UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

“Producción de peroxidasa recombinante de nabo PodC empleando la cepa de *E. coli* Rosetta 2 transformada con el gen *podC* por cultivo en lote y auto-inducción”

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

IBQ. IVANNA KARINA OLIVARES MARIN

ASESOR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SEPTIEMBRE, 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos

Tesis

Producción de peroxidasa recombinante de nabo PodC empleando la cepa de *E. coli* Rosetta 2 transformada con el gen *podC* por cultivo en lote y auto-inducción

Que como requisito para obtener el grado de maestro en ciencias presenta:

IBQ. Ivanna Karina Olivares Marín

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Comité de evaluación:

Dr. Carlos Regalado González
DIRECTOR

Firma

Dra. Blanca Estela García Almendárez
ASESOR

Firma

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
ASESOR

Firma

Dr. Jaime Ortega López
ASESOR

Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
ASESOR

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
Septiembre de 2015

RESUMEN

PodC es una enzima con actividad peroxidasa que puede tener diversas aplicaciones como la remoción de compuestos fenólicos de agua y su empleo en biosensores. No obstante, es necesario mejorar su proceso de producción para permitir que el proceso sea redituable, permitiendo aumentar su disponibilidad. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de PodC bajo dos estrategias de cultivo. Además, se realizó la caracterización cinética de la cepa transformante, encontrando que sus parámetros cinéticos fueron inferiores (μ= 0.51±0.014 h^{-1} y t_d= 1.34±0.037 h) en comparación con los parámetros cinéticos de la cepa parental (μ= 0.62±0.011 h^{-1} y t_d= 1.10±0.020 h). Se eligió el inductor lactosa para su uso en los cultivos en biorreactor debido a que mejoró los parámetros cinéticos (μ= 0.092±0.004 h^{-1} y t_d= 7.50±0.326 h) de la cepa transformante en comparación con los obtenidos usando IPTG (μ= 0.057±0.002 h^{-1} y t_d= 12.16±0.498 h). Las estrategias de cultivo elegidas fueron cultivo por lote, empleado anteriormente para producir a PodC y el cultivo por auto-inducción, propuesto como una de las estrategias idóneas para la producción de proteínas recombinantes en cepas derivadas de *E. coli* BL21. Sin embargo, contrario a lo esperado el cultivo por lote tuvo un mejor desempeño que el cultivo por autoinducción. Lo cual pudo ser causado por el fenómeno de represión catabólica de carbono y a la inhabilidad del medio de cultivo auto-inductor para alcanzar altas densidades celulares. El empleo del cultivo por lote permitió alcanzar un rendimiento final del proceso de 84.84±0.84 mg/mL con una actividad específica de 911.63±8.009 U/mg. El cual fue dos veces mayor al reportado anteriormente (36 mg/mL con actividad específica de 1004 U/mg), si bien, el rendimiento final de PodC empleando cultivo por lote fue de solo del 0.30%, por lo que es necesario mejorar los procesos de solubilización y purificación de la proteína.

Palabras clave: PodC, cultivo por lote, cultivo por auto-inducción

ABSTRACT

PodC is an enzyme with peroxidase activity that can have different applications such as the removal of phenolic compounds from wastewater y its use in biosensors. However, it is necessary to improve its production process to allow it to be profitable y increase their availability. The aim of this study was to evaluate the production of PodC under two growth strategies. In addition, kinetic characterization of the transformant strain was performed, founding that its kinetic parameters (μ= 0.51±0.014 h-1 y td= 1.34±0.037 h) were inferiors compared with those of the parental strain (μ= 0.62±0.011 h^{-1} and t_d= 1.10±0.020 h). The lactose inducer was chosen for cultures in bioreactor due to the capacity of improved kinetic parameters of the transformant strain (μ= 0.092±0.004 h^{-1} and t_d= 7.50±0.326 h) were lower in comparison with those obtained using IPTG (μ= 0.057 ± 0.002 h^{-1} and t_d= 12.16 ± 0.498 h). The culture strategies chosen were batch cultivation, which has been previously used for produce PodC, and the autoinduction strategy, proposed as one of the best strategies for produced recombinant proteins, in strains derived from *E. coli* BL21. Nevertheless, we found that contrary our expectations the batch culture had outperformed the autoinduction culture. Which could be caused by the phenomenon called carbon catabolite repression y the inability of the autoinducer medium to achieve high cell density cultures. The use of batch culture allowed a final process yield of 84.84±0.84 mg/mL with a specific activity of 911.63±8.009 U/mg. Which was twice that reported previously (36 mg/mL with specific activity of 1004 U / mg), although the final yield of PodC was only 0.30%, so it is necessary to improve the processes of solubilization y protein purification.

Keywords: PodC, batch culture, autoinduction culture

Con amor para: mis padres (Gerardo y Griselda), mi pequeñuelo (Axel), mis hermanos (Diego y Gerardín) y mi compañero de aventuras (Beto).

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme hacer lo que más me gusta.

Al Dr. Carlos por aceptarme como su alumna de maestría y permitirme continuar mis estudios de doctorado bajo su asesoría.

A los miembros de mi comité por las observaciones realizadas al presente trabajo, especialmente a la Dra. Blanca y al Dr. Aldo.

A mis compañeros de generación: Mayra, Adri, Francisco, Omar, Ángel y Juan Carlos. En ustedes encontré más que compañeros unos grandes amigos.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Monchis y a Ángel, por hacerme reír tantas veces y apoyarme cuando más lo he necesitado.

A todos los Doctores con los que tuve la suerte de tomar clases, por compartir conmigo un poco de sus conocimientos.

A todos mis compañeros de generación, por hacerme pasar tantos momentos alegres en clases y fuera de ellas, especialmente con aquellos a los que puedo llamar amigos.

A mi familia, que a pesar de todo me ha apoyado siempre.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar la maestría

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO **PÁGINA**

ÍNDICE GENERAL…….. v

RESUMEN i

ABSTRACT ii

DEDICATORIA.....iii

AGRADECIMIENTOS iv

ÍNDICE DE FIGURAS ix

ÍNDICE DE CUADROS xi

1. INTRODUCCIÓN..... 1

1.1 Generalidades de las peroxidasas..... 1

1.2 Estructura general de las peroxidasas Clase III..... 1

1.3 Mecanismo de reacción 3

1.3.1 Ciclo catalítico..... 3

1.3.2 Oxidación del sustrato 3

1.4 Aplicaciones de las peroxidasas en la biotecnología 5

1.5 Peroxidasa de nabo 5

1.6 Producción de peroxidasas de plantas 6

1.6.1 Producción a escala comercial de peroxidasas 7

1.7 Producción de peroxidasas recombinantes 7

1.7.1 Producción de peroxidasa recombinante de nabo (*Brassica napus*) ... 8

1.9 Producción de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante auto-inducción.. 9

2. JUSTIFICACIÓN..... 13

3. HIPÓTESIS 14

4. OBJETIVOS 15

4.1 Objetivo general 15

4.2 Objetivos específicos 15

5. METODOLOGÍA 16

5.1 Material biológico 16

5.2 Medios de cultivo 16

5.2.1 Medios de cultivo ZYM-5052 y MDG 18

5.3 Recuperación de la cepa transformante 18

5.3.1 Extracción de ADN plasmídico 19

5.3.2 Electroforesis de ADN 19

5.3.4 Condiciones de PCR 20

5.4 Generación de conservas de las cepas bacterianas 21

5.5 Ensayos de expresión de la peroxidasa PodC 22

5.5.1 SDS-PAGE 22

5.5.1.1 Tinción de geles de acrilamida con azul brillante de Coomassie.. 23

5.5.1.2 Aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión…. ..... .23

5.5.1.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford 24

5.5.1.5 Concentración de PodC mediante ultrafiltración 25

5.5.1.6 Evaluación de la actividad peroxidasa de PodC 25

5.6 Caracterización cinética de las cepas parental y transformante 26

5.6.1 Preparación del inóculo 26

5.6.2 Cinéticas de crecimiento microbiano 26

5.6.3 Efecto de la inducción de la producción de PodC con IPTG o lactosa… sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante 26

5.6.4 Efecto de la concentración de glucosa y sulfato de magnesio sobre….. los parámetros cinéticos de la cepa transformante 27

5.7 Producción de PodC mediante cultivo en lote y por auto-inducción en…… biorreactor 27

5.7.1 Modelamiento de la fermentación de la cepa transformante 27

5.7.2 Cuantificación de la producción de PodC 29

5.7.3 Producción de PodC en biorreactor mediante cultivo en lote 29

5.7.3.1 Preparación del inóculo 29

5.7.3.2 Condiciones de cultivo por lote 30

5.7.4 Producción de PodC en biorreactor mediante cultivo por…… auto-inducción 30

5.7.4.1 Condiciones de cultivo por auto-inducción 30

5.8 Purificación de PodC mediante cromatografía de afinidad a metal…… inmovilizado (IMAC) 30

5.9 Análisis estadísticos 31

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 32

6.1 Expresión de la peroxidasa recombinante PodC en la cepa *E. coli*…… Rosetta 2 transformada con la construcción pET28b::podC 32

6.1.1 Extracción de ADN plasmídico 32

6.1.2 Detección del gen *podC* en la cepa transformante 33

6.1.3 Ensayos de expresión de PodC con IPTG o lactosa 33

6.2 Caracterización de la cinética de crecimiento de las cepas parental y…….. transformante 37

6.2.1 Curva de crecimiento de las cepas parental y transformante 37

6.2.2 Efecto de la inducción de la expresión de PodC con lactosa o IPTG,…. sobre el crecimiento de la cepa transformante 39

6.2.3 Efecto de las concentraciones de glucosa y sulfato de magnesio…….. sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante 42

6.3 Comparación de la producción de PodC mediante cultivo en lote y por…… auto-inducción en biorreactor 46

6.3.1 Monitoreo de las fermentaciones 46

6.3.2 Rendimientos de la fermentación 48

6.3.3 Proceso de producción de PodC río debajo de la fermentación 50
CONCLUSIONES 53
Bibliografía 54
Anexo 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura general de las peroxidasas Clase III	2
2	Ciclo catalítico genérico de las peroxidasas	4
3	Canal de acceso al sustrato de la HRP	4
4	*Brassica napus* variedad purple top white globe	6
5	Mecanismo de acción de la CCR	10
6	Secuencia del consumo de fuentes de carbono en el medio ZYMZ-5052	11
7	Esquema representativo del programa para PCR	21
8	Electroforesis del ADN plasmídico en gel de agarosa al 1%	32
9	Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%	34
10	SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC con 1 mM de IPTG	35
11	SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC con 2% de lactosa (v/v)	36
12	Curva de crecimiento de las cepas parental y transformante	38
13	Comparación de los parámetros cinéticos μ y *td* de las cepas parental y transformante en medio LB	39

Figura		Página

14	Efecto de la inducción sobre la curva de crecimiento de crecimiento de la cepa transformante	40
15	Comparación de los parámetros cinéticos μ y t_d de la cepa transformante bajo diferentes inductores	41
16	Parámetros cinéticos de la cepa transformada con diferentes concentraciones de glucosa y MgSO4	42
17	Perfil de interacciones de los factores [Glucosa] y [MgSO4]	43
18	Comparación de los parámetros cinéticos de la cepa transformante en medio LB y medio LB suplementado	44
19	SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC en presencia de glucosa 0.5% (p/v) y MgSO4 1mM	45
20	SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC en presencia de glucosa 0.05% (p/v) y $MgSO_4$ 1mM	45
21	Monitoreo de OD, pH, DO y T durante la fermentación	47
22	Parámetros cinéticos de los cultivos por lote y auto-inducción	47
23	Rendimientos de la fermentación	48
24	q_p y Q_s de los cultivos en biorreactor	49
25	SDS-PAGE del proceso de solubilización de la PodC	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cepas bacterianas empleadas	16
2	Composición de la solución de metales traza (1000X)	17
3	Composición por litro de los medios de cultivo empleados	18
4	Composición de la reacción para PCR	20
5	Composición de las soluciones para obtener geles de acrilamida 10% de T	23
6	Parámetros cinéticos de las cepas parental y transformante en medio LB	38
7	Parámetros cinéticos de las cepa transformante bajo diferentes inductores	41
8	Evaluación de los efectos sobre las variables respuesta del diseño experimental	42
9	Concentración de proteína a lo largo del proceso de producción	50
10	Actividad peroxidasa de PodC (U/mg)	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas ubicuas entre todas las formas de vida (Furtmüller *et al*., 2006), las cuales pueden ser clasificadas en dos superfamilias, la peroxidasa-ciclooxigenasa y la peroxidasa-catalasa (distribuías particularmente entre bacterias, hongos y plantas) (Passardi *et al*., 2007; González-Rábade *et al*., 2012). A su vez, la última se divide en tres familias: la Clase I (principalmente enzimas con bifuncionalidad catalasa-peroxidasa), la Clase II (enzimas involucradas en el reciclaje de carbono mediante la degradación de lignina) y la Clase III (peroxidasas secretadas por algas y plantas en forma de metabolito secundario) (Zámocký y Obinger, 2010).

Dentro de la última clase, se encuentra la peroxidasa de rábano picante (HRP), una de las peroxidasas más estudiadas junto con la Citocromo c peroxidasa. Ambas jugaron un papel clave para el desarrollo de la bioquímica estructural y mecánica, permitiendo la elucidación del mecanismo de reacción y de la estructura general de este grupo enzimático con diferentes aplicaciones en biocatálisis (Groves y Boaz, 2014).

1.2 Estructura general de las peroxidasas Clase III

Una de las características estructurales de la HRP (Fig. 1-A) y peroxidasas similares a esta, es que poseen un grupo hemo como cofactor ya que no se encuentra unido de forma covalente a la proteína, particularmente ferroprotoporfirina IX (Fig. 1-B), en el cual se encuentran unidos cuatro nitrógenos pirrólicos al Fe (III) (Poulos, 2014). La quinta posición coordinada en el lado proximal del grupo hemo es la cadena de imidazol de un residuo de histidina, mientras que la sexta posición coordinada del lado distal del grupo hemo se encuentra vacante en la enzima nativa (O'Brien, 2000). Además contienen un sitio de unión H-His, dos sitios de unión a Ca^{2+}, cuatro puentes disulfuro, un péptido señal N-terminal para su excreción y α-hélices extra involucradas en el acceso al grupo hemo (Passardi *et al*., 2004; Regalado *et al*., 2004).

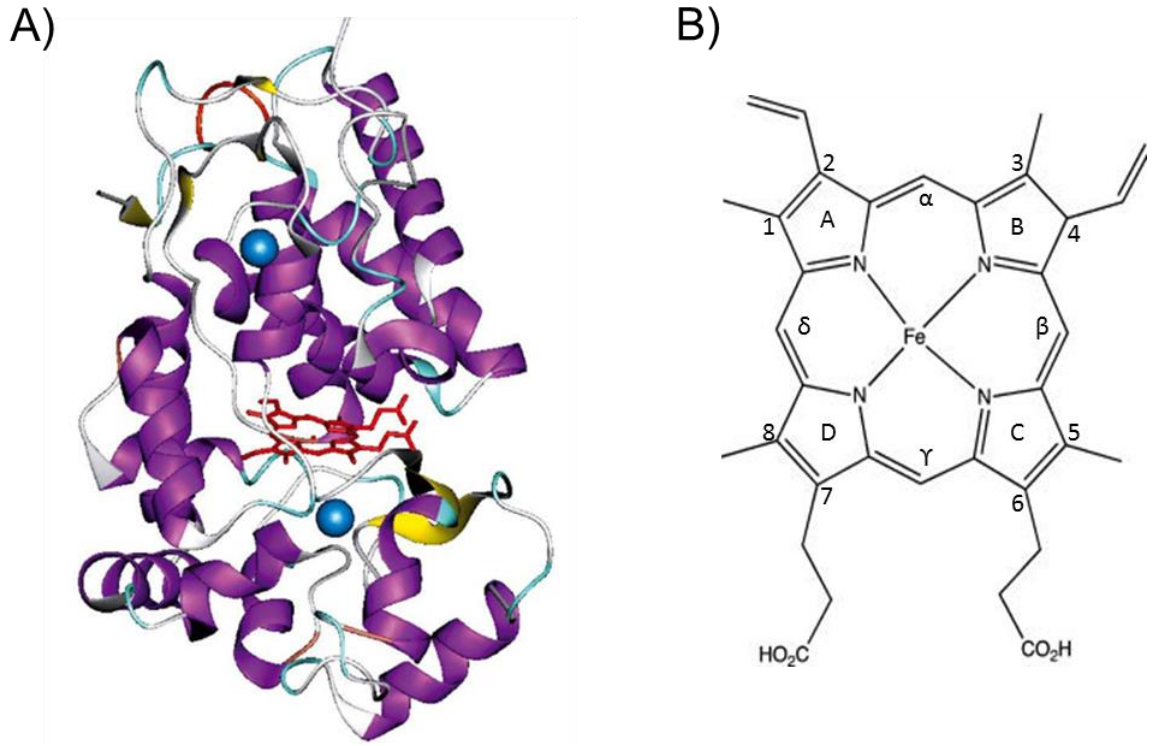


Figura 1. Estructura general de las peroxidasas Clase III. A) Estructura tridimensional de la HRP. El grupo hemo (rojo) ocupa la posición central entre los dominios distal (arriba del grupo hemo) y proximal (debajo del grupo hemo) de la molécula. Ambos dominios cuentan con un átomo de calcio (esferas azules). Las α–hélices se muestran en amarillo, mientras que las láminas-β se encuentran en morado (Tomado de(Veitch, 2004). **B)** Estructura de la ferroprotoporfirina IX. Se observan los cuatros nitrógenos pirrólicos unidos al Fe (III) (Tomado de Poulos, 2014)

Además, cuenta con diferentes sitios de glucosilación que varían de una enzima a otra. Por ejemplo, la peroxidasa catiónica de cacahuate (cPC) tiene tres sitios de N-glucosilación: Asn-60, Asn-166 y Asn-185 (van Huystee *et al*., 2002), mientras que la HRP cuenta con ocho sitios (Asad *et al*., 2011). La fracción glucosilada de las peroxidasas puede llegar a contribuir con el 26% del peso molecular de la enzima (Duarte-Vázquez *et al*., 2001) y los carbohidratos involucrados son N-acetilglucosamina, manosa, fucosa, galactosa y xilosa (van Huystee *et al*., 2004). Sin embargo, se han llegado a acumular peroxidasas recombinantes sin glucosilaciones que pueden mostrar actividad catalítica gracias al plegamiento *in vitro* agregando iones calcio y el grupo hemo (Rodríguez-Cabrera *et al*., 2011; Pliego-Arreaga *et al*., 2013), permitiendo que su mecanismo de reacción se lleve a cabo.

1.3 Mecanismo de reacción

1.3.1 Ciclo catalítico

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, principalmente compuestos fenólicos, precursores de lignina y auxinas, empleando peróxidos, usualmente H_2O_2, como co-sustrato (Passardi *et al*., 2005). El primer paso en el ciclo catalítico genérico de las peroxidasas (Fig. 2) usualmente es la unión del peróxido al átomo de hierro del grupo hemo para producir un intermediario hidroxiperóxido férrico [Fe(III)-OOH] llamado Compuesto 0 causando la desprotonación del peróxido. Posteriormente el protón proveniente del peróxido es entregado por el imidazol al oxígeno terminal del compuesto [Fe(III)-OOH] catalizando la escisión del enlace O-O, produciendo así el Compuesto I [Fe(IV)=O]$^{\bullet}$. A continuación, la reducción de un electrón del Compuesto I da lugar al Compuesto II [Fe(IV)=O], donde el hierro aún se encuentra presente, sin embargo, el radical porfirina fue inactivado. Finalmente se designa como Compuesto III a una molécula de oxígeno que se une al ion ferroso de la peroxidasa [Fe(III)-O-O]. No obstante, este compuesto generalmente solo se forma cuando hay un exceso de H_2O_2 en el medio, provocando la inactivación de la enzima (Passardi *et al*., 2007; Ortiz de Montellano, 2010).

1.3.2 Oxidación del sustrato

En la reacción catalizada por las peroxidasas la oxidación de los sustratos se lleva a cabo mediante la transferencia de electrones al borde expuesto del grupo hemo sin interactuar directamente con el oxígeno ferrilo, ya que el grupo hemo se encuentra embebido en una hendidura de la proteína donde únicamente el borde *δ-meso* del grupo hemo se encuentra expuesto al medio (Fig 3) (Gajhede *et al*., 1997). Por lo que la trayectoria de la reacción se opone a la transferencia del oxígeno ferrilo, distinguiendo a las peroxidasas de las monooxigenasas (Ortiz de Montellano, 2010). A continuación se muestra las reacciones entre el sustrato y los Compuestos I y II.

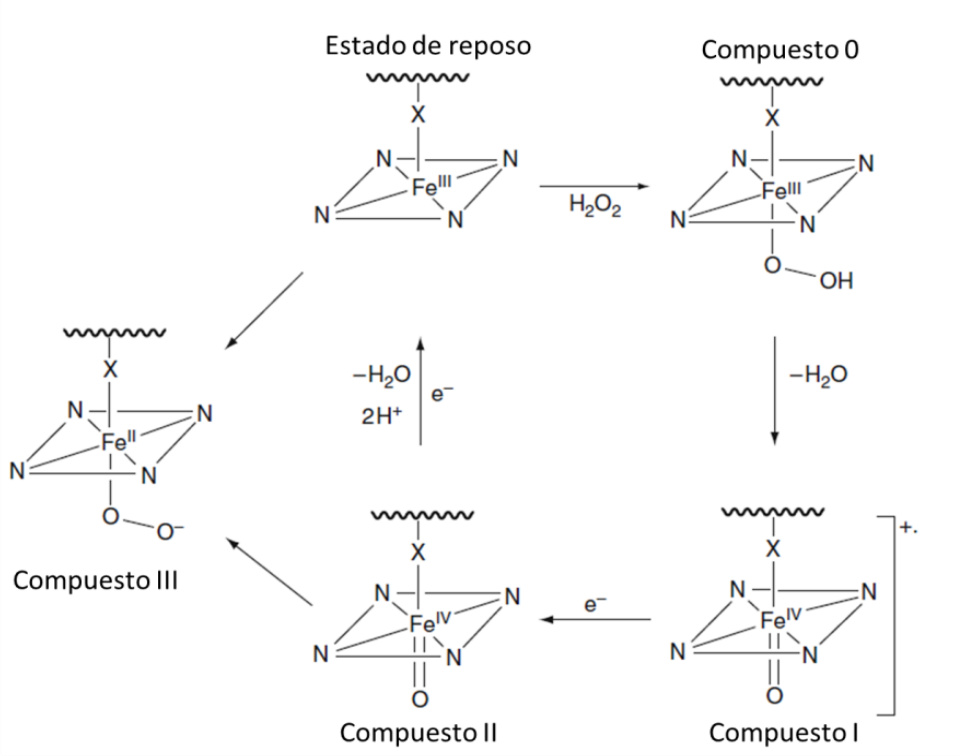


Figura 2. Ciclo catalítico genérico de las peroxidasas. El cuadrado de los cuatro nitrógenos alrededor del átomo de hierro es la representación del grupo prostético hemo de la peroxidasa (Modificado de Ortiz de Montellano, 2010).

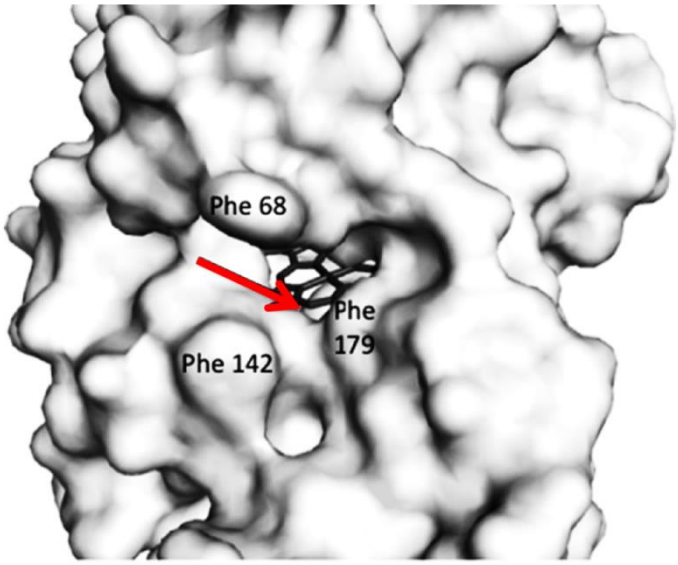


Figura 3. Canal de acceso al sustrato de la HRP. Los residuos aromáticos Phe 68, Phe 179 y Phe 142 flanquean el canal de entrada al sustrato. La flecha apunta al átomo de carbono δ-meso (Ortiz de Montellano, 2010).

$$Fe^{4+}{=}O\,\dot{R}^{+} + SH \longrightarrow Fe^{4+}{=}\dot{O}\,R + S \qquad (1)$$

$$Fe^{4+}{=}O\,R + SH \longrightarrow Fe^{3+}\,\dot{R} + S + H_2O \qquad (2)$$

En la primera reacción una molécula de sustrato entrega un electrón al Compuesto I, lo que reduce al radical *π* catiónico de la porfirina (R), dando como resultado el Compuesto II. Durante la segunda reacción otra molécula de sustrato reducirá al Fe^{4+} a Fe^{3+}, terminando así el ciclo catalítico (Poulos, 2014).

1.4 Aplicaciones de las peroxidasas en la biotecnología

Debido a que los principales sustratos de las peroxidasas son los compuestos fenólicos y aminas aromáticas algunas de las aplicaciones biotecnológicas que tienen son: la remoción de contaminantes fenólicos, la decoloración de tintes sintéticos (Diao *et al*., 2011; Celebi *et al*., 2013), síntesis de polímeros orgánicos (Rodríguez-Cabrera *et al*., 2011), kits de diagnóstico y análisis e inmunoensayos enzimáticos (Vdovenko *et al*., 2013) y los biosensores (Regalado *et al*., 2004; Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009). Siendo los últimos una de las aplicaciones directas de las peroxidasas en la industria alimentaria (Reyes de Corcuera y Cavalieri, 2003) .

1.5 Peroxidasa de nabo

El nabo (*Brassica napus*, basónimo de *Brassica rapa*) conocido también como *Brassica rapa* (Motamed *et al*., 2009) es una planta de la familia de las Brassicaceae, a la cual pertenecen numerosas especies cultivadas como hortalizas y condimentos para el consumo humano y como fuentes de aceites vegetales (Al-Shehbaz y Fuentes-Soriano, 2012)

Dentro del género *Brassica* se encuentran hierbas anuales, bianuales o perennes, algunas especies pueden contar con raíces carnosas, como la *Brassica napus* var. napobrassica y la *Brassica napus* var. purple top white globe (Fig. 4), siendo el último un nabo de pulpa blanca.

Actualmente el nabo es uno de los vegetales alternativos para la producción a escala industrial de peroxidasas, debido a que algunas de las isoformas de su peroxidasa muestran mejor termoestabilidad y actividad que la peroxidasa de rábano picante (Pliego-Arreaga *et al*., 2013) lo cual las hace atractivas para algunas aplicaciones como la remoción de compuestos fenólicos del agua (Duarte-Vázquez *et al*., 2003; Quintanilla-Guerrero *et al*., 2008), el uso en pruebas de diagnóstico y biosensores (Azevedo *et al*., 2003).

Figura 4. *Brassica napus* variedad purple top white globe. Variedad de nabo, caracterizada por tener un bulbo blanco con una coloración morada en la unión del bulbo a las hojas.

1.6 Producción de peroxidasas de plantas

Los extractos enzimáticos a partir de plantas han sido utilizados por un largo periodo, incluso antes de conocer la naturaleza de las enzimas y sus propiedades. La gran mayoría de las enzimas comerciales se han producido a partir de microorganismos. No obstante, las peroxidasas de plantas han incrementado su importancia debido a la gran cantidad de aplicaciones industriales en las cuales pueden ser utilizadas (Regalado *et al*., 2004)

Debido a que las peroxidasas pueden tener un elevado costo, especialmente si se requieren con un alto grado de pureza, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para desarrollar productos que sean estructural y funcionalmente homogéneos.

Algunas de las estrategias que se están siguiendo para dicho propósito son: el cultivo de tejidos (callos, raíces) y el uso de peroxidasas recombinantes de microorganismos y células de insecto genéticamente modificados (González-Rábade *et al*., 2012). Estas estrategias podrían hacer más viable el uso de las peroxidasas a nivel industrial ya que es posible utilizar biorreactores para obtener una actividad enzimática total alta debido al aumento en la productividad volumétrica de los cultivos.

1.6.1 Producción a escala comercial de peroxidasas

Tradicionalmente las peroxidasas fueron producidas a partir de las raíces de algunas plantas, como el rábano picante. No obstante, actualmente no es posible asignar grandes extensiones de tierra cultivable con el único propósito de obtener enzimas.

Debido a lo anterior, se han implementado nuevas estrategias como el cultivo de tejidos vegetales como las raíces y los callos, pudiendo ser modificados genéticamente (Agostini *et al*., 1997; González-Rábade *et al*., 2012; Shkryl *et al*., 2013). Sin embargo, existen problemas asociados al cultivo de tejidos vegetales como lo son la variabilidad e inestabilidad (Doran, 2002), por lo que el uso de peroxidasas recombinantes expresadas en microorganismos es una alternativa viable (Rodríguez-Cabrera *et al*., 2011; Pliego-Arreaga *et al*., 2013; Krainer *et al*., 2014; Krainer y Glieder, 2015).

1.7 Producción de peroxidasas recombinantes

Para la producción de proteínas recombinantes es necesario contar con un sistema de expresión adecuado, vectores de expresión, un sistema de inducción y el gen o fragmento del gen a expresar. Además es necesario tomar en cuenta varios factores como las características de crecimiento celular, los niveles de

expresión, si la proteína sufre modificaciones postraduccionales, la actividad biológica de la proteína y las regulaciones en el uso de organismos modificados genéticamente.

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes, ya que comparado con otros vectores de expresión cuenta con ventajas como la facilidad de manejo, la capacidad para desarrollarse en fuentes de carbono económicas, el escalamiento del proceso es sencillo y pueden llevarse a cabo procesos de fermentación de alta densidad.

No obstante, es conocido que *E. coli* tiene ciertas desventajas como la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales encontradas en las proteínas de origen eucarionte. Además de que en muchas ocasiones no es posible la producción de proteínas solubles.

Por otro lado, es conocido que la expresión de proteínas recombinantes puede resultar en la formación de agregados insolubles de la proteína, los cuales son conocidos como cuerpos de inclusión (Kopito, 2000). Esto es deseable en la producción de proteínas recombinantes ya que facilitan la purificación de las proteínas heterólogas.

Algunos de los microorganismos utilizados actualmente para la producción de peroxidasas recombinantes son: la levadura *Pichia pastoris* para la producción de la peroxidasa HRP (Krainer y Glieder, 2015) y la bacteria *E. coli* (Rodríguez-Cabrera *et al*., 2011; Pliego-Arreaga *et al*., 2013) para la producción de peroxidasa de nabo.

1.7.1 Producción de peroxidasa recombinante de nabo (*Brassica napus*)

Actualmente, *E. coli* es el microorganismo utilizado para producir la peroxidasa recombinante de nabo PodC. No obstante, para poder insertar su gen en la bacteria primero fue necesario obtener el cDNA de esta isoperoxidasa a partir de tejidos del nabo (Romero-Gómez *et al*., 2008)

El cDNA contiene un marco de lectura abierto de 1077 pares de bases (pb) y codifica para una peroxidasa de 358 aminoácidos. Una vez que se obtuvo el cDNA se eligió la cepa de *E. coli* Rosetta 2 para realizar la clonación. Dicha cepa fue transformada con la construcción pET28-BnPa, lo cual resultó en la expresión de la peroxidasa de nabo BnPa en forma de cuerpos de inclusión.

Recientemente se expresó la isoforma de peroxidasa de nabo PodC en la cepa *E. coli* Rosetta 2 transformada con la construcción pET28b::podC, lo cual permitió producir la peroxidasa de nabo recombinante a nivel fermentador mediante una inducción con lactosa mediante cultivo por lote. Posteriormente la proteína se replegó en condiciones oxidativas y se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales, obteniendo un rendimiento de 36 mg L^{-1} (Pliego-Arreaga *et al*., 2013).

1.9 Producción de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante auto-inducción

Uno de los requisitos para que un proceso de producción de proteínas recombinantes tenga factibilidad económica es el obtener densidades celulares altas que permitan mejorar la productividad volumétricas (Shiloach y Fass, 2005), por lo que se han desarrollado diferentes estrategias de cultivo, entre la que se encuentra la producción mediante auto-inducción.

La estrategia de cultivo por auto-inducción fue propuesta por Studier en 2005 y se fundamenta en la capacidad de ciertos componentes de los medios de cultivo para inducir la producción de proteínas recombinantes en cepas de *E. coli* que contengan el promotor *lac*T7.

Esto se debe al estado metabólico celular, causado principalmente por el mecanismo de represión catabólica, el cual es un fenómeno regulatorio donde en presencia de una fuente de carbono preferente la expresión de genes para el catabolismo de fuentes de carbono secundarias y actividad de las enzimas correspondientes se inhiben (Studier, 2005; Ukkonen *et al*., 2013; Mayer *et al*., 2014).

El mecanismo por el cual actúa la CCR (Fig. 6) involucra el dominio $EIIA^{Glc}$ del transportador de glucosa (EII^{Glc}), dicho dominio es la unidad procesadora principal de la CCR (Borirak *et al*., 2014; Kremling *et al*., 2015). En ausencia de glucosa, $EIIA^{Glc}$ se encuentra fosforilado, lo que le permite unirse a la adenilato ciclasa (AC), lo que lleva a la síntesis de AMP cíclico (cAMP). Adicionalmente, un factor desconocido llamado "Factor x" también se requiere para la activación de AC. La síntesis de altas concentraciones de cAMP desencadena la formación de complejos cAMP-Receptor de AMP cíclico (CRP), estos complejos se unen a los promotores de genes involucrados en el catabolismo de fuentes de carbono alternas a la glucosa, permitiendo su activación.

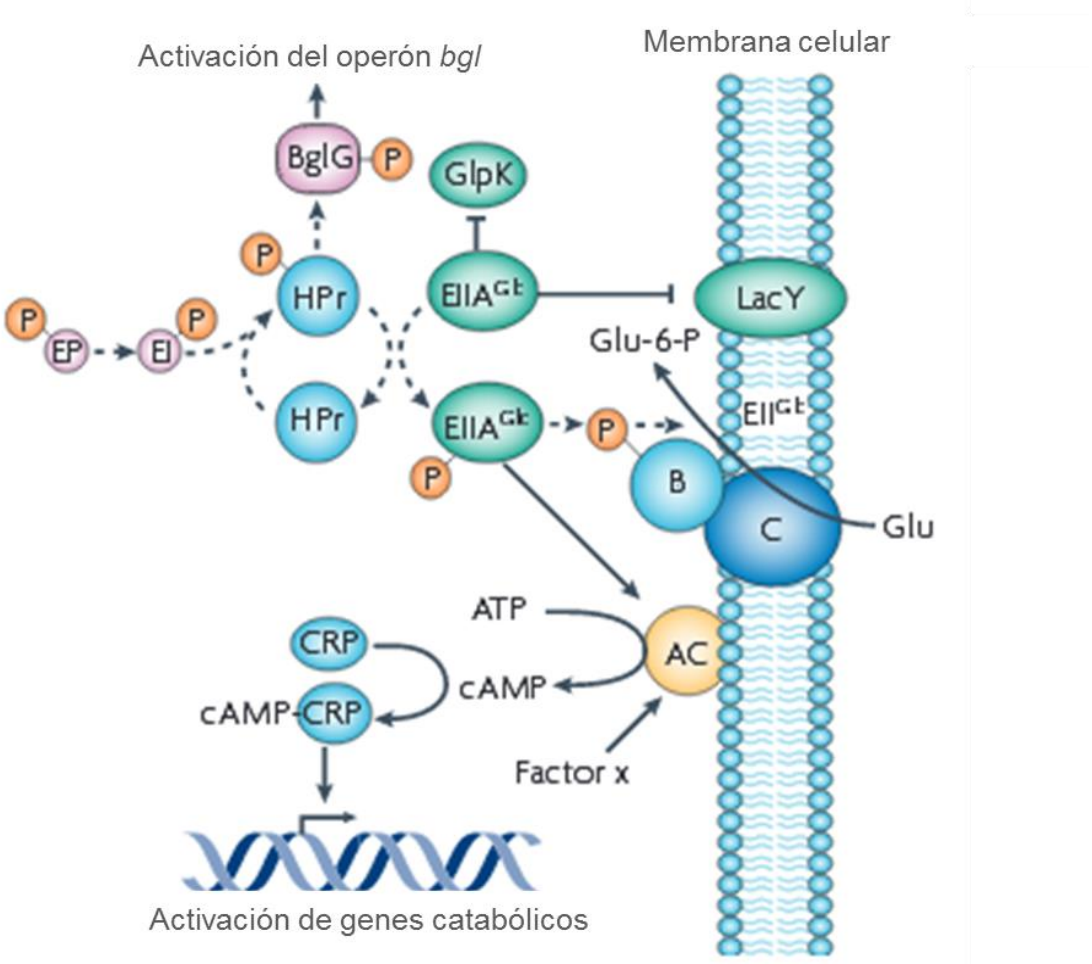


Figura 5. Mecanismo de acción de la CCR. La activación de los genes catabólicos para fuentes de carbono alterna depende del estado de fosforilación de $EIIA^{Glc}$, el cual es dependiente de la relación intracelular fosfoenolpiruvato-piruvato. El cual decrece cuando hay flujos glucolíticos altos (Adaptado de Görke y Stülke, 2008).

Por otro lado, en presencia de glucosa, $EIIA^{Glc}$ se encuentra desfosforilado lo que le impide activar a la AC. En este caso, $EIIA^{Glc}$ se une e inactiva enzimas metabólicas y transportadores de fuentes de carbono secundarias, como la glicerol cinasa (Glpk) y la lactosa permeasa (LacY). Además la proteína histidinada (HPr) contribuye a la CCR mediante la fosforilación del antiterminador transcripcional que controla la expresión del operón *bgl* (BglG) encargado de la expresión de genes que permiten el empleo de β-glucósidos, por lo que en presencia de glucosa el operón *bgl* no se expresa (Deutscher, 2008; Görke y Stülke, 2008; Kremling *et al*., 2015).

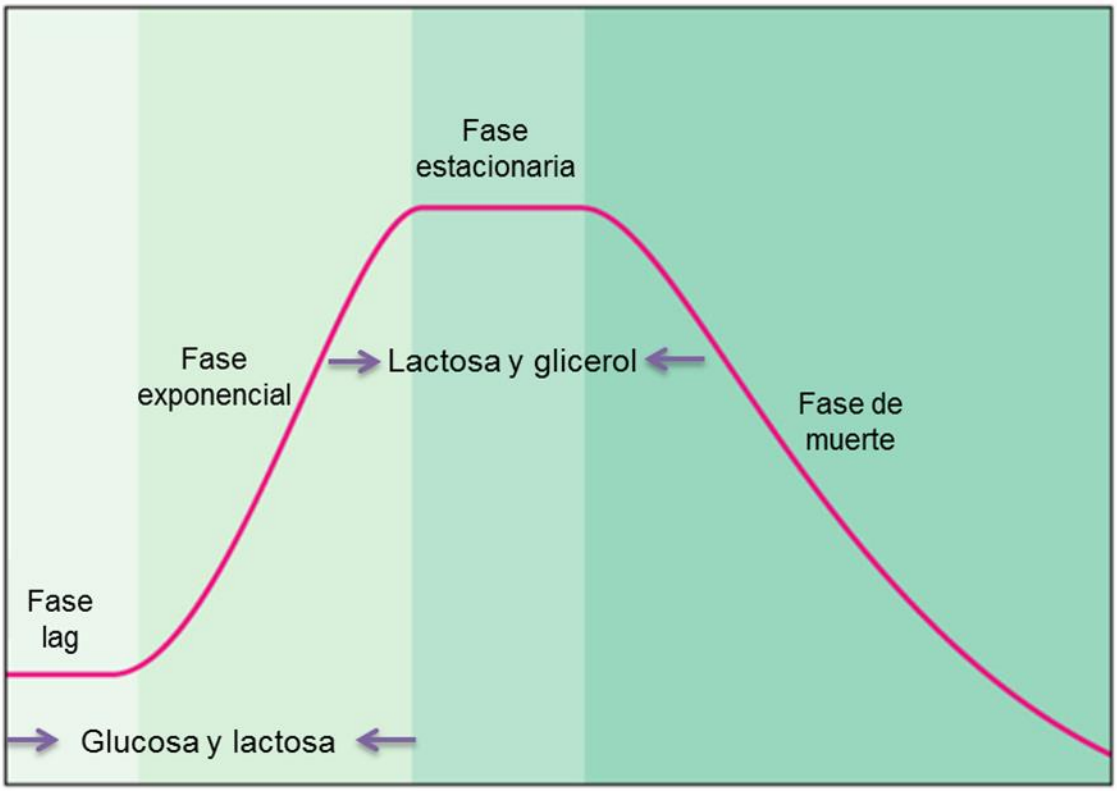


Figura 6. Secuencia del consumo de fuentes de carbono en el medio ZYMZ-5052. La fuente de carbono con mayor preferencia es consumida primero y subsecuentemente las de menor preferencia. Se han reportado casos donde el consumo de las fuentes de carbono puede ser simultáneo (Studier, 2005).

Basándose en la CCR Studier, desarrolló el medio autoinductor ZYM-5052 en el cual la glucosa, la lactosa y el glicerol funcionan como fuentes de carbono principales, donde la glucosa será consumida primero, inhibiendo al operón *lac*, lo que permite obtener altas densidades celulares ya que la célula no desvía su energía para la producción de la proteína recombinante. Una vez que la glucosa es consumida, la lactosa (siguiente fuente de carbono preferencial), comenzará a ser metabolizada actuando al mismo tiempo como fuente de carbono e inductor de la producción de la proteína recombinante. Finalmente se emplea glicerol como fuente de carbono durante la fase estacionaria, una vez que la glucosa y la lactosa fueron consumidas. Por lo que proponemos que empleando el cultivo por autoinducción (usando medio ZYM-5052 en cultivo por lote) podremos obtener una mayor productividad volumétrica de PodC recombinante en comparación del cultivo en lote tradicional con medio LB.

2. JUSTIFICACIÓN

La peroxidasa PodC es una enzima con diferentes aplicaciones biotecnológicas como la remoción de compuestos fenólicos en aguas contaminadas, la construcción de biosensores y su uso como enzimas de diagnóstico. Sin embargo, su extracción a partir de tejidos vegetales a nivel industrial resulta en un proceso de alto costo, por lo que la producción a nivel biorreactor de la peroxidasa recombinante expresada en *E. coli,* podría dar como resultado un proceso más rentable.

3. HIPÓTESIS

La producción de la peroxidasa recombinante PodC mediante el cultivo por autoinducción de la cepa transformante pET28b::podC de *E. coli* permite alcanzar una mayor productividad volumétrica en comparación con el cultivo por lote.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Producir la peroxidasa recombinante de nabo PodC empleando la cepa de *E. coli* Rosetta 2 transformada con el gen *podC* por cultivo en lote y auto-inducción

4.2 Objetivos específicos

1. Expresar la peroxidasa recombinante PodC en la cepa *E. coli* Rosetta 2 transformada con la construcción pET28b::*podC*.
2. Caracterizar la cinética de crecimiento de la cepa parental y la cepa transformante bajo diferentes condiciones de crecimiento.
3. Comparar la producción la peroxidasa recombinante PodC utilizando cultivo por lote y por auto-inducción.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material biológico

En el Cuadro 1 se muestran las características de las cepas que se emplearán en el presente trabajo.

Cuadro 1. Cepas bacterianas empleadas

Cepa	Característica	Referencia
E. coli Rosetta 2 pET28b::*podC* (transformante)	Cepa transformante de *E. coli* Rosetta 2 con la construcción pET28b::podC la cual contiene el gen para la expresión de la peroxidasa de nabo PodC	Pliego-Arriaga *et al.,* 2013
E. coli Rosetta 2 (parental)	Cepa parental con el plásmido pRARE, adecuada para expresión de proteínas eucariontes que contienen codones raros para *E. coli.*	Novagen®

5.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron Luria-Bertani (LB), ZYM-5052 y MDG (Studier, 2005) cuya composición se muestra en el Cuadro 2. Los medios se esterilizaron durante 15 min a una temperatura de 121 °C, a una presión manométrica de 103 kPa. A los medios empleados para el cultivo de la cepa parental se les adicionó 34 µg/mL de cloranfenicol, mientras que a los medios utilizados para el cultivo de la cepa transformante se les agregó además del cloranfenicol 50 µg/mL de kanamicina. La composición de los metales traza se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Composición por litro de los medios de cultivo empleados

Medio de cultivo	Ingrediente	Composición
Luria-Bertani (LB)	Peptona de caseína	10 g/L
	Extracto de levadura	5 g/L
	NaCl (Cloruro de sodio)	5 g/L
	Agar bacteriológico	15 g/L
ZYM-5052	Peptona de caseína	1%
	Extracto de levadura	0.5%
	Na_2HPO_4	25 mM
	KH_2PO_4	25 mM
	NH_4Cl	50 mM
	Na_2SO_4	5 mM
	$MgSO_4$	2 mM
	Metales traza[a]	2x
	Glicerol	0.5%
	Lactosa	0.2 - 2%
	Glucosa	0.05%
MDG[c]	Na_2HPO_4	25 mM
	KH_2PO_4	25 mM
	NH_4Cl	50 mM
	Na_2SO_4	5 mM
	$MgSO_4$	2 mM
	Metales traza[a]	2x
	Glucosa	0.5%
	Aspartato[b]	0.25%

[a] Ver Cuadro 3. [b] Se neutralizó con NaOH antes de esterilizar. [c] Medio empleado para realizar las conservas de la cepa transformante. Las sales y el glicerol fueron de J.T. Baker, EUA, los reactivos microbiológicos de BD, EUA y la glucosa de Sigma-Aldrich, EUA.

Cuadro 3. Composición de la solución de metales traza (1000X)

Ingrediente	Composición
$FeCl_3$[a]	50 mM
$CaCl_2$	20 mM
$MnCl_2$	10 mM
$ZnSO_4$	10 mM
$CoCl_2$	2 mM
$CuCl_2$	2 mM
$NiCl_2$	2 mM
Na_2MoO_4	2 mM
Na_2SeO_3	2 mM
H_3BO_3[b]	2 mM

[a] Se disolvió en 0.12 M de HCl, [b] se disolvió en 60 mM de HCl. Los reactivos empleados fueron de J.T. Baker, EUA.

5.2.1 Medios de cultivo ZYM-5052 y MDG

Los medios de cultivo ZYM-5052 y MDG se prepararon de acuerdo a lo reportado por Studier (2005), para lo cual se prepararon soluciones concentradas de todos los componentes mostrados en el Cuadro 2. Las soluciones concentradas fueron esterilizadas por 15 min 121 °C, excepto las de lactosa, glucosa (esterilizadas por 10 min a 121 °C) y cloruro férrico ($FeCl_3$) (esterilizada mediante filtración con membrana de 0.22 µm de tamaño de poro). Para preparar los medios se agregó el volumen necesario de cada una de las soluciones a agua destilada, previamente esterilizada por 15 min a 121 °C.

5.3 Recuperación de la cepa transformante

La cepa transformante tenía cerca de dos años en el ultracongelador a -70 °C, fue necesario buscar las colonias que aún tuvieran la capacidad de producir la

peroxidasa recombinante PodC. Se realizó la búsqueda de colonias que aún contaran con la construcción pET28b::*podC* mediante PCR y posterior ensayo de expresión con 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, Promega, EUA) y 2% (p/v) de lactosa (BD, EUA).

5.3.1 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico primero se activaron las células contenidas en una chaquira de vidrio de una conserva a -70 °C para lo cual se colocó en 3 mL de medio LB con kanamicina y se incubó en agitación orbital a 180 rpm (MaxQ6000, Thermo Scientific) a 37 °C por 16 h. Posteriormente, se inocularon 5 mL de medio fresco con kanamicina y cloranfenicol con el volumen necesario para obtener una densidad óptica (DO, A_{600}) de 0.01 (Wong y Liao, 2009) y se incubó 37 °C con una agitación de 200 rpm por 16 h. Posteriormente ese cultivo se sembró en cajas con medio sólido LB con los antibióticos anteriormente mencionados y se incubó a 37 °C (Felisa®) hasta observar colonias aisladas. Estas colonias se inocularon en tubos de ensayo con 3 mL de medio LB con antibióticos y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm por 12 h. Un mL de cada cultivo se empleó para realizar la extracción de ADN plasmídico con el kit para extracción de ADN plasmídico Qiaprep Miniprep (Qiagen). La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v).

5.3.2 Electroforesis de ADN

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa, usando amortiguador TAE 1X (TAE 10X: 48.4 g/L Tris base [Invitrogen, EUA], 11.4 mL/L ácido acético glacial [J.T. Baker, EUA], 20 mL/L 0.5 M EDTA pH 8.0 [J.T.Baker, EUA]). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad, EUA) y se sumergieron en amortiguador TAE 1X. Las muestras del ADN se mezclaron con amortiguador de carga 6X (50% [p/v], glicerol 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% [p/v] azul de bromofenol [Bio-Rad, EUA]). Las condiciones de electroforesis fueron 130 V, durante 30 min. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% (v/v) durante 30 min y las bandas se observaron mediante fotodocumentador

(AlphaImager HP, Protein Simple, EUA). Se utilizó el marcador de tamaño molecular 1 kb plus (Invitrogen).

5.3.4 Condiciones de PCR

Las condiciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a Pliego-Arreaga *et al*. (2013). En el Cuadro 4 se muestra la composición de la reacción para PCR.

Cuadro 4. Composición de la reacción para PCR

Componente	Cantidad (µL)
H_2O grado HPLC estéril	7.35
Taq Polimerasa[a]	0.05
Buffer PCR	1
$MgCl_2$ (50 mM)	0.3
dNTP (10 mM)	0.2
Oligonucleótido 1	0.3
Oligonucleótido 2	0.3
ADN templado	0.5

[a] Se empleó la *Taq* DNA polimerasa recombinante de Invitrogen, EUA. Todos los reactivos, excepto los primers, fueron de Invitrogen, EUA.

El programa para PCR (Fig. 7) consistió en una temperatura inicial de 94 °C por 5 min, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 30 s, una temperatura de alineamiento de 68 °C por 30 s, y una temperatura de extensión de 72 °C por 1 min, la temperatura final fue de 72 °C por 7 min y una temperatura de enfriamiento de 4°C por tiempo indefinido. Los oligonucleótidos empleados fueron el podC-S (5'-CCATGGGCCAGTTAAACCCAACGTTT-3') y podC-A (5'-AAGCTTCTAGGATTGTCCATTAACCA-3') sentido y antisentido respectivamente, los cuales se sintetizaron por Sigma-Aldrich.

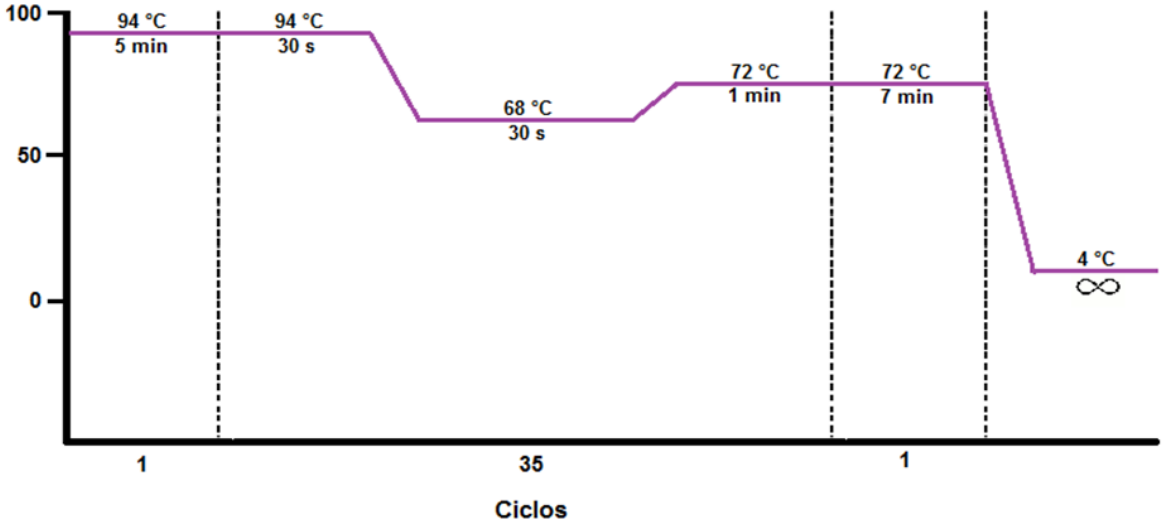


Figura 7. Esquema representativo del programa para PCR. Se realizaron 35 ciclos, un ciclo estuvo compuesto por 30 s a 94°C, 30 s a 68 °C y 1 min a 72 °C. Adicionalmente antes del inicio de los ciclos se calentó a 94 °C por 5 min y al final 72 °C por 7 min. La temperatura de enfriamiento fue de 4 °C por tiempo indefinido. Basado en (Pliego-Arreaga *et al*., 2013)

5.4 Generación de conservas de las cepas bacterianas

Con el propósito de obtener inóculos bajo las mismas condiciones a lo largo de todo el estudio y disminuir variaciones en los cultivos, se generaron conservas de las cepas parental y transformante. La cepa se cultivó en cajas conteniendo medio LB en presencia de los antibióticos descritos anteriormente. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 h. De estas cajas se transfirieron 3 colonias aisladas a un tubo de ensayo estéril con 5 mL de medio LB con antibióticos, se resuspendieron mediante agitación con la ayuda de un vórtex y se incubaron a 37 °C, 180 rpm durante 6 h. Posteriormente se agregó 10% (p/v) de glicerol y se agregaron chaquiras de vidrio estériles. Los tubos se agitaron suavemente hasta que las chaquiras se cubrieron completamente con el medio de cultivo. Con una asa estéril se tomaron aproximadamente 5 chaquiras y se colocaron en crio-viales o tubos eppendorf de 2 mL, los cuales fueron almacenados a –70 °C en un ultracongelador (los cultivos de trabajo se almacenaron a -20 °C) (Studier, 2005).

5.5 Ensayos de expresión de la peroxidasa PodC

La cepa transformante fue activada como se describió en el numeral 5.3.1. EL cultivo obtenido en los 5 mL del medio LB con los antibióticos kanamicina (Fluka, EUA) y cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA) se empleó para inocular 50 mL de medio fresco al 2% (v/v). La densidad óptica se monitoreó cada hora a partir de la inoculación a una longitud de onda de 600 nm. Cuando se alcanzó una DO= 0.60 (aproximadamente a las 5.5 h) se realizó la inducción con 1 mM de IPTG o 2% de lactosa (v/v) (Pliego-Arreaga *et al*., 2013). Se tomaron muestras de 1 mL de cultivo a las 5, 7, 12 y 24 h (después de la inoculación). Las muestras se analizaron por electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970); para lo cual se centrifugaron 5 min a 10 000 rpm y la pastilla se disolvió en 300 µL del amortiguador de carga 2X.

5.5.1 SDS-PAGE

La electroforesis se realizó de acuerdo a lo descrito por (Ausubel *et al*., 2003)Los geles se prepararon con un %C= 2.6 y un %T= 10 (separador) y %C= 2.6 y un %T= 3.6 (concentrador). Se empleó la cámara Mini-Protean 3 (Bio-Rad, EUA). En el Cuadro 5 se muestran los volúmenes necesarios de cada una de las soluciones que se emplearon para la preparación de los geles. Se mezclaron las soluciones (excepto el persulfato de amonio [GE Healthcare, EUA] y el tetrametil-etilen-diamina [TEMED, Invitrogen, EUA]) y se desgasificaron durante 15 min. Posteriormente se agregaron el persulfato de amonio y el TEMED. La solución fue utilizada inmediatamente para la preparación de los geles. Primero se dejó polimerizar el gel separador, una vez que polimerizó se agregó la solución del gel concentrador. El gel se acopló en la cámara de electroforesis y se agregó el amortiguador de corrida (0.125 M Tris base, 0.96 M glicina, 0.5% SDS). Posteriormente las muestras de proteína diluidas 1:1 (v/v) en amortiguador de carga 2X (25% Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.2% 2-mercaptoetanol, 0.001% azul de bromofenol, aforar a 100 mL, almacenado a -20 °C en alícuotas de 1 mL) se cargaron en el gel y se corrió a 15 mA. Se empleó un marcador de bajo peso molecular (Amersham GE Healthcare, EUA). Una vez que el azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel se detuvo la corrida y se procedió a teñir el gel

con azul de Coomassie G-250 (Invitrogen, EUA). Los reactivos para electroforesis fueron de Bio-Rad, EUA, excepto el 2-mercaptoetanol de Sigma-Aldrich, EUA.

Cuadro 5. Composición de las soluciones para obtener geles de acrilamida 10% de T[a]

Solución stock	Gel separador	Gel concentrador
30% acrilamida, 0.8% bisacrilamida	5 mL	0.65
4X Tris-HCl/SDS[b]	3.75 mL	1.25
H_2O	6.25 mL	3.05
Persulfato de amonio 10% (p/v)[c]	0.05 mL	25 µL
TEMED	0.01 mL	5 µL

[a] Volúmenes necesarios para producir 15 mL de gel separador y 5 mL de gel concentrador, [b] gel separador pH=8.8 y gel concentrador pH=6.8, [c] preparar al momento.

5.5.1.1 Tinción de geles de acrilamida con azul brillante de Coomassie

Para teñir los geles éstos se colocaron 15 min en la solución de tinción (50 % (v/v) metanol, 0.05% (p/v) azul brillante de Coomassie G-250 (Invitrogen, EUA), 10% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) de agua destilada) en agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada y se colocó en agitación constante en solución de desteñido (7% (v/v) ácido acético, 5% (v/v) metanol y 88% (v/v) agua destilada) y una hoja de papel Kimwipe® hasta que los geles se destiñeron. Una vez que los geles fueron desteñidos completamente se tomaron fotografías con un fotodocumentador, los geles fueron secados

5.5.1.2 Aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión se aislaron y solubilizaron de acuerdo a Pliego-Arreaga *et al*. (2013). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 4,000 rpm (5810 R, Eppendorf, EUA) por 20 min a 4°C, el sobrenadante se desechó. Tras colocar los tubos en hielo se agregaron 4 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 2 M, EDTA 10 mM) por gramo de peso húmedo. Posteriormente se sonicó (Vibra-Cell VCX500, EUA) durante 10 min (10 s encendido, 15 s descanso) se dejó reposar 10 min en hielo y se repitió la

operación; se empleó la sonda de 13 mm para volúmenes de 1 a 10 mL utilizando una amplitud de 40%. El lisado celular se centrifugó 20 min a 12,000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se desechó. En seguida se agregaron 6 mL del amortiguador de lavado (Tris-HCl 25 mM pH 8) y se resuspendió el pellet mediante pipeteo, se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 20 min, se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado del pellet. Se agregaron 5 mL del amortiguador de solubilización (Cloruro de guanidio [GndCl, Sigma-Aldrich, EUA] 6 M, EDTA 1 mM) por gramo de pellet y se resuspendió mediante pipeteo evitando la formación de burbujas y se colocó en agitación suave a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm a 4 °C por un minuto y se separó la fracción soluble y se analizó mediante SDS-PAGE.

5.5.1.3 Plegamiento de PodC

PodC fue agregada gota a gota al amortiguador de plegamiento (GndCl 4 M, glutatión oxidado [GSSG, Sigma-Aldrich, EUA] 0.7 mM, $CaCl_2$ 5 mM, Tris-HCL 50 mM, pH 8). Se agregaron 1.67 mL de amortiguador de plegamiento por cada mL de PodC. La mezcla se incubó a 4 °C por 24 h. Se agregó 5 µM de cloruro de hemina (MP biomedicals, EUA) disuelta en NaOH 0.1 M y se incubó 2 h a 4 °C (Pliego-Arreaga *et al*., 2013). Se cuantificó la proteína mediante el método de Bradford, 1976.

5.5.1.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford

Se diluyeron entre 10 y 100 µg de proteína en un volumen total de 100 µL de H_2O en un tubo de ensayo. Si no se conocía la concentración aproximada de la muestra, se realizaron una serie de diluciones (1, 1/10, 1/100,1/1000) y se prepararon duplicados para cada una de las muestras. Se agregaron 5 mL del reactivo para teñir proteínas (100 mg de azul de Coomassie, 50 mL de etanol al 95 %, 100 mL de ácido fosfórico [J.T. Baker, EUA], aforar con agua destilada hasta obtener 1 L) a cada tubo de ensayo mezclando por inmersión o en un vórtex, evitando la formación de espuma. Las muestras se midieron a A_{595nm}. Para obtener la concentración de proteína en la muestra se realizó una curva estándar de seroalbúmina, interpolando los valores en el programa GraphPad Prism.

5.5.1.5 Concentración de PodC mediante ultrafiltración

PodC replegada fue concentrada mediante ultrafiltración (Celda agitada de ultrafiltración 8400, EMD Millipore Amicon, Alemania) empleando membranas de con corte de peso molecular de 10 kDa (Millipore, Alemania). Se colocaron 50 mL de PodC replegada y se concentró hasta alcanzar un volumen de 10 mL usando nitrógeno gas para mantener una presión de 3.51545 Kg/cm^2.

5.5.1.6 Evaluación de la actividad peroxidasa de PodC

Se empleó el protocolo para medir actividad peroxidasa con 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) o ABTS (Sigma-Aldrich, EUA). En una celda de poliestireno se agregaron 1.49 mL del sustrato (ABTS 9.1 mM en fosfato de potasio monobásico 100 mM, pH 8, 45 °C), 0.05 mL de 0.3 % (p/p) H_2O_2 (J.T. Baker, EUA) y 0.025 mL de la muestra de enzima. La reacción se monitoreó a A_{405nm} por tres minutos contra un blanco donde PodC se reemplazó por seroalbúmina (Sigma-Aldrich, EUA). Una unidad de actividad de actividad enzimática (U) se definió como los µmol de ABTS consumidos por unidad de minuto a pH 8 y 45 °C. El cálculo de la actividad enzimática se realizó empleando la siguiente ecuación (Tijssen, 1985):

$$\frac{V}{v} * \frac{1}{a.b} * \frac{A}{min} = Actividad\ volumétrica \qquad (2)$$

Donde:

V= volumen de reacción (mL)
v= volumen de la enzima (mL)
a= coeficiente de extinción molar del ABTS (3.72 $mmol^{-1}$ mm^{-1})
b= espesor de la celda (mm)
A/min = pendiente

La actividad específica se calculó dividiendo la actividad volumétrica entre la concentración de la enzima (mg/mL).

5.6 Caracterización cinética de las cepas parental y transformante

5.6.1 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó en tubos de ensayo de 5 mL, con 3 mL de medio LB, con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol en las concentraciones mencionadas anteriormente. Los tubos de ensayo se inocularon con una chaquira de un stock de trabajo de la cepa utilizada y se incubó por 16 h a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Una vez que se obtuvo el inóculo se midió la DO (utilizando como blanco medio de cultivo sin inocular) y se agregó el volumen necesario a 5 mL del medio de cultivo para alcanzar una DO de 0.01 y se incubó a 37 °C a 200 rpm.

5.6.2 Cinéticas de crecimiento microbiano

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 125 mL de medio de cultivo adicionado con kanamicina y cloranfenicol, inoculando el medio para alcanzar una DO de 0.1, como se describió antes. El cultivo se mantuvo a 37 °C con una agitación de 200 rpm, midiendo la DO cada hora durante 12 h. Los datos se analizaran mediante los programas GraphPad Prism v.5 y JMP v.9.

5.6.3 Efecto de la inducción de la producción de PodC con IPTG o lactosa sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante

Se evaluó el efecto de la inducción de la producción de PodC con 1 mM de IPTG y 2% de lactosa (p/v) sobre los parámetros cinéticos μ y t_d de la cepa transformante. Las cinéticas se realizaron en medio LB en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 125 mL de medio de cultivo adicionado con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol. El medio se inoculó a una DO de 0.1, midiéndose cada hora durante 12 h. El cultivo se mantuvo a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Una vez que se alcanzó una DO= 0.600 (aproximadamente a las 5.5 h) se adicionó el inductor. Los datos se analizaron mediante los programas GraphPad Prism v.5 y JMP v.9.

5.6.4 Efecto de la concentración de glucosa y sulfato de magnesio sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante

El efecto de las concentraciones de glucosa (0.5% y 0.05%; p/v) y sulfato de magnesio ($MgSO_4$) (1 mM y 2 mM) sobre los parámetros cinéticos μ y t_d de la cepa parental se evaluaron mediante un diseño factorial 2^2 completamente aleatorizado, con dos réplicas. Las variables respuesta fueron μ y t_d calculadas a partir de la fase exponencial. Las cinéticas de crecimiento se realizaron como en el apartado 5.6.3 y las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

5.7 Producción de PodC mediante cultivo en lote y por auto-inducción en biorreactor

5.7.1 Modelamiento de la fermentación de la cepa transformante

Para realizar el modelamiento de la cepa transformante se evaluaron μ y t_d, usando la ecuación de crecimiento exponencial, el rendimiento en biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), el rendimiento de producto/sustrato ($Y_{p/s}$), el rendimiento de producto/biomasa ($Y_{p/x}$), la velocidad específica de formación de producto (q_p) y la productividad volumétrica (Q_p). Las ecuaciones empleadas para el cálculo de dichos parámetros fueron:

a) Ecuación de crecimiento exponencial

$$Y=Y_0 \exp^{((\mu)(x))} \qquad (2)$$

Dónde:
Y_0 = El valor de Y, t= 0
x = tiempo

b)

$$\mu = \frac{In2}{t_d} \qquad (3)$$

c)

$$t_d = \frac{In2}{\mu} \quad (4)$$

d) Rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = \frac{g\ de\ biomasa\ (x_{máx})}{g\ de\ medio\ de\ cultivo} \quad (5)$$

Donde:
$x_{máx}$ = biomasa producida durante la fermentación

e) Rendimiento de producto/sustrato ($Y_{p/s}$)

$$Y_{p/s} = \frac{g\ de\ producto}{g\ de\ sustrato\ empleado} \quad (6)$$

f) Rendimiento de producto/biomasa ($Y_{p/x}$)

$$Y_{p/x} = \frac{g\ de\ producto}{g\ de\ biomasa\ (x_{máx})} \quad (7)$$

g) Velocidad específica de formación de producto (q_p)

$$q_p = \left(Y_{p/s}\right)(\mu) \quad (8)$$

h) Productividad volumétrica (Q_s)

$$Q_s = \frac{g/_{L\ de\ producto\ obtenido}}{t\ (h)\ total\ de\ cultivo} \quad (9)$$

5.7.2 Cuantificación de la producción de PodC

La cuantificación de PodC se realizó utilizando el kit para proteínas con cola de histidinas (His-Tag Protein ELISA kit, Cell Biolabs, EUA) y se empleó el protocolo descrito por los proveedores. Se recubrieron los pozos de una microplaca con 100 µL de conjugado de polihistidina diluido 1:1000 en la solución de recubrimiento del conjugado y se incubó por 12 h a 4 °C. Se eliminó la solución de recubrimiento y se enjuagaron los pozos con agua destilada. Se volteó la microplaca y se removió el exceso de agua golpeando suavemente sobre una toalla de papel. Se agregaron 200 µL de diluyente de ensayo a cada pozo y se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente, después la placa se almacenó a 4 °C y se removió el diluyente de ensayo. Se agregaron 50 µL de las muestras, cuya concentración de proteína se evaluó (Bradford, 1976) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente en agitador orbital a 100 rpm. Después se agregaron 50 µL del anticuerpo monoclonal Anti-6xHis en una dilución 1:100 a cada pozo y se incubó por 2 h a temperatura ambiente en agitador orbital. Se lavaron los pozos 5 veces con 250 µL de amortiguador de lavado 1X y se secó el exceso. Se agregaron 100 µL del conjugado HRP-anticuerpo secundario en una dilución 1:1000 y se incubó por una hora en un agitador orbital. Se lavaron los pozos 5 veces con amortiguador de lavado 1X. Se agregaron 100 µL de la solución sustrato (aclimatar a temperatura ambiente antes de adicionarse) a cada pozo y se incubó por 20 min en agitador orbital y se detuvo la reacción enzimática agregando 100 µL de solución de paro en cada uno de los pozos. Se midió la A_{450}.

5.7.3 Producción de PodC en biorreactor mediante cultivo en lote

5.7.3.1 Preparación del inóculo

El pre-inóculo se preparó como se describe en el numeral 5.4.1, una vez que se obtuvieron las células estas se inocularon en matraces de 250 mL con 30

mL de caldo LB con los antibióticos mencionados anteriormente en la cantidad necesaria para obtener una DO = 0.05 y se incubó durante toda la noche a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Se inoculó un matraz de 500 mL con 300 mL del medio seleccionado para las fermentaciones adicionado con antibióticos con el volumen necesario para alcanzar una DO=0.01 y el cultivo se incubó durante una noche a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Se agregó el volumen necesario del cultivo para alcanzar una DO inicial = 0.01 en el medio de cultivo del biorreactor.

5.7.3.2 Condiciones de cultivo por lote

El cultivo por lote se realizó en medio LB con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol a 37 °C con agitación de 200 rpm con pH inicial= 7 y una inyección de aire inicial de 3 L/min. La inducción se llevó a cabo al alcanzar una DO≈0.8 y se dejó fermentar por 12 horas, de acuerdo a lo reportado por (Pliego-Arreaga *et al*., 2013)Se empleó un biorreactor de 5 L (Applikon, EUA) el cual cuenta con un sistema de control que consta del Biocontrolador ADI1030, la Bioconsola ADI1035 y el software BioXpert v2.

5.7.4 Producción de PodC en biorreactor mediante cultivo por auto-inducción

5.7.4.1 Condiciones de cultivo por auto-inducción

Las condiciones para el cultivo por auto-inducción fueron las siguientes volumen inicial del cultivo = 3 L, agitación = 200 rpm, pH = inicial de 7 y una inyección de aire inicial de 3 L/min. No se controló ni el oxígeno disuelto ni el pH. Se empleó el medio de cultivo ZYM-5052, empleando el mismo biorreactor.

5.8 Purificación de PodC mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)

La proteína replegada se purificó por IMAC utilizando columnas pre-empacadas con Sefarosa 6, precargada con Ni (His Trap FF, GE, EUA). Se eliminó el etanol de la columna inyectando 5 volúmenes de columna (vdc) de agua destilada. La columna se equilibró con 5 vdc de amortiguador de unión (fosfato de

sodio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol (Fisher, EUA) 30 mM, pH 7.4). Se inyectó la muestra (1 a 5 mL dependiendo de la concentración de proteína) y se lavó extensivamente la columna con 15 vdc de amortiguador de unión. La proteína se eluyó en un solo paso con 5 vdc de amortiguador de elusión (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7.4). Se recolectaron fracciones de 0.5 mL, a las cuales se les medió la A_{280} y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se determinó la proteína total purificada por el método de Bradford y se midió actividad mediante el método de ABTS.

5.9 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se llevó a cabo usando t-student para comparaciones entre dos medias con un intervalo de confianza del 95%, mientras que para comparaciones múltiples se empleó la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$. Se usó el programa GraphPad Prism v. 5.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Expresión de la peroxidasa recombinante PodC en la cepa *E. coli* Rosetta 2 transformada con la construcción pET28b::podC

6.1.1 Extracción de ADN plasmídico

En la Fig. 8 se muestra la electroforesis del aislamiento de ADN plasmídico de cultivos de la cepa transformante provenientes de diferentes colonias aisladas utilizando el kit Qiaprep Miniprep. Las diferentes bandas que se observan pueden deberse a la presencia de diferentes plásmidos así como a sus isoformas topológicas (Schmidt *et al*., 2001).

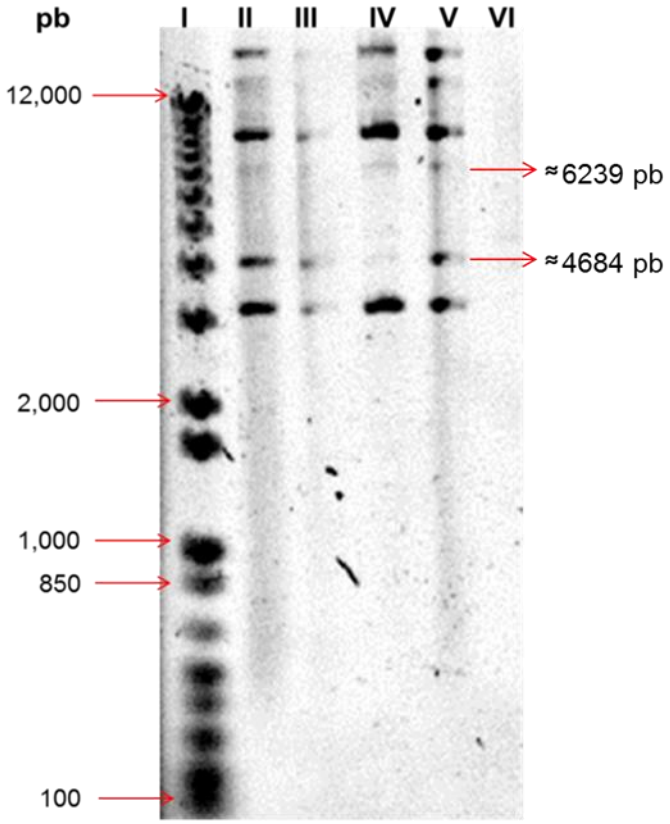


Figura 8. Electroforesis del ADN plasmídico en gel de agarosa al 1%. Carriles: **I**, Marcador de tamaño molecular (1Kb plus de Invitrogen); **II**, **III**, **IV** y **V,** ADN plasmídico extraído de cultivos provenientes de diferentes colonias aisladas de la cepa pET28b::podC::Rosetta 2; **VI,** ADN plasmídico de un cultivo proveniente de una colonia aislada de la cepa Rosetta 2.

La cepa transformante contiene al plásmido pRARE2 (4,684 pb), el cual es empleado para superar problemas en la producción de proteínas recombinantes provocados por la diferencia entre la preferencia de codones de *E. coli* y el organismo al que pertenece la proteína de interés (Novy *et al*., 2011).

Por otro lado, el plásmido pET28b es el vector de expresión con el cual se diseñó la construcción pET28b::podC (6,290 pb), la cual contiene el gen de peroxidasa de nabo *podC* (Pliego-Arreaga *et al*., 2013).

La presencia de ambos plásmidos explica la aparición de dos bandas, mientras que las otras bandas podrían ser las tres formas topológicas (compacta super-enrrollada, relajada circular o linearizada) en las cuales los plásmidos pueden ser amplificados en *E. coli* (Maucksch *et al*., 2013).

6.1.2 Detección del gen *podC* en la cepa transformante

Una vez que se obtuvo el ADN plasmídico, este se empleó como plantilla para realizar PCR del gen *podC*. Se encontró que de los cuatro cultivos, únicamente se logró amplificar el fragmento del tamaño esperado de una sola colonia aislada, a partir de la cual se realizaron las conservas de la cepa transformante con las que se trabajó durante el proyecto. El tamaño del gen *podC* es de 922 pb (Pliego-Arreaga *et al*., 2013). En la Fig. 9 se muestra la electroforesis de los productos de PCR, en el carril III se observa un amplicón del tamaño esperado.

6.1.3 Ensayos de expresión de PodC con IPTG o lactosa

Debido a que la producción de la peroxidasa recombinante PodC se encuentra bajo el promotor T7*lac* fue necesario emplear un inductor para su expresión. El IPTG es un inductor estable del promotor T7, utilizado en el laboratorio para la expresión de proteínas recombinantes (Christensen y Eriksen, 2002; Marbach y Bettenbrock, 2012) debido a que no es metabolizable por *E. coli* (Dekel y Alon, 2005; Su *et al*., 2015)

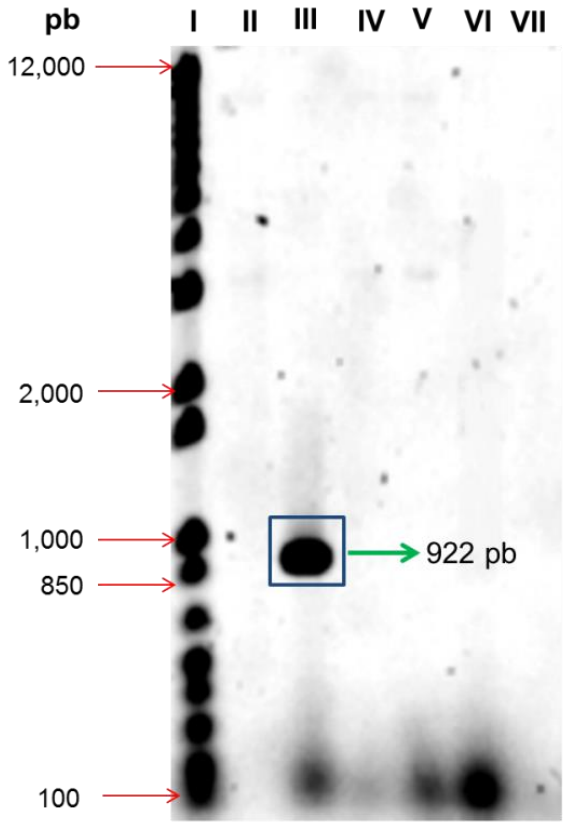


Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%. Carriles: **I**, Marcador de tamaño molecular (1Kb plus de Invitrogen); **II**, **III**, **IV** y **V**, Productos de PCR de los cultivos de la cepa transformante. En el círculo azul se observa el fragmento amplificado con un tamaño molecular de 922 pb; **VI**, Producto de PCR de la cepa Rosetta 2; **VII**, Control negativo.

Por lo que el IPTG tiene algunas ventajas sobre otros inductores metabolizables (p. ej. lactosa); ya que permite que la concentración del inductor sea constante, además que para que actúe como inductor no requiere transformaciones, dando como resultado una mayor expresión de la proteína recombinante (Donovan *et al*., 1996; Kilikian *et al*., 2000). No obstante, debido a su alto costo y toxicidad su uso se ve limitado a fermentaciones realizadas en pequeña escala (Jonasson *et al*., 2002; Aucoin *et al*., 2006).

Una alternativa para el uso del IPTG es el uso de la lactosa como inductor. La lactosa es un carbohidrato metabolizable, el cual necesita ser transformado a su isómero alolactosa para actuar como inductor (Eames y Kortemme, 2012), por

lo que puede provocar una inducción moderada en comparación con la inducción fuerte causada por el IPTG (Su *et al*., 2015).

No obstante, la inducción de proteínas recombinantes puede variar de acuerdo al tipo del inductor (Kim *et al*., 2007) y al sistema de expresión empleado, siendo necesario probar ambos inductores para la elección del mismo. Ésta elección es importante especialmente cuyo se pretende producir la proteína en procesos a gran escala ya que la lactosa ofrece ventajas sobre el IPTG (Donovan *et al*., 2000) debido a su bajo costo y toxicidad nula (Baneyx, 1999; Pei *et al*., 2011).

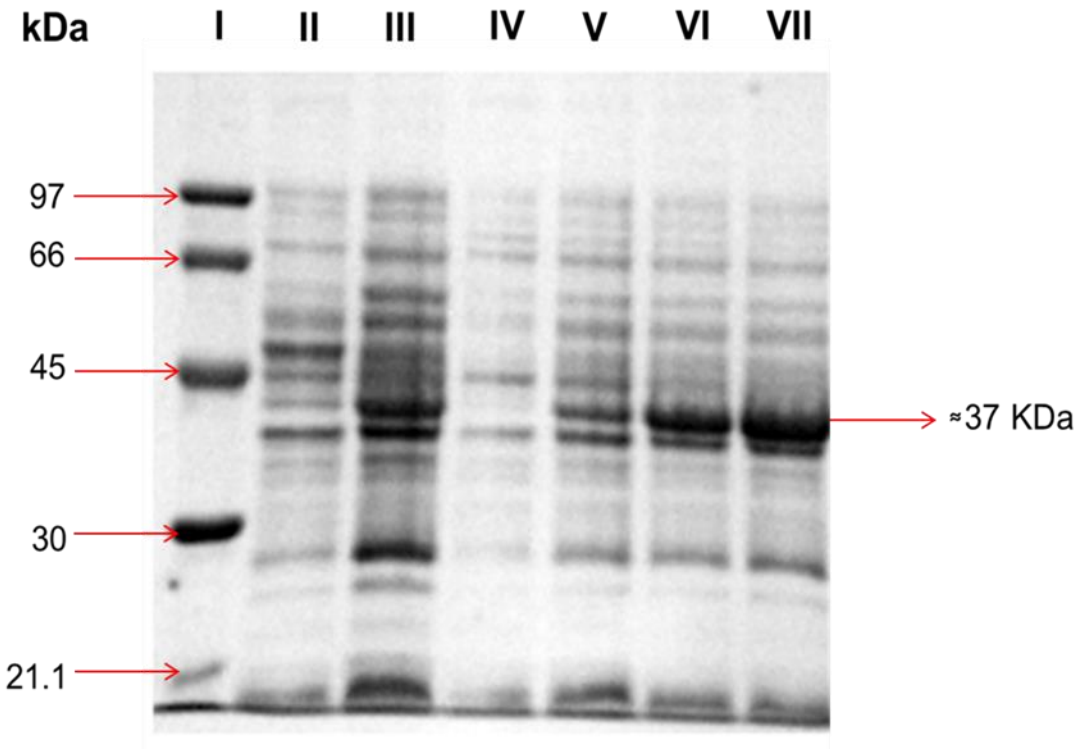


Figura 10. SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC con 1 mM de IPTG. Carriles: **I**, marcador de bajo peso molecular (LMW Ahmersam, GE); **II,** células parental cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); células transformantes: **III,** cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); **IV,** cosechadas 5 h después de la inoculación; **V**, cosechadas 1 h después de la inducción; **VI,** cosechadas 5 h después de la inducción; **VII**, cosechadas 16.5 h después de la inducción.

Al realizar los ensayos de la expresión de PodC se observó que la inducción con 1 mM de IPTG provoca un aumento en la expresión de la proteína a

través del tiempo (Fig. 10). Se observa la proteína de interés, con un peso molecular aproximado a 37 kDa (carriles III-VII); en el control negativo (carril II) se observa una proteína que aproximadamente tiene el mismo peso molecular, esto puede deberse a la presencia de una proteína nativa con un peso molecular similar al de PodC.

De igual manera, cuyo se realizó la inducción con 2% de lactosa (p/v) se observó que la inducción de la expresión de la proteína también aumenta a medida que aumenta el tiempo de inducción (Fig. 11). Por lo tanto, la lactosa fue considerada un inductor igualmente efectivo al IPTG para la inducción de la expresión de la peroxidasa PodC, siendo un inductor viable para su producción a mayor escala, lo cual concuerda con lo reportado por (Pliego-Arreaga *et al*., 2013). Se observa la proteína de interés con un peso molecular aproximado a 37 kDa (carriles III-VII).

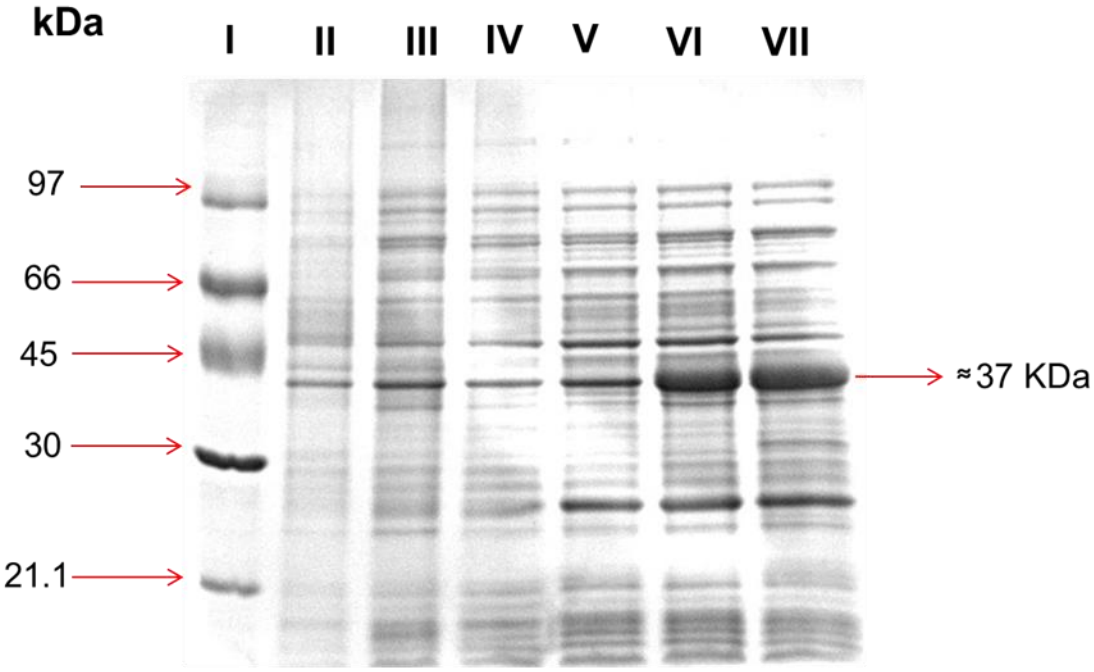


Figura 11. SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC con 2% de lactosa (v/v). Carriles: **I**, marcador de bajo peso molecular (LMW Ahmersam, GE); **II,** Células de parentales cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); células transformantes: **III**, cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); **IV** cosechadas 5 h después de la inoculación; **V**, cosechadas 1 h después de la inducción; **VI**, cosechadas 5 h después de la inducción; **VII**, cosechadas 16.5 h después de la inducción.

6.2 Caracterización de la cinética de crecimiento de las cepas parental y transformante

6.2.1 Curva de crecimiento de las cepas parental y transformante

La dinámica de crecimiento (Fig. 12) de ambas cepas, concuerda con el modelo de crecimiento diaúxico, caracterizado por tener dos fases exponenciales separadas por una fase en la cual la velocidad de crecimiento es mínima, causado por el consumo subsecuente de dos nutrientes (Mostovenko *et al*., 2011). Dicho comportamiento podría deberse al consumo de los nutrientes del medio de cultivo LB seguido por el consumo del acetato producido por su metabolismo. La capacidad para producir y consumir acetato ha sido reportada anteriormente para la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual es la cepa parental de *E. coli* Rosetta 2 (Castaño-Cerezo *et al*., 2014; Wang *et al*., 2014). No obstante, para comprobar si el comportamiento diáuxico es causado por la producción y consumo de acetato es necesario realizar su cuantificación en los cultivos transformantes.

Debido al comportamiento diáuxico de las cepas fue necesario dividir a la cinética en dos fases, la primera entre 0-5 h y la segunda entre 5-12 h, ésta división permitió analizar cada una de las fases con la ecuación de crecimiento exponencial.

Al realizar la comparación entre los parámetros cinéticos μ y t_d de las cepas parental y transformante durante la primera fase (Fig. 13) se observó que la transformación de la cepa parental tuvo un efecto negativo sobre su dinámica de crecimiento, obteniendo un valor de μ 17.74% mayor al de la cepa transformante y una t_d 17.91% menor. Esto sugiere que la cepa parental crece más rápido que la transformante durante las dos fases (Cuadro 6). El crecimiento de la cepa transformante se inhibió debido a la presencia de la construcción genética pET28b::podC. El efecto negativo de los plásmidos sobre el crecimiento de *E. coli* ha sido reportado anteriormente (Hoffmann y Rinas, 2004; Carneiro *et al*., 2013) y se cree que se debe al gasto metabólico causado por la expresión de las proteínas

codificadas en los plásmidos. Esta inhibición puede incluso observarse antes de la inducción de la expresión de la proteína objetivo, debido a que la replicación y el mantenimiento del plásmido induce estrés metabólico en *E. coli* (Silva *et al*., 2012).

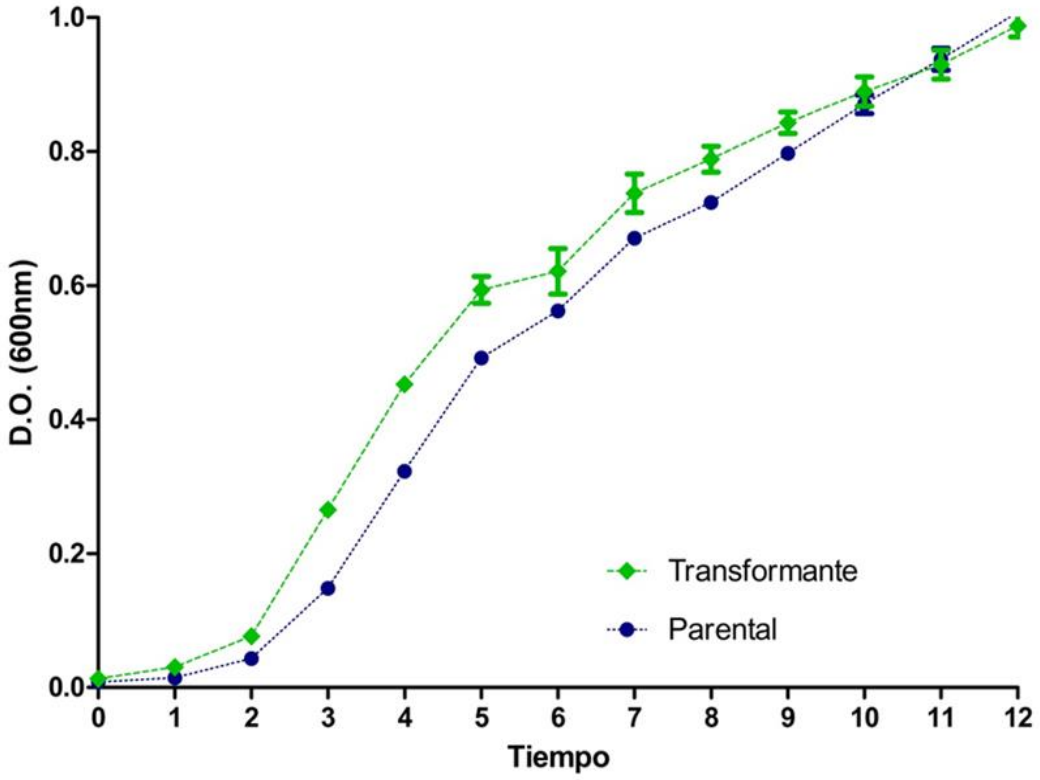


Figura 12. Curva de crecimiento de las cepas parental y transformante. Se observó que ambas cepas tuvieron un comportamiento diáuxico, la fase de desaceleración se mostró de la hora 5 a la 6, aunque dicho comportamiento es más evidente para la cepa transformante.

Cuadro 6. Parámetros cinéticos de las cepas parental y transformante en medio LB

Primera fase de crecimiento				**Segunda fase de crecimiento**			
Parental		Transformante		Parental		Transformante	
μ (h^{-1})	t_d (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)
0.62±0.011	1.10±0.020	0.51±0.014	1.34±0.037	0.09±0.003	7.28±0.291	0.06±0.001	10.26±0.163

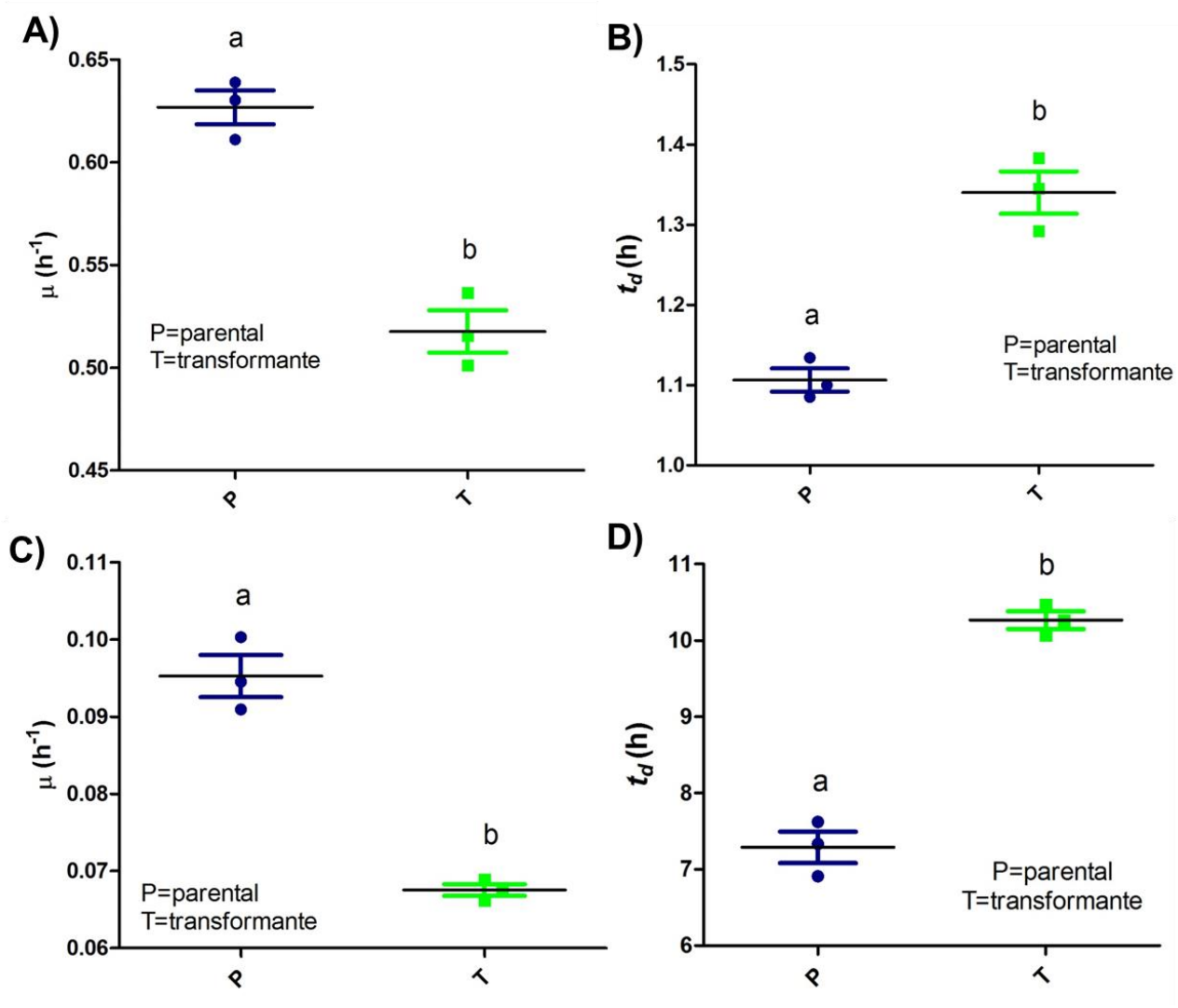


Figura 13. Comparación de los parámetros cinéticos *μ* y t_d de las cepas parental y transformante en medio LB. Primera fase de crecimiento: **A)** constante de velocidad de crecimiento, **B)** tiempo de duplicación; Segunda fase de crecimiento: **C)** constante de velocidad de crecimiento, **D)** tiempo de duplicación.

6.2.2 Efecto de la inducción de la expresión de PodC con lactosa o IPTG, sobre el crecimiento de la cepa transformante

Pliego-Arriaga *et al.* (2013), emplearon diferentes concentraciones de lactosa para inducir la expresión de PodC, encontrando que la concentración con una mayor eficiencia de expresión era al 2% (p/v) de lactosa, además realizaron ensayos de expresión con 1 mM del inductor IPTG concluyendo que la lactosa era un inductor aún más eficiente que el IPTG.

No obstante, no se había analizado el efecto que tiene la inducción de la expresión de PodC sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante, por lo que era importante analizarlo para completar su caracterización cinética (Fig. 14).

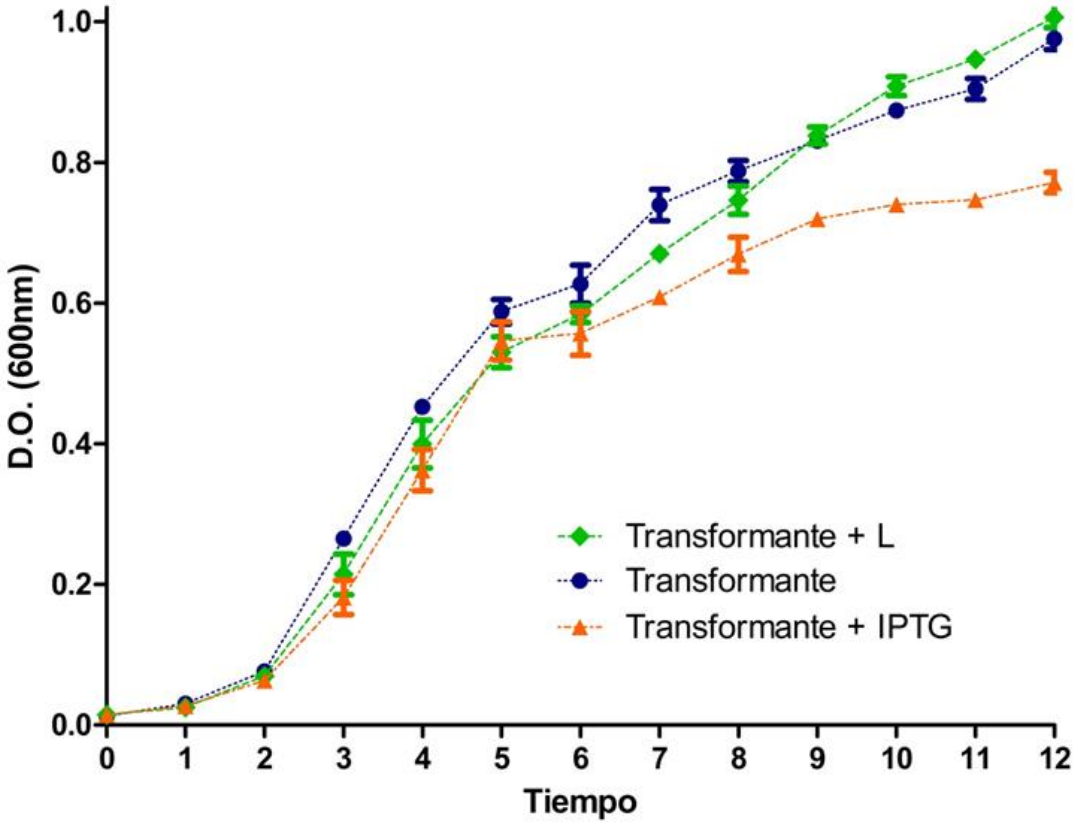


Figura 14. Efecto de la inducción sobre la curva de crecimiento de la cepa transformante. La inducción con 2% de lactosa o 1 mM de IPTG se realizó a las 5 horas y media después de inocular los medios de cultivo, al alcanzar una DO = 0.600.

La inducción con IPTG remarcó el comportamiento diáuxico, mientras que la inducción con lactosa hizo que el comportamiento diáuxico casi desapareciera. Sin embargo, fue necesario analizar los parámetros cinéticos *μ* y *td* (Cuadro 7) para comprobarlo. Al realizar la comparación entre los parámetros cinéticos obtenidos (Fig. 15) se comprobó que la inducción con lactosa mejoró aproximadamente 30% los parámetros cinéticos de la cepa transformante, mientras que la inducción con IPTG tuvo como efecto un crecimiento 1.6 veces más lento posiblemente por su efecto tóxico, lo cual puede deberse que a

diferencia del IPTG, la lactosa es un inductor metabolizable, por lo que una vez que se encuentra dentro de la célula es transformado a glucosa y galactosa por acción de la β-galactosidasa (Lewis, 2013), por lo que puede ser empleada como fuente de carbono.

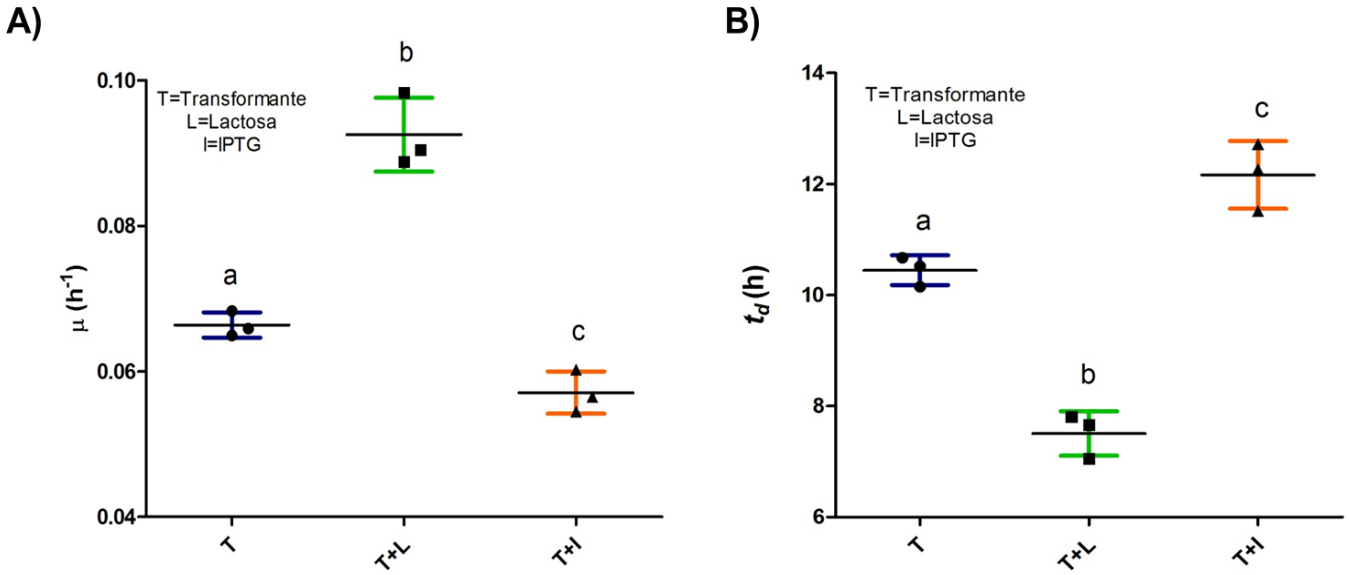


Figura 15. Comparación de los parámetros cinéticos *μ* y t_d de la cepa transformante bajo diferentes inductores. **a)** Constante de velocidad de crecimiento, **b)** tiempo de duplicación.

Cuadro 7. Parámetros cinéticos de las cepa transformante bajo diferentes inductores

Sin inductor		Lactosa		IPTG	
μ **(h^{-1})**	t_d **(h)**	***μ*** **(h^{-1})**	t_d **(h)**	***μ*** **(h^{-1})**	t_d **(h)**
0.066±0.001	10.44±0.218	0.092±0.004	7.50±0.326	0.057±0.002	12.16±0.498

Debido a que la lactosa mejoró los parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa transformante, además de ser un inductor eficaz para la producción de la peroxidasa recombinante fue elegida como inductor para la producción de la enzima recombinante mediante cultivo en lote y por auto-inducción.

6.2.3 Efecto de las concentraciones de glucosa y sulfato de magnesio sobre los parámetros cinéticos de la cepa transformante

El medio de cultivo LB es un medio rico que ha sido empleado para la producción de proteínas recombinantes (Broedel Jr *et al*., 2001). No obstante, su formulación tradicional contiene únicamente trazas de fuentes de carbono, por lo que la adición al medio de cultivo con glucosa y algunos cationes divalentes (p.ej. Mg^{2+}) (Rosano y Ceccarelli, 2014), así como la variación de otros de sus componentes pueden mejorar la producción de proteínas recombinantes (Sivashanmugam *et al*., 2009; Marini *et al*., 2014). Es por esto, que se evaluaron los parámetros cinéticos *μ* y *td* bajo diferentes concentraciones de glucosa y $MgSO_4$ (Fig. 16). Los mejores parámetros cinéticos se obtuvieron en el tratamiento 1, donde la concentración de glucosa fue de 0.05% (p/v) y 1 mM de $MgSO_4$.

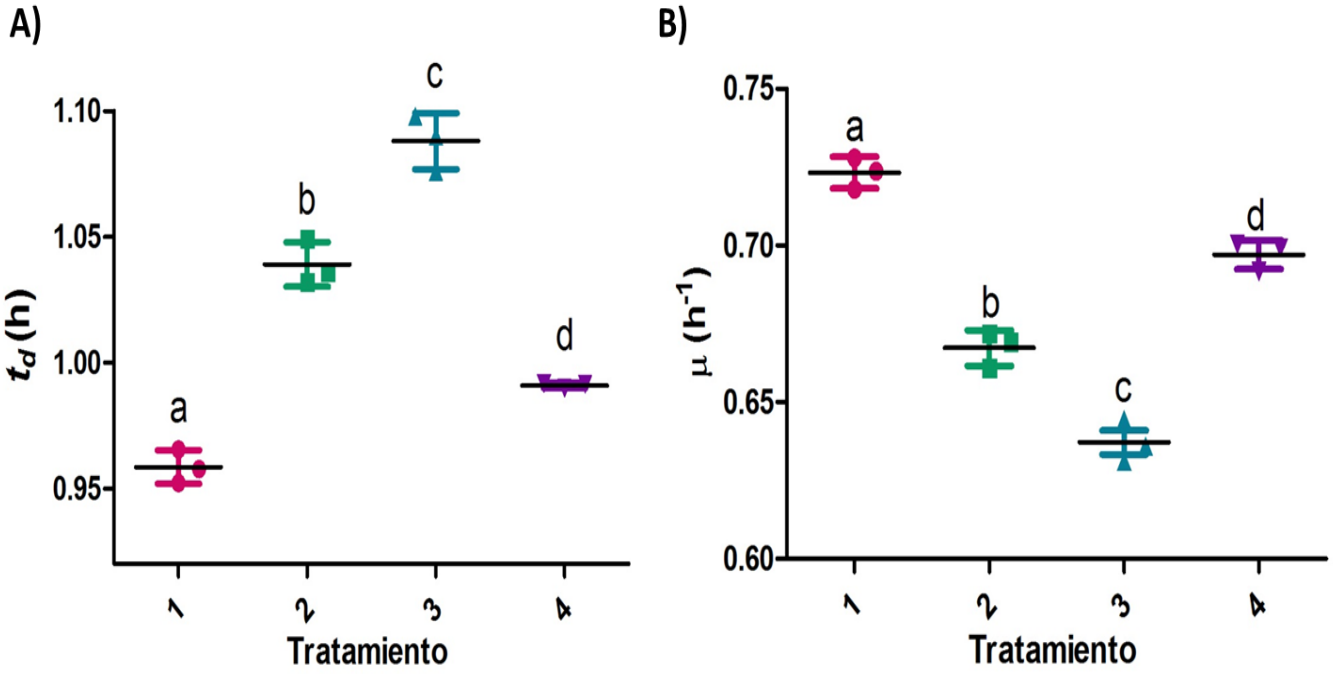


Figura 16. Parámetros cinéticos de la cepa transformada con diferentes concentraciones de glucosa y $MgSO_4$. A) Tiempo de duplicación obtenidos con los diferentes tratamientos; **B)** constante de velocidad de crecimiento, obtenidas con los diferentes tratamientos. Tratamientos: 1= 0.5% de glucosa y 1 mM de $MgSO_4$, 2= 0.05% de glucosa y 2mM de $MgSO_4$, 3= 0.05% de glucosa y 1 mM de $MgSO_4$, 4= 0.5% de glucosa y 2 mM de $MgSO_4$. Los porcentajes fueron p/v.

Analizando el diseño experimental, se encontró que la concentración de glucosa y su interacción con la concentración de $MgSO_4$ fueron significativas (Cuadro 8) para ambas variables respuesta, al obtener un valor F < 0.0001, la concentración de glucosa tuvo mayor significancia al obtener las mayores proporciones F para ambas variables respuesta. El perfil de interacciones se muestra en la Fig. 17, donde el nivel superior de glucosa y el inferior de $MgSO_4$ mostraron las mejores variables de respuesta. Además el $MgSO_4$ únicamente es significativo si la glucosa se mantiene en el nivel superior. Los parámetros cinéticos mejoraron por la adición de glucosa y $MgSO_4$ al medio LB, por lo que ambos nutrientes tienen un efecto positivo sobre la cinética de crecimiento del microorganismo (Fig. 18). Esto concuerda con lo mencionado anteriormente por (Shiloach y Fass, 2005; Rosano y Ceccarelli, 2014), quienes recomiendan la suplementación con glucosa, glicerol y cationes como el magnesio para producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, ya que permiten alcanzar altas densidades celulares y mejorar la productividad volumétrica de los cultivos. No obstante, fue necesario analizar las muestras de los cultivos para corroborar la acumulación de PodC en las células (Figs. 19 y 20).

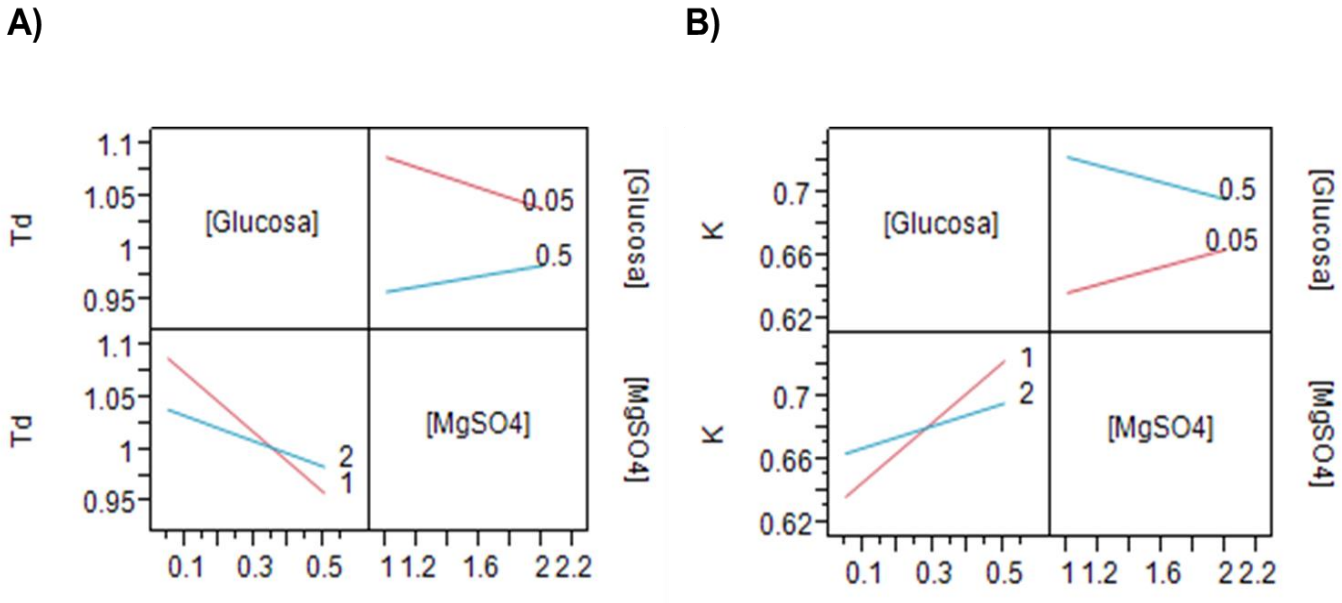


Figura 17. Perfil de interacciones de los factores [Glucosa] y [$MgSO_4$]. a) Perfil de interacciones para el tiempo de duplicación (Td= t_d); **b)** perfil de interacciones para la constante de velocidad de crecimiento (K= μ). Rojo= Nivel inferior, Azul= Nivel superior. Se desea que el t_d disminuya y que la μ incremente.

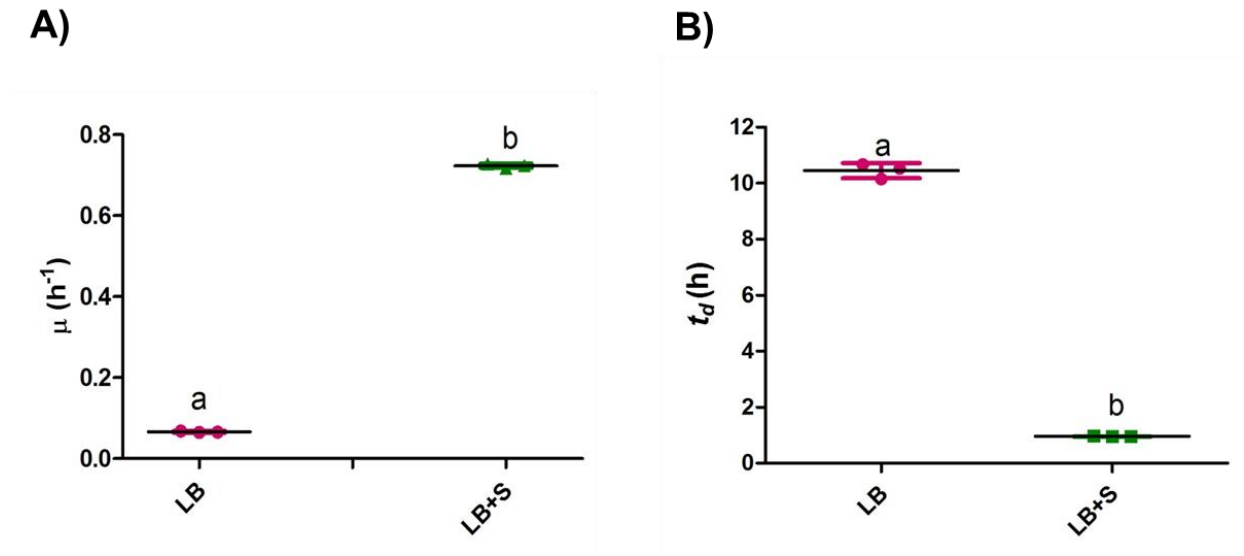


Figura 18. Comparación de los parámetros cinéticos de la cepa transformante en medio LB y medio LB suplementado. a) Constante de velocidad de crecimiento, **b)** tiempo de duplicación. LB= medio LB, LB+S= medio LB suplementado con 0.5% (v/p) de glucosa y 1 mM de $MgSO_4$.

Cuadro 8. Evaluación de los efectos sobre las variables respuesta del diseño experimental (datos generados por el programa JMP v.10)

μ (h^{-1})				t_d (h)			
Origen del efecto	**Suma de cuadrados**	**Proporción F**	**Prob > F**	**Origen del efecto**	**Suma de cuadrados**	**Proporción F**	**Prob > F**
[Glucosa] (0.05,0.5)	0.02512	286.12	<.0001*	[Glucosa] (0.05,0.5)	0.01022	334.2875	<.0001*
[$MgSO_4$] (1,2)	0.00043	4.9057	0.0576	[$MgSO_4$] (1,2)	0.00000	0.0109	0.9194
[Glucosa] *[$MgSO_4$]	0.00415	46.8105	0.0001*	[Glucosa] *[$MgSO_4$]	0.00217	71.0060	<.0001*

El mejor tratamiento (glucosa 0.5% /p/v y $MgSO_4$ 1 mM) no permitió la producción de PodC (Fig. 19), mientras que el tratamiento con glucosa 0.05% y $MgSO_4$ 1 mM (Fig. 20) muestra apenas una pequeña banda correspondiente a PodC, lo que indica que la inducción con lactosa cuyo hay presencia de glucosa no es tan efectiva como la inducción en ausencia de glucosa. Esto puede ser consecuencia del fenómeno metabólico conocido represión catabólica por carbono (CCR), el cual controla el orden en el que se metabolizan las diferentes fuentes de carbono (Kremling *et al*., 2015).

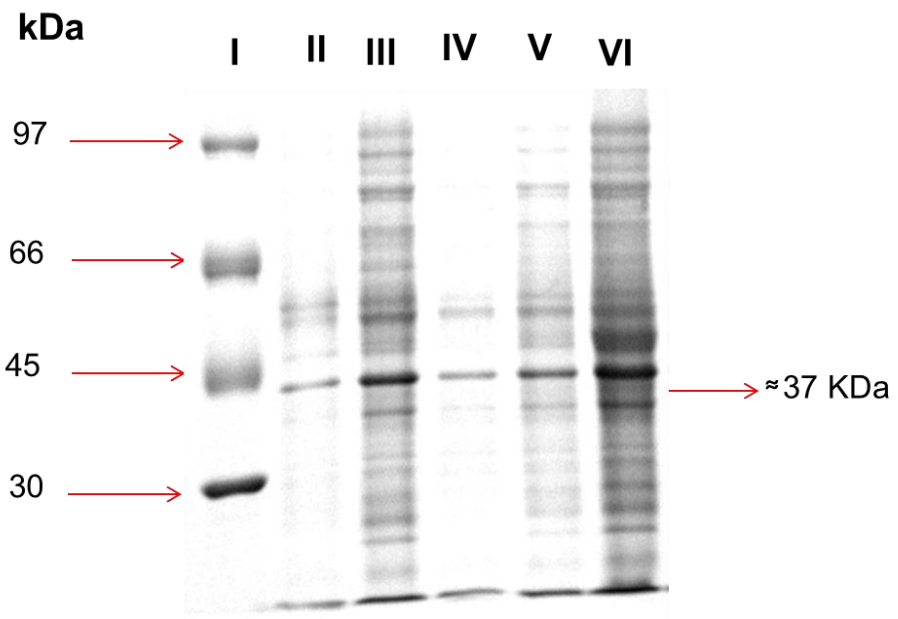


Figura 19. SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC en presencia de glucosa 0.5% (p/v) y $MgSO_4$ 1mM. Carriles: **I**, marcador de bajo peso molecular (LMW Ahmersam, GE); **II,** células parentales cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); células transformantes: **III**, cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); **IV** cosechadas 5 h después de la inoculación; **V**, cosechadas 1 h después de la inducción; **VI**, cosechadas 5 h después de la inducción; **VII**, cosechadas 16.5 h después de la inducción.

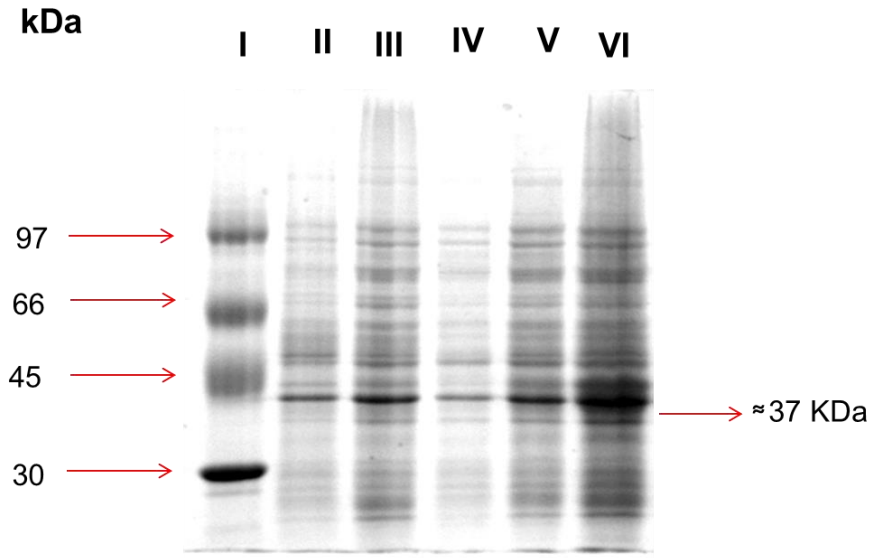


Figura 20. SDS-PAGE de la inducción de la producción de la peroxidasa PodC en presencia de glucosa 0.05% (p/v) y $MgSO_4$ 1mM. Carriles: **I**, marcador de bajo peso molecular (LMW Ahmersam, GE); **II,** células parentales cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); células transformantes: **III**, cosechadas 24 h después de la inoculación (sin inducir); **IV** cosechadas 5 h después de la inoculación; **V**, cosechadas 1 h después de la inducción; **VI**, cosechadas 5 h después de la inducción; **VII**, cosechadas 16.5 h después de la inducción.

6.3 Comparación de la producción de PodC mediante cultivo en lote y por auto-inducción en biorreactor

6.3.1 Monitoreo de las fermentaciones

Para la comparación de la producción de PodC mediante cultivo en lote *vs.* auto-inducción se llevaron a cabo al menos dos fermentaciones por cada tipo de cultivo y las fermentaciones fueron monitoreadas por el software BioXpert v.2. En la Fig. 21 se muestran las gráficas del monitoreo de pH, oxígeno disuelto (OD), DO y temperatura (T).

La T se mantuvo constante durante ambas estrategias de cultivo, siendo lo esperado debido al control de T del biorreactor. Con respecto al OD, este comenzó a disminuir en ambos tipos de cultivos cuyo comenzó la fase exponencial de crecimiento probablemente debido al aumento en la demanda de oxígeno, causado por un aumento en la concentración de biomasa (Cárcamo *et al*., 2014). Lo anterior concuerda con los resultados de (Riedel *et al*., 2013), quienes reportaron que la mayor demanda de oxígeno por célula, en diferentes cultivos bacterianos incluyendo *E. coli*, ocurrió durante la fase exponencial, mientras que la menor demanda de oxígeno fue durante la fase estacionaria.

Por otro lado, el pH disminuyó de 6.9 a 6.3 durante el cultivo por auto-inducción (Fig. 21-B), mientras que en el cultivo por lote la disminución en el pH fue de 7 a 5.8. Los cambios durante la fermentación mediante auto-inducción fueron menores a los observados durante el cultivo por lote, pudiendo deberse a que el medio auto-inductor es un medio con amortiguador de pH. La causa más probable de acidificación del medio de cultivo durante las fermentaciones es la acumulación en el medio de subproductos metabólicos, principalmente de acetato, ya que ha sido reportado como una de las principales causas de acidificación del medio de cultivo durante la producción de proteínas recombinantes (Eiteman y Altman, 2006; Lara, 2011; Riedel *et al.,* 2013; Leone *et al*., 2015).

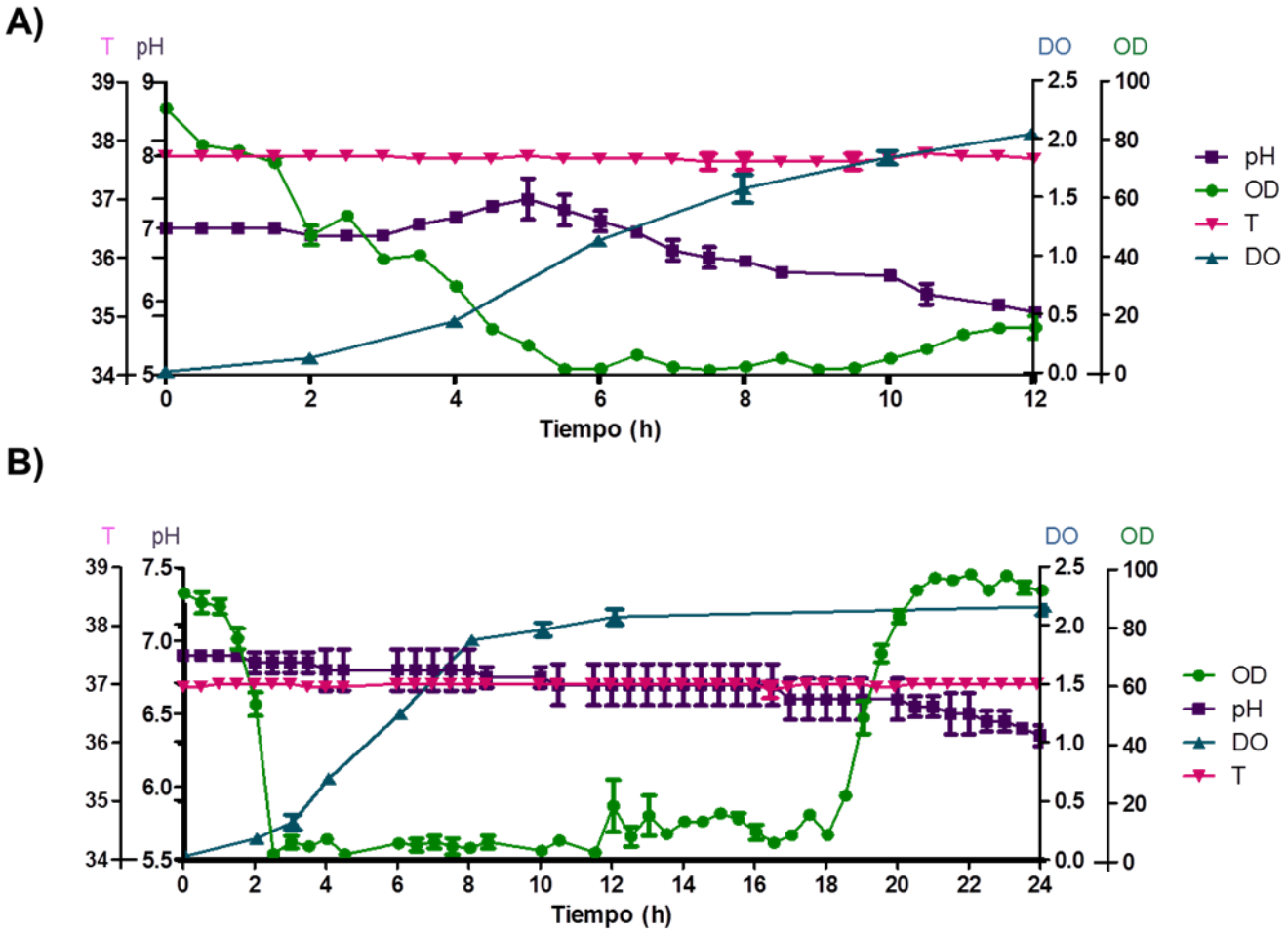


Figura 21. Monitoreo de OD, pH, DO y T durante la fermentación. **A)** Cultivo por lote, **B)** cultivo por auto-inducción. La T se muestra en °C, el OD en %, el pH y la DO en unidades.

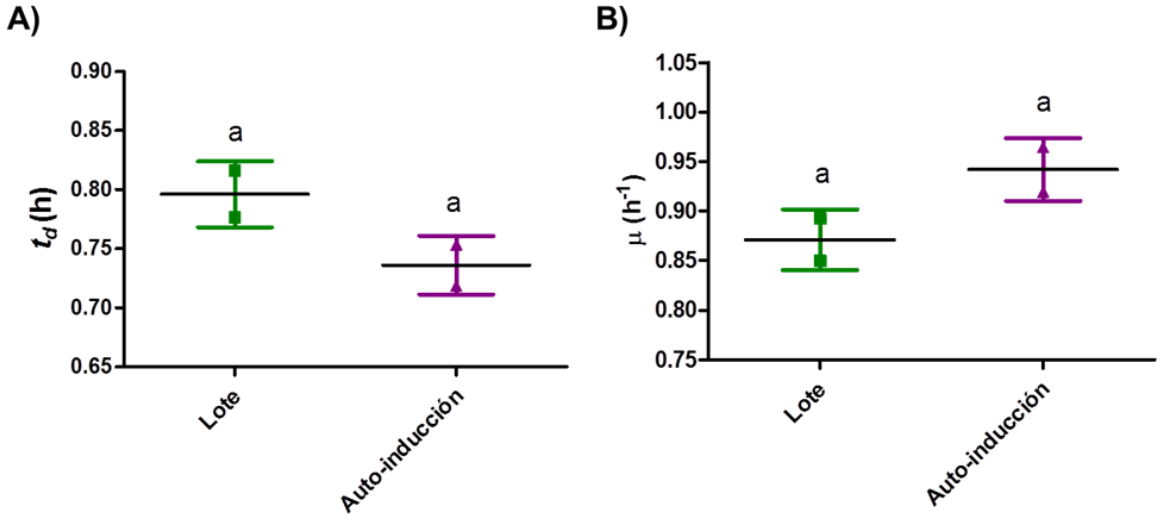


Figura 22. Parámetros cinéticos de los cultivos por lote y auto-inducción. A) Tiempo de duplicación, **B)** constante de velocidad de crecimiento

El parámetro DO fue empleado para evaluar la cinética de crecimiento de la cepa transformante bajo éstos dos métodos de cultivos (Fig. 22), encontrando que no hubo diferencias significativas en μ y t_d. Esto podría deberse a que la cantidad de glucosa (0.05% [p/v]) del medio auto-inductor fue muy pequeña para hubiera una diferencia significativa en los parámetros cinéticos de ambos cultivos.

6.3.2 Rendimientos de la fermentación

Se calcularon los rendimientos de las fermentaciones (Fig. 23) empleando ambas estrategias de cultivo, encontrando que la estrategia de cultivo por auto-inducción tuvo un mejor ($Y_{x/s}$), pudiendo deberse a que el medio de cultivo auto-inductor contiene glucosa como fuente de carbono y a que el tiempo de fermentación fue del doble.

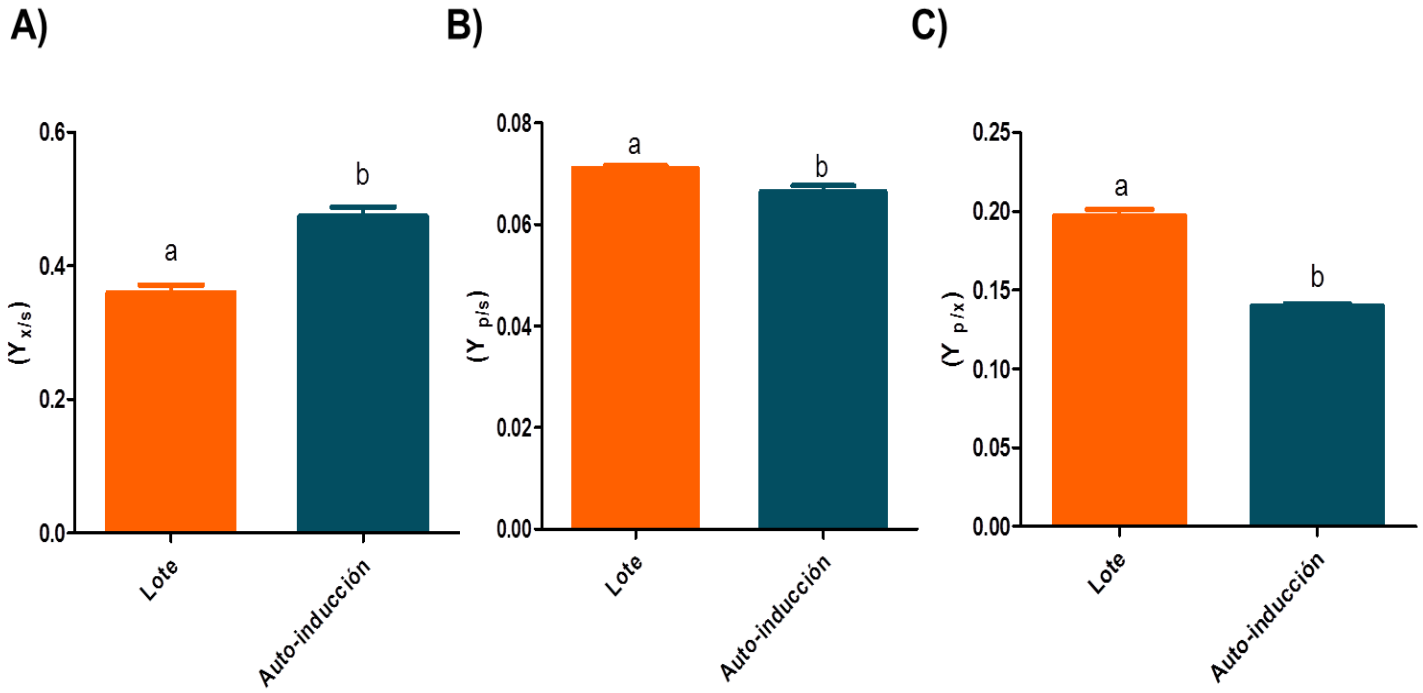


Figura 23. Rendimientos de la fermentación. A) Rendimiento biomasa/sustrato (g de biomasa/g de medio de cultivo), **B)** rendimiento producto/sustrato (g de PodC/g de medio de cultivo), **C)** rendimiento PodC/biomasa (g de PodC/g de biomasa).

No obstante, el cultivo por lote mostró mejores ($Y_{p/s}$) y ($Y_{p/x}$), lo cual fue una sorpresa ya que se esperaba que el cultivo auto-inductor mostrara mejores

rendimientos de cultivo. Además se evaluaron la q_s y la Q_p (Fig. 24), al igual que los rendimientos que involucraban al producto, el cultivo por lote obtuvo mejores resultados, lo que indica que el mejor tipo de cultivo para la producción de PodC es el cultivo por lote, lo que nos indica que la hipótesis que nos habíamos planteado inicialmente no fue correcta. Esto podría deberse a que uno de los objetivos de emplear el cultivo por auto-inducción es alcanzar altas densidades celulares alcanzando la saturación del medio a las 24 h de cultivo a DO= 12 (Studier, 2005b). Sin embargo, la saturación del medio a las 24 h de nuestro cultivo fue DO=2.186±0.018 la cual fue muy similar a la del medio LB a las 12 h a DO= 2.057±0.032. Studier, (2005) observó que la aireación también era importante para alcanzar altas densidades celulares y producción de la proteína objetivo empleando el cultivo por auto-inducción a nivel matraz, además (Mayer *et al*., 2014) emplean una agitación que aumenta de 536 a 1000 rpm. Por lo que la agitación que empleamos (200 rpm) pudo haber afectado negativamente al cultivo.

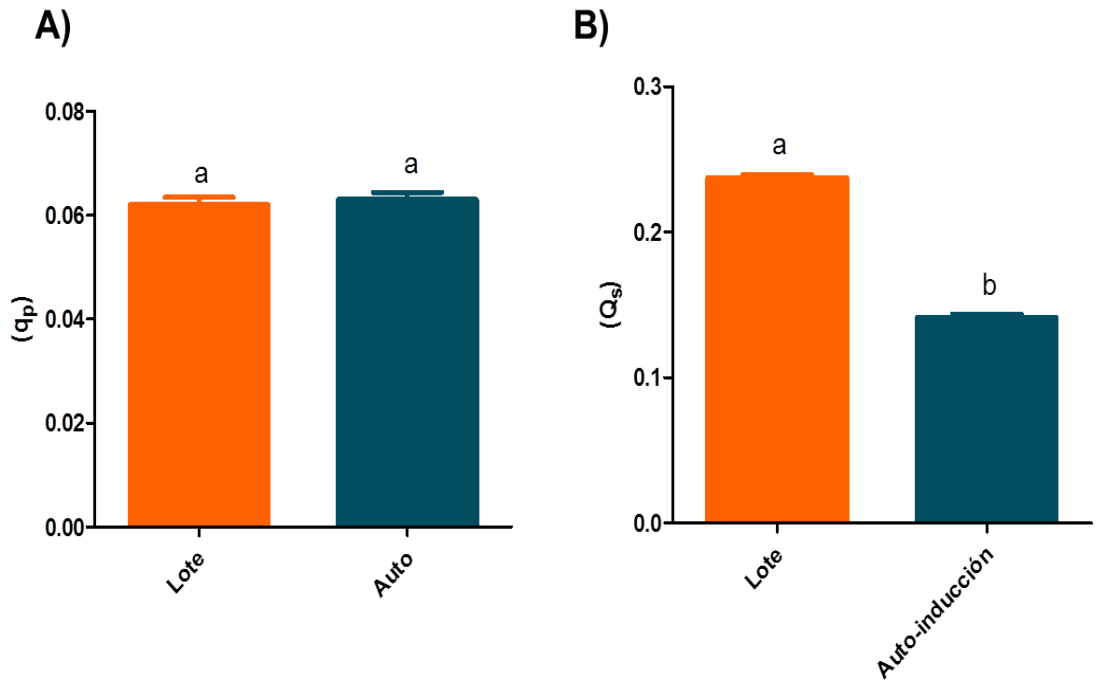


Figura 24. q_p y Q_s de los cultivos en biorreactor. A) Velocidad de formación de producto (h^{-1}), **B)** productividad volumétrica (g/L h^{-1}).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos de cultivo empleados en la q_p, lo que podría indicar que la velocidad de formación de PodC es independiente al método de cultivo empleado para la producción de PodC.

6.3.3 Proceso de producción de PodC río debajo de la fermentación

El proceso de producción de PodC río abajo implica el aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión (Fig. 25), el replegamiento de PodC soluble y la purificación de la misma. En el Cuadro 9 se muestra la concentración de proteína en cada uno de los pasos. Cerca del 30% de la proteína total corresponde a la producción de PodC, lo cual es 10% mayor a la producción de HRP en *E. coli* (Lin *et al*., 1999). En cuanto a la producción de PodC únicamente se había reportado el rendimiento al final del bioproceso de 36 mg/L (Pliego-Arreaga *et al*., 2013), en comparación con el cual, el rendimiento final de los cultivos por lote (84.84±0.84 mg/L) y por auto-inducción (175.4±1.39 mg/L) fueron significativamente mayores (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de proteína a lo largo del proceso de producción

Cultivo por lote			Cultivo por autoinducción		
Muestra (Lisado celular)	Proteína (g/L)	Rendimiento (%)	Muestra (Lisado celular)	Proteína (g/L)	Rendimiento (%)
Total	10.19±0.14	100	Total	11.85±0.21	100%
PodC[a*]	2.845±0.015	27.92	PodC[a*]	3.395±0.044	28.64
PodC-R[b]	0.600±0.014	21.09	PodC-R[b]	0.702±0.022	20.68
PodC-P[c]	0.084±0.010	2.96	PodC-P[c]	0.175±0.014	5.16

[a] Cuantificado con el kit de ELISA His-tag protein, [b] PodC replegada, [c] PodC purificada, * Se tomó como el 100% de proteína recombinante para calcular los porcentajes de PodC-R y PodC-P.

Sin embargo, en el proceso de solubilización y purificación de la proteína se perdió cerca del 96% de proteína recombinante durante ambos tipos de cultivo, por lo que sería importante realizar una optimización tanto para el proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión como de la purificación para maximizar los rendimientos del proceso. En el análisis SDS-PAGE del aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión (Fig. 25) se observa que bajo las condiciones de solubilización una cantidad significativa de PodC continúa siendo insoluble al final del proceso.

La actividad de PodC se evaluó en dos puntos del proceso: después del replegamiento y después de la purificación (Cuadro 10), encontrando que la actividad de PodC era 2.8 veces mayor, en ambas etapas del proceso de producción, cuando había sido producida por cultivo en lote, por lo cual se recomienda continuar la producción de PodC empleando esta estrategia de cultivo.

Cuadro 10. Actividad peroxidasa de PodC (U/mg)

Cultivo por lote		**Cultivo por auto-inducción**	
Replegada	Purificada	Replegada	Purificada
138.22±4.89	911.63±8.009	49.51±0.169	323±2.509

La actividad de PodC-R sin purificar de ambos cultivos, fue menor a lo reportado por Pliego-Arriaga *et al*. (2013) de 265.79 U/mg, no obstante, los valores de PodC purificada producida por cultivo en lote fueron comparables a los reportados anteriormente de 1004.6 (U/mg), logrando obtener una mayor cantidad de PodC con una actividad específica similar a lo anteriormente reportado (Pliego-Arriaga *et al*., 2013).

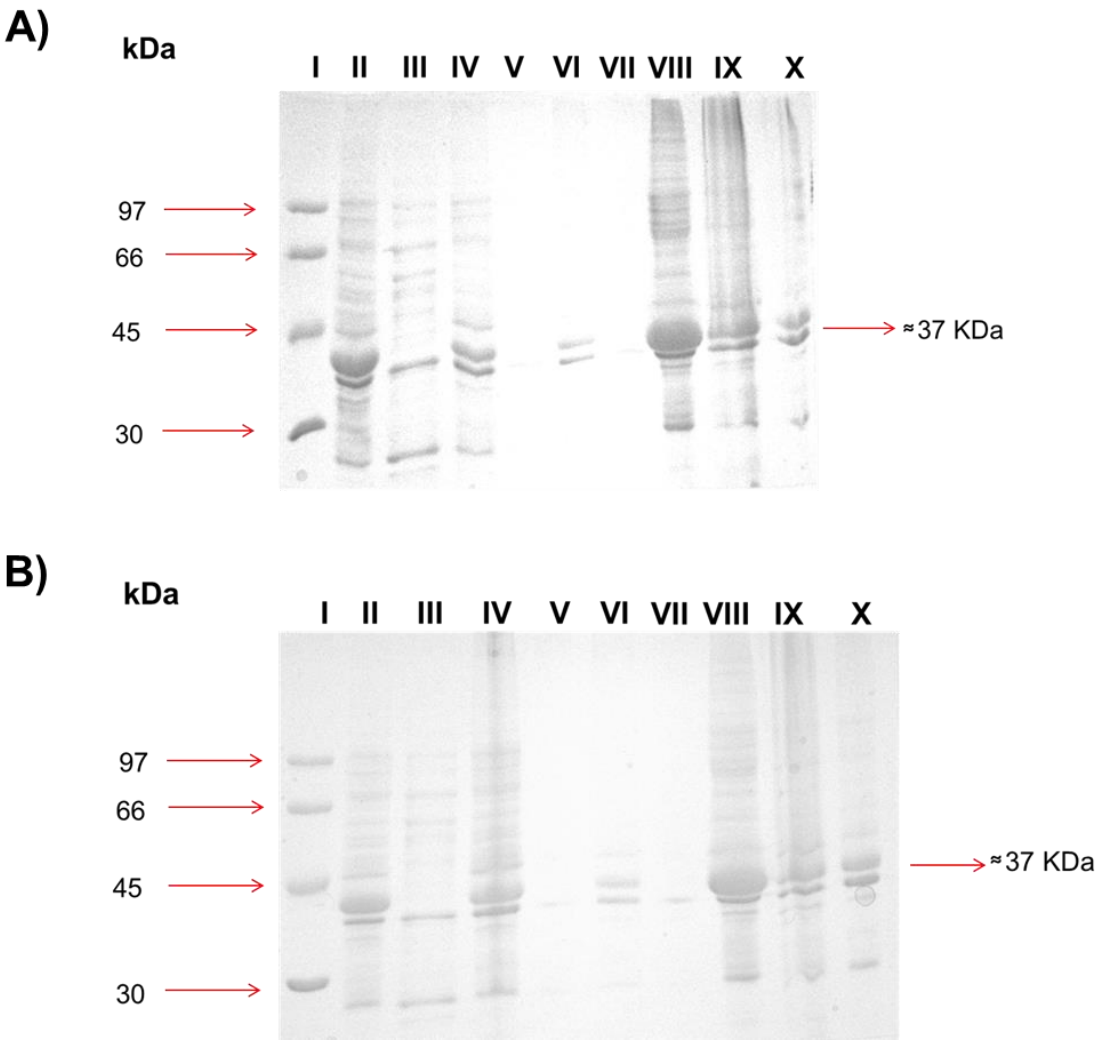


Figura 25. SDS-PAGE del proceso de solubilización de la PodC. A) Proceso de solubilización de PodC producida por lote. **B)** proceso de solubilización de PodC producida por auto-inducción. Carriles: **I,** marcador de bajo peso molecular (LMW Ahmersam, GE); **II,** lisado celular; **sobrenadante: III,** lisado; **V,** lavado 1; **VII,** lavado 2; **IX,** PodC soluble; **pastilla: IV,** lisado; **VI,** lavado 1; **VIII,** lavado 2; **X,** PodC insoluble.

CONCLUSIONES

La lactosa es el mejor inductor para la producción de PodC recombinante debido a su capacidad para mejorar los parámetros cinéticos y ser un inductor igualmente eficiente al IPTG.

La suplementación del medio de cultivo LB con glucosa y $MgSO_4$ mejora la μ y el t_d de la cepa transformante, no obstante, la suplementación no es necesaria a nivel biorreactor, ya que se obtienen valores semejantes a los obtenidos en matraz con medio LB suplementado, lo cual puede deberse a que los fenómenos de transferencia se llevan a cabo de una manera más apropiada en el biorreactor.

El mejor método de cultivo para la producción de PodC recombinante es el cultivo por lote, ya que tuvo un mejor desempeño que el cultivo por auto-inducción, causado probablemente a la ineficiencia del medio ZYM-5052 para alcanzar altas densidades celulares.

Es necesario realizar la optimización de los procesos de solubilización y purificación de PodC para mejorar los rendimientos finales del proceso.

Bibliografía

Agostini, E., S. M. de Forchetti y H. A. Tigier. 1997. Production of peroxidases by hairy roots of *Brassica napus*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 47:177–182.

Asad, S., K. Khajeh y N. Ghaemi. 2011. Investigating the structural and functional effects of mutating Asn glycosylation sites of horseradish peroxidase to Asp. Appl. Biochem. Biotechnol. 164:454–463.

Aucoin, M. G., V. McMurray-Beaulieu, F. Poulin, E. B. Boivin, J. Chen, F. M. Ardelean, M. Cloutier, Y. J. Choi, C. B. Miguez y M. Jolicoeur. 2006. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. Microb. Cell Factories 5:27.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Morre, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Sruhl. 2003. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc.

Azevedo, A. M., V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinović, J. M. S. Cabral y L. P. Fonseca. 2003. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. In: Biotechnology Annual Review. Vol. 9. Elsevier. p. 199–247.

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 10:411–421.

Borirak, O., M. Bekker, y K. J. Hellingwerf. 2014. Molecular physiology of the dynamic regulation of carbon catabolite repression in *Escherichia coli*. Microbiology 160:1214–1223.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254.

Broedel Jr, S. E., S. M. Papciak, y W. R. Jones. 2001. The selection of optimum media formulations for increased yield of recombinant proteins in *E. coli*. Tech. Bull. Athena Enzyme Syst. Group 2:2–6.

Cárcamo, M., P. Saa, J. Torres, S. Torres, P. Mandujano, J. R. P. Correa y E. Agosin. 2014. Effective dissolved oxygen control strategy for high-cell-density cultures. Lat. Am. Trans. IEEE Rev. IEEE Am. Lat. 12:389–394.

Carneiro, S., E. C. Ferreira y I. Rocha. 2013. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 164:396–408.

Castaño-Cerezo, S., V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer y M. Cánovas. 2014. Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Nε-lysine acetylation. Appl. Microbiol. Biotechnol.:1–13.

Celebi, M., M. A. Kaya, M. Altikatoglu y H. Yildirim. 2013. Enzymatic decolorization of anthraquinone and diazo dyes using horseradish peroxidase enzyme immobilized onto various polysulfone supports. Appl. Biochem. Biotechnol. 171:716–730.

Christensen, M. L. y N. T. Eriksen. 2002. Growth and proton exchange in recombinant *Escherichia coli* BL21. Enzyme Microb. Technol. 31:566–574.

Dekel, E. y U. Alon. 2005. Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. Nature 436:588–592.

Deutscher, J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 11:87–93.

Diao, M., N. Ouédraogo, L. Baba-Moussa, P. W. Savadogo, A. G. N'Guessan, I. H. N. Bassolé y M. H. Dicko. 2011. Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. Biodegradation 22:389–396.

Donovan, R. S., C. W. Robinson y B. R. Glick. 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.

Donovan, R. S., C. W. Robinson y B. R. Glick. 2000. Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under the transcriptional control of the *Escherichia coli* lac promoter. Can. J. Microbiol. 46:532–541.

Doran, P. M. 2002. Properties and applications of hairy-root cultures. In: Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker Inc., New York.

Duarte-Vázquez, M. A., B. E. García-Almendárez, C. Regalado y J. R. Whitaker. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. Var. purple top white globe) roots. J. Agric. Food Chem. 49:4450–4456.

Duarte-Vázquez, M. A., M. A. Ortega-Tovar, B. E. García-Almendarez y C. Regalado. 2003. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. J. Chem. Technol. Biotechnol. 78:42–47.

Eames, M. y T. Kortemme. 2012. Cost-benefit tradeoffs in engineered lac operons. Science 336:911–915.

Eiteman, M. A. y E. Altman. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. Trends Biotechnol. 24:530–536.

Furtmüller, P. G., M. Zederbauer, W. Jantschko, J. Helm, M. Bogner, C. Jakopitsch y C. Obinger. 2006. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. Arch. Biochem. Biophys. 445:199–213.

Gajhede, M., D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith y T. L. Poulos. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 A ° resolution. Nat. Struct. Biol. 4:1032–1038.

González-Rábade, N., M. del Carmen Oliver-Salvador, E. Salgado-Manjarrez y J. A. Badillo-Corona. 2012. In vitro production of plant peroxidases—A review. Appl. Biochem. Biotechnol. 166:1644–1660.

Görke, B. y J. Stülke. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Nat. Rev. Microbiol. 6:613–624.

Groves, J. T. y N. C. Boaz. 2014. Fishing for peroxidase protons. Science 345:142–143.

Hamid, M. y Khalil-ur-Rehman. 2009. Potential applications of peroxidases. Food Chem. 115:1177–1186.

Hoffmann, F. y U. Rinas. 2004. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: Physiological Stress Responses in Bioprocesses. Vol. 89. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 73–92.

van Huystee, R. B., M. R. Roig, V. L. Shnyrov y I. Y. Sakharov. 2004. Peroxidase stability related to its calcium and glycans. Phytochem. Rev. 3:19–28.

van Huystee, R. B., Y. Sun y B. Lige. 2002. A retrospective look at the cationic peanut peroxidase structure. Crit. Rev. Biotechnol. 22:335–354.

Jonasson, P., S. Liljeqvist, P.-A. Nygren y S. Ståhl. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. 35:91–105.

Kilikian, B. V., I. D. Suárez, C. W. Liria y A. K. Gombert. 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. Process Biochem. 35:1019–1025.

Kim, S., L. H. Cheung, W. Zhang y M. G. Rosenblum. 2007. Improved expression of a soluble single chain antibody fusion protein containing tumor necrosis factor in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:99–106.

Kopito, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. 10:524–530.

Krainer, F. W. y A. Glieder. 2015. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99:1611–1625.

Krainer, F. W., R. Pletzenauer, L. Rossetti, C. Herwig, A. Glieder y O. Spadiut. 2014. Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 95:104–112.

Kremling, A., J. Geiselmann, D. Ropers y H. de Jong. 2015. Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. Trends Microbiol. 23:99–109.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavege of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.

Lara, Á. R. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Rev. Mex. Ing. Quím. 10:209–223.

Leone, S., F. Sannino, M. L. Tutino, E. Parrilli y D. Picone. 2015. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. Microb. Cell Factories 14.

Lewis, M. 2013. Allostery and the *lac* Operon. J. Mol. Biol. 425:2309–2316.

Lin, Z., T. Thorsen y F. H. Arnold. 1999. Functional expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution. Biotechnol. Prog. 15:467–471.

Marbach, A. y K. Bettenbrock. 2012. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. J. Biotechnol. 157:82–88.

Marini, G., M. D. Luchese, A. P. C. Argondizzo, A. C. M. A. de Góes, R. Galler, T. L. M. Alves, M. A. Medeiros y A. L. Larentis. 2014. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. BMC Biotechnol. 14:1.

Maucksch, C., C. Bronwen y R. Carsten. 2013. Plasmid dna concatemers: influence of plasmid structure on transfection efficiency. In: Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors. Wiley-VCH.

Mayer, S., S. Junne, K. Ukkonen, J. Glazyrina, F. Glauche, P. Neubauer y A. Vasala. 2014. Lactose autoinduction with enzymatic glucose release: Characterization of the cultivation system in bioreactor. Protein Expr. Purif. 94:67–72.

Mostovenko, E., A. M. Deelder y M. Palmblad. 2011. Protein expression dynamics during *Escherichia coli* glucose-lactose diauxie. BMC Microbiol. 11:126.

Motamed, S., F. Ghaemmaghami y I. Alemzadeh. 2009. Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase: Purification and Characterization. Ind. Eng. Chem. Res. 48:10614–10618.

Novy, R., D. Drott, K. Yaeger y R. Mierendorf. 2011. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. inNovations 12.

O'Brien, P. J. 2000. Peroxidases. Chem. Biol. Interact. 129:113–139.

Ortiz de Montellano, P. R. 2010. Catalytic mechanisms of heme peroxidases. In: Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer, Alemania.

Passardi, F., N. Bakalovic, F. K. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, C. Penel y C. Dunand. 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. Genomics 89:567–579.

Passardi, F., C. Cosio, C. Penel y C. Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep. 24:255–265.

Passardi, F., D. Longet, C. Penel y C. Dunand. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plant. Phytochemistry 65:1879–1893.

Pei, X.-L., Q.-Y. Wang, C.-L. Li, X.-F. Qiu, K.-L. Xie, L.-F. Huang, A.-M. Wang, Z.-W. Zeng y T. Xie. 2011. Efficient production of a thermophilic 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli* by continuous lactose induction strategy. Appl. Biochem. Biotechnol. 165:416–425.

Pliego-Arreaga, R., C. Regalado, A. Amaro-Reyes y B. E. García-Almendárez. 2013. Lactose-induced expression of recombinant turnip peroxidase in *Escherichia coli*. Rev. Mex. Ing. Quím.

Poulos, T. L. 2014. Heme enzyme structure and function. Chem. Rev. 114:3919–3962.

Quintanilla-Guerrero, F., M. A. Duarte-Vázquez, R. Tinoco, M. Gómez-Suárez, B. E. García-Almendárez, R. Vazquez-Duhalt y C. Regalado. 2008. Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. J. Agric. Food Chem. 56:8058–8065.

Regalado, C., B. Almendárez-García y M. A. Duarte-Vázquez. 2004. Biotechnological applications of peroxidases. Phytochem. Rev. 3:243–256.

Reyes de Corcuera, J. I. y R. P. Cavalieri. 2003. Encyclopedia of agricultural, food, and biological engineering. Marcel Dekker Inc., New York.

Riedel, T. E., W. M. Berelson, K. H. Nealson y S. E. Finkel. 2013. Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions. Appl. Environ. Microbiol. 79:4921–4931.

Rodríguez-Cabrera, N. A., C. Regalado y B. E. García-Almendárez. 2011. Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase. J. Agric. Food Chem. 59:7120–7126.

Romero-Gómez, S., M. A. Duarte-Vázquez, B. E. García-Almendárez, L. Mayorga-Martínez, O. Cervantes-Avilés y C. Regalado. 2008. A putative peroxidase cdna from turnip and analysis of the encoded protein sequence. Plant Foods Hum. Nutr. 63:157–162.

Rosano, G. L. y E. A. Ceccarelli. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front. Microbiol. 5.

Schmidt, T., K. Friehs y E. Flaschel. 2001. Structures of plasmid DNA. In: Plasmids for Therapy and Vaccination. Wiley-VCH.

Al-Shehbaz, I. A. y S. Fuentes-Soriano. 2012. *Brassicaceae*. Flora Mesoam. 2:1–78.

Shiloach, J. y R. Fass. 2005. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. Biotechnol. Adv. 23:345–357.

Shkryl, Y. N., G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov, T. V. Avramenko, E. A. Günter, Y. S. Ovodov, T. I. Muzarok y Y. N. Zhuravlev. 2013. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rolB gene of Agrobacterium rhizogenes. J. Biotechnol. 168:64–70.

Silva, F., J. A. Queiroz y F. C. Domingues. 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. Biotechnol. Adv. 30:691–708.

Sivashanmugam, A., V. Murray, C. Cui, Y. Zhang, J. Wang y Q. Li. 2009. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Protein Sci. 18:936–948.

Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expr. Purif. 41:207–234.

Su, L., R. Hong y J. Wu. 2015. Enhanced extracellular expression of gene-optimized *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia coli* by optimization of induction strategy. Process Biochem.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier.

Ukkonen, K., S. Mayer, A. Vasala y P. Neubauer. 2013. Use of slow glucose feeding as supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. Protein Expr. Purif. 91:147–154.

Vdovenko, M. M., C.-T. Hung, I. Y. Sakharov y F.-Y. Yu. 2013. Determination of okadaic acid in shellfish by using a novel chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay method. Talanta 116:343–346.

Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry 65:249–259.

Wang, H., F. Wang, W. Wang, X. Yao, D. Wei, H. Cheng y Z. Deng. 2014. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: An Alkaline pH Shift Approach. PLoS ONE 9:e112777.

Wong, W. W. y J. C. Liao. 2009. Microbial maximal specific growth rate as a square-root function of biomass yield and two kinetic parameters. Metab. Eng. 11:409–414.

Zámocký, M. y C. Obinger. 2010. Molecular phylogeny of heme peroxidases. In: Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer, Alemania.

Anexo

A. Tabla de símbolos empleados

Símbolo	Significado
μ (h^{-1})	Constante de velocidad de crecimiento
t_d (h)	Tiempo de duplicación
$(Y_{x/s})$	Coeficiente de rendimiento de biomasa/sustrato
$x_{máx}$	Biomasa producida durante la fermentación
$(Y_{p/s})$	Coeficiente de rendimiento de producto/sustrato
$(Y_{p/x})$	Coeficiente de rendimiento de producto/biomasa
(q_s)	Velocidad específica de consumo de sustrato
(Q_s)	Productividad volumétrica
%T	$\frac{g\ de\ acrilamida + g\ de\ bisacrilamida}{volumen\ total\ (mL)} X\ 100$
%C	$\frac{g\ de\ bisacrilamida}{g\ de\ acrilamida + g\ de\ bisacrilamida}\ x\ 100$

B. Protocolo para realizar geles electroforéticos mediante el método de Laemmli (Ausubel *et al*., 2003)

1. Ensamblar firmemente las láminas de vidrio en el soporte con abrazaderas y verificar que no haya fuga de líquidos.

2. Preparar las soluciones para el gel separador de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 5. *El porcentaje de acrilamida en el gel separador depende del peso molecular de la proteína de interés. Generalmente se emplean geles al 5% para proteínas de 60-200 kDa, geles al 10% para proteínas con peso molecular entre 16-70 kDa y geles al 15% para proteínas con peso molecular entre 12 y 45%.*

3. Empleando una punta limpia para micropipeta se agrega 1 mL de agua saturada con isobutanol. *El agua saturada con isobutanol se prepara mezclandoo agua e isobutanol mediante agitación en un embudo de separación. Se deja reposar y la fase acuosa (fase inferior) se retira. El proceso debe repetirse varias veces. El agua saturada con isobutanol es la fase superior obtenida en el último proceso.* Dejar polimerizar el gel de 30-40 min.

4. Eliminar el isobutanol y lavar con Tris-HCL pH 8.8.

5. Preparar el gel concentrador de acuerdo al Cuadro 5. Agregar la solución al molde para gel, evitando la introducción de burbujas de aire, y colocar el peine para formar los carriles. Dejar polimerizar de 30-40 min.

6. Diluir una alícuota de la muestra de proteína 1:1 (v/v) con amortiguador de muestra 2X SDS y calentar de 3 a 5 min a 100°C. Para preparar muestras precipitadas de proteína disolver el pellet en 50-100 µL de amortiguador de carga 1X.

7. Remover el peine con cuidado, enjuagar con Tris-HCL pH 8.8 y agregar amortiguador de corrida 1X.

8. Colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenar con amortiguador de corrida 1X.

9. Cargar las muestras en los carriles del gel empleando puntas diferentes para micropipeta para cada una de las diferentes muestras.

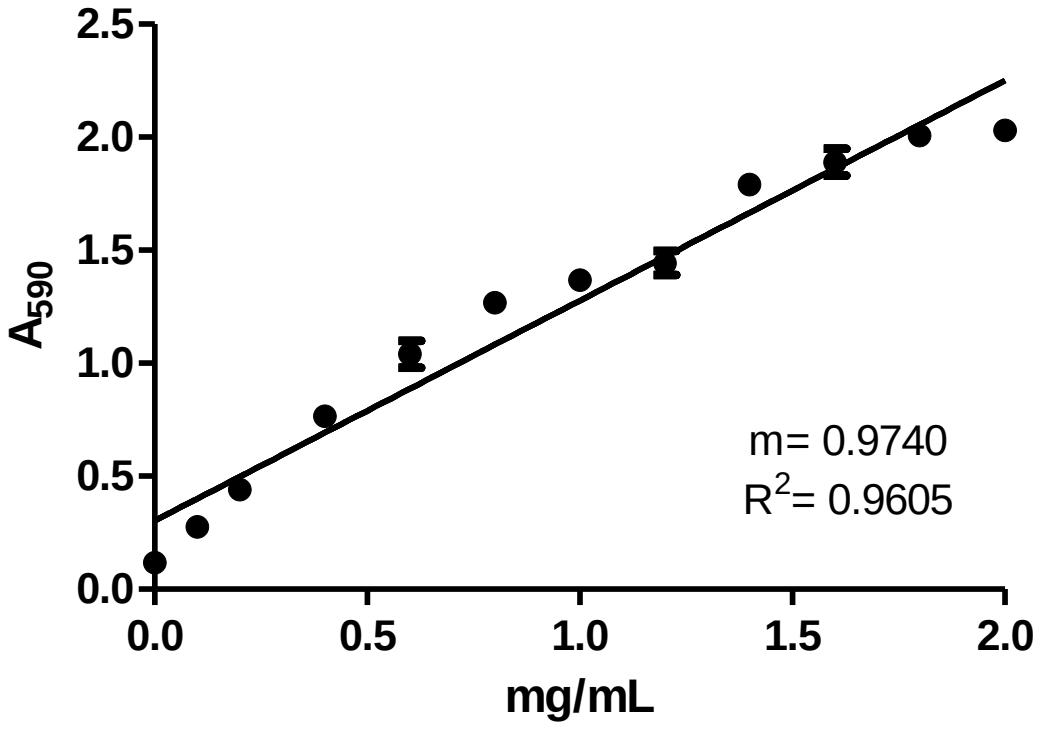
10. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder y correr a 10 mA (constante) hasta que el azul de bromofenol entre al gel separador. Posteriormente incrementar la corriente a 15 mA y correr hasta que el azul de bromofenol haya alcanzado el fondo del gel.

11. Desconectar la fuente de energía, eliminar el amortiguador de corrida. *El gel puede teñirse con azul de Coomassie o plata, también puede ser transferido a una membrana para secuenciación o inmunoensayos.*

C. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Si no se conoce la concentración aproximada de la muestra, se realizaron una serie de diluciones (1, 1/10, 1/100,1/1000) y se prepararon duplicados para cada una de las muestras. Agregar 5 mL del reactivo para teñir proteínas (100 mg de azul de Coomassie, 50 mL de etanol al 95%, 100 mL de ácido fosfórico, se aforó con agua destilada hasta obtener 1 L y se filtró en papel Whatman® no.1) a cada tubo de ensayo y se mezcló por inmersión o en un vórtex, evitando la formación de espuma. Posteriormente las muestras se midieron a A_{595nm}. Para obtener la concentración de proteína en la muestra se realizó una curva estándar de seroalbúmina.

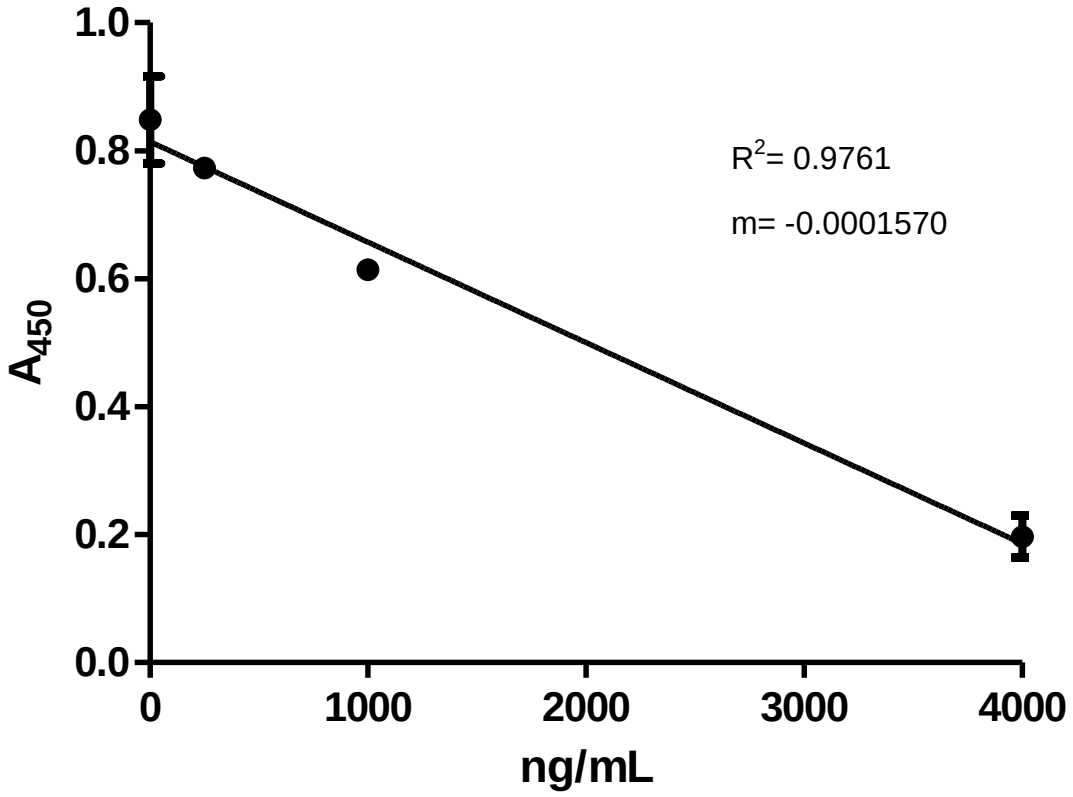
A continuación se muestra una de las curvas estándar con las que se interpolaron los valores desconocidos de concentración de proteína, empleando el programa GraphPad Prism v.5.



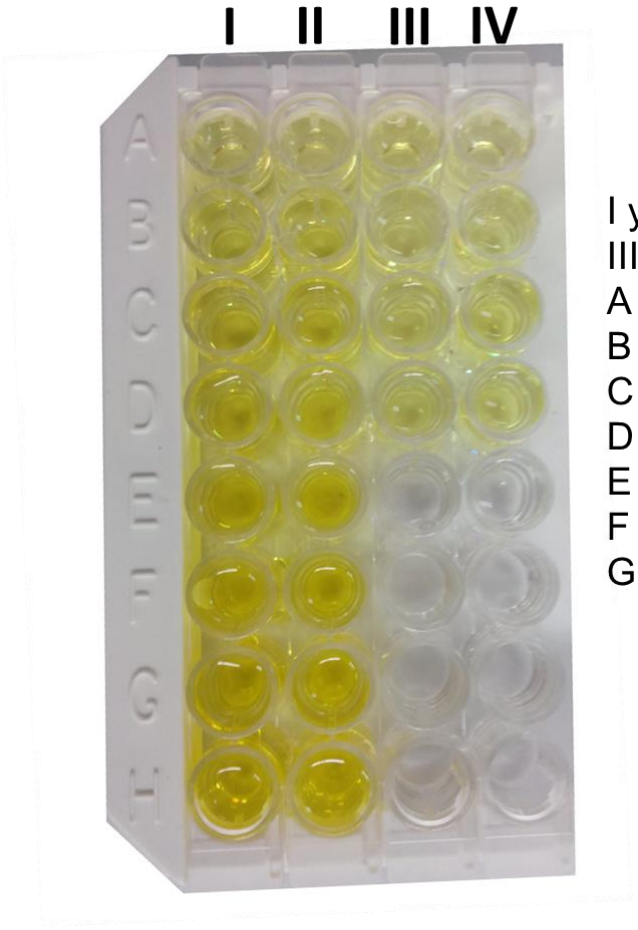
D. Cuantificación de proteína con el kit de ELISA His-Tag Protein

Para poder emplear el kit para cuantificación de proteínas con cola de histidinas es necesario conocer antes la concentración de proteína total de la muestra. Si la concentración era desconocida se cuantificó mediante Bradford. La concentración que se colocó en la reacción de ELISA se diluyó para tener una concentración de 0.01 mg/mL. Para conocer la concentración de proteína con cola de histidinas se interpolaron los valores de absorbancia con una curva patrón, empleando el programa GraphPad Prism v.5.

A continuación se muestra una de las curva estándar generadas.



A continuación se muestra una imagen representativa de la microplaca donde se llevó a cabo el ensayo ELISA. A medida que la absorbancia aumenta la cantidad de proteína recombinante en la muestra disminuye.



I y II = Curva de calibración
III y IV = Muestra y controles negativos
A III y IV = Lote 1
B III y IV = Lote 2
C III y IV = Auto-inducción 1
D III y IV = Auto-inducción 2
E III y IV = Lisado sin inducir
F III y IV = Control negativo
G III, IV y H III y IV = pozos vacíos