig. 4.1. Sistema de fermentación</b>	<b>17</b>
<b>Fig. 4.2. Representación del vector de expresión pPA102</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 4.3 Estrategia experimental</b>	<b>22</b>
<b>Fig. 5.1. Curva de crecimiento de la cepa W3110/pPA102</b>	<b>29</b>
<b>Fig. 5.2. Gel de electroforesis de ADN plasmídico de posibles transformantes</b>	<b>30</b>
<b>Fig. 5.3. Actividad específica máxima en las clonas 21,23,24 y 14 de W3110/pPA102</b>	<b>31</b>
<b>Fig. 5.4. Valores máximos promedio de actividad en diferentes fuentes de carbono</b>	<b>33</b>
<b>Fig. 5.5. Cinética de cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD</b>	<b>35</b>
<b>Fig. 5.6. Superficie de respuesta del rendimiento de producto por biomasa</b>	<b>41</b>
<b>Fig. 5.7. Superficie de respuesta del rendimiento de sustrato por biomasa</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 5.8. Superficie de respuesta de la actividad enzimática específica de PA</b>	<b>45</b>
<b>Fig. B.1. Curva estándar de concentración celular</b>	<b>57</b>
<b>Fig. B.2. Curva estándar de concentración de lactosa</b>	<b>58</b>
<b>Fig. B.3. Curva estándar de actividad enzimática</b>	<b>59</b>
<b>Fig. B.4. Curva estándar de proteína total</b>	<b>60</b>

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1. Fermentaciones donde se ha utilizado el SLB</b>	<b>4</b>
<b>Tabla 1.2. Fermentaciones a partir de SLB con organismos genéticamente modificados</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 4.1. Composición del medio mínimo M9</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 4.2. Composición del medio LB kanamicina</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 4.3. Variables y niveles del diseño experimental</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 5.1. Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5.2. Genotipo de la cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5.3. Actividad máxima promedio de PA con diferente fuente de carbono</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 5.4. Resumen de rendimientos y actividad de PA obtenidos en los experimentos en reactor</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 5.5. Análisis de varianza de <math>Y_{P/X}</math></b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5.6. Análisis de varianza de <math>Y_{X/S}</math></b>	<b>42</b>
<b>Tabla 5.7. Análisis de varianza de actividad específica</b>	<b>44</b>
<b>Tabla B.1. Elaboración de curva estándar para la determinación de biomasa</b>	<b>57</b>
<b>Tabla B.2. Elaboración de curva estándar para la determinación de lactosa</b>	<b>58</b>
<b>Tabla B.3. Elaboración de curva estándar de actividad enzimática de PA</b>	<b>59</b>
<b>Tabla B.4. Elaboración de curva estándar para la determinación de proteína</b>	<b>60</b>
 <b>INDICE DE ECUACIONES</b>	
<b>(2-1) Ecuación de velocidad de crecimiento</b>	<b>12</b>
<b>(2-2) Ecuación de rendimiento biomasa por sustrato</b>	<b>13</b>
<b>(2-3) Ecuación de rendimiento producto por biomasa</b>	<b>14</b>
<b>(4-1) Cálculo de actividad enzimática volumétrica de PA</b>	<b>26</b>
<b>(5-1) Ecuación de mejor ajuste para <math>Y_{P/X}</math></b>	<b>40</b>
<b>(5-2) Ecuación de mejor ajuste para <math>Y_{X/S}</math></b>	<b>42</b>
<b>(5-3) Ecuación de mejor ajuste para actividad específica de PA (U/mg células)</b>	<b>44</b>

## NOMENCLATURA

<b>6-APA</b>	<b>Ácido 6-aminopenicilánico</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>AFA</b>	<b>Ácido fenilacético</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina de suero bovina</b>
<b>DQO</b>	<b>Demanda química de oxígeno</b>
<b>DNS</b>	<b>Ácido dinitrosalicílico</b>
<b><i>Gal</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de cepa capaz de metabolizar galactosa</b>
<b>I</b>	<b>Represor del operón <i>lac</i></b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropil tio-β-D-galactopiranosido</b>
<b>KB</b>	<b>Kilopares de bases de ADN</b>
<b>K<sub>m</sub></b>	<b>Kanamicina</b>
<b>LB</b>	<b>Medio de cultivo ampliamente utilizado</b>
<b><i>Lac</i></b>	<b>operón o conjunto de genes para el metabolismo de lactosa</b>
<b><i>Lac</i><sup>+</sup></b>	<b>Genotipo de una cepa capaz de metabolizar lactosa</b>
<b>M9</b>	<b>Medio mínimo de cultivo frecuentemente utilizado</b>
<b>OD</b>	<b>Oxígeno disuelto</b>
<b>PA</b>	<b>Penicilino acilasa</b>
<b><i>pac</i></b>	<b>Gen que codifica a la enzima penicilino acilasa</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer de fosfatos</b>
<b>PDAB</b>	<b>p-dimetilaminobenzaldehido</b>
<b>pPA102</b>	<b>Plásmido para la expresión de penicilino acilasa</b>
<b>SLB</b>	<b>Suero de leche bovino</b>
<b>sppac</b>	<b>Péptido señal de penicilino acilasa</b>
<b>X</b>	<b>Concentración celular o biomasa</b>
<b>Y<sub>P/S</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por sustrato</b>
<b>Y<sub>P/X</sub></b>	<b>Rendimiento de producto por biomasa</b>
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	<b>Rendimiento de biomasa por sustrato</b>
<b>μ</b>	<b>Velocidad específica de crecimiento</b>



## RESUMEN

El suero de leche bovino (SLB) es un residuo industrial rico en lactosa, proteínas y minerales, debido a su alta carga orgánica se considera un efluente contaminante de cuerpos de agua.

Actualmente se han propuesto diversas alternativas para el tratamiento del SLB para reducir su potencial contaminante mediante la separación de proteínas y evaporación para obtener concentrados empleados como suplementos en alimentación humana y animal. Otra alternativa consiste en utilizar el suero de leche como sustrato en fermentaciones para producir etanol, ácidos orgánicos, enzimas, polímeros etc.

Las herramientas de ingeniería genética y la biotecnología permiten modificar microorganismos para su aplicación en la producción de metabolitos de interés comercial con alto valor agregado. El promotor *lac* es uno de los más utilizados para el control de expresión de productos génicos en bacterias y se induce por la presencia de lactosa o por el análogo sintético isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) el cual resulta costoso en procesos de escala industrial. La enzima penicilino acilasa se seleccionó como modelo de estudio por que se emplea a gran escala en la producción de antibióticos de nueva generación como las penicilinas semisintéticas.

Este trabajo propone la utilización del suero de leche como sustrato e inductor de la producción de penicilino acilasa como una alternativa de uso. Se seleccionó la cepa *E.coli* W3110/pPA102 para la expresión de la enzima recombinante en un medio a base de suero de leche. Se planteó un diseño experimental de bloques completos considerando dos factores concentración de suero y % oxígeno disuelto (OD) a tres niveles para evaluar la eficiencia del suero de leche (SLB) como sustrato en la producción de la enzima. Los experimentos se realizaron en un reactor de 1 L tipo lote instrumentado a 29 °C y pH 7.0. Se determinaron las condiciones óptimas para alcanzar el máximo de producción de PA (0.613 U/mg células) a 5 g/L de concentración inicial de SLB y 3 % OD de acuerdo con el análisis estadístico. Se observó inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones de sustrato (SLB). Se demostró que el SLB es utilizado de manera eficiente como sustrato e inductor en la producción de PA.

Palabras clave: proteínas recombinantes, optimización, biorreactor.

## ABSTRACT

Bovine milk whey (BMW) is an industrial disposal rich in lactose, proteins and minerals. Due to its high organic content it is considered a contaminant effluent of water bodies. Recently, several alternatives have been proposed for the treatment of BMW conducted to reduce its pollutant potential by separating proteins or by evaporation to obtain concentrates used as nutritional supplements in human and animal diets. Another alternative consist on using bovine whey as substrate in fermentations to produce ethanol, organic acids, enzymes, polymers etc.

Genetic engineering techniques and biotechnology allows modifying microorganisms for its application on the production of commercial interesting metabolites with additional market value. The *lac* promoter is one of the most employed to control the expression of gene products in bacteria and it is induced by the presence of lactose or the synthetic analogue isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) which results expensive in processes at industrial scale. The penicillin acylase (PA) enzyme has been selected as study model because it is employed on the production of new generation antibiotics at large scale such as semisynthetic penicillins.

This work suggests the application of bovine whey as substrate and inducer in the production of penicillin acylase as an alternative of use. The *E. coli* strain W3110/pPA102 was selected for the expression of the recombinant enzyme on whey based medium. A complete blocks experimental design was proposed considering two factors (BMW concentration and dissolved oxygen) at three levels to evaluate bovine whey efficiency as substrate on the production of the recombinant enzyme. The experiments were carried out in a 1L instrumented batch reactor at 29 ° C and 7.0 pH. A cellular growth inhibition effect was observed at high BMW concentrations. The optimal conditions to achieve a maximum of PA production (0.613 U/mg cells) were 5 g/L of initial concentration of BMW and 3 % oxygen concentration according to the statistical analysis. It was proved that the BMW works efficiently as substrate and inducer on the PA production and that limited oxygen conditions improve the enzyme activity.

Keywords: recombinant proteins, optimization, bioreactor

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Tratamiento del suero de leche**

El suero de leche bovino (SLB) que se produce como residuo durante elaboración industrial del queso representa del 80 al 90 % del volumen total de leche procesada y su descarga al medio ambiente se convierte en un problema de contaminación del subsuelo y mantos acuíferos debido a su alta carga orgánica (32000 mg/L DQO) susceptible a fermentación por microorganismos patógenos y ubicuos (Marshall, 1982). A pesar de los numerosos esfuerzos para encontrar aplicaciones del SLB en cualquiera de sus formas, se calcula que entre un 40 y un 50 % del total de SLB producido se desecha y el resto se emplea principalmente en suplementos de alimentación animal y humana.

En los últimos años se ha propuesto la reutilización de desechos industriales orgánicos que se generan en gran volumen y de manera continua, como el suero de leche. Para resolver el problema de contaminación generado por el SLB se ha empleado tratamientos biológicos y químicos para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) antes de desechar el suero (Fang, 1991; Rossano y col. 2001). Fang (1991), propuso un proceso de tratamiento del SLB empleando lodos activados y procesos anaerobios logrando disminuir la DQO en un 99 %.

Ghaly y Kamal (2004), emplearon el suero de leche como sustrato para la producción de proteína unicelular. Para esto utilizaron la levadura *Kluyveromyces fragilis* logrando reducir la DQO del medio en un 43 % y el contenido de lactosa en un 99 %. Al remover la biomasa por ultrafiltración la DQO se redujo en un 98 % del valor inicial cuantificado en el suero.

## 1.2. Suero de leche como sustrato en fermentaciones

Se han reportado trabajos que utilizan el SLB como sustrato de fermentaciones para la producción de etanol, por *S. cerevisiae* y *K. fragilis* con buen rendimiento de producción (0.46 g producto/g lactosa) (Varela y col. 1992, Porro y col. 1992, y Terrel y col.1984).

El-Samragy y col (1996), obtuvieron ácido cítrico a partir de suero de leche adicionado con metanol y sal, con un porcentaje de conversión del 28.24 % después de 9 días de fermentación con dos cepas de *Aspergillus niger*. Ambas cepas mostraron buena capacidad para convertir lactosa de suero de leche en ácido cítrico.

Huang y Yang (1998) desarrollaron un proceso de producción de ácido acético a partir de la fermentación de SLB suplementado con hidrolizado de caseína, hidrolizado de levadura y licor de maíz, en células inmovilizadas de *Clostridium formicoaceticum* y *Lactococcus lactis* en un reactor de columna empacado.

Roukas, (1999) desarrolló un proceso de producción del polisacárido pululana en la fermentación de SLB desproteinizado con *Aurobasidium pullulans*. Alcanzando el máximo en concentración del polisacárido (11 g/L) y en rendimiento (47.2 %) al hidrolizar la lactosa del suero desproteinizado por la vía enzimática.

Lee y col. (2000a) obtuvieron ácido succínico en fermentaciones con *Anaerobiospirillum succiniciproducens* tipo lote y continuo de suero de leche adicionado con extracto de levadura y peptona con un rendimiento de producción máximo del 96 % y una productividad de 0.46 g/L h.

El-Holi y Al-Delaimy (2003) obtuvieron ácido cítrico de la fermentación con *Aspergillus niger* ATCC9642 a partir de suero de leche suplementado con diferentes fuentes de carbono, vitaminas, fosfatos y metanol. En una fermentación de 20 días lograron la máxima producción de ácido cítrico (106.5 g/L) con el medio de suero de leche suplementado con 15 % p/v de sacarosa y 1 % de metanol.

Qureshi y Maddox (2003), emplearon como medio de cultivo un filtrado de suero de leche suplementado con lactosa para la producción de acetona-butanol-etanol (ABE) con una cepa de *Clostridium acetobutylicum* en un reactor tipo lote acoplado a una remoción de ABE por perstracción. Reportaron un rendimiento bajo de consumo de lactosa (0.31g producto/g lactosa) ya que no se consumió por completo en la fermentación y la producción de ABE alcanzó un máximo de 87.2 g/L.

Ramírez y col. (2003) demostraron que la levadura *Kluyveromyces lactis* fue capaz de producir la enzima  $\beta$ galactosidasa empleando como medio de cultivo suero de leche desproteínizado por termocoagulación. Optimizaron condiciones de temperatura, pH, velocidad de agitación y tiempo de fermentación del proceso por el método de superficie de respuesta y un diseño de experimento ortogonal central compuesto. La producción máxima de enzima alcanzada a las condiciones óptimas fue de 8.3 U /mL.

El suero de leche también se ha empleado como sustrato en la producción simultánea de nisina y ácido láctico por *Lactococcus lactis*. Liu y col. (2004) determinaron que los nutrientes extracto de levadura,  $MgSO_4$  y  $KH_2PO_4$  afectaban significativamente la formación de ambos compuestos. Al optimizar estos dos factores con un modelo polinomial de segundo orden obtuvieron el máximo de producción de nisina (92.9 mg/L) y ácido láctico (19.3 g/L).

En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los productos de fermentación de suero de leche por diferentes microorganismos entre los cuales predominan alcoholes y ácidos orgánicos ya que tienen una aplicación directa como producto.

**Tabla 1.1.** Ejemplo de fermentaciones donde se utiliza el SLB como sustrato.

<b>Compuesto producido</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
2,3 butilenglicol	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Barret y col. (1983)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Terrel y col. (1984)
Etanol	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Valera y col. (1992)
Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Porro y col. (1992)
Acido propiónico	<i>Propionibacterium sp.</i>	Lewis y Yang (1992)
Galactiol	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Izumori y col. (1994)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Samragy y col. (1996)
Acido acético	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	Huang y Yang (1998)
Acido succínico	<i>A .succiniciproducens</i>	Lee y col. (2000a)
1,2 propanediol	<i>T .themosaccharolyticum</i>	Altaras y col. (2001)
Acido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	El-Holi y col. (2003)
β-galactosidasa	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ramírez y col. (2003)
Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Qureshi y Maddox (2003)
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)
Ácido láctico	<i>Lactococcus lactis</i>	Liu y col. (2004)

### **1.3 Fermentaciones de suero de leche con microorganismos genéticamente modificados**

Existen pocos trabajos donde se utiliza suero de leche como fuente de carbono para producir compuestos en *E.coli*. Konicek y col. (1994), estudiaron la producción del polisacárido extracelular goma xantana por una cepa de *X. campestris* recombinante capaz de metabolizar lactosa (*lac*<sup>+</sup>) en la fermentación de un medio con suero de leche. El rendimiento de producción promedio del polisacárido (1.4 %) de la fermentación del suero de leche resultó comparable al obtenido en un medio definido con lactosa .

Kumar y col. (1992) desarrollaron un sistema de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* en *Sacharomyces cerevisiae* empleando como medio de producción suero de leche filtrado donde el 40 % de la actividad de la enzima total fue secretada al medio por la levadura y el producto resultó altamente glicosilado.

Compagno y col. (1995) obtuvieron etanol y biomasa de levadura en un proceso biotecnológico de fermentación de suero de leche y almidón con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con un plásmido episomal concluyendo que la composición del medio modulaba la productividad del sistema.

Maullu y col. (1999) demostraron que era posible producir lisozima humana recombinante en una cepa genéticamente modificada de *K. lactis* cultivada en suero de leche de la producción de queso cottage con un alto nivel de producción de la proteína heteróloga (125  $\mu$ g/mL). Además los experimentos realizados a escala laboratorio mostraron una eficiencia de producción de la proteína recombinante aún mayor a la reportada con un medio de cultivo sintético o definido.

Leite y col. (2000) utilizaron una cepa de *E. coli* recombinante para la producción de etanol a partir de suero de leche con un rendimiento menor al esperado. Observaron que la adición de metales en trazas, extracto de levadura y componentes de medio LB mejoraron la producción notablemente y se redujo el tiempo de fermentación.

Beom y col. (2000) y Anh y col. (2000) fueron capaces de obtener el polímero biodegradable polihidroxibutirato (PHB), a partir de suero de leche empleando cepas de *E. coli* genéticamente modificadas. Los autores encontraron que la limitación de oxígeno en el proceso de fermentación incrementa la producción de PHB en cultivos de lote alimentado.

Viitanen y col. (2003) desarrollaron un sistema de expresión en *E.coli* recombinante de las enzimas alcohol deshidrogenasa y murimidasa de *Lactobacillus* empleando suero de leche desproteinizado por ultrafiltración como sustrato. Demostraron la eficiencia de la lactosa del suero de leche como sustrato e inductor de la expresión de ambas enzimas en *E.coli* recombinante bajo el control del promotor *lac*. También estudiaron la expresión de ambas enzimas en presencia de diferente fuente de carbono encontrando que tanto en los cultivos con lactosa y lactosa con glicerol, la producción de las enzimas recombinantes fue favorecida.

En los trabajos mas recientes se emplean microorganismos genéticamente modificados como sistema para aumentar la producción de una amplia gama de metabolitos de interés comercial como es el caso de enzimas, alcoholes y polímeros biodegradables entre otros (Tabla 1.2).

**Tabla.1.2.** Productos obtenidos con microorganismos recombinantes en fermentaciones utilizando suero de leche como sustrato. \*Se utilizó suero de leche como inductor y glucosa como sustrato.

Producto	Microorganismo recombinante	Referencia
Goma xantana	<i>Xanthomona campestris</i>	Konicek y col. (1994)
$\beta$ -galactosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kumar y col. (1992)
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Compagno y col. (1995)
Lisozima humana	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Maullu y col. (1999)
Etanol	<i>Escherichia coli</i>	Leite y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Ahn y col. (2000)
Polihidroxibutirato	<i>Escherichia coli</i>	Beom Soo K. (2000)
Alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)
Muramidasa	<i>Escherichia coli</i> *	Vittanen y col. (2003)



## 1.4. Penicilino Acilasa como Modelo de Estudio

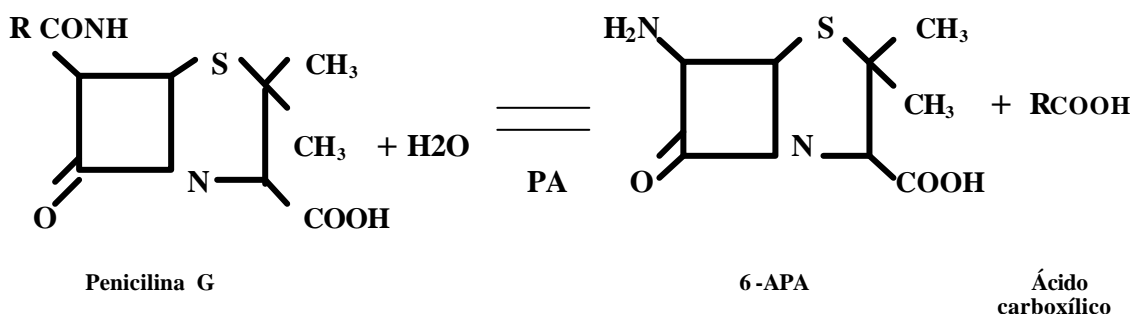
### 1.4.1. Penicilino Acilasa

La enzima penicilino acilasa (PA) o penicilino amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.11) se encuentra distribuida ampliamente en los microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras, y hongos filamentosos (Duggleby, 1995). Es utilizada principalmente a escala industrial para la producción del ácido 6-aminopenicilánico, la materia prima para la síntesis de penicilinas semi-sintéticas (Terreni y col. 2001; Youshko y col. 2001).

Las penicilinas semisintéticas surgen de modificaciones del compuesto ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que dan lugar a cambios en la cadena lateral de la penicilina al ser sintetizada, esto sirve como protección al ataque de las enzimas  $\beta$ -lactamasas que han desarrollado algunos microorganismos como resistencia a los antibióticos (Valle y col. 1991; Ospina y col. 1992). La PA también se utiliza en la producción de agentes antiplaquetarios y en la activación de profármacos contra el cáncer (Vrudhula y col. 1993; Lu y col. 1999). No está claro la función *in vivo* de PA de *E. coli*, sin embargo se cree que la enzima puede estar involucrada en la asimilación de compuestos aromáticos como fuente de carbono en el modo libre de vida de los microorganismos (Burlingame y col. 1983).

### 1.4.2 Acción catalítica de la Penicilino Acilasa

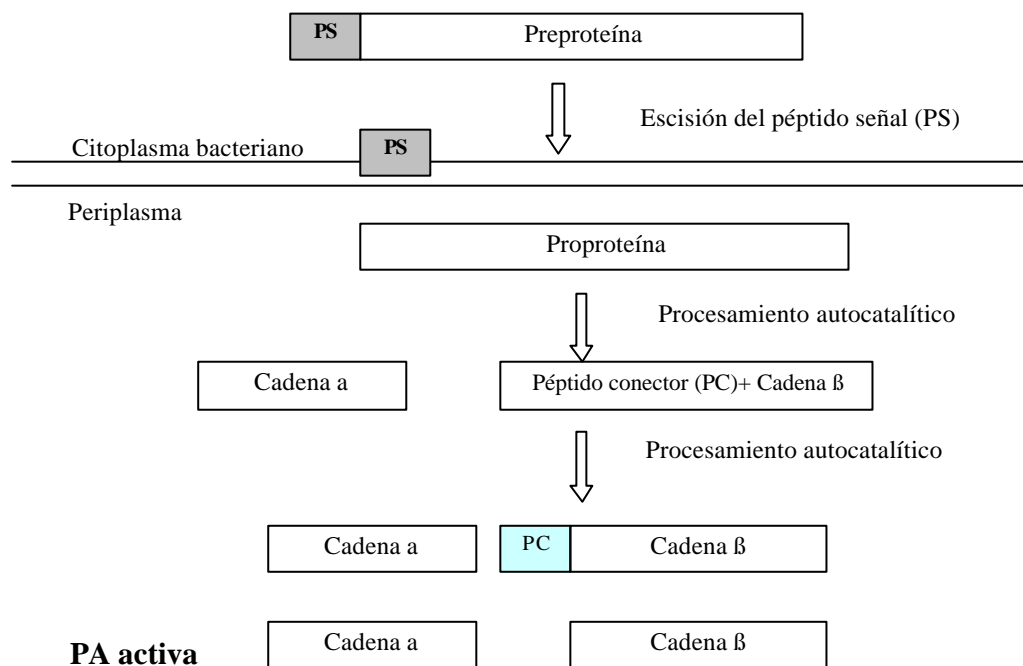
El substrato (penicilina G) es hidrolizado por la penicilina acilasa en el enlace amida para formar ácido 6-aminopenicilico y ácido fenilacético (Fig.1.1).



**Fig.1.1.** Reacción de hidrólisis de la penicilina G por acción de la enzima PA.

### 1.4.3. Procesamiento postraduccional de PA en *E. coli*

La PA pertenece a la familia de las N terminal nucleofílico (Ntn)-hidrolasas donde todos los miembros de esta familia comparten una estructura tridimensional similar y llevan a cabo un autoprosesamiento proteolítico. El procesamiento postraduccional de la PA inicia con el transporte de la preproteína de 95 kDa al espacio periplásmico al efectuar una translocación se elimina el péptido señal dando lugar a lo que se conoce como pro-proteína la cual sufre un procesamiento autocatalítico que separa la cadena  $\alpha$  (209 a.a.) de la cadena  $\beta$  (566 a.a.) unida a un péptido conector (54 a.a.) el cual participa en el plegamiento final de las cadenas (Sizmann y col., 1990) y también es escindido por un corte auto-proteolítico. Ambas cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$  ahora libres se unen para formar la enzima activa (Duggleby y col. 1995). La enzima madura de *E.coli* es un heterodímero periplásmico de 80kDa.



**Fig.1.2.** Mecanismo de autoprosesamiento proteolítico de PA (Duggleby y col. 1995).

## **1.5 Efecto de las condiciones del proceso de producción de penicilina acilasa en *E.coli* recombinante**

La expresión del gen de PA en *E.coli* está regulada por diferentes factores como temperatura (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001; Yang y col.,1988), concentración de oxígeno (De León y col., 1996, 2003) la concentración de la fuente de carbono (Shömer y col., 1984) y en cepas nativas por la adición de ácido fenilacético como inductor (Robas y col., 1993).

La producción de PA es influenciada negativamente durante la etapa postraduccional por altas temperaturas de cultivo. A temperaturas por encima de los 37 ° C, el precursor de la enzima PA no puede ser procesado y tiende a formar cuerpos de inclusión dentro de la bacteria. La temperatura óptima para la expresión de la enzima se encuentra alrededor de los 22-29 ° C (Robas y col., 1993; Dai y col., 2001).

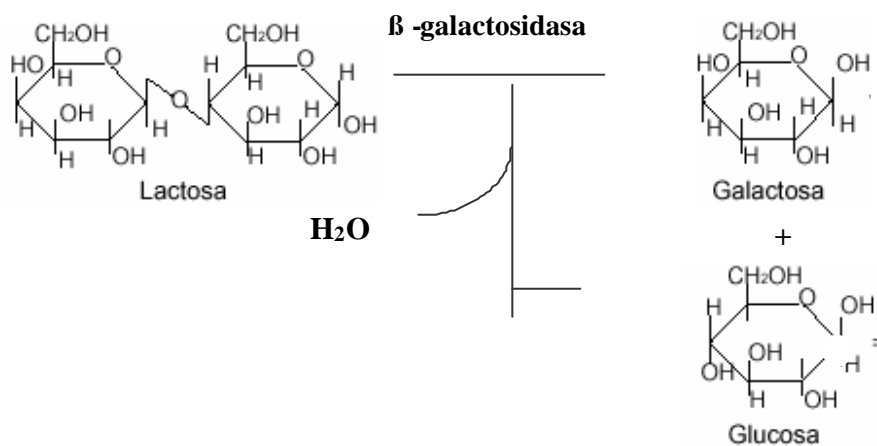
El efecto del oxígeno sobre la producción de enzimas recombinantes ha sido evaluado por varios autores. La limitación de oxígeno disminuye la velocidad específica de crecimiento en los cultivos pero favorece la producción y procesamiento de la enzima PA (Ramírez y col., 1994a, De León, 1996, De León y col., 2003). En condiciones no limitantes de oxígeno, el metabolismo de *E. coli* produce acetato por hidrólisis de piruvato, un efecto conocido como “*efecto Pasteur*” (Doelle y col., 1982).

La concentración de la fuente de carbono también afecta la velocidad de crecimiento en cultivos bacterianos. Se ha observado que una alta concentración de fuente de carbono en el medio de cultivo puede reprimir catabólicamente el crecimiento microbiano mientras que una concentración muy baja de sustrato puede también limitar el crecimiento de la bacteria y de la producción del metabolito de interés al emplear toda la fuente de carbono disponible para llevar a cabo sus funciones metabólicas básicas (Ramírez y col. 1994a).

## 1.6 Metabolismo de lactosa

La lactosa es degradada por la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, produciendo  $\beta$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-galactosa. Ésta enzima también puede catalizar la conversión de lactosa a alolactosa ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-6)-D-glucopiranososa) por transglucosilación, y puede hidrolizar alolactosa (Huber y col. 1980).

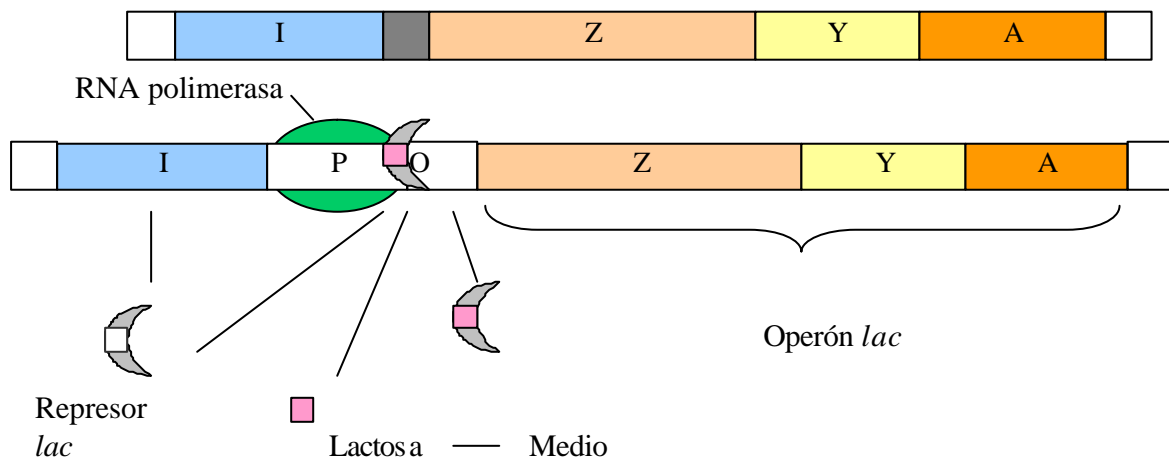
Las enzimas necesarias para metabolizar el disacárido lactosa son codificadas por el operón *lac* que incluye tres genes Z, Y y A. El gen *lac* Z codifica a  $\beta$ -galactosidasa, que escinde al disacárido en glucosa y galactosa. El gen *lac* Y codifica la enzima lactosa permeasa la cual se encarga del transporte de lactosa del medio hacia el interior de la célula. El gen *lac* A codifica a tiogalactósido transacetilasa una enzima cuya función aún no se conoce bien pero se cree que actúa como un mecanismo de protección contra la congestión metabólica por  $\beta$ -galactósidos no metabolizables y de potencial tóxico que pueden ser importados a la célula.



**Fig.1.3.** Reacción de degradación de la lactosa.

## 1.7 Operón *lac*

La síntesis de las tres enzimas del operón *lac* es inducida rápidamente cuando las células de *E. coli* se colocan en un medio con lactosa como única fuente de carbono y se reprime de igual manera cuando las células se transfieren a un medio sin lactosa. Por lo tanto los tres genes del operón *lac* son regulados coordinadamente (Fig. 1.4). La alolactosa es el inductor fisiológico de esta vía metabólica. Se ha demostrado que cuando la lactosa se añade a un cultivo o medio de crecimiento de *E. coli*, se alcanzan altos niveles de galactosa, glucosa y alolactosa dentro de las células y son rápidamente expulsados al medio (Huber y col. 1980). Algunas moléculas de estructura similar a la de la lactosa pueden inducir la expresión de los genes del operón *lac*, aunque no puedan ser hidrolizadas por la  $\beta$ -galactosidasa. Uno de estos inductores, el  $\beta$ -D-tiogalactósido de isopropilo (IPTG) puede difundirse hacia el interior de las células y debido a que no se metaboliza, su concentración permanece constante. Las moléculas de IPTG se unen a la proteína del represor I permitiendo la transcripción de  $\beta$ -galactosidasa y permeasa funcionales gracias a un aumento en la síntesis de mRNA de *lac* (Lodish y col. 2003). El disacárido lactosa se ha probado en procesos biotecnológicos como inductor de sistemas de expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor *lac* con una eficiencia comparable a la del inductor IPTG (Donovan y col. 1996).



**Fig.1.4.** Modelo de Jacob y Monod de la regulación de la transcripción del operón *lac* por el represor I.

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

### 2.1. Cultivo tipo Lote

Muchos de los procesos bioquímicos involucran el uso de reactores tipo lote para el crecimiento de poblaciones celulares. En este tipo de proceso después de que se inocula un medio líquido con células vivas, no se adiciona o se remueve fuente de carbono, excepto por algunos gases del medio de cultivo durante todo el transcurso del proceso. La concentración de nutrientes, células y productos cambia con el tiempo del cultivo.

### 2.2. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

En los procesos tipo lote, el crecimiento exponencial se alcanza después de una fase de retardo (lag) donde la célula se prepara para un crecimiento exponencial sintetizando metabolitos y duplicando su ADN para duplicarse. La velocidad de crecimiento en esta etapa se define como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{? X}{? t} \quad (2-1)$$

Donde:

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$X$  = biomasa (g/L).

## 2.3. DEFINICIÓN DE RENDIMIENTO

La razón entre la cantidad de células producidas o productos celulares y el sustrato consumido se denomina rendimiento (Y) y tiene un papel muy importante en el diseño y en la viabilidad económica de un proceso biotecnológico.

### 2.3.1. Rendimiento aparente de biomasa por sustrato

El crecimiento celular involucra el consumo de sustrato el cual proporciona energía y compuestos para la síntesis de componentes estructurales y funcionales de la célula. Este rendimiento es de utilidad como parámetro de eficiencia del sustrato en el crecimiento microbiano. Se denomina rendimiento aparente debido a que no se considera la conversión de sustrato para la energía de mantenimiento.

Se observa frecuentemente que el total de masa formada por crecimiento celular es proporcional a la masa de sustrato (fuente de carbono) utilizada (Bailey J.E., Ollis D.F., 1986).

El factor de rendimiento celular  $Y_{X/S}$  se define como la relación:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_F - X_i)}{(S_F - S_i)} \quad (2-2)$$

Donde:

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/L).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/L).

$S_F$  = Concentración final de sustrato (g/L).

$S_i$  = Concentración inicial de sustrato (g/L).

### 2.3.2. Rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ )

El rendimiento de producto por concentración celular generada depende de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto), y del tipo de cultivo (lote o continuo). Este parámetro indica la eficiencia de producción del metabolito por biomasa.

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{(P_F - P_i)}{(X_F - X_i)} \quad (2-3)$$

Donde:

$P_F$  = Concentración final de producto (U/mL).

$P_i$  = Concentración inicial de producto (U/mL).

$X_F$  = Concentración final de biomasa (g/mL).

$X_i$  = Concentración inicial de biomasa (g/mL).



### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Establecer un proceso de producción de penicilino acilasa en *E.coli* recombinante a partir de un medio mínimo formulado con suero de leche bovino como inductor y única fuente de carbono.

#### **Objetivos particulares**

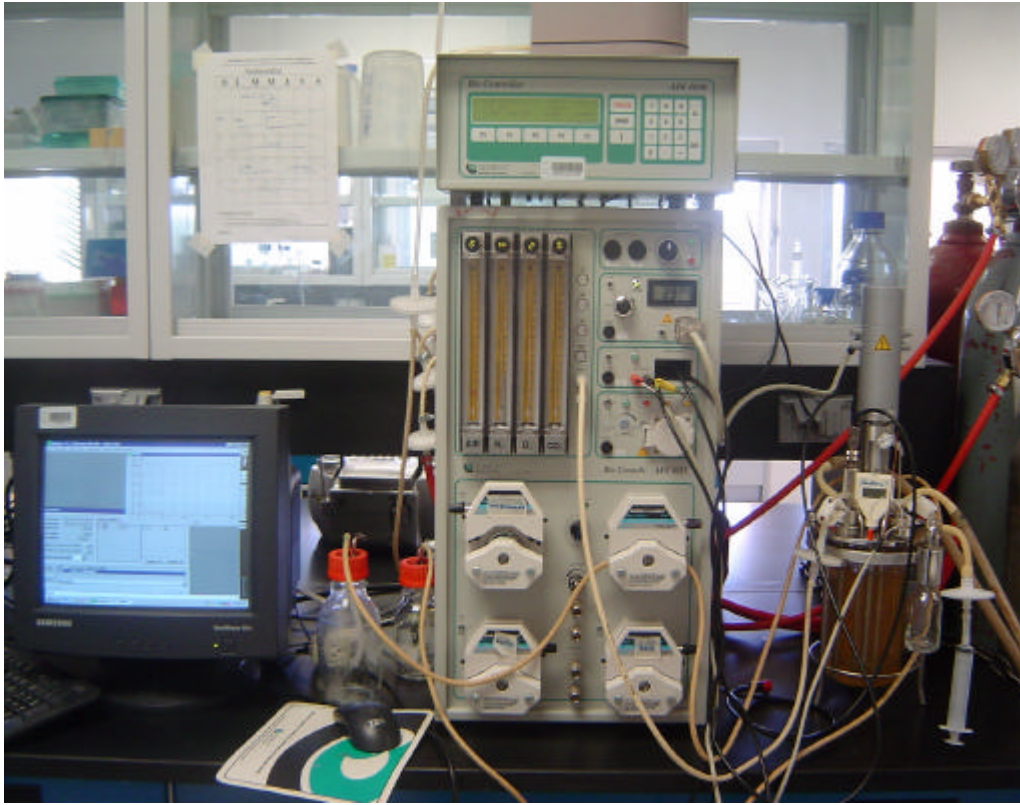
- Desarrollar un medio de cultivo para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* a partir de suero de leche en polvo.
- Seleccionar una cepa de *E. coli* (*gal*<sup>+</sup>, *lac*<sup>+</sup>) capaz de crecer en un medio a base de suero de leche y transformarla con el vector de expresión de PA.
- Evaluar el efecto de la concentración de suero de leche y porcentaje de oxígeno disuelto en la producción de penicilino acilasa recombinante en experimentos en bioreactor tipo lote.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sistema de fermentación

El sistema de fermentación (Fig. 4.1) consiste de un reactor de tanque agitado de 1 Litro (Applikon). El reactor está equipado con 2 turbinas Rushton acopladas a un motor controlado para ajustar la velocidad de agitación necesaria para alcanzar una transferencia de oxígeno adecuada en el bioreactor. Se empleó un electrodo de pH (Applikon), un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Applikon), ambos esterilizables y un sensor de nivel de espuma, así como una línea de entrada para oxígeno, nitrógeno y aire comprimido. La temperatura se controló a 29 °C durante el proceso con un intercambiador de calor sumergido en el medio. El pH se mantuvo a  $7.0 \pm 0.1$  en todos los cultivos adicionando una solución de NaOH, 2 N. Ocasionalmente se adicionó una solución de silicón al 0.1 % (v/v) para disminuir la formación de espuma.

El sistema de control estuvo constituido por una consola automatizada ADI 1035 (Applikon) donde se localizan los actuadores y conexiones de los sensores del sistema que responden a un controlador ADI 1030 (Applikon) programado con un algoritmo de control de lazo cerrado proporcional integral derivativo (PID). Este último compara los valores en un instante de las variables pH y OD medidos por los sensores con el valor deseado (*setpoint*) y se recalcula la respuesta de los actuadores requerida. Los electrodos miden el valor de una variable y transmiten una señal analógica al controlador donde es convertida a una señal digital para tomar una acción que es reenviada en forma analógica a los actuadores.. La adquisición de los datos se realizó por medio de el programa BioXpert versión 1.1x (Applikon) para Windows.



**Fig.4.1** Sistema de fermentación automatizado empleado en este trabajo.

## 4.2. CEPAS BACTERIANAS

En éste trabajo se utilizaron las cepas de *E. coli* JM101/pPA102 proporcionada por el Dr. O.T, Ramírez (IBT,UNAM,Cuernavaca), BL21SI (Gibco), BL21pLysS (Invitrogen) y W3110.

## 4.3. MEDIOS DE CULTIVO

### 4.3.1. Medio Mínimo M9

Es un medio mineral utilizado ampliamente en la industria como medio de producción de proteínas recombinantes (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Medio Mínimo M9.

Reactivo	g/L
Fuente de carbono	5
NaCl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.0
CaCl <sub>2</sub>	0.01
Solución de Kanamicina [35 mg/mL]	1µL/mL
Solución de Tiamina [0.1%]	40 µL/L

**Preparación:** Se disuelven los reactivos de la tabla 5.1 en agua destilada y se esterilizan en autoclave a 15 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos. La fuente de carbono (glucosa, galactosa o lactosa) y el sulfato de magnesio se disuelven y esterilizan por separado del resto de los componentes del medio para evitar la caramelización del azúcar. Una vez que el medio se enfría a una temperatura aproximada de 40 °C, se agrega la solución de kanamicina y la solución de tiamina. Los inóculos se realizaron en medio M9 suplementado con 5 g/L de extracto de levadura (Difco).

Los cultivos en reactor se llevaron a cabo en medio M9 donde se utilizó como fuente de carbono suero de leche en polvo (Land O' Lakes) a 5, 10 ó 15 g/L, se solubilizó por separado en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se separó el exceso de proteína por centrifugación a 13000 rpm por 15 min. Se adicionó la solución estéril como fuente de carbono.

#### 4.4 Inóculos

Para los experimentos de expresión en matraz se tomó una azada de células crecidas en medio LB/kanamicina (Tabla 4.2) para inocular 100 mL de medio M9 glucosa adicionado con extracto de levadura en un matraz Erlenmeyer de 250 mL incubado por 12 h a 29 ° C y 200 rpm.

Para los experimentos en reactor se inocularon 100 mL de medio M9 suero de leche con una azada de las colonias de las placas de agar LB/kanamicina (LB/Km) y se incubaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL por 12-14 h a 29 ° C y 200 rpm. Se adicionó el inóculo necesario en los cultivos en biorreactor para alcanzar una densidad óptica cercana a 0.2.

#### 4.5 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas de este trabajo se realizó en medio LB líquido y sólido. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 30 % y almacenadas a -80° y en placas LB con kanamicina para las diferentes cepas que fueron refrigeradas a 4 ° C por 30 días.

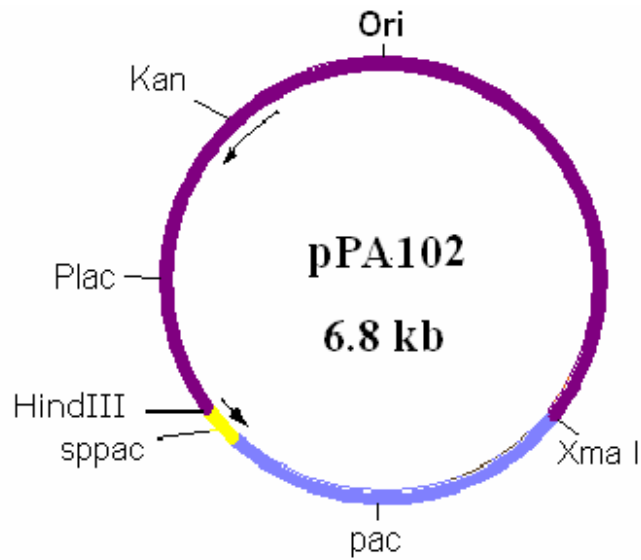
**Tabla 4.2.** Medio LB/Km.

<b>Reactivo</b>	<b>g/L</b>
Bactotripton (peptona)	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
*Agar microbiológico	10
Kanamicina (35 mg/L)	1mL

\* Se agrega sólo para preparar medio sólido.

#### 4.6. Vector de expresión de PA ( pPA102) en *E. coli*

Se utilizó el vector de expresión pPA102 reportado por Merino (1992) el cual contiene el gen de la penicilino acilasa *pac* bajo el control del promotor *lac*, un origen de replicación para *E.coli* y el gene de resistencia a kanamicina (Fig.4.2).



**Fig.4.2.** Representación del Vector de expresión pPA102 (Merino, 1992).

#### 4.7. Aislamiento del plásmido pPA102

Se aisló el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* JM101/pPA102 (Merino, 1992) y se corrieron geles de agarosa al 1% por electroforesis para corroborar la identidad del vector.

#### 4.8. Transformación de la cepa de expresión

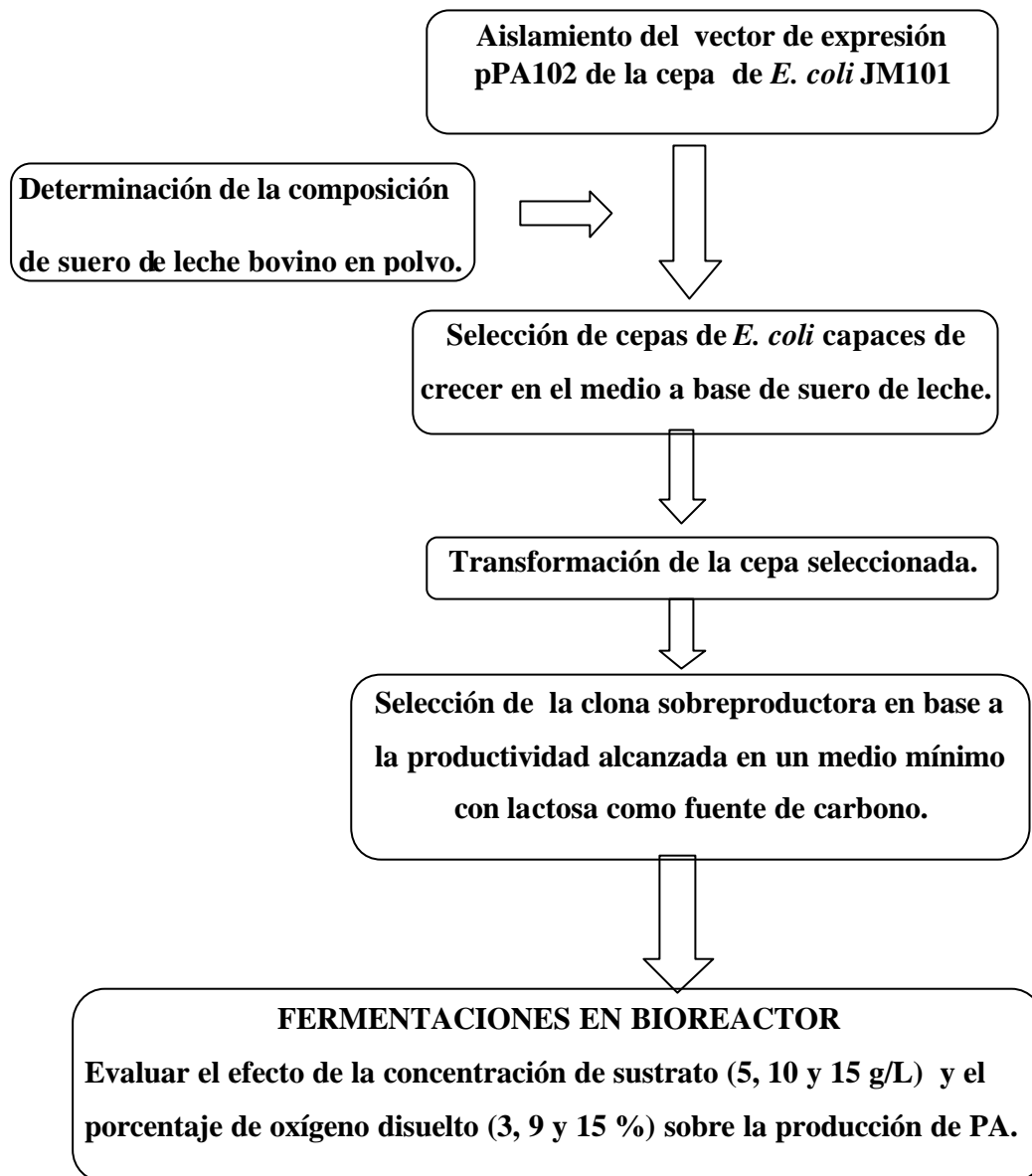
Las cepas de *E.coli* BL21SI, BL21pLysS y W3110 se transformaron con el plásmido pPA102 por el método de choque térmico (Sambrook, 1989).

#### **4.9. Selección de clonas sobreproductoras de PA**

Se sembró el volumen total de la reacción de transformación en placas de medio LB/ Km para crecer y seleccionar las clonas transformadas con el gen de la PA capaces de crecer en presencia del antibiótico a 29 ° C. Se realizaron minipreparaciones para 20 colonias seleccionadas al azar, después se linealizó el ADN plasmídico por digestión con la enzima Eco R1 y se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% para comprobar la presencia del plásmido en las probables transformantes.

#### **4.10 Estrategia Experimental**

En la Figura 4.3. se describe la estrategia experimental seguida en este trabajo para la expresión de la enzima penicilino acilasa en cultivos de *E. coli* recombinante en un medio a base de suero de leche bovino. Se probó la capacidad de crecimiento de tres cepas de *E. coli* BL21 pLysS, BL21 SI y W3110 en el medio en base a suero de leche bovino de entre las cuales se seleccionó W3110 por alcanzar la mayor concentración de biomasa (g/L). Una vez obtenidas las clonas transformadas de *E.coli* W3110 se evaluó la actividad específica de la enzima y la productividad para seleccionar la mas adecuada para crecer en el medio con suero de leche. La clona 24 de *E.coli* W3110 fue seleccionada para emplearse en una serie de diez experimentos en biorreactor bajo condiciones controladas de temperatura (29 ° C) y pH (7.0) donde se evaluó el efecto de la concentración inicial de suero de leche y el porcentaje de oxígeno disuelto sobre la producción de la enzima PA. Se realizó un análisis de varianza y de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de la producción de la enzima PA en este sistema.



**Fig. 4.3.** Estrategia experimental.



#### 4.11. Diseño Experimental

Se planteó un diseño experimental de bloques completos incluyendo dos factores concentración de suero de leche bovino (SLB) y % de oxígeno disuelto a tres niveles (Tabla 4.3.). Los experimentos se realizaron de manera aleatoria para disminuir la tendencia de error experimental.

**Tabla. 4.3.** Valores de variables independientes y niveles utilizados en el diseño experimental.

Símbolo	Variables Independientes	Niveles			Unidades
		-1	0	+1	
A	Concentración de SLB	5	10	15	g/L
B	% de Oxígeno Disuelto	3	9	15	%

## **4.12. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.12.1. Tratamiento de muestras**

Se tomaron muestras de 4 mL cada dos horas durante la fermentación para llevar un seguimiento del proceso. Se utilizó 1 mL de muestra para la determinación óptica de biomasa y el volumen restante se centrifugó durante 5 min a 4185 xg para separar la alicuota en dos fracciones: sobrenadante y paquete celular. El sobrenadante se congeló (-20°C) para determinar posteriormente la concentración de lactosa, mientras que la pastilla celular se resuspendió en un buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.8 y fue refrigerado a 4 °C para la determinación de actividad enzimática y proteína total.

### **4.12.2. Determinación de concentración celular**

La concentración celular se determinó mediante la densidad óptica evaluada a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) y se correlacionó con una curva de calibración para convertir la densidad óptica en peso seco (Apéndice B.1).

### **4.12.3. Determinación de lactosa**

Se determinó la concentración de lactosa en el medio de cultivo por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959) basado en la reducción del reactivo DNS por azúcares reductores presentes como la lactosa, formando un compuesto nitroaminado de color amarillo-naranja. La absorbancia medida a 550 nm es directamente proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra. Se construyó una curva estándar (Apéndice B.2) de absorbancia contra concentración de lactosa en g/L para relacionar la absorbancia de las muestras y calcular su concentración de lactosa. Se realizaron diluciones de los sobrenadantes de las muestras para llevarlas a una concentración dentro del rango de la curva estándar (0.1-1.0 g/L).

El procedimiento analítico fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 0.25 mL de las diluciones problema y se agregaron 0.75 mL de reactivo DNS (ácido 1-3 dinitrosalicílico), la mezcla se agitó y fue calentada a baño maría durante 15 minutos. Se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente. Por último se les añadió 4 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia a 550 nm.

#### **4.12.4. Determinación de actividad enzimática de PA**

Se llevó a cabo por el método del *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) reportado por Balasingham y col. (1972), basado en la reacción colorimétrica del grupo carbonilo del PDAB con un grupo amino libre del 6-aminopenicilánico (6-APA) producto de la reacción de hidrólisis de la penicilina G por la PA.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 450  $\mu$ L de las muestras almacenadas a 4° C, las cuales se incubaron en tubos de ensayo de vidrio (100 mm X 13 cm) en un baño a 37° C durante 5 minutos. Se añadió 50  $\mu$ L de una solución de penicilina G al 20 % en PBS pH 7.8 y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 37° C. A los 10 minutos se tomaron 40  $\mu$ L de la reacción y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 960  $\mu$ L de etanol absoluto para detener la reacción. Se agregó 500  $\mu$ L del reactivo PDAB, se agitó con un vortex. Se centrifugaron los tubos a 2375 xg durante 6 minutos. Por último se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV/Vis (Cary-Varian) después de 15 minutos de adicionado el reactivo PDAB, utilizando como blanco el buffer de fosfatos PBS tratado de la misma manera que a las muestras. Este análisis se realizó dentro de las primeras 48 h posteriores al experimento para evitar degradación o pérdida de actividad de la enzima.

Para realizar los cálculos de actividad enzimática se construyó una curva estándar (Apéndice B.3) a partir de diluciones conocidas del compuesto 6-APA en un buffer de fosfatos (pH 7.8), las cuales se procesaron con el método del PDAB y se leyó su absorbancia para relacionarla a la concentración de 6-APA de la dilución. Una unidad enzimática equivale a la cantidad necesaria de la enzima para hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de penicilina G por minuto a 37 ° C.

La actividad enzimática por mililitro de muestra (U/mL) se calcula de la siguiente manera:

(4-1)

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{(\text{D.O.} - b) \times D \times 1000}{m \times \text{PM}_{6\text{-APA}} \times t(\text{min}) \times (0.45 \text{ mL})} \quad [=] \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Donde:

**D.O.** = Densidad óptica de las muestras a 415 nm.

**b** = Ordenada al origen de la curva estándar.

**m** = Pendiente de la curva estándar.

**D** = Dilución de la muestra.

**PM<sub>6-APA</sub>** = Peso molecular de 6-APA (216.24 mg/mmol).

**t** = Tiempo de reacción muestra-sustrato (10 min).

**U** = Unidad de actividad enzimática.

#### **4.12.5. Determinación de proteína total**

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951) el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade reactivo E (Apéndice A) y reactivo Folin para formar un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. El método se basa en la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con el ión cobre en solución alcalina y la reducción del reactivo de Folin (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) que se reduce a heteropolimolibdeno azul por la oxidación de aminoácidos aromáticos catalizada por cobre.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras refrigeradas a 4 ° C y se les adicionó 900  $\mu\text{L}$  de agua. Se agregaron 5 mL de reactivo E, se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin 1N, se agitaron las muestras y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron lecturas de absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

Se construyó una curva estándar de concentración de proteína total (Apéndice B.4), a partir de diluciones estándar de concentración conocida de una solución patrón de albúmina de suero bovina (BSA stock de concentración 1.4 mg/mL) en agua destilada, las cuales se procesaron igual que las muestras y las lecturas de absorbancia obtenidas se correlacionaron con la concentración conocida de proteína total en las diluciones.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de la composición del suero de leche en polvo

Se realizó un análisis bromatológico del suero de leche en polvo (tabla 5.1) donde se determinó el contenido de lactosa en base seca y el contenido de proteína total, mientras que el resto de los componentes (grasas y cenizas) no se cuantificaron por encontrarse en mínima proporción.

**Tabla 5.1.** Componentes mayoritarios del suero de leche en polvo (Land O'Lakes Inc.)

Componente	%
Lactosa *	87.7
Proteínas	11.7
Otros	< 1

\* Reportado como azúcares reductores totales.

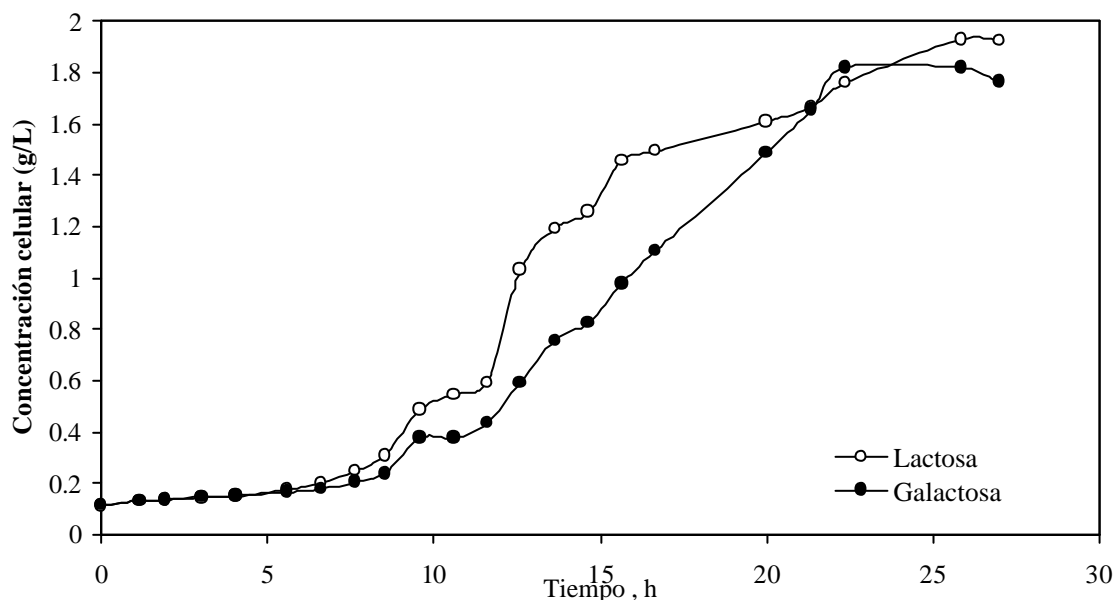
### 5. 2. Selección de la cepa de expresión

En la tabla 5.2 se muestra el genotipo de las cepas empleadas en este trabajo. Fue necesario cambiar de cepa de *E.coli* para la expresar la enzima PA en el medio a base de SLB ya que *E.coli* JM101 (?lac) es incapaz de metabolizar lactosa. Se probaron dos cepas *E. coli* BL21 pLysS y BL21 SI diseñadas para la expresión de proteínas heterólogas con alta eficiencia por que son deficientes de las proteasas *lon* y *ompT*. Sin embargo con ambas cepas se obtuvieron bajas concentraciones celulares en el medio mínimo con lactosa, mientras que con la cepa *E. coli* W3110 se observó un efecto favorable en la expresión de la enzima PA al utilizar suero de leche como sustrato e inductor.

**Tabla 5.2.** Genotipo de cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
JM101	$\lambda$ <i>lac</i> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , sup E, pro AB <sup>+</sup> , <i>lac Z</i> M15
BL21pLysS	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3, pLys
BL21 SI	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i> , <i>lon</i> , <i>dcm</i> , DE3
W3110	Lac <sup>+</sup> , <i>gal</i> <sup>+</sup> , F <sup>?</sup> IN ( <i>rrnD-rrnE</i> )1

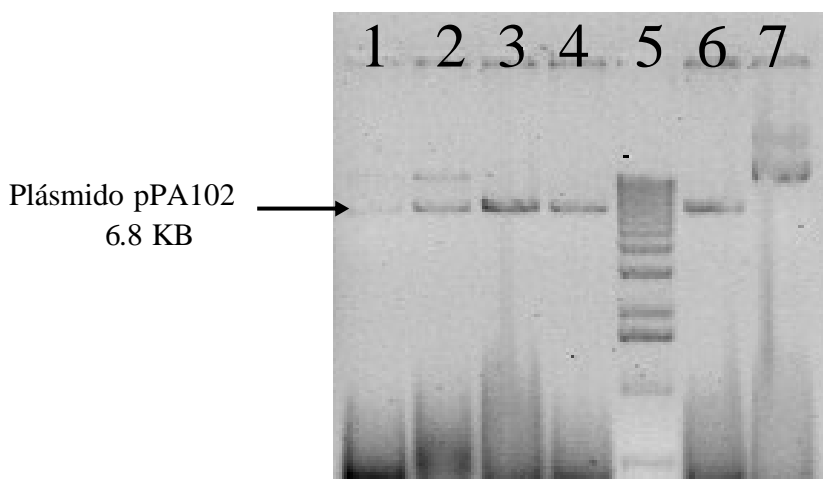
En la figura 5.1. se muestra la cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* W3110 en cultivos en presencia de lactosa o galactosa. Se puede observar que en ambos casos se presentó una fase de retardo del crecimiento de 7 horas la cual termina cuando se alcanza la pendiente de ajuste lineal de la fase exponencial, además la concentración celular final fue muy similar en los dos cultivos. Este resultado corrobora que esta cepa metaboliza de igual manera lactosa y galactosa, característica deseable en la cepa de expresión en un medio con suero de leche.



**Fig.5.1.** Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* W3110 en medio mínimo con lactosa y galactosa como fuente de carbono a 5 g/L.

### 5.3 Selección de clona sobreproductora de PA

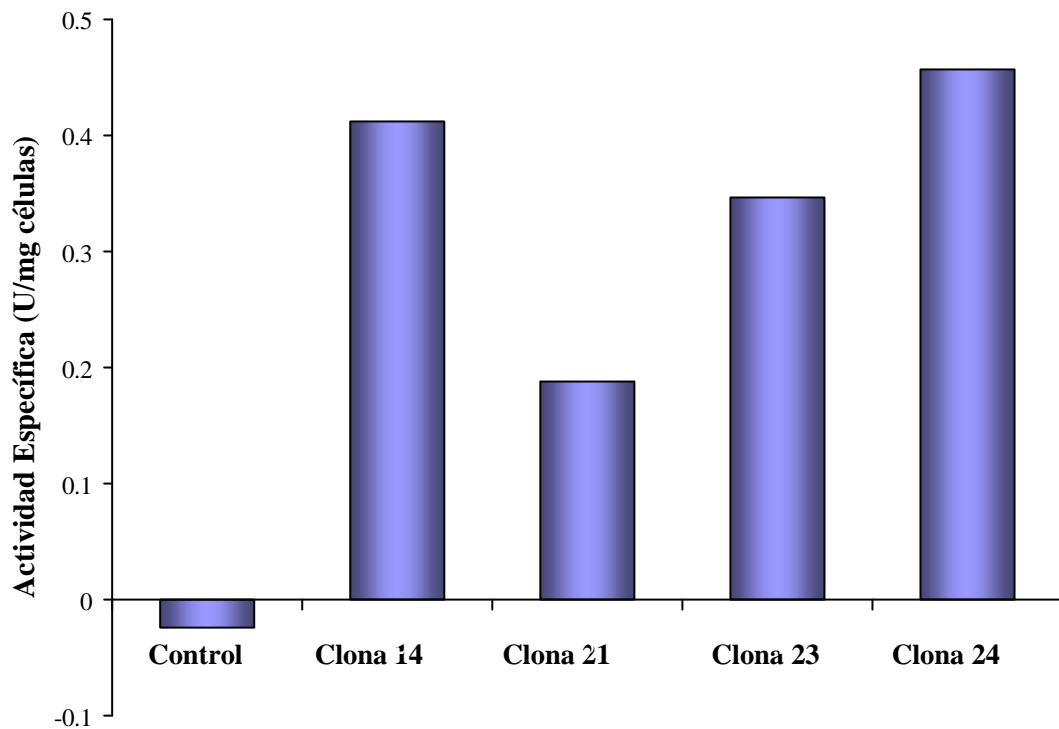
En la Fig.5.2 se observan 6 muestras de 5 de las colonias de *E.coli* W3110 que fueron seleccionadas al azar, en las cuales se confirmó la presencia del vector pPA102 por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las 6 muestras se observó la presencia de ADN plasmídico linealizado con un peso molecular de aprox. 6.8 KB.



**Fig.5.2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de muestras de ADN plasmídico de posibles transformantes de *E. coli* W3110/pPA102: carril (1) clona 9 digerida con Eco R1, (2) clona 14 digerida con Eco R1, (3) clona 21 digerida con Eco R1, (4) clona 23 digerida con Eco R1, (5) MPM 1KB, (6) clona 24 digerida con Eco R1, (7) clona 24 sin digerir.

Las clonas seleccionadas confirmadas como transformantes positivas se utilizaron en pruebas de expresión. Se observó que las clonas produjeron diferentes niveles de actividad de la enzima en un medio mínimo con lactosa mientras que en la cepa no transformada no hubo producción de la enzima (Fig 5.3). Se seleccionó la clona 24 para la expresión de PA en los siguientes experimentos en reactor por presentar la mayor productividad entre las clonas (0.059 U/mLh) así como el valor máximo de actividad específica (0.458 U/mg células) después de 17 h de cultivo en matraz a 29 °C agitado a 200 rpm. Probablemente estas diferencias en la actividad enzimática se deban al número de copias del plásmido en la célula.





**Fig.5.3.** Actividad específica máxima de PA (U/mg células) en las clonas 21, 23, 24 y 14 después de 17 h de cultivo. El control consiste en la cepa no transformada.

#### 5.4. Evaluación de la producción de PA utilizando diferentes sustratos

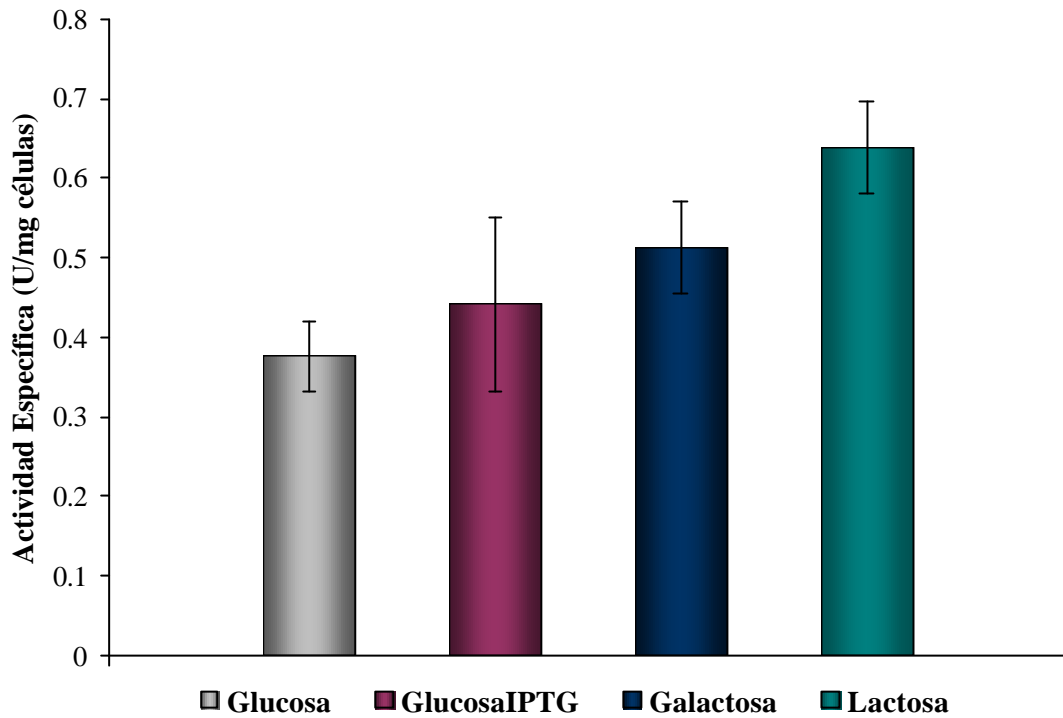
En la figura 5.4 se muestran los valores de actividad enzimática específica de los cultivos con glucosa IPTG, galactosa y lactosa como sustrato y un cultivo control con glucosa. Contrario a lo observado con la cepa JM101 de *E. coli*, en la cepa W3110 se observó una alta producción de la enzima en presencia de glucosa sin inductor sintético IPTG (cultivo control). Este resultado sugiere que el medio con suero de leche es una buena opción para la expresión de la enzima recombinante en la cepa seleccionada ya que se induce la producción de PA con lactosa, galactosa y glucosa sin necesidad de inductores sintéticos.

El uso de lactosa demostró la capacidad de inducción similar a la obtenida con galactosa en la producción de la PA. La actividad específica máxima de PA fue de 0.639 y 0.514 U/mg células para los cultivos que contenían lactosa y galactosa respectivamente y no se observó diferencia significativa entre sí (Fig. 5.4).

En los cultivos inducidos con glucosa y glucosa IPTG, la adición del inductor sintético aumentó la expresión de PA pero no se alcanzó el nivel de actividad obtenido con lactosa o galactosa. Este efecto sugiere que se alcanzó un máximo de expresión de la enzima al inducir con glucosa IPTG, lactosa o galactosa bajo las condiciones de este experimento.

En la Tabla. 5.3 se presenta un resumen de los valores de actividad máximos obtenidos en las pruebas de expresión en medios con diferente fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por duplicado para efecto de reproducibilidad.

La actividad volumétrica máxima fue de 1.05 U/mL y se presentó en el cultivo con lactosa como fuente de carbono e inductor, mientras que en el cultivo con galactosa fue de 0.952 U/mL. Este resultado muestra que la fuente de carbono lactosa resultó igual de eficiente que la galactosa en la producción de PA.



**Fig. 5.4.** Valores máximos promedio de actividad específica de W3110/pPA102 en diferentes fuentes de carbono.

**Tabla.5.3.** Valores máximos promedio de actividad de PA en *E. coli* W3110/pPA102 con diferente fuente de carbono.

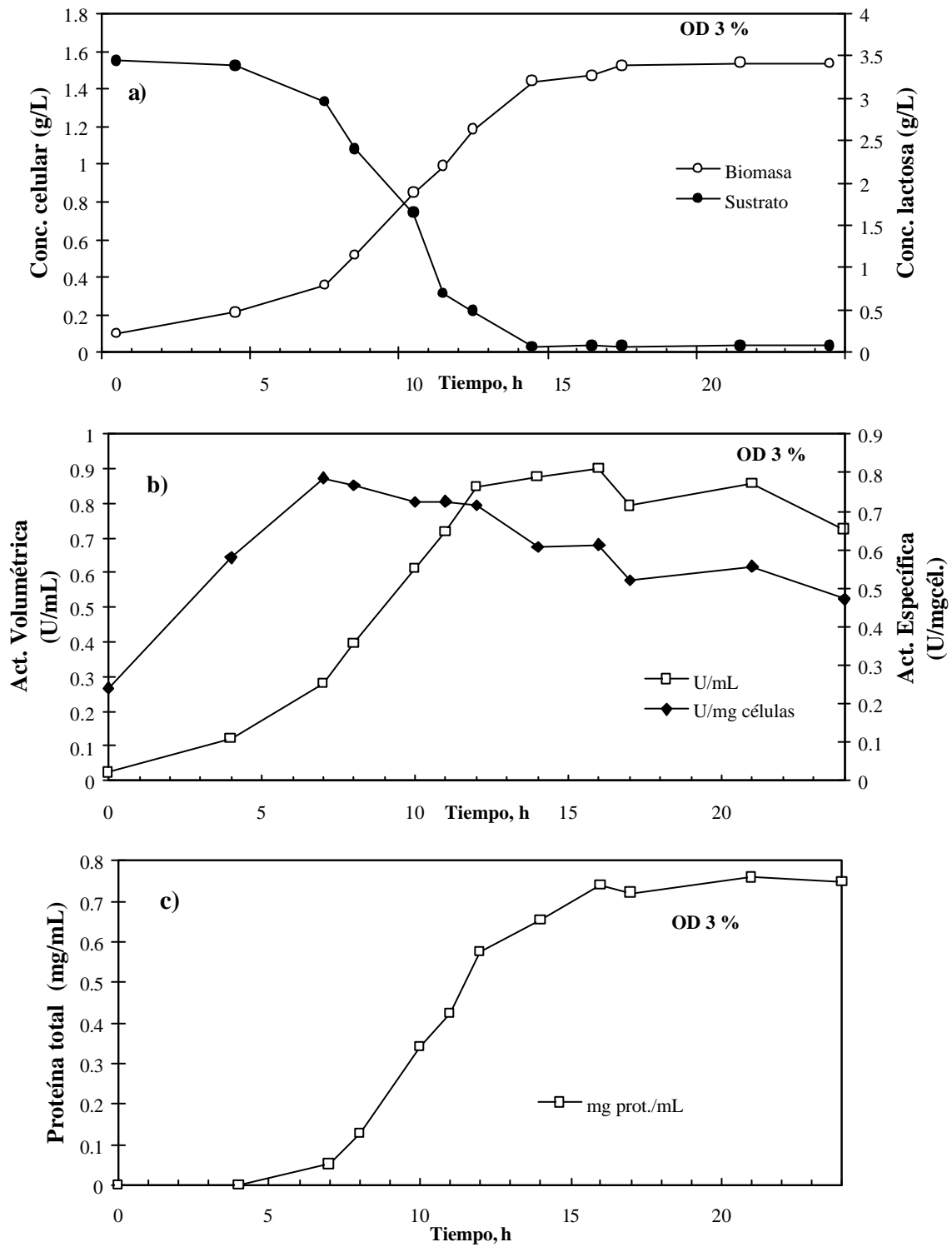
Sustrato	Activ. Máx. Vol. (U/mL)	Activ. Máx. Esp. (U/mg <sub>células</sub> )
Glucosa	0.736± 0.040	0.376 ± 0.044
Glucosa IPTG	0.886± 0.0014	0.441 ± 0.111
Galactosa	0.936± 0.180	0.514 ± 0.058
Lactosa	1.051± 0.166	0.639 ± 0.058

## 5.5. Cultivos en biorreactor con base en el diseño experimental

En la Fig. 5.5. se muestra la cinética de cultivo a 5 g/L SLB y 3 % OD, el resto de los cultivos se encuentran en el apéndice D. En la figura 5.5.a se presenta la cinética de crecimiento celular y consumo de lactosa. La concentración celular alcanza un máximo de 1.6 g/L al agotarse la lactosa del medio. La concentración de oxígeno disuelto no afectó de manera significativa la velocidad de crecimiento ni la concentración celular alcanzada en los experimentos con 5 g/L de suero de leche como concentración inicial bajo diferentes condiciones de OD (Ver tabla 5.4). En los gráficos de control de oxígeno disuelto que se encuentran en el apéndice C se puede observar una perturbación en el control de OD al término de la fase exponencial de los cultivos con excepción de aquellos que fueron controlados a 15 % OD donde la perturbación es imperceptible.

Respecto a la producción de PA (Fig.5.5.b), ésta si fue afectada por el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio. En el cultivo a 3 % OD y 5 g/L SLB se obtuvo la mayor actividad volumétrica de PA (0.793 U/mL), mientras que en los cultivos con 9 y 15 % OD, los valores de actividad máxima fueron de 0.61 y 0.57 U/mL respectivamente (Apéndice D). Lo anterior concuerda con lo publicado por Ramírez (1994b) donde reporta que al aumentar la velocidad específica de crecimiento, la actividad enzimática se ve afectada.

En la Fig.5.5b se muestra el perfil de actividad específica para el mismo cultivo. Se puede apreciar un máximo en la actividad específica durante la fase de exponencial (8-15 h). Para una concentración inicial de 5 g/L de SLB la actividad específica máxima fue de 0.613 U/mg células y fue obtenida en el cultivo controlado a 3 % de OD. En los cultivos controlados a una OD de 9 y 15 % las actividades fueron menores al cultivo a 3 % y similares entre sí (0.506 y 0.424 U/mg células respectivamente). En la Fig. 5.5.c se muestra la curva de proteína total durante la fermentación donde el máximo fue de 0.7 mg/mL, y se puede observar un perfil similar al de concentración celular.



**Fig.5.5.** Cinética del cultivo con 5 g/L de SLB controlado a 3 % OD. **a)** Crecimiento celular. **b)** Perfil de actividad volumétrica y específica de PA. **c)** Proteína total.

Las cinéticas generadas de la serie de cultivos con 10 g/L de concentración inicial de suero de leche en el medio, presentaron una tendencia similar a la de cultivos con 5 g/L de concentración de sustrato. La menor velocidad específica de crecimiento en las fermentaciones realizadas a la concentración de 10 g/L de SLB ( $0.1405 \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvo en el cultivo con el nivel más bajo de OD (3 %), mientras que a OD mayores (9 y 15 %) las velocidades de crecimiento alcanzadas son comparables a las obtenidas en los experimentos a 5 g/L de sustrato (Tabla 5.4). La densidad celular final alcanzada en las fermentaciones con 10 g/L de suero a 9 y 15 % OD fue de 2.06 y 2.19 g/L respectivamente, mientras que a una OD de 3% la concentración celular resultó mucho más baja que la obtenida en el resto de las fermentaciones (Apéndice D).

Respecto a la producción de PA se observó una diferencia muy marcada en la actividad volumétrica relacionada con el nivel de OD en el medio. En la fermentación a la condición de OD del 9 % se obtuvo la actividad volumétrica ( $0.65 \text{ U/mL}$ ) y específica ( $0.35 \text{ U/mg}$  de células) máximas entre los cultivos con concentración intermedia de sustrato. También en este cultivo se presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ( $0.235 \text{ h}^{-1}$ ) aunque la diferencia con el cultivo a 15 % de OD y 10 g/L SLB no fue significativa. Los valores de actividad volumétrica y específica de PA en estos cultivos disminuyeron al aumentar el %OD en el medio.

En los cultivos que se realizaron con 15 g/L de suero de leche, la velocidad específica de crecimiento se vio disminuida en los cultivos a 3 y 15 % de OD ( $0.11$  y  $0.145 \text{ h}^{-1}$  respectivamente) con respecto al promedio, mientras que en la fermentación a 9 % de OD se alcanzó una velocidad específica cercana al máximo entre fermentaciones ( $0.236 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual puede indicar que este nivel de concentración de OD se aproxima al óptimo para favorecer el crecimiento de la cepa empleada.

La máxima concentración celular final (2.2 g/L) en los cultivos con 15 g/L de SLB en el medio se obtuvo con la mayor concentración de oxígeno disuelto (15 % OD) con una adecuada reproducibilidad en la réplica. Mientras que a las otras condiciones de OD (3 y 9 %) el crecimiento bacteriano fue equiparable entre ambos cultivos alcanzando una concentración celular promedio de  $1.9 \text{ g/L} \pm 0.02$ .

Entre las fermentaciones con la mayor concentración inicial de fuente de carbono, se puede apreciar que a 9 % OD, el perfil de producción de la enzima difiere de los otros cultivos, resultando en el valor más alto de actividad volumétrica (0.61 U/mL) y específica (0.47 U/mg de células) entre las fermentaciones con 15 g/L de SLB. Este resultado coincide con el aumento de velocidad específica de crecimiento lo cual demuestra que la cinética de producción de la enzima está asociada al crecimiento microbiano. La reproducibilidad de las fermentaciones fue probada realizando una única réplica para la condición 15 g/L de SLB y 15 % OD (Ver Apéndice D).

Con respecto a la actividad específica se obtuvo la producción más alta de PA a 9 % OD (0.47 U/mg células), y a las otras dos condiciones 3 y 15 % OD la producción fue mas baja (0.209 y 0.22 U/mg células respectivamente). A diferencia de lo observado a concentraciones más bajas de sustrato (5 y 10 g/L), el máximo de actividad específica de PA se alcanzó después de 15 h de cultivo.

## **5.6. Parámetros de rendimiento en la producción de PA**

En la tabla 5.4. se muestra el resumen de los resultados de actividad enzimática volumétrica, actividad específica y velocidad específica de crecimiento máximas de las fermentaciones en biorreactor, así como los valores calculados de rendimiento de producto por biomasa ( $Y_{P/X}$ ) y el rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{X/S}$ ) y productividad, cada uno de estos puntos serán discutidos en las secciones siguientes.

### **5.7. Eficiencia de suero de leche en la expresión de enzimas recombinantes en *E. coli***

En los cultivos de *E. coli* W3110 en biorreactor inducidos con suero de leche se alcanzó una actividad específica de PA (0.613 U/mg células) comparable al máximo obtenido en las pruebas de expresión con galactosa, glucosa IPTG y glucosa aunque la producción siguió una cinética más lenta. Lo anterior concuerda con lo reportado por Viitanen y col. (2003) quienes obtuvieron los niveles máximos de actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en cultivos tipo lote alimentado de *E. coli* Rb791 recombinante a 30 ° C con glucosa y glicerol como fuente de carbono y lactosa y suero de leche como inductores. En la expresión de la enzima recombinante murimidasa en cultivos lote alimentado a 37 ° C de *E. coli* BL21(DE3), inducidos con lactosa de suero de leche, Viitanen y col. (2003) observaron una acumulación importante de galactosa formada dentro de las células que no fue metabolizada, lo cual confirma que esta cepa no es capaz de metabolizar eficientemente lactosa tal como se observó en este trabajo. En ambos casos reportados por Viitanen y col. (2003) el suero de leche fue empleado como inductor y no como fuente de carbono, además la concentración de oxígeno disuelto empleada (30%) para la producción de las dos enzimas es mucho mayor que la óptima encontrada para la penicilino acilasa. La eficiencia del suero de leche como sustrato y/o inductor de la expresión de enzimas recombinantes depende de la cepa de *E. coli*, la enzima y las condiciones óptimas de expresión como: pH, temperatura y % OD.

### **5.8 Efecto de la velocidad específica de crecimiento y la OD sobre la producción de PA**

Como se discutió anteriormente, la velocidad de crecimiento afecta significativamente la producción de PA, lo que se ve reflejado en el rendimiento de producción de la enzima en base a la concentración celular. En la serie de experimentos en reactor, el mayor rendimiento de producto por biomasa generada (602.6 U/g células) así como la productividad más alta (0.054 U/mLh) se obtuvieron en el cultivo a 5 g/L de SLB y 3 % OD a una velocidad específica de crecimiento de 0.192 h<sup>-1</sup>.



El rendimiento de biomasa por sustrato máximo se alcanzó en el cultivo con 5 g/L de SLB y 15 % OD , pero el rendimiento de producto para estas condiciones es la mitad del obtenido con el cultivo a 3 % OD. El aumento en el % de oxígeno disuelto a la concentración más baja de sustrato (5g/L) favorece la formación de biomasa pero no así la producción de la enzima. Este resultado es congruente con lo observado por De León (2003) quien sugiere que la producción de la enzima mejora al limitar el oxígeno disponible durante la fermentación en un rango entre 1 y 5 % de OD. En la mayoría de las fermentaciones la velocidad específica de crecimiento se mantuvo en un rango limitado a pesar de las condiciones de cultivo diferentes, exceptuando los cultivos a 10 y 15 g/L con 3 %OD (experimentos 4 y 7) donde la limitación de oxígeno disminuyó la velocidad y el crecimiento celular, resultando además en una pobre producción de la enzima recombinante.

**Tabla 5.4.** Resumen de resultados de las fermentaciones realizadas en reactor para evaluar el efecto de la concentración de sustrato y OD en la producción de PA.

EXPERIMENTO	SLB g/L	% OD	Y X/S	Y P/X U/g	Ac.Esp. máx. (U/mgcel)	Act.Vol. máx. (U/mL)	Productividad (U/mLh)	$\mu$ h <sup>-1</sup>
1	5	3	0.361	602.6	0.613	0.793	0.054	0.1919 (r <sup>2</sup> =0.991)
2	5	9	0.285	396.5	0.506	0.609	0.040	0.2136 (r <sup>2</sup> =0.989)
3	5	15	0.468	338.4	0.424	0.573	0.036	0.2182 (r <sup>2</sup> =0.992)
4	10	3	0.252	177.5	0.185	0.229	0.016	0.1405 (r <sup>2</sup> =0.985)
5	10	9	0.398	393.8	0.349	0.651	0.032	0.2355 (r <sup>2</sup> =0.991)
6	10	15	0.305	341.8	0.384	0.524	0.035	0.2154 (r <sup>2</sup> =0.984)
7	15	3	0.186	166.2	0.209	0.311	0.015	0.1115 (r <sup>2</sup> =0.992)
8	15	9	0.215	272.8	0.466	0.611	0.034	0.2209 (r <sup>2</sup> =0.989)
9	15	15	0.232	192.3	0.192	0.326	0.016	0.1368 (r <sup>2</sup> =0.998)
Réplica	15	15	0.236	207.9	0.227	0.467	0.018	0.1525 (r <sup>2</sup> =0.983)

## 5.9. ANÁLISIS DE VARIANZA

### 5.9.1. ANOVA del Rendimiento $Y_{P/X}$

Se realizó el análisis de varianza de las variables concentración de SLB (A) y oxígeno disuelto (B) en una ecuación que describe a la respuesta rendimiento de producto por biomasa con el menor error y que incluye los términos A, B,  $A^2$ , AB,  $A^2B$  y  $AB^2$  con una  $R^2=0.93$  y un coeficiente de variación de 22.88 (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{P/X}$ .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	1.437E10 <sup>5</sup>	6	23954.98	4.461	0.167
Error	1.074E10 <sup>4</sup>	2	5370.38		
Total	1.545E10 <sup>5</sup>	8			

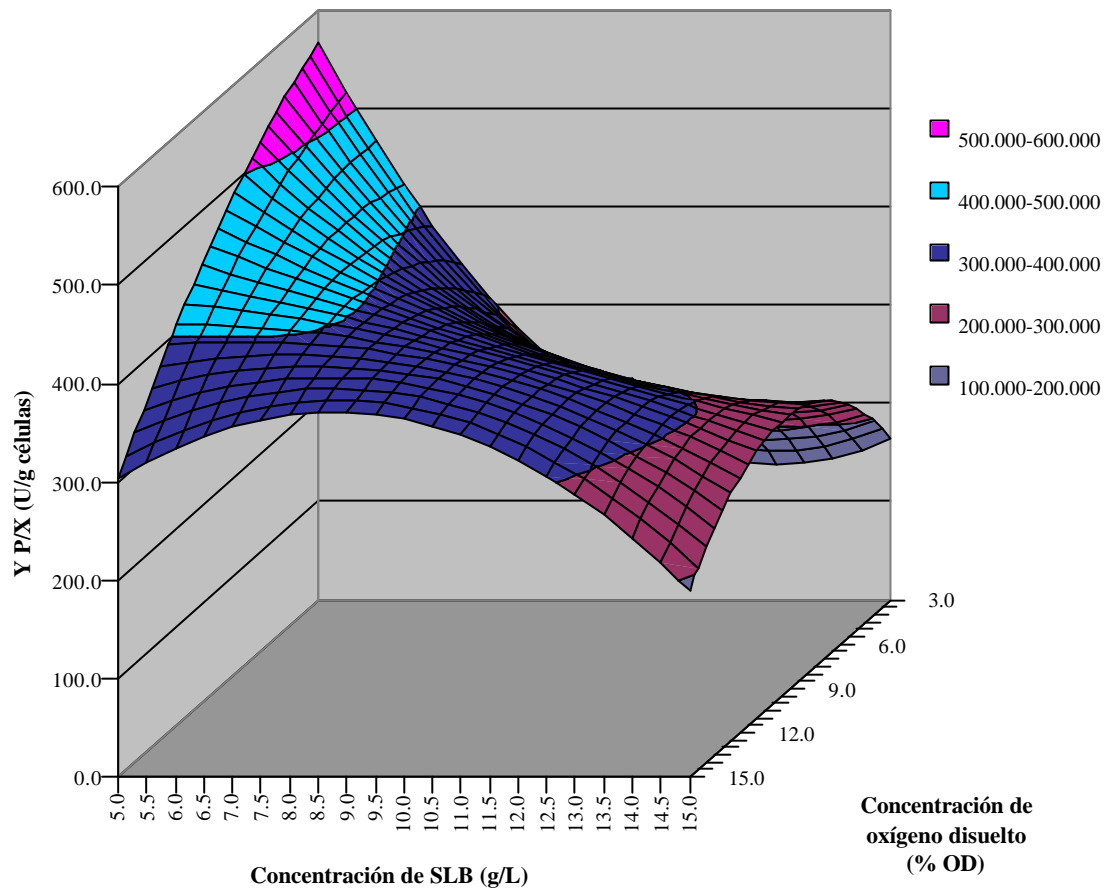
$$R^2=0.9305.$$

La ecuación que describe mejor el rendimiento de producto por biomasa se escribe:

(5-1)

$$Y_{P/X} = 1579.383333 - 245.07875*(A) - 104.95*(B) + 9.451167*(A^2) + 24.701667*(AB) - 0.9445*(A^2B) - 0.188472*(AB^2)$$

El análisis de superficie (Fig. 5.6) muestra que el óptimo de rendimiento de producto por biomasa se presenta con las condiciones 5 g/L de suero de leche y 3 % OD y fue confirmado con la herramienta solver de Excel.



**Fig. 5.6.** Superficie de respuesta para el rendimiento de producto por biomasa (U/gcélulas).

## 5.9.2. ANOVA del Rendimiento $Y_{X/S}$

**Tabla 5.6.** Análisis de varianza para la respuesta  $Y_{X/S}$ .

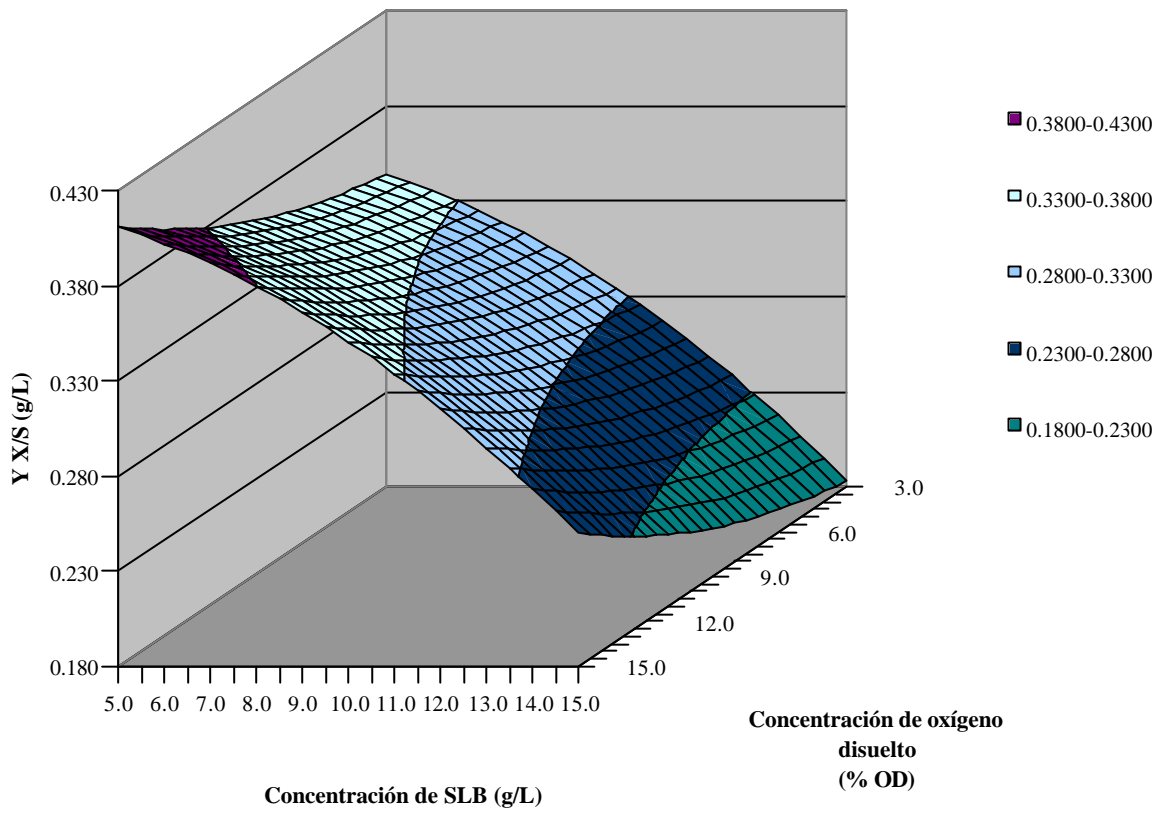
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.04682	2	0.02341	6.346	0.0331
Error	0.02213	6	0.00369		
Total	0.06895	8			

La ecuación de mejor ajuste para los datos de rendimiento de biomasa por sustrato se expresa como:

(5-2)

$$Y_{X/S} = 0.362102 - 0.000807*(A^2) + 0.000308 (B^2)$$

En la figura 5.7. se puede observar la superficie de respuesta para el rendimiento de biomasa por sustrato en función de la concentración de oxígeno y concentración de sustrato. Las condiciones óptimas para alcanzar el máximo rendimiento fueron 5 g/L de SLB y 15 % de OD. El gráfico de superficie muestra un efecto de inhibición del crecimiento microbiano al aumentar la concentración inicial de suero de leche en la fermentación, esto significa que para favorecer la producción de biomasa es mejor trabajar a niveles bajos de SLB y niveles no limitantes de OD.



**Fig.5.7.** Superficie de respuesta para el rendimiento sustrato por biomasa en la producción de PA.

### 5.9.3. ANOVA de la Actividad específica máxima (U/mg células).

En la tabla 5.7. se muestra el análisis de varianza del modelo de actividad específica en función de las variables A (concentración de SLB) y B (% OD). Se propuso la ecuación de mejor ajuste para describir la respuesta actividad específica la cual involucra los términos A, B, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, AB, A<sup>2</sup>B y AB<sup>2</sup>.

**Tabla 5.7.** Análisis de varianza para la respuesta Actividad específica (U/mg células).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F	P > F
Modelo	0.26305	7	0.03758	12.498	0.2145
Error	0.00301	1	0.00301		
Total	0.26605	8			

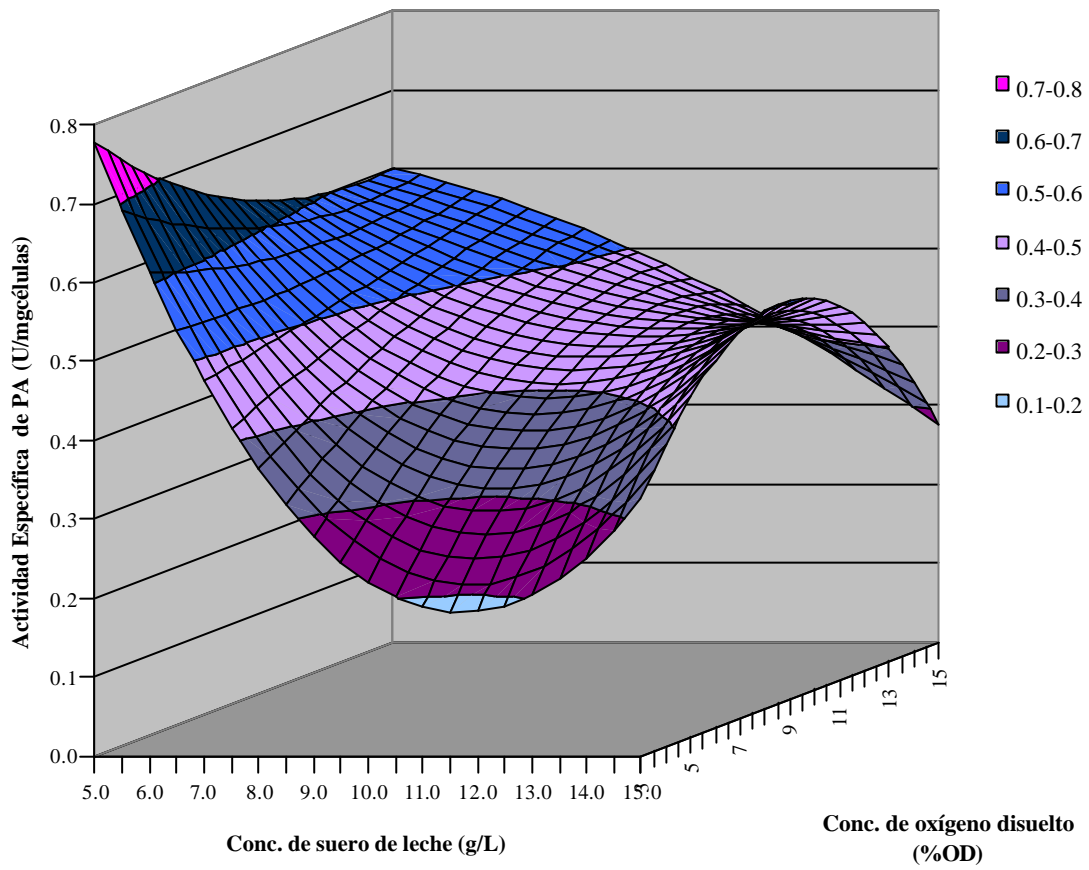
Se propuso la siguiente ecuación para describir la producción de PA en términos de actividad enzimática específica (U/mg células) :

(5-3)

$$\text{Actividad específica} = Y = 2.566653 - 0.419779*(A) - 0.20625*(B) + 0.016938*(A^2) + 0.00519*(B^2) + 0.038883*(AB) - 0.001238*(A^2B) - 0.000726*(AB^2)$$

El modelo propuesto para actividad específica en U/mg células fue el que se ajustó mejor a los datos obtenidos experimentalmente en las fermentaciones para la producción de PA con un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) del modelo de 0.9887.

De acuerdo con el análisis de máximos y mínimos las condiciones óptimas se encuentran a 5 g/L de suero de leche y 3 % de OD como se puede observar en la Fig. 5.8. Aunque el modelo en teoría sugiere que se puede alcanzar una actividad específica mayor por debajo de los niveles probados experimentalmente, en la práctica el disminuir el nivel de oxígeno durante la fermentación afecta de manera considerable el rendimiento de biomasa por sustrato como se observa en la sección 5.9.2.



**Fig. 5.8.** Superficie de respuesta para la actividad enzimática específica de PA (U/mg células).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

La expresión de penicilino acilasa (PA) en *E. coli* W3110/pPA102 se logró en presencia de galactosa, lactosa y glucosa con IPTG en el medio de cultivo, sin embargo hay una expresión basal en ausencia de inductor. El perfil de producción de PA en *E. coli* W3110 fue del tipo asociado a crecimiento. La inducción de PA con el medio adicionado con suero de leche resultó más lenta pero alcanzó los mismos niveles que se obtienen cuando se induce con IPTG o galactosa.

A la concentración más alta de suero de leche (15 g/L) y a todas las condiciones de oxígeno disuelto evaluadas (3, 9 y 15 %), la velocidad específica de crecimiento fue significativamente más baja que el promedio alcanzado en el resto de los cultivos, demostrando que existe un efecto de inhibición por sustrato en las fermentaciones.

Las condiciones de oxígeno disuelto afectan de manera importante la producción de la enzima penicilina acilasa y los valores de actividad volumétrica y específica por igual. En todas las fermentaciones, la actividad específica de PA y la productividad del proceso fueron dependientes de las condiciones de oxígeno y concentración inicial de suero. Las mejores condiciones para la producción de PA de acuerdo con el análisis de superficie de respuesta y la herramienta Solver de Excel son: concentración inicial de 5 g/L de suero de leche y 3 % de oxígeno disuelto constante.

Los resultados generados en este trabajo muestran que el suero de leche puede ser empleado eficientemente como sustrato e inductor en la producción de proteínas recombinantes como la penicilino acilasa, y representa una alternativa a los procesos actuales de tratamiento del suero de leche, que es un efluente altamente contaminante.



## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar cultivos de tipo lote alimentado, ya que la edad del cultivo influye en la actividad de penicilino acilasa (PA) en *E.coli* W3110/pPA102. Estos experimentos podrían determinar si el efecto observado al final de los cultivos se debe a limitaciones postraduccionales o por presencia de proteasas.

Se demostró que 5 g/L de suero de leche es suficiente para alcanzar valores altos, tanto de crecimiento de la cepa como de producción de PA, por lo que se recomienda utilizar el suero líquido en lugar de suero de leche en polvo procesado, con lo que se evita la necesidad de aplicar tratamientos costosos de concentración como evaporación y ultrafiltración.

Por otra parte se recomienda investigar el mecanismo responsable de la expresión de PA con diferentes fuentes de carbono en la *E.coli* W3110. Este patrón de inducción puede ser el resultado de la fusión del promotor *lac* en la secuencia del promotor *pac* en el vector de expresión pPA102.

## 7. REFERENCIAS

Ahn W. S., Park S. J., Lee S. Y. (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3624-3627.

Altaras, N.E., Etzel, M.R., Cameron, D.C. (2001). Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8. *Biotechnol Prog.* 17(1):52-56.

Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition. McGraw-Hill International Editions; Cap. 7.

Balansingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., y Lilly, D.(1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E.coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 250-256.

Barret, E.L., Collins, E.B., Hall, B.J. y Matoi, S.H. (1983). Production of 2,3-butylene glycol from *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* . *J Dairy Sci.* 66(12):2507-2514.

Beom Soo Kim. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. (2000). *Enzyme Microb Technol.* 27: I. 10, 774-777.

Burlingame, R. and Chapman, P.J. 1983. Catabolism of phenilpropionic acid and its 3-hydroxyderivate by *E. coli*. *J.Bacteriol.* 155 (1): 113-121.

Compagno C, Porro D, Smeraldi C, Ranzi BM. (1995). Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(5):822-825.

Dai, M., Zhu, Y., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G. y 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, 1298-1303.

De León, A. (1996). Tesis de Maestría. Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilina acilasa por *Escherichia coli* recombinante. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

De León, A., Hernández, V., Galindo, E., y Ramírez, O.T. (2003). Effects of dissolved oxygen on the production of recombinant Penicillin Acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 33:689-697.

Doelle, H.W., Ewings, K.N. y Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial system. *Adv. Biochem. Eng.* 23:1-35.

Donovan RS, Robinson CW y Glick BR. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol.* 16:145-154.

Duggleby H. W., Tolley S.P. , Hill C.P., Dodson E.J. , Dodson G. and Moody P.C. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature* 373: 264-268.

El-Holi M.A. y Al-Delaimy K. S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger* . *African J Biotechnol.* 2 (10) 356-359.

El-Samragy Y.A.<sup>1</sup>;Khorshid M.A.; Foda M.I.; Shehata A.E. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger* *International J of Food Microbiol.* 29:2 411-416 .

Ennis, B.M., Maddox, IS. (1987). Butanol production from lactose hydrolysed whey permeate by fermentation with *Clostridium acetobutylicum*: comparison with non hydrolysed whey permeate. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22(1): 75-81.

Fang, H.H.P. (1991). Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated sludge and anaerobic processes. *J. Dairy Sci.* 74: 2015-2019.

Ghaly A.E., and Kamal M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res.* 38(3):631-44.

Huang Y., y Yang ST. (1998). Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol.Bioeng* 60(4):498-507.

Huber R.E., Lytton J., y Fung E.B. (1980). Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141(2):528-33.

Jacob F, Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56.

Konicek, J., Konickova-Radochova, M. (1994). Use of whey for production of exopolysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiol.(Praga)*. 37(2):102-104.

Kumar V., Ramakrishnan S., Teeri TT., Knowles JK., Hartley BS.(1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grow on whey permeate. *Bioæchnol (NY)*. (1):82-5.

Lee PC, Lee WG, Kwon S, Lee SY, Chang HN. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54(1):23-7.

Leite A. R., Guimarães W. V., De Araujo E. F., Silva D. O. (2000). Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian J of Microbiol* . 31:212-215.

Liu C, Liu Y, Liao W, Wen Z, Chen S. (2004). Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. *Appl Biochem Biotechnol*. 113-116:627-38.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. España. Cap.10, 342-345.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193(1): 265-275.

Lu, J.Y., Lowe, D.A., Kennedy, M.D. y Low, P.S. (1999). Folate-targeted enzyme produg cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug. *J. of Drug Targeting*. 7: (1), 43-53.

Marshall, K. R. (1982). Industrial isolation of milk proteins: Whey proteins. *Developments in Dairy Chemistry*. 1: 339-373.

Maullu C., Lampis G., Desogus A., Ingianni A., Rossolini G. M., y Pompei R. (1999). High-Level Production of Heterologous Protein by Engineered Yeasts Grown in Cottage Cheese Whey . *Applied and Environmental Microbiol*. Vol. 65: (6), 2745-2747.

Merino P. (1992). Tesis Doctoral. Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gen *pac* y su producto, la enzima penicilino acilasa de *Escherichia coli*. Instituto de Biotecnología .UNAM. Cuer., Mor. México.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem*. 13:420-428.

Ospina, S.S., López-Mungía, A., González, R.L. y Quintero, R. (1992). Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53:205-214.

Porro, D.; Martegani, E.; Ranzi, B. M. (1992). Lactose\ whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 799-805.

Quintero R. (1987). Ingeniería Bioquímica .Teoría y aplicaciones. Editorial Alambra Mexicana; Cap. 3.

Qureshi, N., Maddox, I.S.(2003). Production of butanol from concentrated lactose/whey permeate using *Clostridium acetobutylicum* and removal by perstraction. 25th Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals. Paper No. 3-10.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. y Quintero, R. (1994a). Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Proc. Biochem.* 29: 197-206.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. y López-Munguía, A. (1994b). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16:895-903.

Ramírez MA.O., Rivas N. (2003). Production and partial characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Arch Latinoam Nutr.* 53(2):194-201.

Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G. y Branlant, C. (1993). Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC11105. *Biotech. Bioeng.* 41, 14-24. *Current Microbiol.* 29, 263-268.

Rossano R, D'Elia A, Riccio P. (2001). One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite--a flexible procedure suitable for small- and medium-scale preparations. *Protein Expr Purif.* 21(1):165-9.

Roukas, T., (1999). Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22(6):617-621.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Shömer, U., Segner, A. y Wagner, F. (1984). Penicillin acylase from the hybrid strain *E. coli* 5K(pHM12): enzyme formation and hydrolysis of  $\beta$ lactam antibiotics with whole cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 307-312.

Sizmann D., Keilman C., and Böck A. (1990). Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *E. coli*. ATCC 11105. *Eur.J.Biochem.* 192: 143-151.

Terrel, S. L.; Bernard, A.; Bailey, R. B. (1984). Ethanol from whey: continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 577-580.

Terreni, M., Pagani, G., Ubiali, D., Fernandez-Lafuente, R., Mateo, C., Guisan, J.M.(2001). Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic síntesis of cephamandole from cephalosporin C. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2429-2432.

Varela, H., Ferrari, M.D., Loperena, L. Y Lareo, C. (1992). Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiol.* 8(1):14 – 20.

Valle, F., Balbás, P., Merino, E. y Bolívar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature and industry. *Trends in Biochem Sci.* 16: 36-40.

Vrudhula, V.M., Senter, P.D., Fisher, K.J., Wallace, P.M. (1993). Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate. *J. Med. Chem.* 2: 919-923.

Viitanen M., Vasala A., Neubauer P. y Alatosava T. (2003). Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbiol C. Factories*. [www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2](http://www.microbialcellfactories.com/content/2/1/2).

Yang, S.L., Wu, R.P., Wang, J.X., He, J.S. y Zhang, S.B. (1988). Cloning and expression of the penicillin acylase gene. III. Temperature regulates the expression of the penicillin acylase gene at transcriptional level. *Chin. J. Biotechnol.* 4: 32-37.

Youshko, M.I., Van Langen, L.M., Vroom, E., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K. (2001). Highly efficient synthesis of ampicillin in a aqueous solution precipitate system: repetitive addition of substrates in a semicontinuous process. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 426-430.



## APÉNDICES

### Apéndice A

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

##### A.1 Kanamicina (35 mg/μL).

Se disuelven 0.0448 g de kanamicina (Sigma) en 1 mL de agua destilada. La solución se esteriliza en frío a través de un filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. La solución estéril se almacena en refrigeración a 4 ° C y se reemplaza cada mes.

##### A.2 PDAB (p-dimetil-aminobenzaldehído)

Se disuelven 10 g de reactivo PDAB en 50 mL de etanol al 60 % (v/v), luego agregar 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y aforar a 1 L con etanol al 60 % (v/v).

##### A.3 Penicilina G al 20%.

Disolver 0.2 g de penicilina G (Sigma) en 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.8.

##### A.4 6-APA (ácido 6-aminopenicilánico).

Se disuelven 2.5 g de reactivo 6-APA por L de buffer de fosfatos a pH 7.8.

##### A.5 Buffer de fosfatos a pH 7.8.

Mezclar 42.5 mL de una solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M y 457.5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M. Ajustar pH con ácido fosfórico y aforar a 1 L .

##### A.6 Reactivo DNS

Se disuelve 1 g de NaOH (Baker), 20 g de tartrato de sodio y potasio, 0.05 g de metabisulfito de sodio y 0.2 g de fenol en 60 mL de agua destilada. Se agrega 1 g de ácido 3-5-dinitrosalicílico (Sigma) a la solución y se afora a 100 mL. Se mantiene en refrigeración y protegido de la luz.

### **Reactivo E**

Se prepara por separado las siguientes soluciones:

- A) Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en agua destilada.
- B) Solución de tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada.
- C) Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N

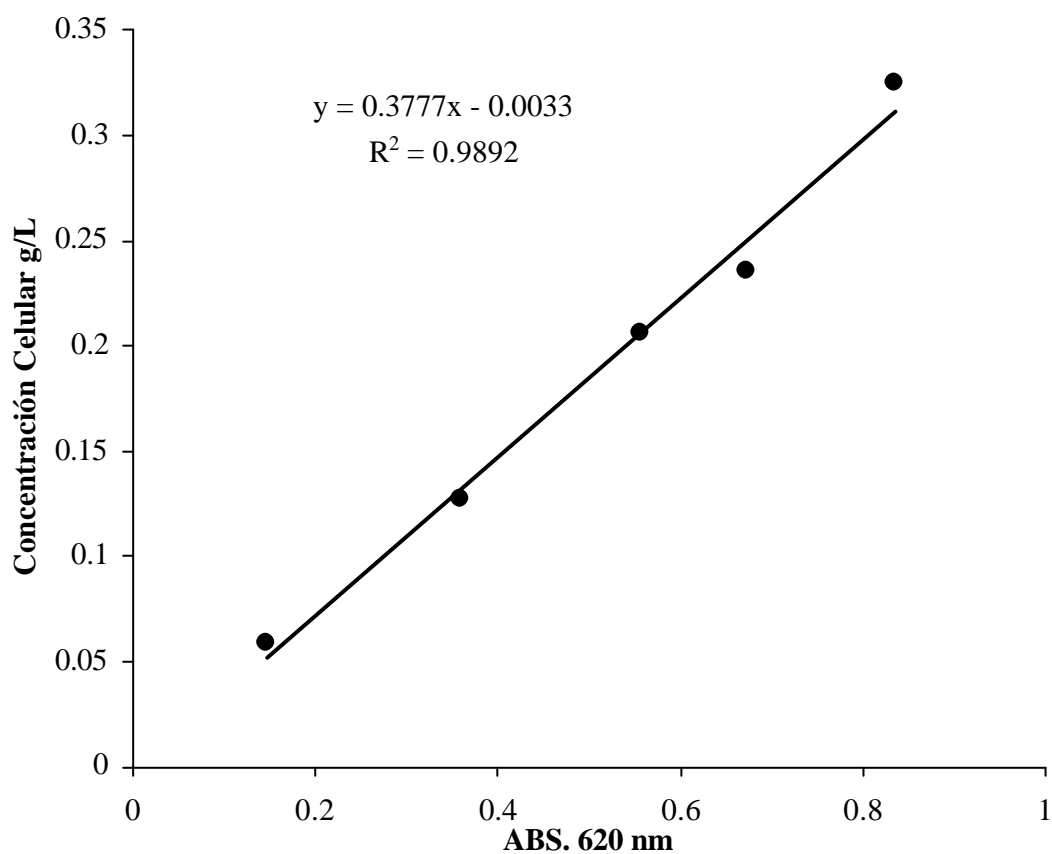
Para preparar 100 mL de reactivo E se mezcla 1 mL de la solución A), 1 mL de la solución B y 98 mL de la solución C. El reactivo se almacena a 4 ° C y protegido de la luz.

## Apéndice B

### B .1. Curva estándar de concentración celular (peso seco)

**Tabla. B.1.** Datos para la construcción de la curva peso seco

Muestra	1	2	3	4	5
Vol. de muestra (L)	0.2	0.098	0.1	0.05	0.048
Peso seco (g)	0.0126	0.0112	0.0207	0.0119	0.01568
Abs. 620 nm.	0.1469	0.3578	0.5566	0.6723	0.8346
Conc. celular (g/L)	0.063	0.1143	0.207	0.238	0.3266

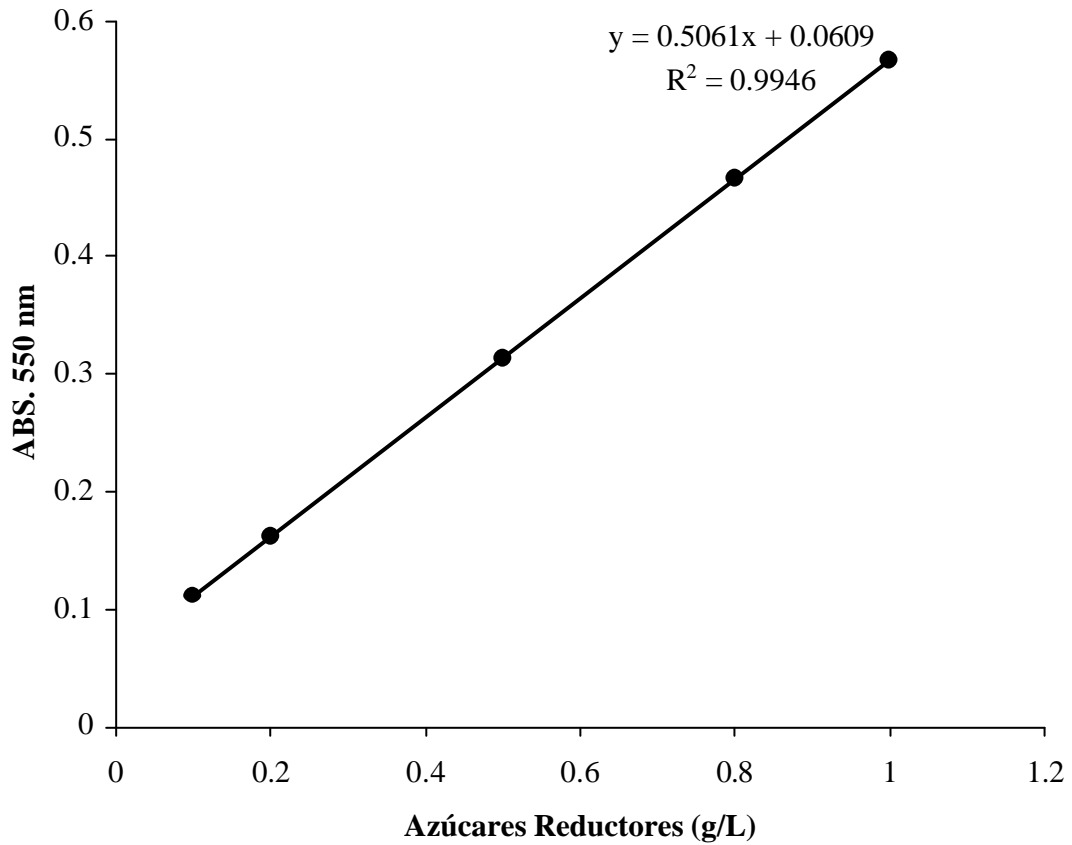


**Fig.B.1.** Determinación de concentración celular.

**B.2 Curva estándar de azúcares reductores por el método del ácido di-nitrosalicílico (DNS).**

**Tabla.B.2.** Datos para la construcción de la curva.

TUBO		1	2	3	4	5
Estd. lactosa (g/L)	0	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0
Conc. Lactosa (g/L)	----	0.0837	0.13081	0.4315	0.76276	0.96815
Vol. de muestra (µL)	----	250	250	250	250	250
Reactivo DNS (µL)	500	500	500	500	500	500
Agua (mL)	4.25	4	4	4	4	4
Abs. 550 nm	---	0.0116	0.0354	0.1876	0.35525	0.4592



**Fig.B.2.** Determinación de lactosa.

### B.3 Curva Estándar para la Determinación de Actividad Enzimática de PA.

Tabla B.3. Datos de construcción de la curva.

TUBO	6-APA(mg/mL)	Alícuota	Etanol abs.	PDAB	PBS pH 7.8	d.o.415 nm
(BCO)1	0	0	0.96	0.5	0.04	0
2	0.078	0.04	0.96	0.5	0	0.0345
3	0.1562	0.04	0.96	0.5	0	0.074
4	0.3135	0.04	0.96	0.5	0	0.1475
5	0.625	0.04	0.96	0.5	0	0.2865
6	1.25	0.04	0.96	0.5	0	0.575

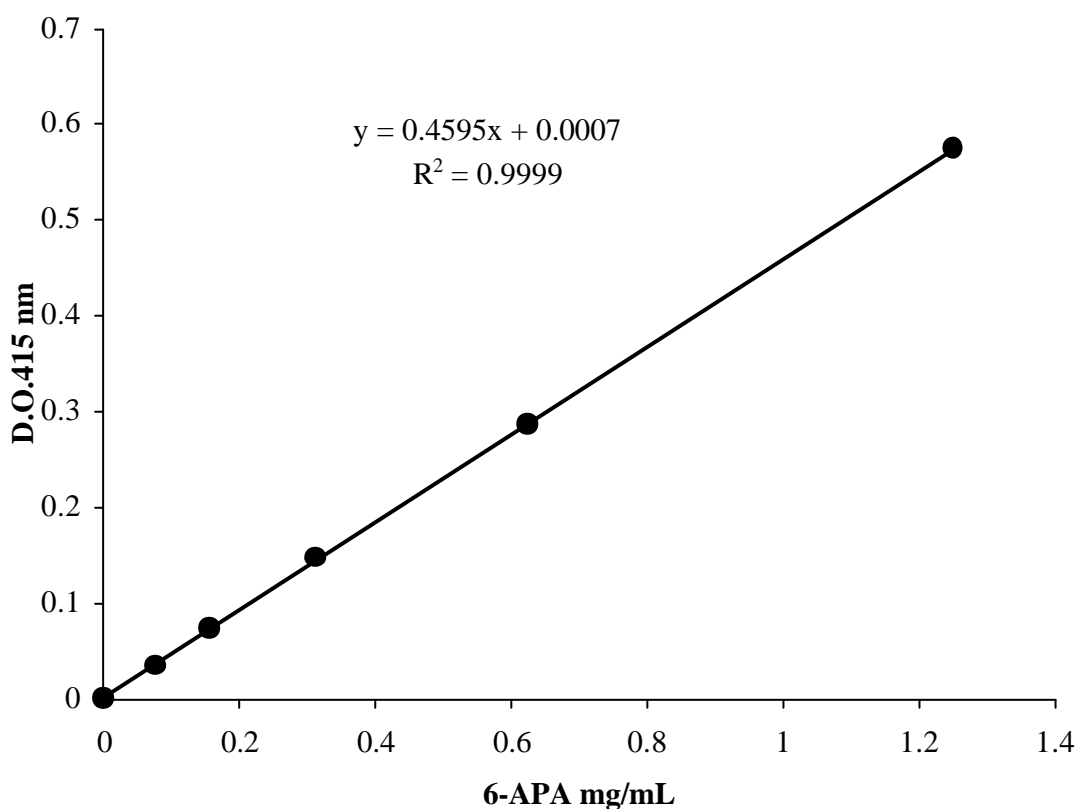
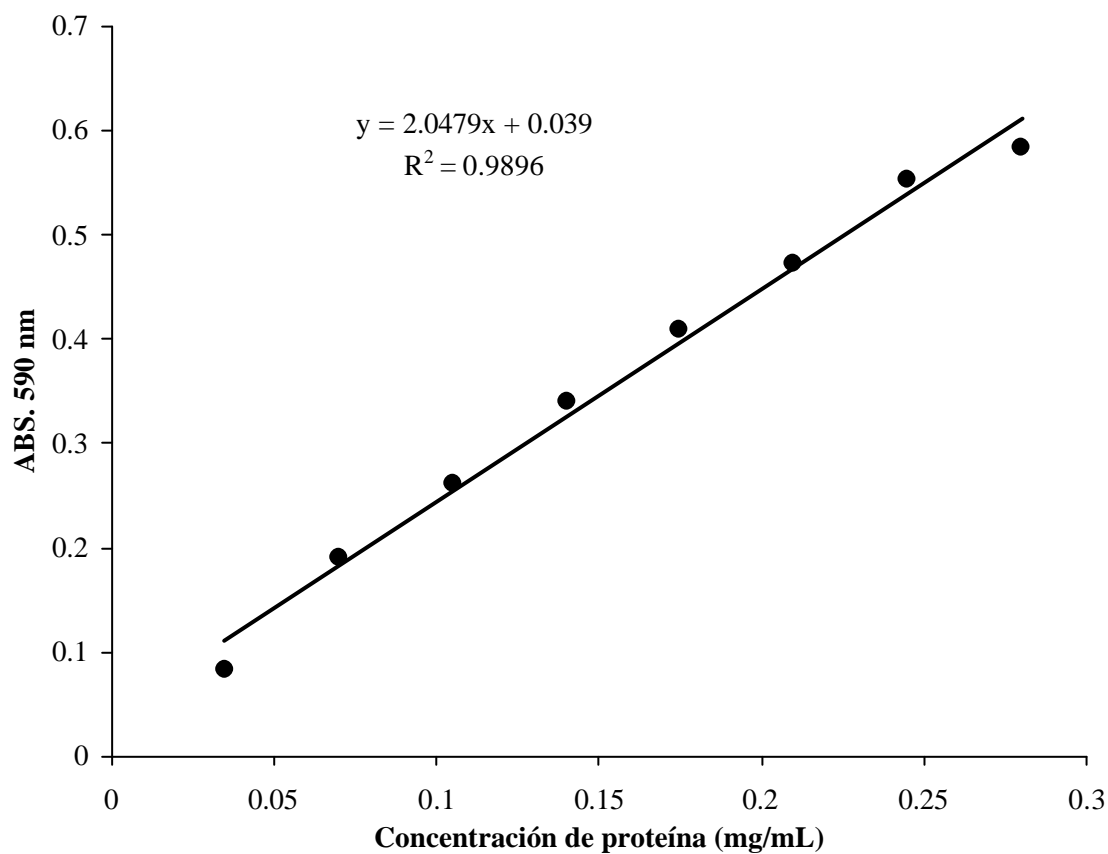


Fig. B.3 Determinación de actividad enzimática de PA.

#### B.4 Curva estándar para la determinación de proteína total.

**Tabla.B.4.** Datos para la construcción de la curva.

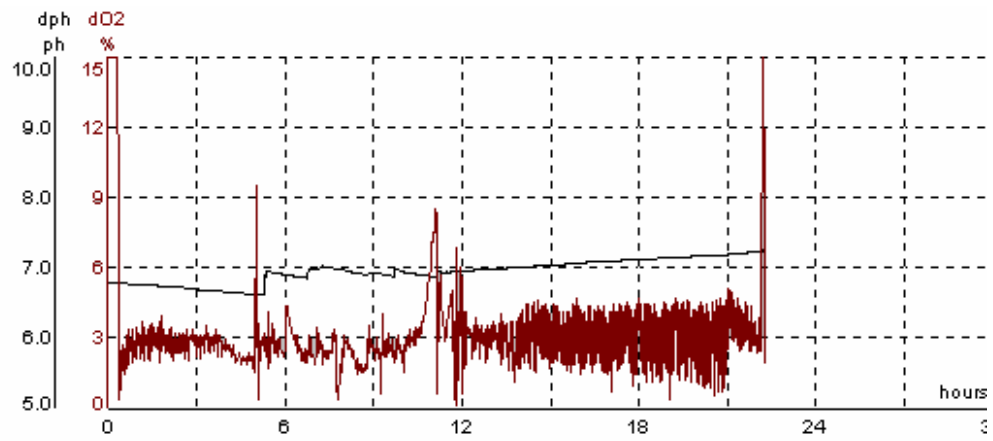
TUBO		1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (µL)	----	25	50	75	100	125	150	175	200
Agua (µL)	1000	975	950	925	900	875	850	825	800
Reactivo E (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Reactivo Folin (µL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Conc. Prot.( mg/mL)	----	0.035	0.07	0.105	0.14	0.175	0.21	0.245	0.28
Abs. 590 nm	----	0.083	0.190	0.261	0.340	0.410	0.473	0.553	0.583



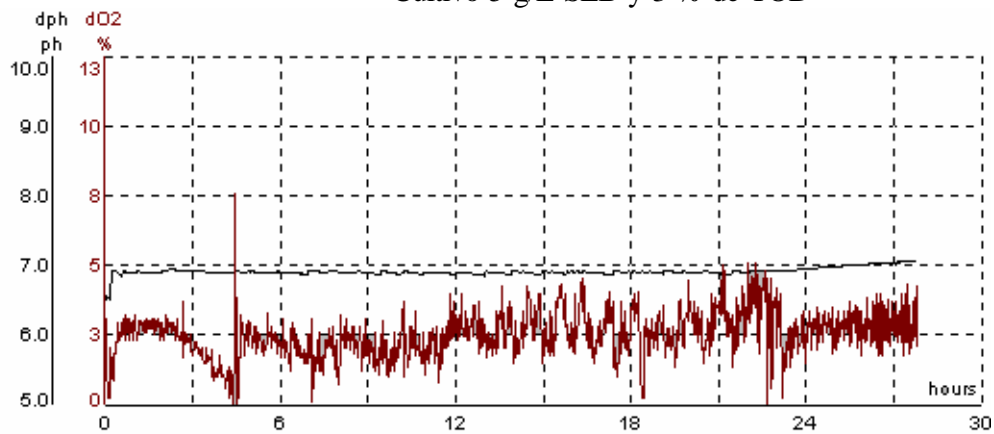
**Fig.B.4.** Determinación de proteína total.

## Apéndice C

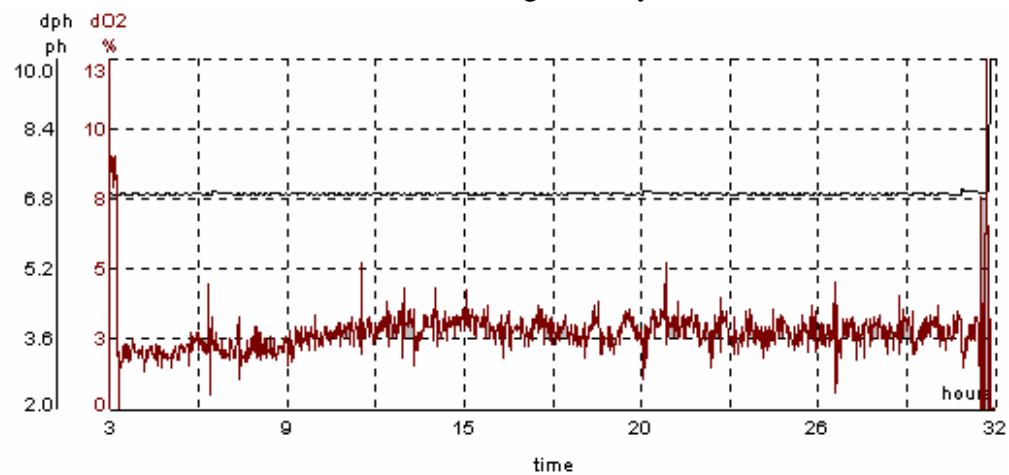
### Perfiles de TOD y pH durante las fermentaciones en reactor.



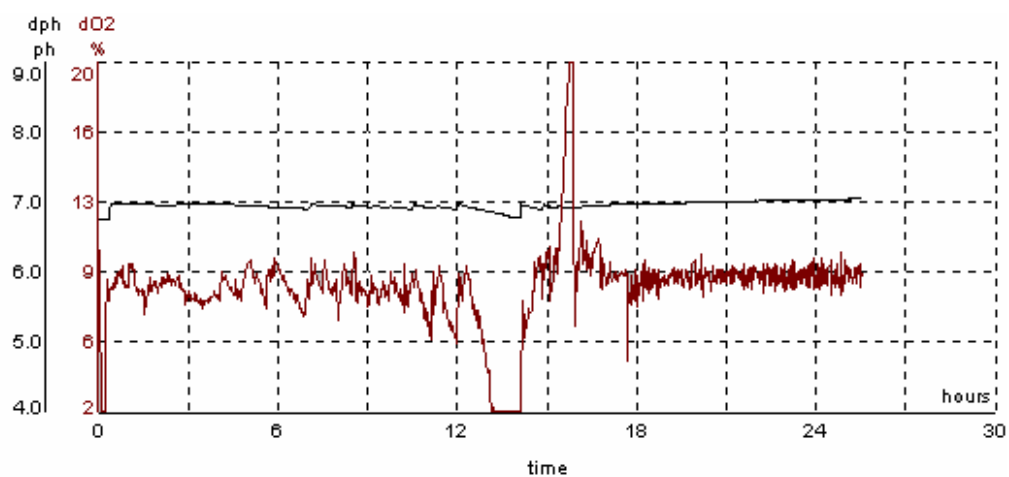
Cultivo 5 g/L SLB y 3 % de TOD



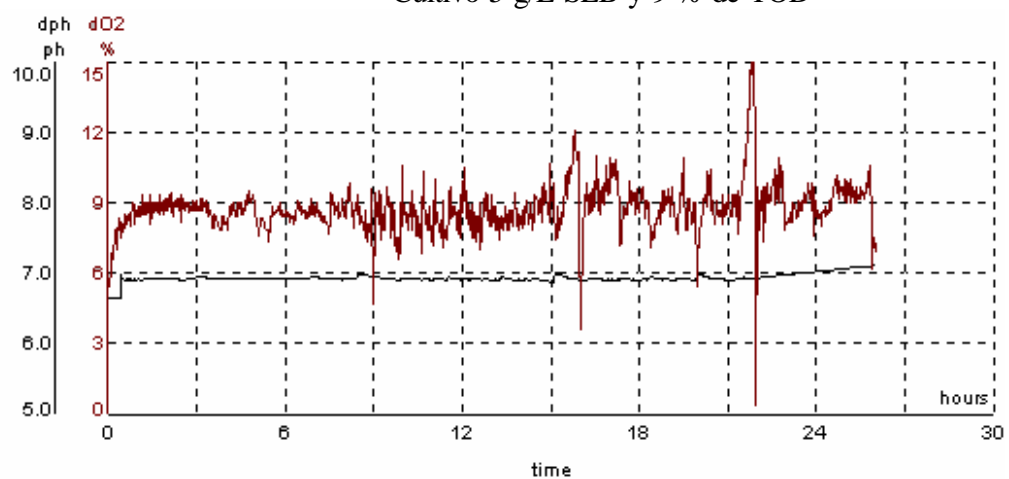
Cultivo 10 g/L SLB y 3 % de TOD



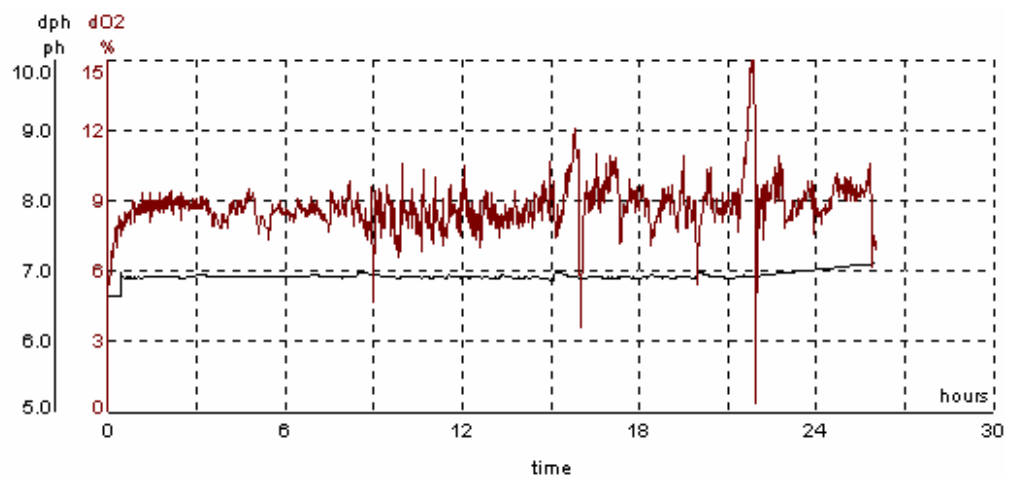
Cultivo 15 g/L SLB y 3 % de TOD



Cultivo 5 g/L SLB y 9 % de TOD

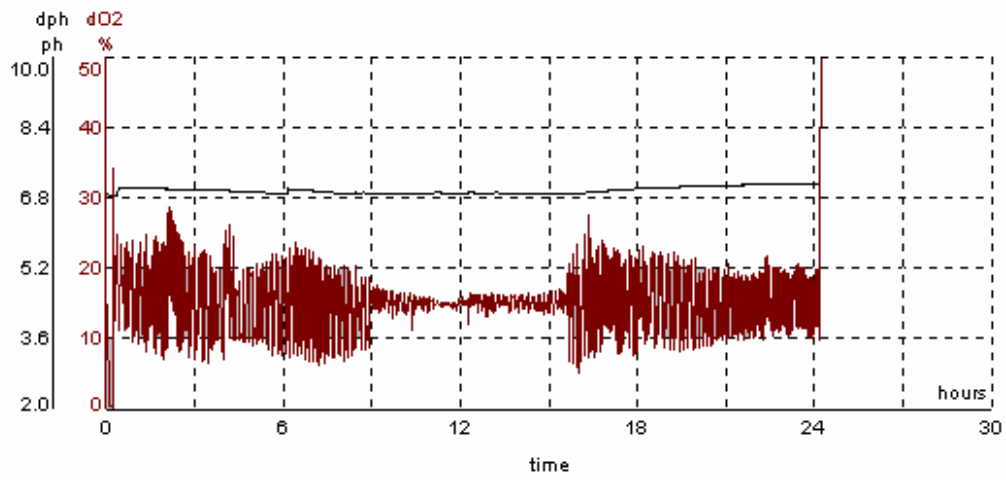


Cultivo 10 g/L SLB y 9 % de TOD

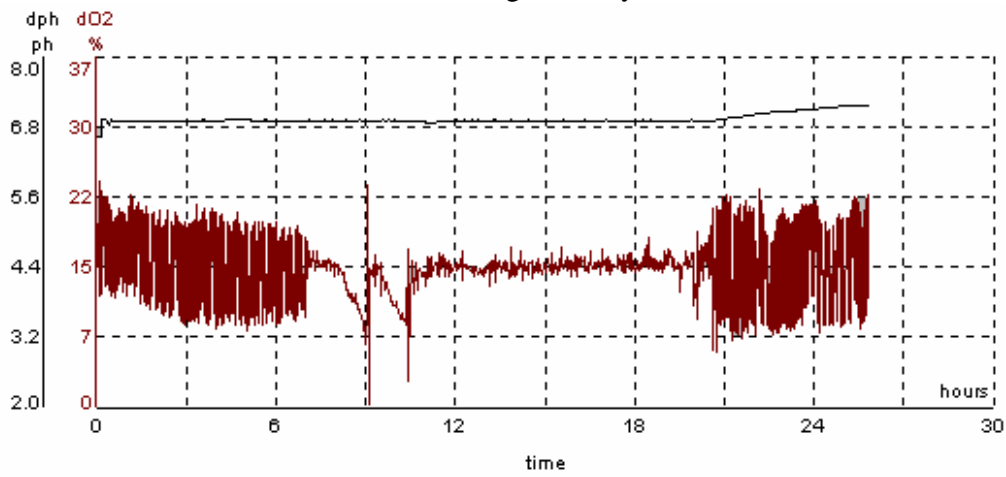


Cultivo 15 g/L SLB y 9 % de TOD

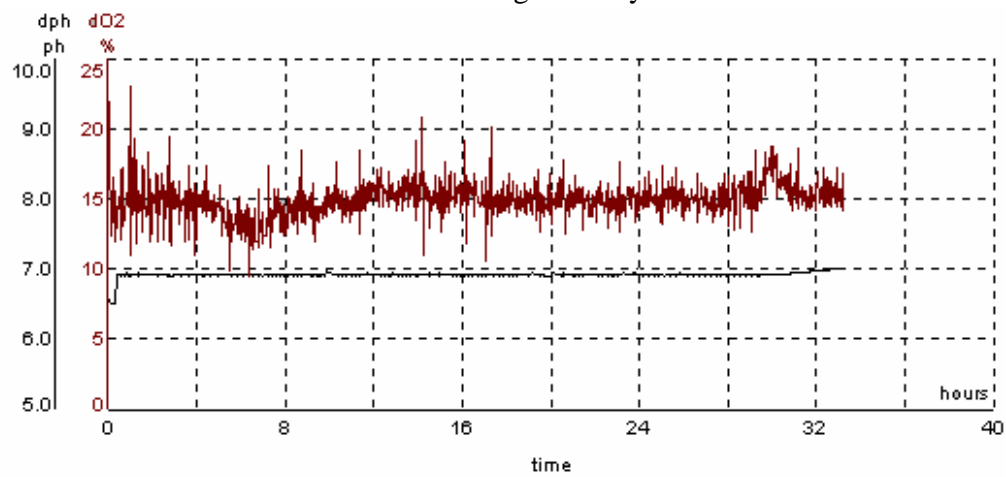




Cultivo 5 g/L SLB y 15 % de TOD

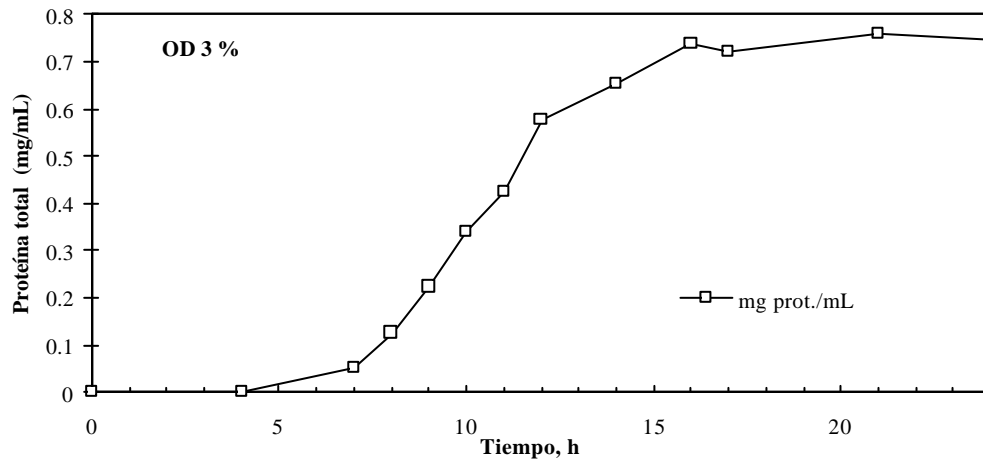
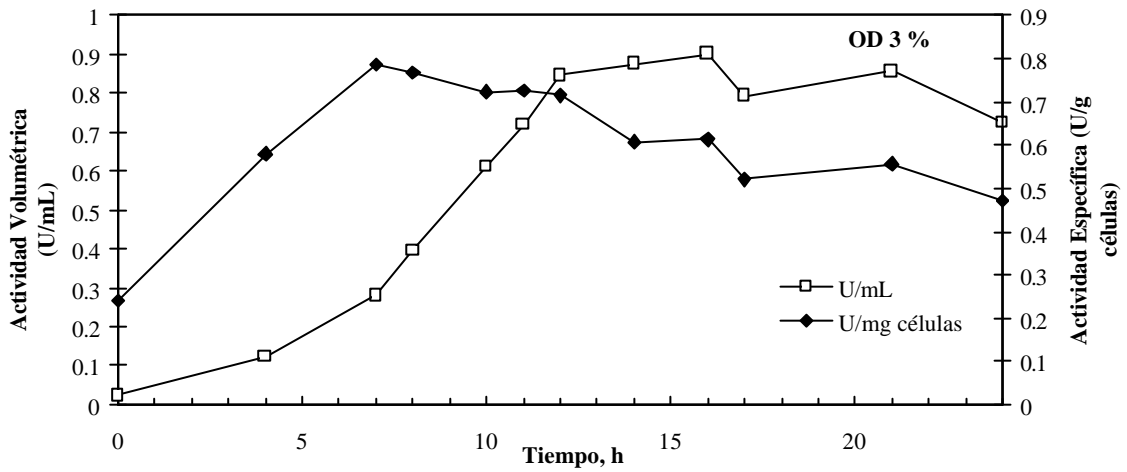
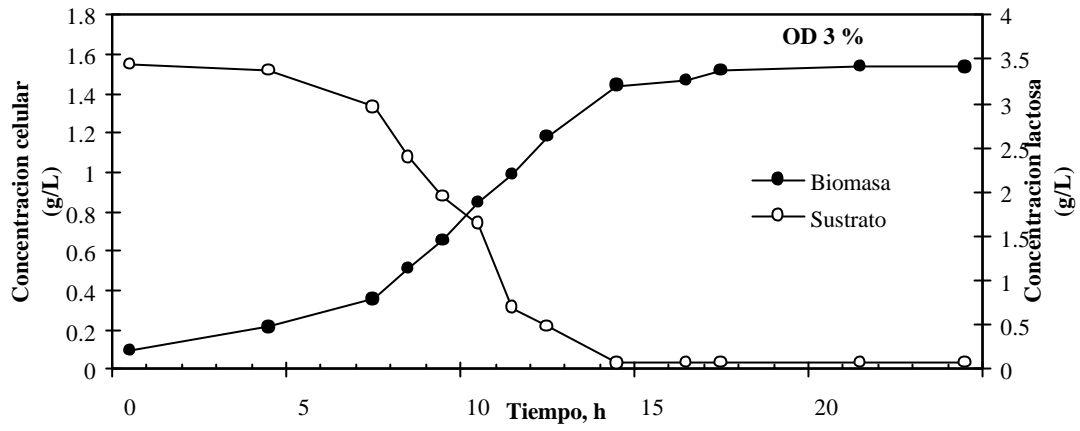


Cultivo 10 g/L SLB y 15 % de TOD

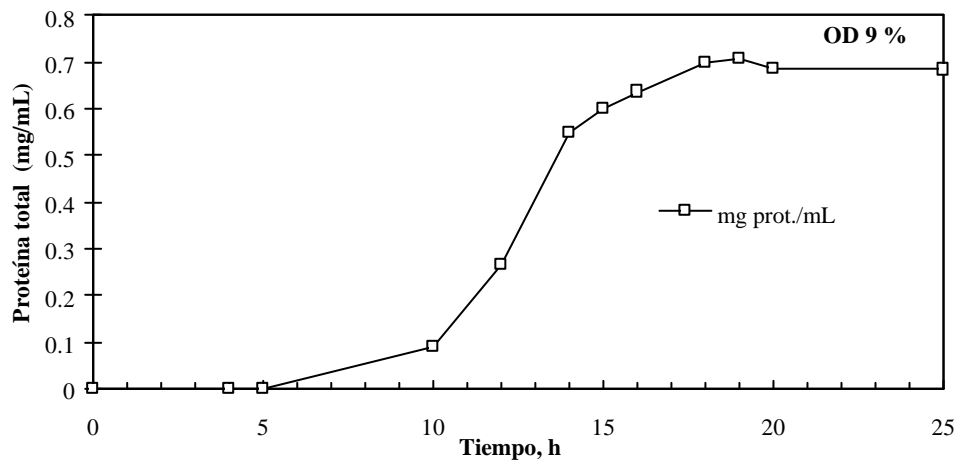
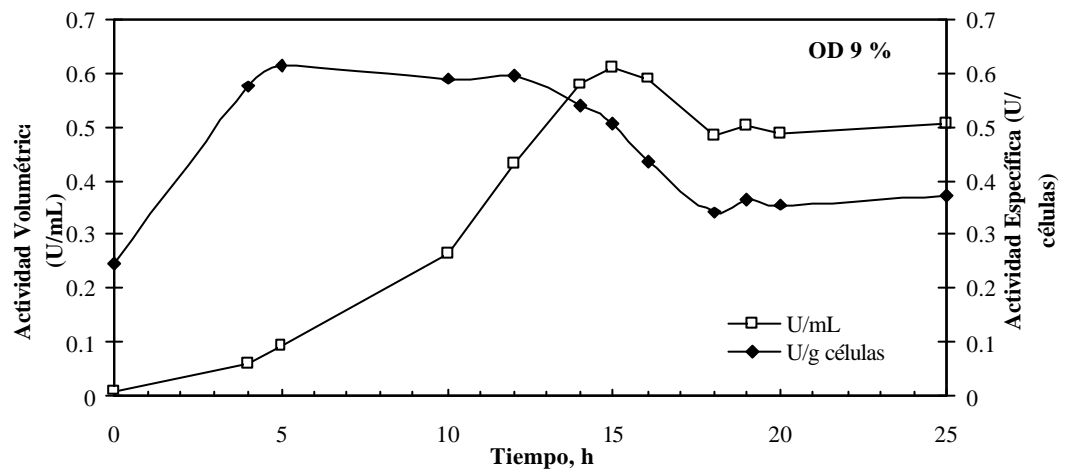
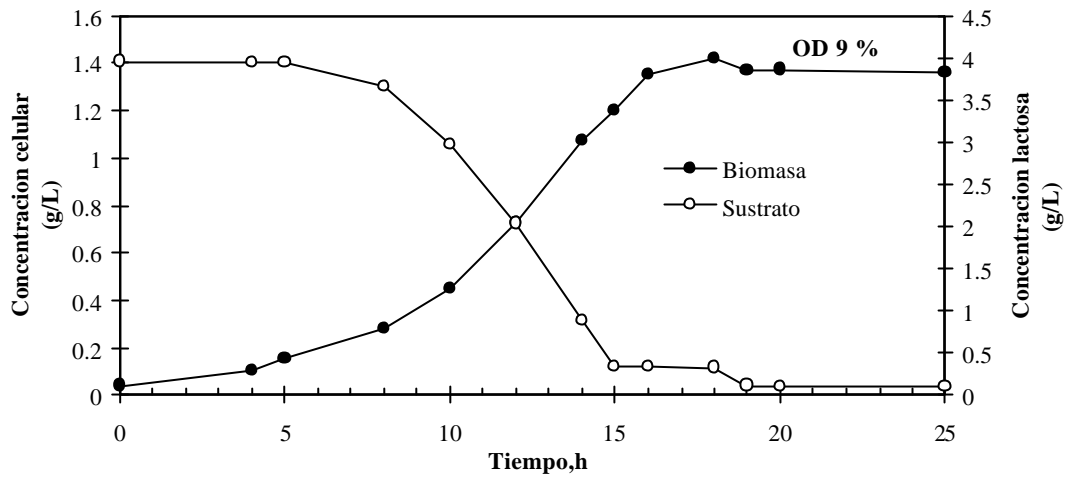


Cultivo 15 g/L SLB y 15 % de TOD

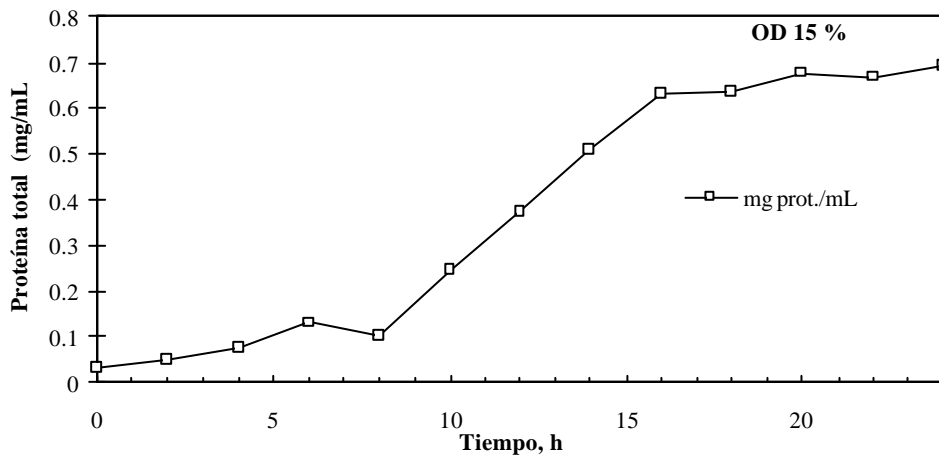
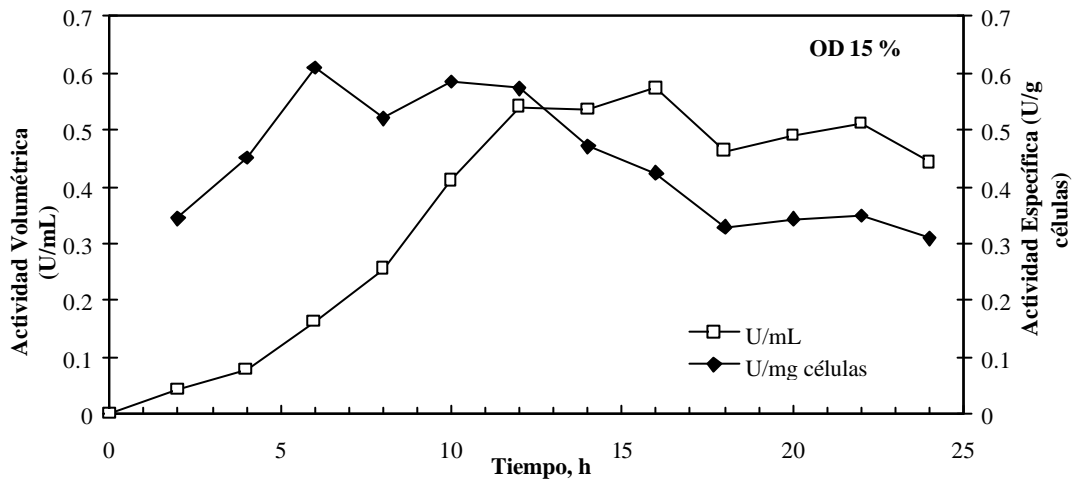
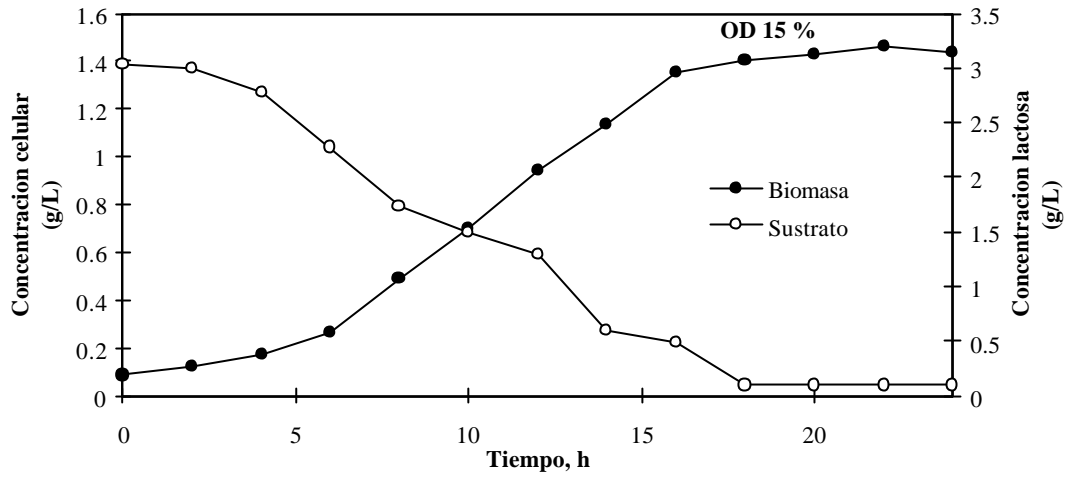
## APÉNDICE D



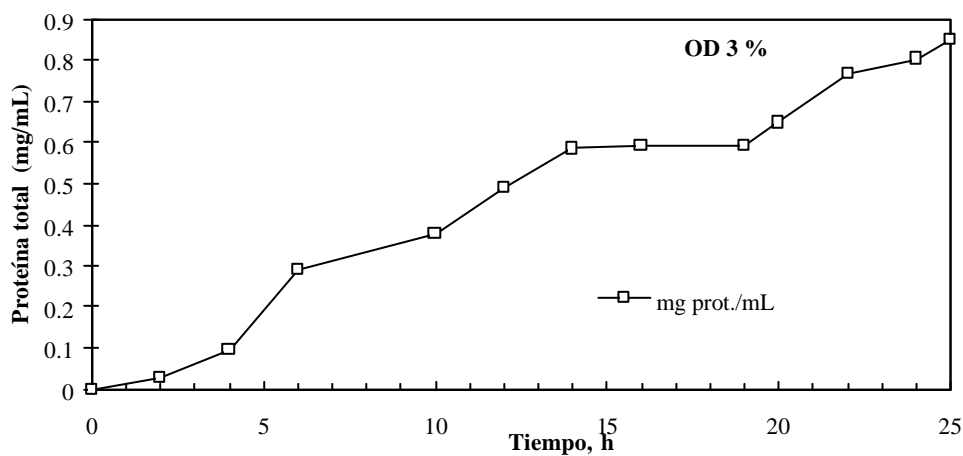
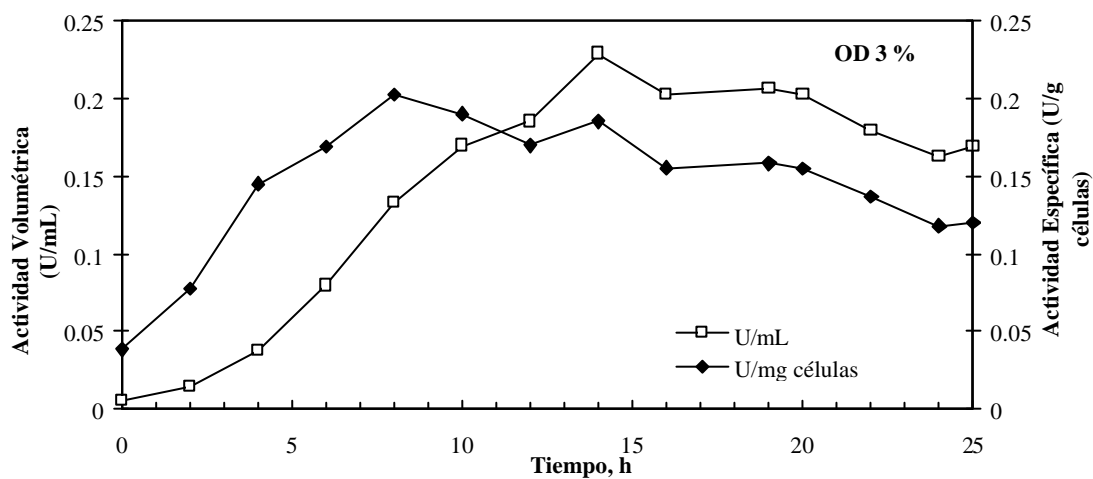
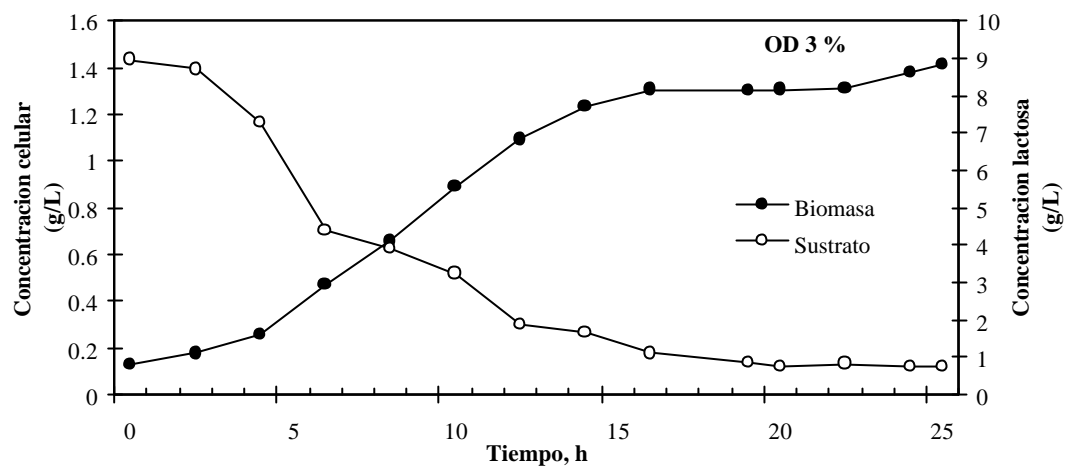
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



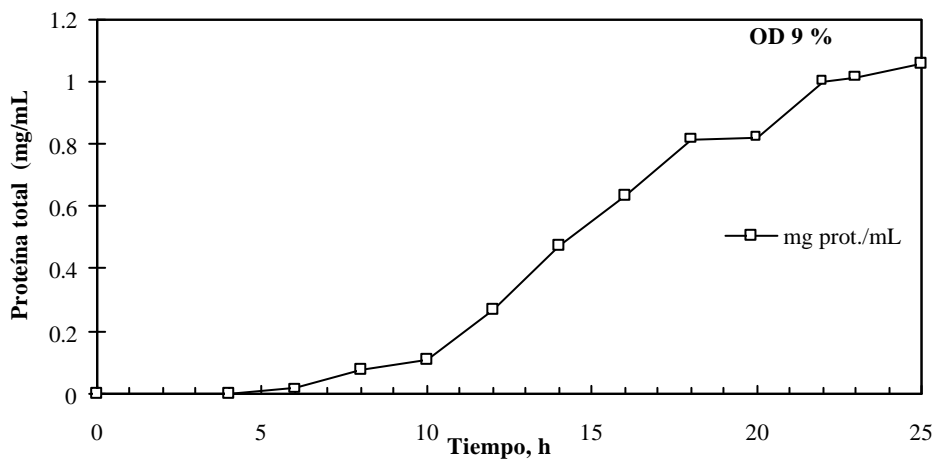
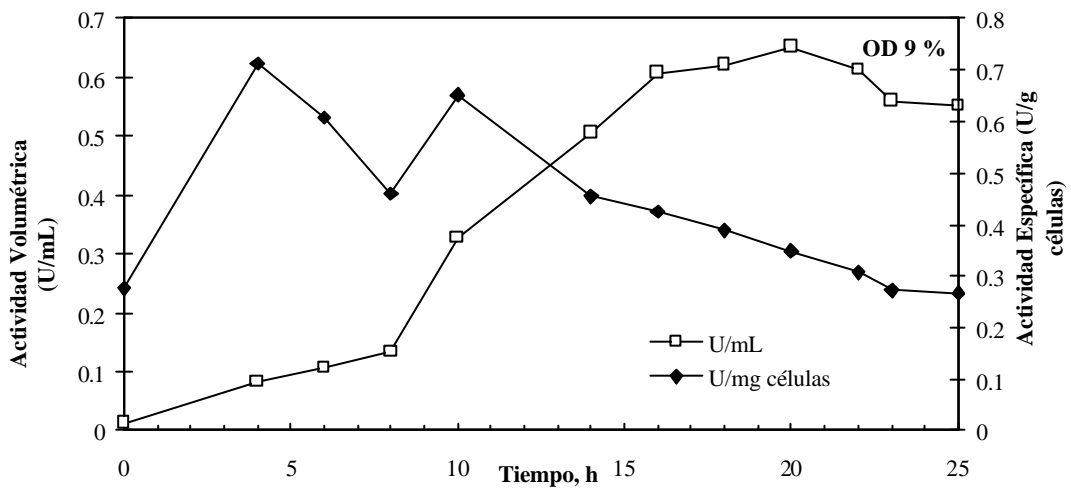
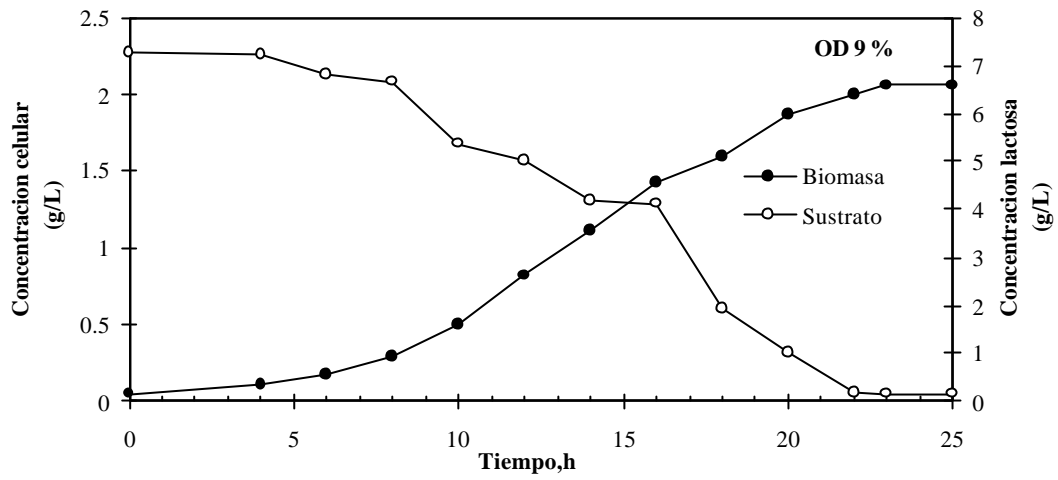
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



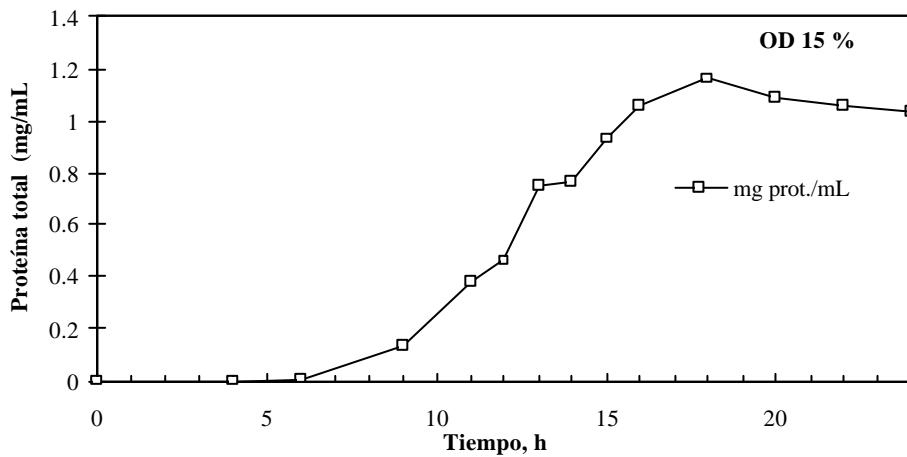
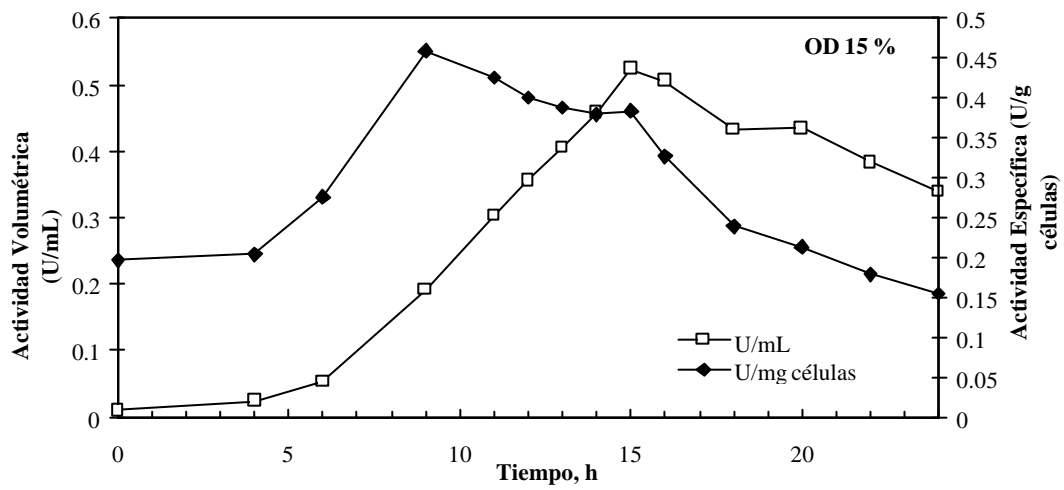
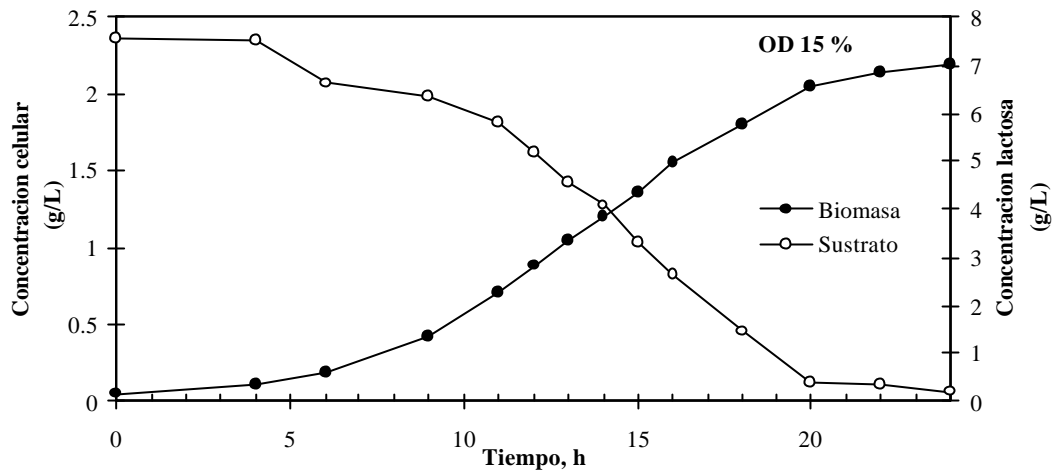
**CULTIVO CON 5 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



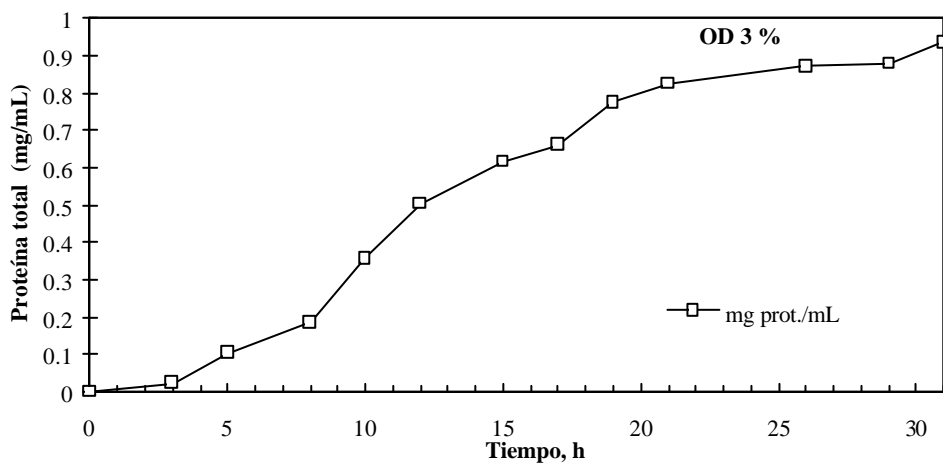
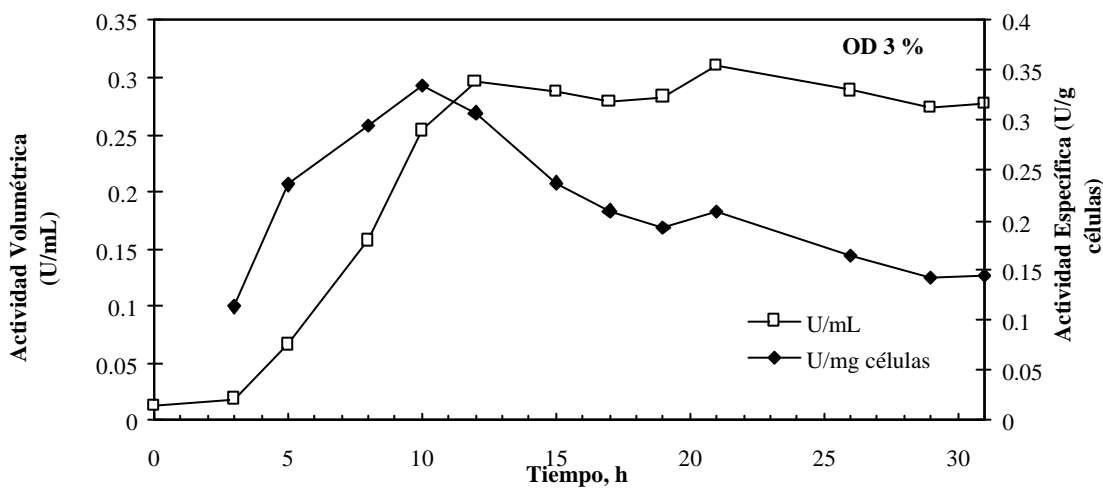
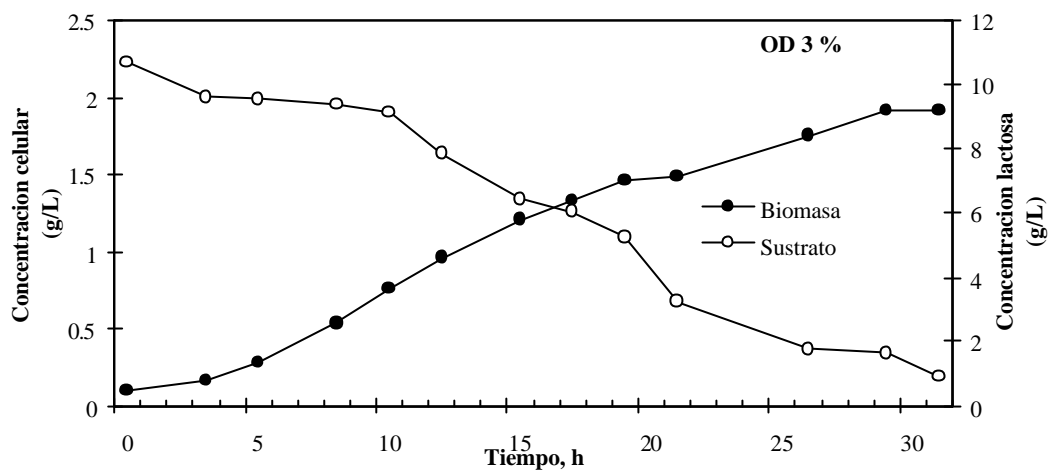
**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**

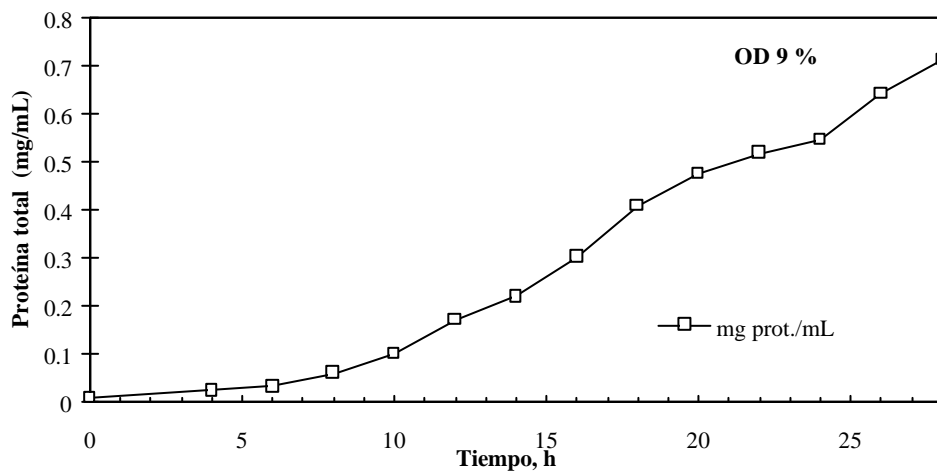
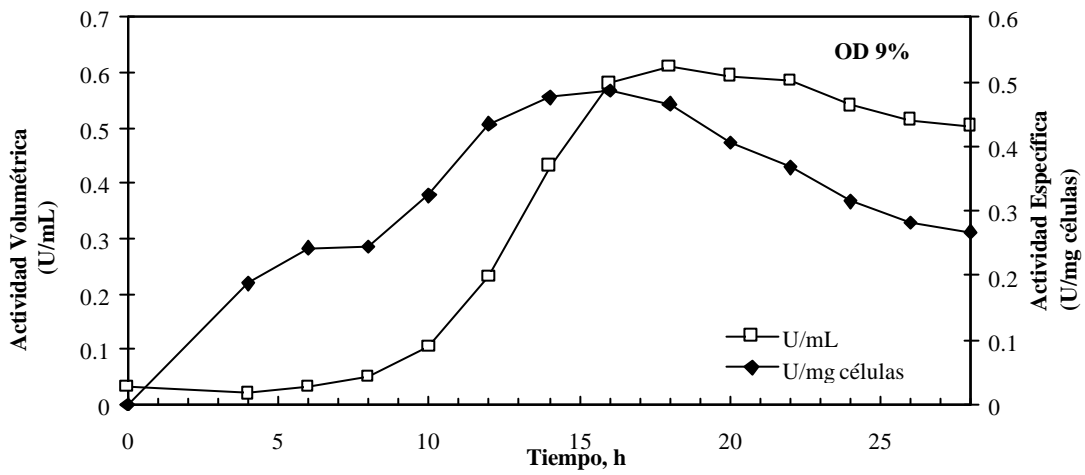
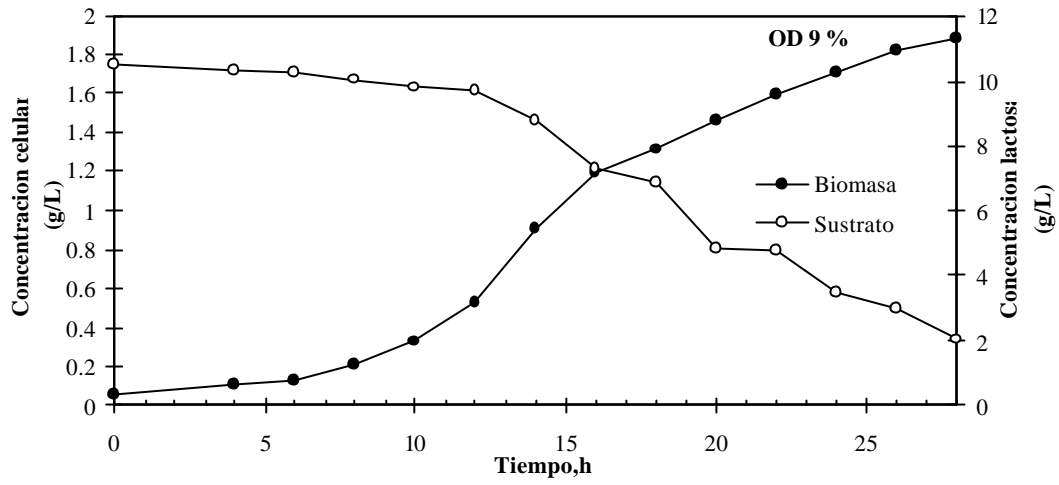


**CULTIVO CON 10 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**

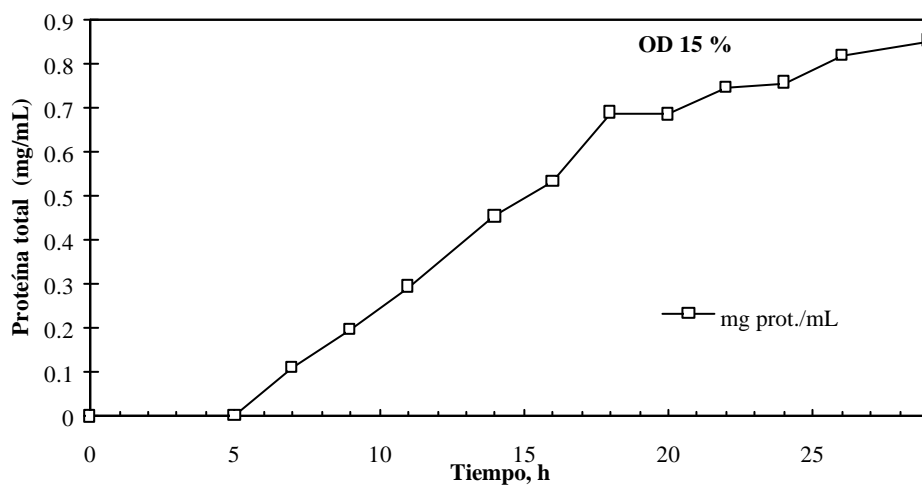
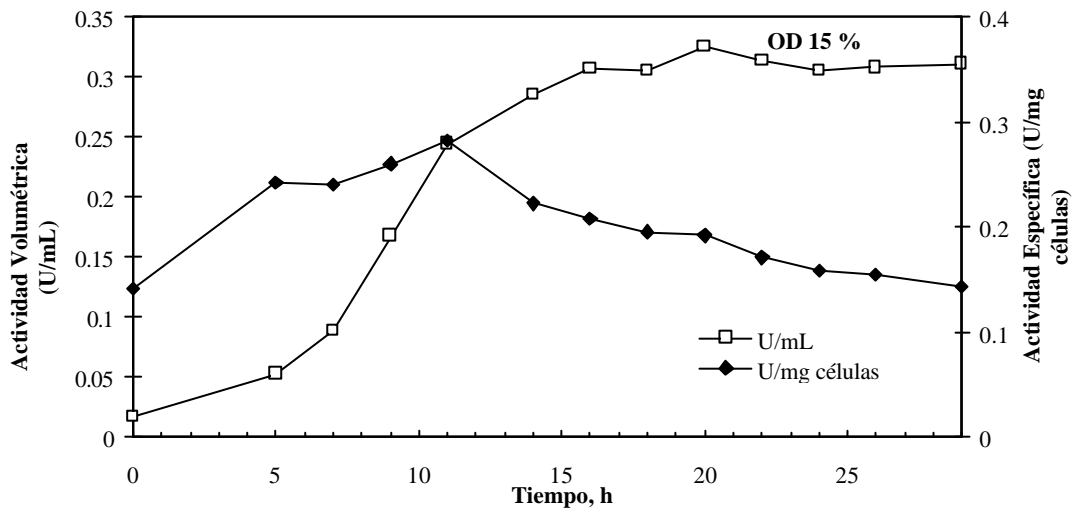
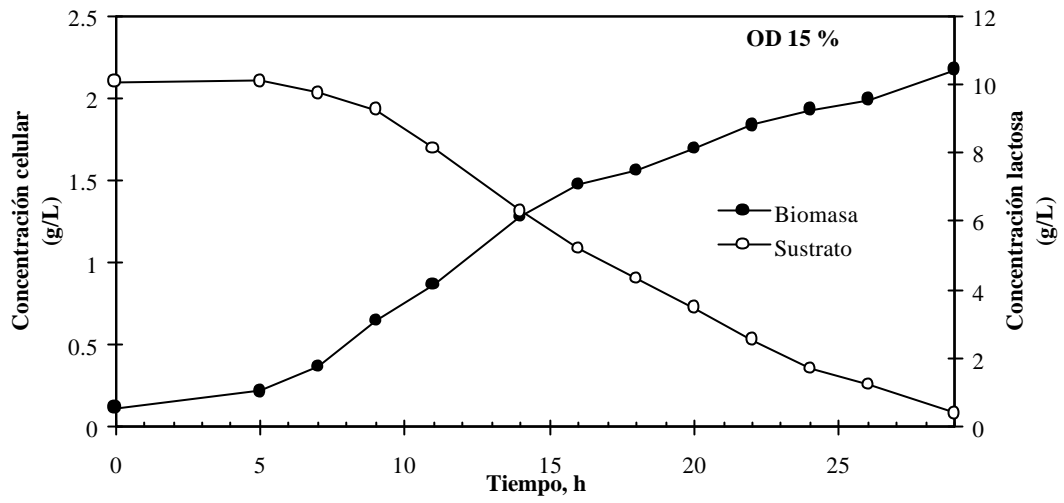


**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 3 % DE OD CONSTANTE**

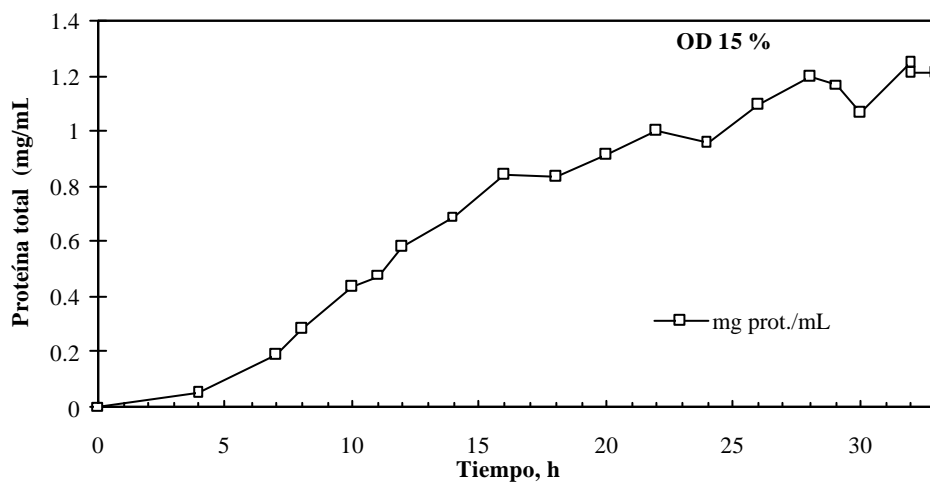
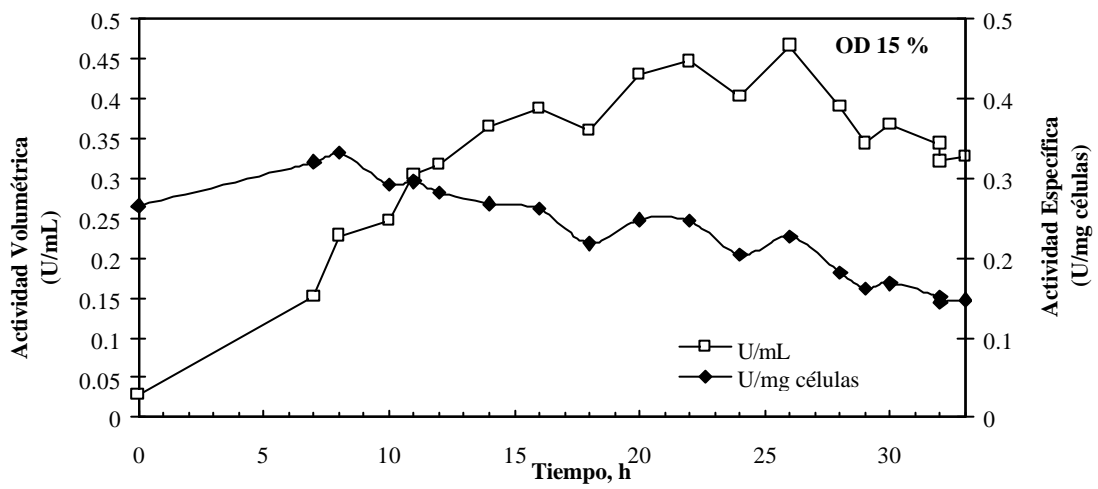
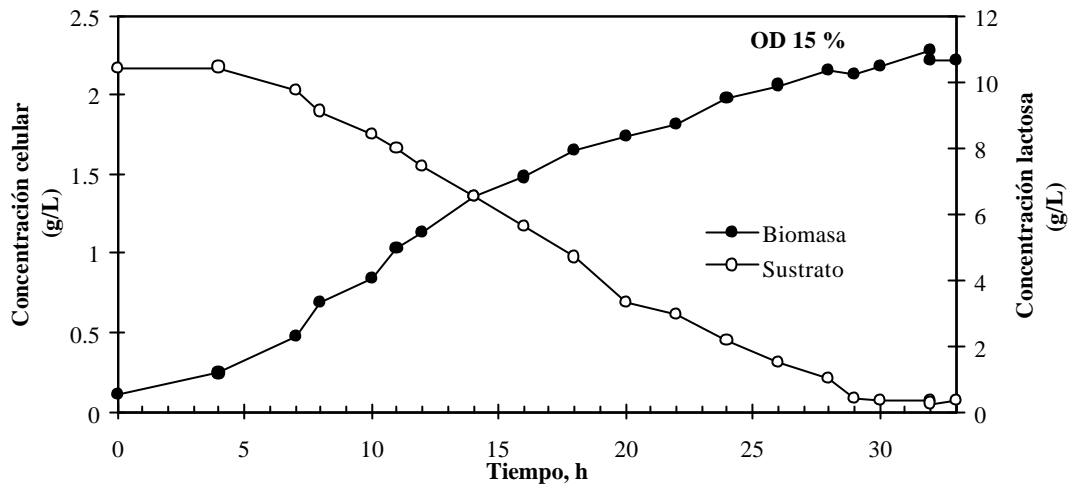




**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 9 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE**



**CULTIVO CON 15 G/L DE SLB INICIAL Y 15 % DE OD CONSTANTE (RÉPLICA)**