



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

**Optimización de la expresión de una proteína de amaranto con
propiedades antihipertensivas en *Escherichia coli***

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Jocksan Ismael Morales Camacho

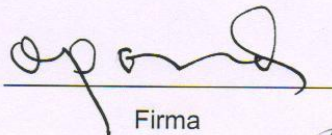
Dirigido por

Dr. Octavio Paredes López

SINODALES

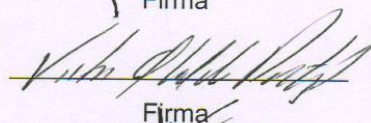
Dr. Octavio Paredes López

Presidente


Firma

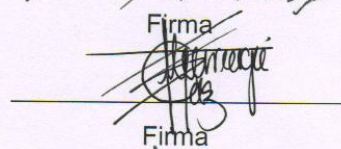
Dr. Víctor Olalde Portugal

Secretario


Firma

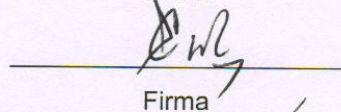
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal


Firma

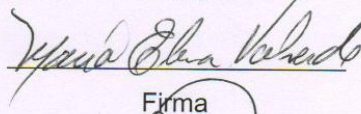
Dr. Carlos Regalado González

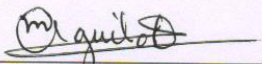
Suplente

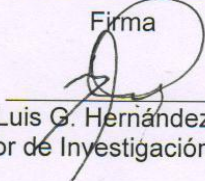

Firma

Dra. María Elena Valverde González

Suplente


Firma


QB. Magali E. Aguilar Ortíz
Director de la Facultad de Química


Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**Optimización de la expresión de una proteína de amaranto con
propiedades antihipertensivas en *Escherichia coli***

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Presenta

I.A. Jocksan Ismael Morales Camacho

Director de Tesis

Dr. Octavio Paredes López

Santiago de Querétaro, Qro., Octubre 2011.

RESUMEN

La modificación proteica es una alternativa para generar proteínas con aplicaciones terapéuticas. En nuestro laboratorio se modificó la subunidad ácida de la amarantina con péptidos antihipertensivos (ACM3) y se expresó en la cepa *Escherichia coli* Rosetta (DE3). En esta investigación se sobreexpresó la proteína ACM3 a nivel fermentador en la misma cepa mediante el control de diferentes factores: la composición del medio de cultivo, los inductores (IPTG o lactosa), el flujo de aire, la temperatura del cultivo, la agitación y la hora de la inducción. El objetivo de este trabajo fue optimizar la expresión de ACM3 en *Escherichia coli* Rosetta utilizando medios mínimos y lactosa como inductor.

Las fermentaciones a nivel matraz mostraron que los medios mínimos A6 y A7 en combinación con el 0.5% (p/v) de lactosa permitieron la acumulación de la proteína recombinante. Entonces, para mejorar los rendimientos de ACM3 a nivel fermentador se probaron los medios A6 y A7, el inductor lactosa y diferentes condiciones fisicoquímicas. Los experimentos se realizaron mediante un diseño Plackett-Burman con puntos centrales para observar factores con efectos significativos.

Los factores significativos en A6 fueron la peptona, el pH, la agitación y la inducción con lactosa. En el medio A7, la concentración de ACM3 fue afectada por la triptona, la agitación, la inducción con lactosa, el momento y la temperatura de inducción. Así, los factores se ajustaron según los resultados del análisis estadístico y los rendimientos de ACM3 se incrementaron de 303.2 a 1,531 mg/L en el medio A6 y de 363.4 a 1,681 mg/L en el medio A7. La mayor productividad se alcanzó en 4 h (~190 mg/L·h) y 6 h (~203 mg/L·h) de inducción en los medios A6 y A7, respectivamente. El efecto antihipertensivo de la proteína ACM3 que se expresó en los medios A6 y A7 se observó en ensayos *in vitro* por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina que mostró un IC₅₀ de 0.043 mg/mL y 0.041 mg/mL, respectivamente. Entonces, la expresión de ACM3 en diferentes medios no generó diferencias significativas en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ($P \geq 0.05$).

(Palabras clave: *Escherichia coli* Rosetta, lactosa, péptidos antihipertensivos)

SUMMARY

Protein modification is an alternative for creating proteins with therapeutic applications. In our laboratory an acid sub-unit of amaranthine with anti-hypertensive peptides (ACM3) was modified and expressed in the Rosetta *Escherichia coli* (DE3) strain. In this research the ACM3 protein at a fermenting level was over-expressed in the same strain by controlling different factors: composition of the culture, inductors (IPTG or lactose) air flow, culture temperature, speed agitation and time induction. The objective of this work was to optimize the ACM3 expression in Rosetta *Escherichia coli* using minimum media and lactose as an inductor. Fermentations at flask level showed that the A6 and A7 minimum media in combination with 0.5% (w/v) lactose allowed for the accumulation of the recombinant protein. Then, to improve the yields of ACM3 at fermenting level, the A6 and A7 media, lactose inductor and different physicochemical conditions were tested. The experiments were carried out using a Plackett-Burman design with central points to observe factors with significant effects. The significant factors in A6 were peptone, the pH, speed agitation and lactose induction. In medium A7, the concentration of ACM3 was affected by tryptone, speed agitation, lactose induction and time and temperature of induction. The factors were adjusted according to the results of the statistical analysis, and the yields of ACM3 increased from 303.2 to 1,531 mg/L in medium A6 and from 363.4 to 1,681 mg/L in medium A7. The greatest productivity was reached in 4 h (~190 mg/L·h) and 6 h (~203 mg/L·h) of induction in the A6 and A7 media, respectively. The anti-hypertensive effect of the ACM3 protein expressed in the A6 and A7 media was observed in *in vitro* trials through the inhibition of the angiotensin converting enzyme that showed an IC₅₀ of 0.043 mg/mL and 0.041 mg/mL, respectively. Thus the ACM3 expression in different media did not create significant differences in angiotensin converting enzyme inhibition ($P \geq 0.05$).

(Key words: Rosetta *Escherichia coli*, lactose, anti-hypertensive peptides)

DEDICATORIAS

A **mí esposa** que con su apoyo, aliento, amor y complicidad me ha ayudado a conseguir una meta más en mí vida. A **mí mamá**, por su amor y el ejemplo de vida que a lo largo de estos años me ha brindado. Al **Sr. Humberto Minto** y la **Sra. Carmen García**, por el apoyo brindado en todo momento. A mis hermanos **Abí, Salma, Líz y Beto** que siempre han estado conmigo. Y a todos los niños, **Abner, Vane, Abí, Jagdiel, Kehila, Josue y Raciél**, cuya alegría y ocurrencias provocan que la vida sea más divertida. A **mí papá** que en todo momento está en mí mente y corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Octavio Paredes López, por brindarme la oportunidad de experimentar en los laboratorios que están bajo su dirección.

A la Dra. María Elena Valverde, por la revisión del presente documento y por sus comentarios para mejorarlo.

A los Doctores que forman parte del comité, por sus comentarios para enriquecer esta investigación.

A mis amigas Tania, Miriam, Rosa y Edith, por sus consejos y todos los momentos que compartimos durante mi estancia en el Cinvestav.

A a todos los compañeros de la UAQ, en especial a Fer, Vero, Yuli, Esaú, Caro y Luis por su amistad.

A Talía, Carmelita y Laurita, por la disposición y ayuda en todos los procesos.

A la planta docente del PROPAC, por compartir sus conocimientos y ser parte de mi proceso de aprendizaje.

A todas las personas y amigos que escapan de mi mente, pero que en algún momento han sido parte de mi formación profesional y humana.

Al Conacyt, por la beca que me ayudó a sostener los estudios de posgrado.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato y la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la asesoría y dirección del Dr. Octavio Paredes López.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. Enfermedades crónico-degenerativas	3
1.1. Las enfermedades cardiovasculares: la hipertensión arterial	4
2. Sustancias Nutraceuticas	6
2.1. Los péptidos bioactivos	8
2.1.1. Péptidos con actividad opioide	9
2.1.2. Péptidos con actividad antimicrobiana e inmunomodulante	10
2.1.3. Péptidos con actividad hipocolesterolemica	10
2.1.4. Péptidos con actividad antitrombótica	11
2.1.5. Péptidos con actividad antioxidante	12
2.1.6. Los péptidos antihipertensivos	13
2.1.6.1. Mecanismo de acción de los péptidos antihipertensivos	15
3. El amaranto	16
3.1. La amarantina	17
4. Procesos fermentativos	20
5. Sistemas de expresión: <i>E.coli</i>	24
6. Expresión y mejoramiento de proteínas recombinantes	26
7. Factores implicados en la expresión proteica	29
7.1. Regulación de la transcripción del operón <i>lac</i>	29
7.2. Efecto de la concentración de inductor	31
7.3. Efecto de la temperatura	34
7.4. Composición del medio de cultivo	34

7.5. El momento y duración de la inducción	35
8. Herramientas estadísticas para la mejora de un proceso	36
9. Escalamiento de la expresión de proteínas	37
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. OBJETIVOS	40
1. Objetivo general	40
2. Objetivos específicos	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Microorganismo y condiciones de cultivo	42
2. Expresión de la proteína a nivel analítico	42
2.1. Medios de cultivo	42
2.2. Agente Inductor	44
3. Expresión de la proteína a nivel fermentador	44
4. Análisis y diseño estadístico de los experimentos	46
5. Análisis de la proteína recombinante	48
5.1. Electroforesis	48
5.2. Análisis tipo Western <i>blot</i>	49
5.3. Cuantificación de proteína	50
6. Purificación de la proteína recombinante	51
6.1. Proteínas solubles e insolubles	51
6.2. Saturación con sulfato de amonio	52
6.3. Purificación por electroelución	53
6.4. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés	53
7. Evaluación de la actividad inhibitoria que posee la proteína recombinante sobre la enzima convertidora de angiotensina I (IECA)	54
7.1. Digestión enzimática	54
7.2. Determinación del IC ₅₀ sobre la ECA	55
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
1. Expresión a nivel matraz	57
2. Expresión a nivel fermentador con el medio de cultivo A6	61
2.1. Análisis estadístico	65
3. Expresión a nivel fermentador con el medio de cultivo A7	69
3.1. Análisis estadístico	72

4. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina con los modelos generados	75
4.1. Análisis de la expresión de proteína en los procesos optimizados	77
5. Purificación de la proteína recombinante	80
5.1. Purificación por electroelución	82
5.1.1. Determinación del punto isoeléctrico	85
6. Determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de angiotensina (IECA)	88
VII. CONCLUSIONES	91
VIII. PERSPECTIVAS	92
IX. BIBLIOGRAFÍA	93

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Cambios en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas en México	4
2	Clasificación de la presión arterial según la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología	5
3	Productos alimenticios con efectos nutracéuticos	7
4	Péptidos bioactivos identificados en diferentes fuentes alimenticias	13
5	Péptidos con actividad antihipertensiva identificados en diferentes fuentes alimenticias	15
6	Productos de interés comercial fabricados mediante procesos fermentativos	21
7	Componentes principales de un fermentador con tanque agitado	23
8	Secuencia de aminoácidos de la subunidad ácida de la amarantina con los péptidos IPP y VYVYVYVY	28
9	Medios de cultivo y composición	43
10	Diseño factorial y tratamientos	44
11	Factores y niveles para el medio A6	45
12	Factores y niveles para el medio A7	46
13	Estructura de tratamientos a nivel fermentador para A6 y A7	48
14	Concentración de la proteína de interés (6 h de inducción)	59
15	Expresión de la subunidad de la amarantina modificada en el medio A6 (24 h de inducción)	64
16	Estimación de efectos de los factores para la expresión a nivel fermentador con el medio A6	65
17	Análisis de varianza para el modelo generado con el medio A6	68
18	Expresión de la subunidad de la amarantina modificada en el medio A7 (24 h de inducción)	70

Cuadro	Descripción	Página
19	Estimación de efectos de los factores para la expresión a nivel fermentador con el medio A7	72
20	Análisis de varianza para el modelo generado con el medio A7	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Distribución de la prevalencia de Hipertensión en México	6
2	Tipos de fermentador	22
3	Esquemas de un fermentador	23
4	Funcionamiento del operón <i>lac</i>	31
5	Estrategia experimental	41
6	Cuantificación por densitómetro	51
7	SDS-PAGE de los tratamientos a nivel fermentador con diferentes medios y agentes inductores	57
8	SDS-PAGE de los tratamientos a nivel fermentador con diferentes medios y agentes inductores	58
9	Expresión a nivel matraz de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos	60
10	Western <i>blot</i> de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos	61
11	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> Rosetta	62
12	Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos a nivel fermentador con el medio A6	63
13	Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada (mg/L) con el medio A6	64
14	Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A6	66
15	Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 6 h de inducción	67
16	Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 24 h de inducción	67
17	Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos a nivel fermentador con el medio A7	69

Figura	Descripción	Página
18	Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A7 (mg/L)	71
19	Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A7	73
20	Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 24 h de inducción	74
21	Optimización de la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada	75
22	Productividad de <i>E. coli</i> para la expresión de la subunidad ácida de la amarantina mediante los modelos optimizados	77
23	Análisis de la expresión de proteína en el medio A6 con el modelo optimizado	78
24	Análisis de la expresión de proteína en el medio A7 con el modelo optimizado	79
25	Proteínas solubles e insolubles en <i>E. coli</i> Rosetta	80
26	Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	81
27	Preparación de muestras proteicas para electroeluir	82
28	Gel de acrilamida electroeluido	83
29	Proceso de purificación de la proteína que se expresó en el medio A6	84
30	Proceso de purificación de la proteína que se expresó en el medio A7	85
31	Punto isoeléctrico (pI) teórico de la subunidad ácida de la amarantina modificada	86
32	pI experimental de la subunidad ácida de la amarantina modificada expresada en el medio A6	87
33	pI experimental de la proteína expresada en el medio A7	88
34	pI experimental de la proteína expresada en el medio A7	89
35	Actividad IECA del captopril y de la subunidad ácida de la amarantina modificada	90

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión se considera un problema de salud a nivel mundial porque es un factor importante para el desarrollo de las enfermedades isquémicas del corazón como infarto al miocardio, aterosclerosis, etc. En México se estima que el 30.8% de la población entre 20 y 69 años de edad tiene este padecimiento. Para la prevención o control de la hipertensión existen fármacos como el captopril o enalapril que provocan reacciones secundarias como tos seca, angioedema, entre otras. En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido dar cuenta de que algunos alimentos contienen sustancias que benefician al ser humano, por ejemplo, proteínas que cuando son hidrolizadas por efecto de la digestión o de la preparación de los alimentos liberan péptidos bioactivos, es decir, sustancias de origen proteico que ejercen cierta actividad biológica en el organismo humano. Se ha reportado que existen péptidos con actividad hipocolesterolémica, opioide, inmunomodulatoria, antihipertensiva, entre otras. Estas sustancias se pueden sintetizar mediante procesos químicos, hidrólisis enzimática o por métodos recombinantes. En efecto, la biotecnología ha permitido la identificación, la síntesis y el aislamiento de este tipo de productos mediante el uso de sistemas de expresión como las bacterias.

En el laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato (Cinvestav) se han desarrollado investigaciones sobre productos de interés nutracéutico. En 1996 se clonó y caracterizó el cDNA de la amarantina, globulina 11S mayoritaria del amaranto (Barba de la Rosa y col., 1996). En el año 2008, Luna-Suárez modificó la subunidad ácida de la amarantina mediante ingeniería de proteínas con la inserción de péptidos antihipertensivos para mejorar las propiedades nutracéuticas de la proteína. Esta proteína modificada se expresó en células de *E. coli* Origami, en esta investigación se obtuvieron niveles de expresión de 200mg/L. Mas tarde, Arano (2010) transformó células de *E. coli* Rosetta con la secuencia de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos y obtuvo 700 mg/L de la proteína recombinante con el medio de cultivo Terrific y la sustancia inductora IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido).

En la presente investigación se optimizó la expresión de la subunidad ácida de la amarantina en *E. coli* Rosetta en medios mínimos y con lactosa como inductor; además se manipularon factores fisicoquímicos a nivel fermentador para incrementar la producción de la proteína. El diseño estadístico del experimento consistió en un diseño Plackett-Burman con la finalidad de identificar los factores más importantes en la expresión de la proteína recombinante. Finalmente, se evaluó la actividad antihipertensiva *in vitro* que posee la proteína recombinante mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Enfermedades crónico-degenerativas

Las enfermedades crónico-degenerativas deterioran progresivamente la salud de las personas. Se dice que estos padecimientos están asociados con un estilo de vida inapropiado, caracterizado por la falta de actividad física o una dieta inadecuada, el envejecimiento y en algunos casos factores hereditarios. Entre las enfermedades crónico-degenerativas más importantes destacan las cardiovasculares, las cerebrovasculares y la diabetes. Los padecimientos crónico-degenerativos son de los principales problemas de salud en todo el mundo porque existe un número elevado de personas con estas enfermedades que, en muchos casos, contribuyen al incremento de la mortalidad, son causa de incapacidad prematura y su tratamiento genera un costo elevado (Córdova-Villalobos y col., 2008). Existen factores que determinan la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y que, si son tratados, pueden prevenir o retrasar los efectos que provocan en las personas que las padecen, entre estos factores destacan la hipertensión arterial, el sobrepeso y la obesidad, las concentraciones anormales de los lípidos sanguíneos, el tabaquismo, el sedentarismo y el síndrome metabólico (Epping-Jordan y col., 2005). En México, las enfermedades crónico-degenerativas han ido en ascenso durante los últimos años. Esta dinámica de crecimiento se puede observar en el siguiente Cuadro 1 (Córdova-Villalobos y col., 2008).

Cuadro 1. Cambios en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas en México

Padecimiento	Encuesta Nacional de Enfermedades crónicas 1994 (%)	Cambio porcentual 1994-2000 (%)	Encuesta Nacional de Salud 2000	Cambio porcentual 2000-2006 (%)	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (%)
Sobrepeso*	38	0.01	38.4	3.6	39.8
Obesidad ⁺	20.9	13.39	23.7	29.9	30.8
Hipertensión arterial	26.6	15.4	30.7	0.03	30.8
Colesterol-HDL < 40 mg/dl	61	4.2	63.6	Aún no informado	Aún no informado
Triglicéridos > 150 mg/dl	42.3	13.0	47.8	Aún no informado	Aún no informado
Síndrome metabólico [‡]	26.6	27.8	34	Aún no informado	Aún no informado
Diabetes [#]	4	22	5.8	25	7

* Índice de masa corporal de 25 a 29.9 kg/m²

⁺ Índice de masa corporal \geq 30 kg/m²

[‡] Definido con base en los criterios del Programa Nacional de Educación en Colesterol 2001

[#] Diagnóstico previo

Córdova-Villalobos y col., 2008.

1.1. Las enfermedades cardiovasculares: la hipertensión arterial

Las enfermedades cardiovasculares como la arterosclerosis, el infarto al miocardio o el paro cardíaco, son importantes problemas de salud a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2020 este tipo de enfermedades serán la primera causa de muerte a nivel mundial, seguida de las enfermedades infecciosas (López y Murray, 1998). El mayor factor de riesgo para generar enfermedades cardiovasculares es la hipertensión arterial (HTA), definida como cifras reiteradas de presión arterial iguales o mayores a 140 mm de Hg en la presión sistólica y/o 90 mm de Hg en la presión diastólica (Moore, 2005). La Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología han

clasificado a la presión arterial para efectos de diagnóstico clínico, esta interpretación se puede observar en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de la presión arterial según la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología		
Clasificación	Presión arterial sistólica (mm de Hg)	Presión arterial diastólica (mm de Hg)
Óptima	<120	<80
Normal	120-129	80-84
Normal-alta	130-139	85-89
Hipertensión		
Grado 1 (ligera)	140-159	90-99
Grado 2 (moderada)	160-179	100-109
Grado 3 (grave)	≥180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	<90

Guidelines Comitee, 2003.

En el 2003 la Joint Nacional Committee de los Estados Unidos de América, organismo encargado del estudio de la hipertensión arterial (HTA), definió una categoría más sobre HTA y la denominó prehipertensión. Este término es aplicado a personas que presentan cifras reiteradas de presión arterial sistólica de 120 a 139 mm de Hg y/o cifras de presión arterial diastólica de 80 a 89 mm de Hg, entonces, la categoría de presión arterial normal queda para individuos con valores menores a estas cifras, y personas con valores mayores padecen hipertensión. Las personas que padecen prehipertensión poseen un riesgo mayor de desarrollar alguna enfermedad cardiovascular comparada con personas normotensas; por lo tanto, personas con prehipertensión deben vigilar y cambiar sus hábitos alimenticios e incrementar la actividad física para evitar el desarrollo de la enfermedad antihipertensiva (Pérez Caballero, 2008).

La presión arterial elevada, que suele ser asintomática, está asociada a un alto consumo de sal, sobrepeso, consumo excesivo de alcohol e inactividad

física. La hipertensión arterial, además de ser un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades isquémicas del corazón, las enfermedades cerebrovasculares y la insuficiencia renal, es causa directa de un número importante de muertes. Según la National Health and Nutrition Examination Survey, en el año 2005 en Estados Unidos se reportaron 50 millones de casos, mientras que en México la incidencia de este padecimiento en la población de 20 años o más es de 30.8% y a partir de los 60 años de edad más del 50% de los hombres y más del 60% de las mujeres presentan hipertensión arterial (Secretaría de Salud, 2007).

Se calcula que en México esta enfermedad genera alrededor de 40 mil muertes anuales. Los estados del norte del país representan el 35% de casos a nivel nacional, es decir, la mayor prevalencia se encuentra en Baja California Sur, Coahuila, Durango, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (Secretaría de Salud, 2007). En la Figura 1 se observa la prevalencia de la hipertensión en el territorio Nacional.

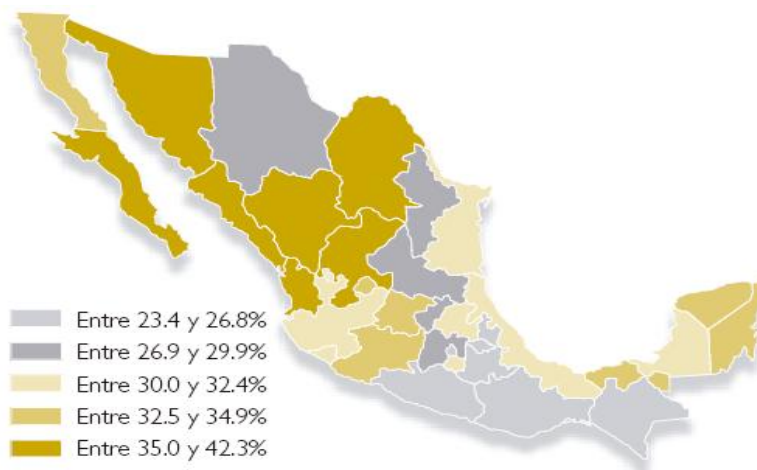


Figura 1. Distribución de la prevalencia de hipertensión en México. Secretaría de Salud, 2007.

2. Sustancias Nutraceuticas

En los últimos años, debido a los problemas de salud a nivel mundial y a la conciencia pública que se ha generado en torno a los alimentos seguros y saludables, muchas investigaciones se han enfocado al estudio de sustancias nutraceuticas:”componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido

para la salud de carácter médico, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades” (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2000). El interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos ha aumentado por su evidente valor terapéutico y por su importancia para la industria alimenticia, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contengan, además por la demanda que existe en el mercado (Martínez y Martínez, 2006). Actualmente existe una renovada atención en incluir ciertos componentes a los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia nutricional de la población. En el Cuadro 3 se enlistan algunos productos que existen en el mercado y que por su composición generan efectos nutraceuticos.

Cuadro 3. Productos alimenticios con efectos nutraceuticos		
Producto	Sustancia nutraceutica	Efecto
Barras de cereal	Ácido fólico Calcio Proteína de soya	Prevención de cáncer y osteoporosis
Alimentos con soya	Isoflavonas	Disminución de los síntomas de la menopausia
Derivados lácteos	Ácido linoleico, proteínas	Reducción de ciertos tipos de cáncer y prevención de enfermedades cardiovasculares
Pastas y cereales	Fibra insoluble	Reducción de cáncer de colón
Aceites	Ácidos grasos insaturados	Prevención de enfermedades cardiovasculares y mejora de las funciones cerebrales.

La clasificación de las sustancias nutraceuticas es muy compleja debido a la gran cantidad de compuestos que se han reportado. Algunos autores las clasifican de acuerdo a la estructura química o al efecto biológico que ejercen en el cuerpo humano, se han catalogado como fibra dietética (soluble e insoluble),

probióticos y prebióticos, antioxidantes fenólicos (fenólicos, antocianinas, flavonoides), antioxidantes vitamínicos (vitamina A, E, C) y péptidos bioactivos, entre otros (Goldberg, 1994; Hurst, 2002).

2.1. Los péptidos bioactivos

Entre los siglos XVII y XX, se han descubierto antibióticos, vacunas y diferentes fármacos para el tratamiento o prevención de enfermedades, desgraciadamente muchos de estas sustancias provocan efectos secundarios. El uso de antibióticos provoca reacciones como diarrea, fiebre, inflamación del intestino, entre otras. Otros fármacos son retenidos en órganos del cuerpo y pueden causar daño renal, además reacciones alérgicas al interactuar con otras drogas (Agyei y Danquah, 2011). Las proteínas son uno de los componentes principales en los alimentos, estas sustancias le confieren características organolépticas y nutricionales a los alimentos, tales como la consistencia, la textura, el sabor, entre otras. Las proteínas son importantes a nivel nutricional porque funcionan como fuente de energía, aportan nitrógeno y aminoácidos esenciales. Su presencia en alimentos brinda características funcionales como agente emulsificante, gelificante y espumante, principalmente. En las últimas décadas se ha estudiado a las proteínas por los efectos benéficos que poseen, de esta manera, diferentes investigaciones han reportado la existencia de péptidos bioactivos que tienen cierta utilidad y que pueden servir para el tratamiento terapéutico en diferentes sistemas del cuerpo humano (Hancock y Sahl, 2006; Kim y Wijesekara, 2010). Entonces, estas estructuras bioactivas pueden ser una alternativa para reducir el consumo de los fármacos y por lo tanto ofrecen muchas ventajas, entre ellas destacan la baja toxicidad, amplio espectro de acción terapéutica y bajos niveles de acumulación en el cuerpo (Marx, 2005). Desde un punto de vista estructural, los péptidos bioactivos son moléculas de naturaleza proteica que ejercen un efecto fisiológico en el cuerpo humano. Usualmente son cadenas que contienen de 2 a 20 aminoácidos; sin embargo, en algunos casos poseen más de 20 aminoácidos y son considerados componentes derivados de alimentos (Vermeirssen y col., 2004). Estos péptidos se encuentran comúnmente

inactivos en las proteínas que los contienen y cuando son liberados por hidrólisis durante el proceso digestivo o durante el proceso de elaboración de los alimentos (lácteos como quesos o leches fermentadas), adquieren propiedades funcionales (Hartmann y Meisel, 2007). Los péptidos bioactivos pueden absorberse por el intestino o entrar intactos a la circulación sanguínea y ejercer efectos benéficos en el organismo o producir sólo efectos a nivel del sistema digestivo (Kitts y Weiler, 2003).

Ahora bien, desde una perspectiva fisiológica y según la composición, estas moléculas pueden ejercer diversas funciones en el organismo, tales como la antihipertensiva, la hipocolesterolemica, la antioxidante, la antimicrobiana y/o la inmunomoduladora, la antitrombótica y la opioide (Erdmann y col., 2008). Otra característica de estos péptidos es que, debido al potencial de mejorar la salud y los perfiles de seguridad que ofrecen, se pueden usar como componentes en alimentos funcionales y nutraceúticos (Korhonen y Pihlanto, 2003). Incluso, algunos péptidos bioactivos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados (Meisel, 2004). Los péptidos bioactivos se pueden producir por métodos recombinantes porque una vez conocida la secuencia del péptido se puede diseñar un vector y clonarlo en algún sistema recombinante que exprese el péptido de interés. Otra forma de producir péptidos bioactivos es a través de hidrólisis enzimática de productos o residuos alimenticios. Asimismo, también se pueden producir por síntesis química (Agyei y Danquah, 2011).

2.1.1. Péptidos con actividad opioide

Los péptidos con actividad opioide poseen efecto fisiológico similar al de la morfina, funcionan por la interacción que establecen con receptores opioides del tipo δ (delta), κ (kappa) y μ (mu). La estructura común que presentan estos péptidos es la presencia de un residuo de tyrosina (Tyr) en el extremo N-terminal así como la presencia de un residuo aromático en la (Phe o Tyr) en la tercera o cuarta posición del péptido. Además, un residuo de prolina (Pro) en la segunda posición es importante para dar orientación a las cadenas laterales de tirosina o fenilalanina (Hartmann y Meisel, 2007). Otras funciones fisiológicas reportadas

para estos péptidos son la de ejercer una acción antidiarreico y mejorar la absorción de aminoácidos. Por ejemplo, en el 2005 Meisel reportó la existencia de casomorfina producidas por la hidrólisis de proteínas de leche bovina que regulan la motilidad del intestino y mejoran la absorción de agua y electrolitos; por lo tanto, actúan como agente antidiarreico.

2.1.2. Péptidos con actividad antimicrobiana e inmunomodulante

Se sabe que las proteínas de la leche, animal o humana, poseen propiedades antibacterianas conferidas por algunas proteínas tales como lactoferrina, inmunoglobulinas y péptidos que se generan al hidrolizar otras proteínas lácteas. Se han reportado otros péptidos con actividad bactericida como los hidrolizados de proteína de huevo. Los péptidos antimicrobianos pueden actuar de muchas formas sobre células bacterianas; por ejemplo, activan de enzimas que provocan lisis celular, forman poros a través de la membrana, inhiben de la síntesis de ácidos nucleicos o por el efecto sinérgico con otras moléculas del sistema inmune (Lohner y Blondelle, 2005; Hernández-Ledesma y col., 2008). La actividad de alcalasa, tripsina o pepsina sobre β -Lg dio como resultado fragmentos bacteriostáticos contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (El-Zahar y col., 2004). En cuanto a la actividad inmunomodulante no se tiene claro el mecanismo de acción, pero se ha observado que existen péptidos derivados de la hidrólisis de β -caseína y α -caseína capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo y ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones (Vioque y Millán, 2005). Algunas investigaciones sugieren que la actividad inmunomodulante de los péptidos es consecuencia de la actividad antimicrobiana que poseen. En el 2006 Biziulevicius y col. reportaron que los hidrolizados de β -Lg producidos por cuatro proteasas gastrointestinales provocan fagocitosis de bacterias y hongos en ratones.

2.1.3. Péptidos con actividad hipocolesterolémica

Estudios en ratas han reportado que las proteínas de suero lácteo poseen una mayor actividad hipocolesterolémica en comparación con las proteínas de caseína o las proteínas de soya. Una investigación realizada por Nagaoka y col. en el 2001 mostró la primera evidencia de que los hidrolizados producidos con tripsina ejercían actividad hipocolesterolémica en ratas, esto lo observaron al utilizar células de selección Caco-2 y notar un incremento en la excreción de esteroides. Estos autores identificaron cuatro nuevos péptidos que inhibieron la absorción de colesterol *in vitro*, estos péptidos correspondían a fragmentos de β -Lg bovina.

Otros investigadores han concluido que los hidrolizados proteicos de soya reducen la absorción de colesterol porque disminuyen los niveles de éste en sangre de las personas hipercolesterolémicas y en estudios *in vivo* reducen la absorción de colesterol en ratas. Se ha reportado que el efecto de estos péptidos está dado por la disminución de la solubilidad micelar del colesterol que para ser absorbido por las células es solubilizado en micelas formadas por ácidos bÍlicos, entonces, los péptidos hipocolesterolémicos compiten con el colesterol por las micelas, esto provoca la disminución final de colesterol y; por lo tanto, la absorción por células del epitelio intestinal (Vioque y Millán, 2005).

2.1.4. Péptidos con actividad antitrombótica

Los péptidos con actividad antitrombótica inhiben la agregación plaquetar y la unión de fibrinógeno debido a que compiten por receptores específicos de la plaqueta. Así, se han reportado secuencias que son liberadas por hidrólisis de κ -caseína por actividad de la renina y que tienen actividad antitrombótica, los principales corresponden a la secuencia Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys correspondiente a los aminoácidos 106 a 116 (Hartmann y Meisel, 2007; Vioque y Millán, 2005).

2.1.5. Péptidos con actividad antioxidante

En la mayoría de los organismos se producen sustancias oxidantes que pueden generar daños en moléculas como proteínas, lípidos o ADN. En los seres humanos, este daño se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades. Los alimentos también se ven afectados por procesos oxidativos que disminuyen su calidad nutricional y funcional. Diferentes autores han reportado la existencia de péptidos que limitan o disminuyen el daño oxidativo y que pueden ser utilizados para prevenir la oxidación de células del cuerpo humano. Estos péptidos se pueden ingerir en la dieta o emplearse en la industria de los alimentos con el fin de disminuir el deterioro de alimentos causado por la oxidación (Vioque y Millán, 2005). Se han identificado diferentes secuencias peptídicas derivadas de la hidrólisis de α -caseína que poseen actividad antioxidante ya que previenen la oxidación enzimática que provoca la lipoxigenasa sobre los ácidos grasos (Fitzgerald y Murray, 2006). Por otra parte, la adición de prolina o leucina en la región amino-terminal del dipéptido His-His puede mejorar la actividad antioxidante por el posible efecto sinérgico con otras sustancias como butil hidroxitolueno (BHT) o butil hidroxianisol (BHA) (Kitts y Weiler, 2003). También se han obtenido péptidos antioxidantes a partir de leche, soya, huevo y pescado (Vioque y Millán, 2005). En el Cuadro 4 se enlistan péptidos aislados de diferentes fuentes alimenticias, los cuáles poseen propiedades bioactivas en diferentes sistemas del cuerpo humano.

Cuadro 4. Péptidos bioactivos identificados en diferentes fuentes alimenticias			
Fuente alimenticia	Péptido	Bioactividad	Referencia
Para- κ -caseína (leche bovina)	FFSDK f(17-21)	Inmunomoduladora	Gill y col., 2000
Lisozima de huevo	Lisozima f(98-112) IVSDQNQMNAWV AWR	Antimicrobiana	Expósitoa y Recio, 2006
Arroz	QYPMYPLR	Opioide e inmunomoduladora	Hartmann y Meisel, 2007
β -lactoglobulina (leche bovina)	IIAEK	Hipocolesterolémica	Hartmann y Meisel, 2007
κ -caseína (leche humana y bovina)	f(106-116) MAIPPKKDQDK	Antitrombótica	Hartmann y Meisel, 2007
Langosta americana	QYGNLLSLLNQYR	Antimicrobiana	Battison y col., 2008
Hidrolizados de soya	Péptidos de diferentes pesos moleculares	Inmunomoduladora	Kong y col., 2008

Tomado de Agyei y Danquah, 2011

2.1.6. Los péptidos antihipertensivos

En los últimos años se ha reconocido que existen factores nutricionales que participan en la prevención o tratamiento de la hipertensión; por lo tanto, muchas investigaciones se han enfocado al estudio de fuentes alimenticias con actividad antihipertensiva. Los péptidos antihipertensivos generan esta bioactividad, por esta razón éstos han adquirido gran importancia; además, han sido los más estudiados debido a la incidencia de la hipertensión entre la población, ya que este padecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (infarto al miocardio, arterosclerosis, entre otras).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) juega un papel muy importante en la regulación de la presión sanguínea. Esta enzima cataliza la síntesis de angiotensina I a angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor al mismo tiempo, un inactivador del polipéptido vasodilatador bradiquinina (Erdmann, 2008). Para inhibir el proceso anterior se han sintetizado productos como captopril,

enalapril, lisinopril, ramipril y trandolapril, agentes antihipertensivos o inhibidores de ECA (Comma-Canella y col., 2005) que, cabe destacar, provocan reacciones secundarias como tos seca y angioedema (Hayes y col., 2007). Algunas investigaciones han reportado la existencia de péptidos que poseen las mismas características inhibitorias. Ferreira y col. (1970) aislaron nueve péptidos biológicamente activos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Entre ellos destaca el péptido con la secuencia pirrolodón-carboxil-Lys-Trp-Ala-Pro que mostró la más alta actividad inhibitoria de ECA¹. A partir de estos hallazgos, se comenzó a buscar compuestos con estas propiedades en otras fuentes, principalmente en proteínas alimentarias que no provoquen efectos perjudiciales. En estudios recientes, se han identificado péptidos antihipertensivos aislados de leche, ovalbúmina, pescado, carne de res, carne de pollo, soya, arroz, amaranto, entre otras (Hernández-Ledesma y col., 2010). En el Cuadro 5 se enlistan péptidos con actividad antihipertensiva identificados en diversas fuentes alimenticias.

¹ Cabe señalar que para estimar el efecto inhibitor que poseen los péptidos se determina el valor IC₅₀ que se refiere a la cantidad necesaria de péptido para inhibir al 50 % la actividad de la ECA.

Cuadro 5. Péptidos con actividad antihipertensiva identificados en diferentes fuentes alimenticias			
Fuente alimenticia	Péptido	IC₅₀	Referencia
Sardina	GWAP	3.86 µM	Matsufuji y col., 1994
Hidrolizados de caseína con proteínasa K	VYP	288 µM	Abubakar y col., 1998
Bonito	IKPLNY	43 µM	Fujita y Yoshikawa, 1999
Pollo	LAP	3.2 µM	Fujita y col., 2000
Queso gouda	RPKHPIKHQ	13.4 µM	Saito y col., 2000
Productos de suero lácteo	ALPM	928 µM	Murakami M. y col., 2004
Kéfir de leche de cabra	LVYPPFGPIP	27.9 µM	Quiros A. y col., 2005
β-lactoglobulina	LQKW	34.7 µM	Hernández-Ledesma y col., 2007
β-lactoglobulina de proteína de cabra	LLF	79.8 µM	Hernández-Ledesma y col., 2007
Salmón	IW	1.2 µM	Enari y col., 2008
Carne de res	FHG	52.9 µg/mL	Jang y col., 2008
Carne de cerdo	ND	3.9 mg/mL	Ahhmed y col., 2009
Queso manchego	KKYNVPQL	77.1	Miguel M. y col., 2010

Ahhmed y Muguruma, 2010; Hernández-Ledesma y col., 2010

2.1.6.1. Mecanismo de acción de los péptidos antihipertensivos

El mecanismo de acción de los péptidos antihipertensivos es diferente al mecanismo que las drogas llevan a cabo. La función de los fármacos antihipertensivos es bloquear indiscriminadamente la actividad de la enzima, mientras que los péptidos antihipertensivos compiten por la enzima; es decir, la ECA reacciona con los péptidos inhibidores de la enzima en lugar de atacar a la angiotensina I. Los péptidos inhibitorios de ECA o antihipertensivos son generalmente péptidos de cadena corta que contienen residuos de aminoácidos polares como la prolina y/o aminoácidos aromáticos con estructuras ramificadas cuyas interacciones electroestáticas con el centro activo de la enzima provocan la

inhibición de la actividad (Hartman y Meisel, 2007). Algunas investigaciones han reportado que un mismo péptido antihipertensivo muestra diferencias en el efecto inhibitor a nivel *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, podemos decir que es consecuencia de diferentes mecanismos involucrados en la regulación de la presión sanguínea (Hernández-Ledesma y col., 2010). En el 2009 Yamaguchi y col. observaron el efecto en la expresión de genes mediante el análisis de microarreglos de ADN en ratas espontáneamente hipertensas (REH) sometidas a una dieta por 5 días que incluyó la administración repetida de los péptidos antihipertnsivos VPP e IPP. Estos científicos reportaron un incremento significativo para el gen de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta enzima está involucrada en la regulación de la presión arterial porque sintetiza óxido nítrico (NO), que es un radical libre que promueve la angiogenesis y la vasodilatación, el cual se genera por la oxidación de L-arginina a L-citrulina (Gokce, 2004). El óxido nítrico es fisiológicamente importante porque mantiene la homeostasis vascular, promueve la dilatación vascular y protege la capa interna de los vasos sanguíneos porque disminuye la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos (Barba de la Rosa y col., 2010).

Algunas investigaciones han reportado que receptores opioides están involucrados en el efecto antihipertensivo de algunos péptidos, tal es el caso de α -lactorfina que es un tetrapéptido (YGLF) formado por la proteólisis de α -lactoalbumina *in vitro* con pepsina y tripsina. Cuando se administra este tetrapéptido a REH, se produce una relajación endotelio dependiente en sus arterias mesentéricas que es inactivada por un inhibidor de eNOS. Por lo tanto, este péptido provoca la estimulación de receptores opioides a nivel gastrointestinal y, en consecuencia, la liberación de óxido nítrico que causa una vasodilatación (Nurminen y col., 2000).

3. El amaranto

La planta del amaranto desempeñó un papel muy importante en diferentes culturas ancestrales de América, los usos fueron distintos, se empleó en la alimentación, se utilizó en ceremonias religiosas y como planta con fines

terapéuticos. Durante la conquista española se prohibió el cultivo de esta planta por razones vinculadas a cuestiones religiosas, por ello el uso y consumo de esta planta disminuyó (Paredes López y col., 1990). La familia Amaranthaceae se compone de 60 géneros y aproximadamente 800 especies herbáceas anuales o perennes. En México se cultiva y consume el género *A. hypocondriacus*. El amaranto es una planta dicotiledónea y se considera un pseudocereal puesto que produce granos tipo cereal. En los últimos años varios reportes han proporcionado amplia información respecto al valor nutricional y nutracéutico que tiene el grano del amaranto. Entre lo más destacado se encuentra el alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales como lisina, que contribuye a satisfacer los requerimientos de proteína en niños y adolescentes porque proporciona hasta un 70% de la energía en una dieta normal (Paredes López y col., 2006). El consumo del amaranto provee de beneficios a la salud, entre ellos destacan la disminución de osteoporosis, el poder antioxidante que presentan algunos pigmentos que se encuentran en las semillas, la reducción de los niveles de colesterol en sangre y la actividad antihipertensiva provocada por los péptidos que se generan al hidrolizar proteínas presentes en el grano (Paredes López y col., 2006; Vechi y Añón, 2009; Barba de la Rosa y col., 2010; Hernández-Ledesma y col., 2010).

3.1. La amarantina

Las proteínas de semilla se clasifican en dos categorías: las de mantenimiento, que son esenciales para el metabolismo celular, y las de reserva, que son metabolizadas durante la germinación. En las etapas iniciales del desarrollo de la plántula, las proteínas de reserva proveen una fuente de nitrógeno reducido, así como de carbono y azufre. Además, estas proteínas representan un aporte significativo a la alimentación dado que se acumulan en grandes cantidades en las semillas (Higgins, 1984; Herman y Larkins, 1999).

La clasificación tradicional de las proteínas de reserva se ha realizado con base a su solubilidad, entre ellas están: las albúminas, que son solubles en agua; las globulinas, solubles en soluciones salinas diluídas; las prolaminas, que se extraen con mezclas de alcohol-agua, y las glutelinas, que se obtienen en

condiciones severas de pH (ácidas o básicas) (Osborne, 1924). Sin embargo, Fukushima (1991) propone una nueva clasificación según la presencia o ausencia de intrones en el gen, la homología de la estructura primaria, la presencia de estructuras repetitivas que influyen en la estructura secundaria y la ruta biosintética. De acuerdo a esto, estas proteínas están divididas en dos grupos, por un lado, las prolaminas que incluyen a las albúminas y, por otro, las globulinas que incluyen a las glutelinas.

Las globulinas presentes en los distintos tipos de granos son las proteínas más ampliamente distribuidas ya que se pueden localizar en el endospermo y en el polen (Shewry, 1995). Por su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa se dividen en dos grupos: las globulinas 7S (7-8S), también conocidas como vicilinas, y las globulinas 11S (11-13S), denominadas leguminas. Ambos grupos presentan variaciones considerables en su estructura, resultado de modificaciones post-traduccionales (Danielsson, 1949). En seguida se presentan algunas de las diferencias estructurales de cada grupo.

En forma madura las proteínas 7S se consideran trímeros formados por subunidades de 50-70 kDa, en cambio las globulinas 11S se encuentran como hexámeros formados por subunidades de 60-80 kDa. Hay que señalar que en ambos grupos las subunidades están acopladas por interacciones no covalentes; sin embargo, en las globulinas 11S las subunidades presentan un corte proteolítico como parte del procesamiento post-traducciona (Casey, 1999).

Las globulinas 11S son proteínas comunes en las semillas de plantas superiores y, en muchas ocasiones, son la fracción mayoritaria de las proteínas de reserva en granos, principalmente en dicotiledóneas y en algunos cereales como la avena y el arroz (Nielsen y col., 1995). Entre algunos tipos de globulinas tenemos a la amarantina, que es un homohexámero (Sanfeng y Paredes-López, 1997; Barba de la Rosa y col., 1996), y a la glicinina de soya, que es una heterohexámero (Staswick y col., 1984). Ahora bien, a continuación se detallará qué es la amarantina.

En general, la amarantina representa cerca del 18.6% de la proteína total del grano del amaranto y aproximadamente el 90% del total de las globulinas; en

efecto, la mayor parte de las globulinas 11S presentes en el amaranto es amarantina. Esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 300-400 kDa y está constituida por seis subunidades de 52 kDa, cada una con un polipéptido ácido (34-36 kDa) y un polipéptido básico (22-24 kDa) unidos por un puente disulfuro (Barba de la Rosa y col., 1992; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Sanfeng y Paredes-López, 1997).

La secuencia nucleotídica completa del cDNA de la amarantina presenta un marco de lectura abierto de 1506 pares de bases (pb) que codifican para un polipéptido de 477 residuos de aminoácidos. Los primeros 23 residuos del extremo amino son aminoácidos hidrofóbicos y funcionan como péptido señal para el transporte hacia el retículo endoplásmico. Asimismo, esta secuencia tiene los cuatro residuos de cisteína conservados entre las globulinas 11S, responsables de mantener las subunidades ácida y básica unidas (Barba de la Rosa y col., 1996).

Gracias al alto porcentaje de amarantina, el amaranto contiene un buen balance de aminoácidos esenciales. Por ejemplo, el alto contenido de lisina (3.7-7.6%) y aminoácidos azufrados (3.1-7.1%) permite que el amaranto sea una fuente importante de estos aminoácidos (Barba de la Rosa y col., 1992; Segura-Nieto y col., 1994).

Ahora bien, en las siguientes líneas se mencionarán las características funcionales de la amarantina. En cuanto a la solubilidad, se encontró que las globulinas del amaranto muestran una precipitación parcial en un rango de pH de 4.5-6.8 (Gorinstein, 1993). De forma detallada, la máxima insolubilidad se presenta en un rango de pH de 4.5-6 y una precipitación parcial en un rango de pH de 6.1-6.8. Cabe señalar que esto sucede por la presencia de diferentes estados ionizables de la proteína (Segura-Nieto y col., 1994). La actividad emulsificante de las globulinas de amaranto, según Konishi y Yoshimoto (1989), es dos veces mayor que la de aislados de soya y más baja que las de la caseína. Estos investigadores también encontraron que la hidrofobicidad de estas globulinas se incrementó hasta en un 200% después de un calentamiento a 100 °C.

4. Procesos fermentativos

Los procesos fermentativos o fermentaciones han sido utilizados y desarrollados por el hombre desde hace aproximadamente ocho mil años, a pesar de que no se conocía la presencia e influencia de los microorganismos en esos procesos. La palabra fermentación proviene del término en latín *fermentare* que significa “ebullir”. Este término se utilizó porque describía la aparición de burbujas formadas por el CO₂ que se desprende durante la fabricación del vino y que provoca la agitación del líquido. El concepto de fermentación se ha ido modificando a lo largo de los años y en la actualidad prevalecen dos criterios para su definición: uno bioquímico y el otro microbiológico. Desde un punto de vista bioquímico, una fermentación se define como el proceso mediante el cual las sustancias orgánicas (sustrato) sufren una serie de cambios químicos (reducciones y oxidaciones) que producen energía. Al finalizar el proceso, se presenta una acumulación de diversos productos, unos más oxidados (aceptores de electrones) y otros más reducidos (donadores de electrones) que el sustrato, con un balance de energía positivo. Esta energía es utilizada en el metabolismo de los microorganismos. El término fermentación, desde un punto de vista microbiológico, alude al proceso en el que los microorganismos producen metabolitos o biomasa mediante el uso de cultivos en suspensión líquida para llevar a cabo transformaciones de materia orgánica. La descomposición de los sustratos es catalizada por enzimas sintetizadas por los microorganismos para tal fin (Hernández, 2003).

En la actualidad, los procesos fermentativos son utilizados para la producción de una variedad de productos económicamente importantes, algunos ejemplos se enlistan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Productos de interés comercial fabricados mediante procesos fermentativos	
Tipo de sustancia	Productos
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico
Aminoácidos	Lis, Met, Trp, Val
Alcoholes y solventes	Acetona, butanol, etanol
Antibióticos	Bacteriocina, estreptomina, penicilina
Esteroides	Cortisona, testosterona, hidrocortisona
Vitaminas	Ácido ascórbico, caroteno, rivoftabina
Proteína unicelular (biomasa)	Células de hongos, levaduras, bacterias y algas
Antígenos	Vacunas

Hernández, 2003

La fermentación se realiza en un recipiente conocido como fermentador, reactor o biorreactor; su función principal es mantener al medio y al microorganismo en las condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de los compuestos de interés. Generalmente, los biorreactores se construyen de vidrio o acero inoxidable. A escala de laboratorio, su volumen oscila desde uno hasta cincuenta litros, y a nivel industrial pueden alcanzar hasta los 300,000 litros. El volumen de trabajo de un fermentador es hasta del 80% del volumen total. Existen diferentes tipos de fermentadores, cada uno está diseñado para adaptarse a las condiciones de operación necesarias para optimizar la producción de la sustancia de interés. Los más utilizados a nivel laboratorio son el matraz erlenmeyer y el reactor de tanque agitado, mismos que se pueden observar en la Figura 2 (Hernández, 2003).

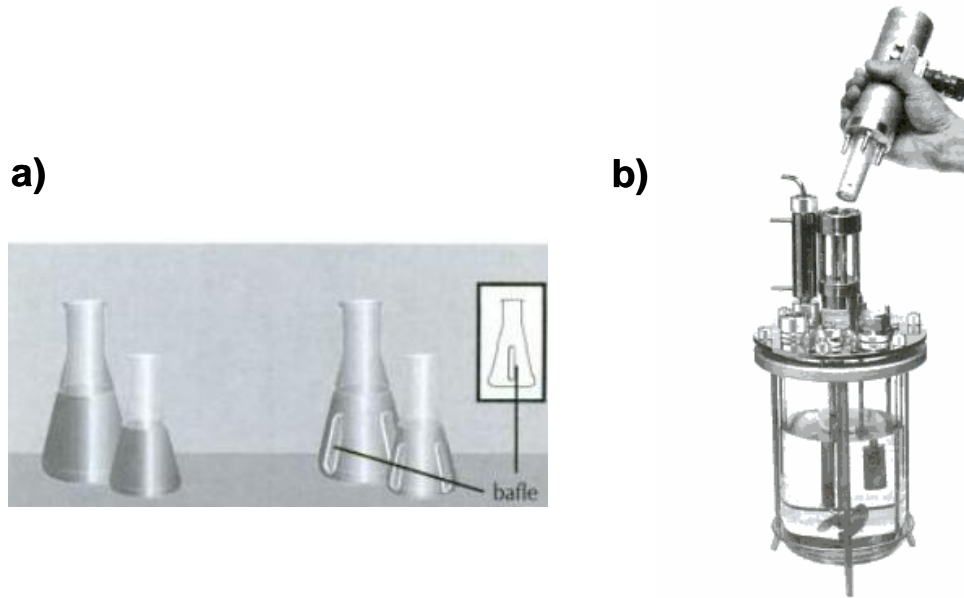


Figura 2. Tipos de fermentador. a) Matraz erlenmeyer con baffles y sin baffles; b) Fermentador de tanque agitado.

El matraz erlenmeyer es la herramienta más utilizada en el laboratorio porque sirve para seleccionar la mejor cepa, la preparación del inóculo y el estudio inicial de las condiciones adecuadas para el desarrollo del cultivo, antes de aumentar el tamaño del proceso. La principal desventaja es que no se controlan condiciones como pH, asepsia y oxígeno disuelto que requiere el crecimiento óptimo de microorganismos (Hernández, 2003). Se han diseñado matraces con hendiduras internas (baffles) cuya función es evitar la formación de vértices y lograr un mezclado homogéneo (Figura 2a).

El reactor de tanque agitado está compuesto principalmente por un tanque que puede ser fabricado de vidrio o acero inoxidable con un motor en la parte superior o inferior para la agitación del caldo de cultivo (Figura 2b). Cuando el biorreactor es pequeño se puede esterilizar en autoclave o si es de un mayor volumen se cuenta comúnmente con un sistema de inyección de vapor para su esterilización (Hernández, 2003). En el Cuadro 7 se enlistan los componentes principales de un reactor con tanque agitado y sus funciones; en la Figura 3a se observa un diagrama de un fermentador.

Cuadro 7. Componentes principales de un fermentador con tanque agitado		
Componente	Descripción	Función
Sistema de agitación	Compuesto por el motor y los impulsores o paletas.	Aumentar la disponibilidad de oxígeno y realizar el mezclado del caldo de fermentación.
Placas deflectoras	Placas colocadas a lo largo del reactor.	Evitar la formación de un vórtice (Figura 3b) y por lo tanto, un mejor mezclado.
Dispositivos de adición, extracción y control	Puertos o aberturas en la tapa del fermentador.	Permitir la adición de sustancias y el control de temperatura, pH, etc.
Sistema de aireación	Entrada de aire estéril cerca de las paletas para su distribución en todo el caldo.	Proveer de oxígeno para mejorar el desarrollo de los microorganismos.
Sistema de transferencia de calor	Serpentines (tuberías internas) o chaquetas (doble pared que cubre al reactor) por las que pasa aire o agua.	Controlar la temperatura del cultivo a través del uso de termostatos.

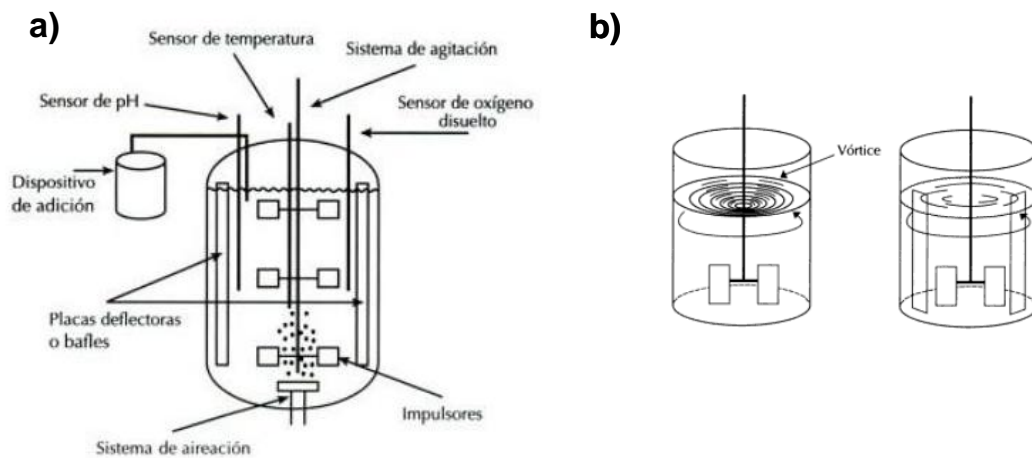


Figura 3. Esquemas de un fermentador. a) Componentes principales; b) Sistema de agitación.

Los procesos de fermentación pueden desarrollarse por dos sistemas o métodos de fermentación: el cultivo en lote o discontinuo y el cultivo continuo (Hernández, 2003; Tresguerres y col., 2003). El cultivo en lote o discontinuo es un sistema cerrado; es decir, después de iniciar el proceso, cuando se mezclan los microorganismos con el medio de cultivo, lo único que se adiciona durante el proceso son antiespumantes, aire y sustancias para el control de pH. Por lo tanto, conforme transcurre la fermentación cambia la composición del medio de cultivo y aumenta la concentración de biomasa y metabolitos (Hernández, 2003). La fermentación concluye cuando los nutrientes escasean o se acumulan compuestos tóxicos y limitan el crecimiento microbiano, o bien cuando se alcanza la concentración deseada de productos de interés (McNeil y Hervey, 2008).

El cultivo continuo se puede describir como un sistema abierto porque constantemente se agrega medio de cultivo fresco a los microorganismos y al mismo tiempo se retira caldo de fermentación; por lo tanto, se consiguen condiciones homeostáticas en el reactor y se logra mantener una cantidad de microorganismos estable, esto permite mantener un proceso de fermentación por periodos prolongados de tiempo (Hernández, 2003; Tresguerres y col., 2003).

5. Sistemas de expresión: *E.coli*

Algunos microorganismos pueden ejercer efectos benéficos a través de dos mecanismos: los efectos directos, donde el propio microorganismo produce un efecto probiótico (Fuller, 1989) y los efectos indirectos, que en muchos casos se dan durante la fermentación porque los microorganismos actúan como fábricas en la generación de metabolitos secundarios con propiedades benéficas a la salud humana (Stanton y col., 2005).

E. coli posee efectos indirectos, por ello constituye el mejor sistema para la obtención de proteínas recombinantes o heterólogas. Este sistema de expresión ha sido uno de los más utilizados por diversas razones, entre ellas están: la bacteria crece rápidamente y en altas densidades en medios de cultivo baratos, es fácil de manejar y se puede utilizar con gran diversidad de vectores de clonación; además, existen cepas mutantes que favorecen la expresión de proteínas

heterólogas (Baneyx, 1999). Sin embargo, el sistema de *E. coli* no es perfecto porque es incapaz de realizar modificaciones postraduccionales como: glicosilación, fosforilación, metilación, entre otras. Además, no posee un mecanismo de secreción de proteínas que permita su liberación al medio y tiene limitada capacidad para la formación de puentes disulfuro. No obstante, estas limitaciones pueden ser superadas mediante la ingeniería de proteínas (Makrides, 1996; Kamionka, 2011). *E. coli* es uno de los sistemas más empleados para la expresión de proteínas heterólogas a nivel laboratorio y a escala industrial, aunque en algunas ocasiones la expresión de proteínas de origen eucariótico ha resultado en una producción mínima debido al uso de codones raros presentes en genes clonados provenientes de organismos eucarióticos (Zhou y col., 2004). Este fenómeno es provocado por la existencia de codones diferentes a los del organismo huésped, además afecta los niveles de expresión, la calidad de la proteína mutante, la estabilidad del RNA mensajero y del plásmido (Rosano y Ceccarelli, 2009). Para solucionar este problema se han transformado cepas de expresión con plásmidos que albergan genes que codifican para RNAs de transferencia (tRNAs) de codones raros, un claro ejemplo es la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) que se ha reportado como un buen sistema de expresión de proteínas eucarióticas (Sorensen y Mortensen, 2005). La cepa Rosetta contiene el plásmido pR.A.R.E. (Novagen) que es resistente al cloranfenicol y suministra tRNAs para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, lo cual permite mejorar el rendimiento en la expresión de proteínas a diferentes escalas de crecimiento (Novy y col., 2001).

Los recientes avances en el entendimiento de la función, regulación e interacciones de los productos genéticos, junto con el uso de herramientas como la ingeniería de proteínas, hacen de *E. coli* el huésped más atractivo para la producción de proteínas recombinantes (Kamionka, 2011).

Cabe mencionar que en el laboratorio de biotecnología del Cinvestav-UI se han realizado algunos estudios de la expresión de la amarantina con el sistema *E. coli*. Destacan el estudio de Medina-Godoy (2005) que logró expresar con éxito la proamarantina con una cola de histidinas en *E. coli Origami* (DE3), y el de Luna-

Suárez (2008) que expresó con la misma cepa la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos.

6. Expresión y mejoramiento de proteínas recombinantes

Mediante la ingeniería de proteínas se han realizado y diseñado múltiples modificaciones estructurales a proteínas a través del uso de técnicas genéticas y químicas con la finalidad de mejorar las propiedades y/o funciones de una proteína. Algunas de las razones para generar cambios en una proteína son: crear proteínas quiméricas o estructurales, generar cambios que mejoren las propiedades catalíticas de algunas proteínas, mejorar la purificación proteica y modificar la estructura con la finalidad de producir proteínas con capacidad terapéutica (Kamionka, 2011).

En el 2009, Rao y col. diseñaron un péptido multímero recombinante que fue expresado como una proteína de fusión acoplado a glutation S-transferasa (GST) en *E.coli* BL21. Estos científicos insertaron sitios de restricción específicos dentro de la construcción del vector de expresión para la degradación enzimática, es decir, este multímero al ser hidrolizado por enzimas digestivas libera once péptidos con actividad antihipertensiva. Con esta investigación, los autores establecieron un nuevo procedimiento para la obtención de proteínas con fines terapéuticos. La estrategia de utilizar GST como proteína de fusión permitió una purificación más sencilla mediante cromatografía de afinidad y facilitó la obtención de una proteína con 95% de pureza.

En 1990, la glicinina de soya fue modificada por Kim y col. mediante la eliminación de las regiones variables con la inserción de cuatro codones de metionina. Las proteínas modificadas se expresaron en *E. coli* y los investigadores evaluaron la capacidad de autoensamble en trímeros de la proteína recombinante. Según los resultados observados mediante análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa los autores concluyeron que las deleciones hechas en las regiones I, IV y V fueron toleradas porque las proteínas mutantes se ensamblaron de forma similar que las silvestres.

Escherichia coli tiene un mecanismo oxidativo para proteínas en el espacio periplásmico, este espacio se puede emplear para producir proteínas humanas que requieren enlaces disulfuro. Algunos investigadores han aprovechado ese ambiente para una mejor expresión de proteínas heterólogas. Winter y col. (2001) mejoraron la eficiencia de la formación de enlaces disulfuro al fusionar en la región C-terminal de la proinsulina una proteína periplásmica llamada disulfuro oxidoreductasa (DsbA). Con esta estrategia, los autores lograron un incremento en la expresión de proinsulina nativa soluble en *E. coli*.

En el 2005, Medina-Godoy y col. realizaron la modificación de la amarantina con la adición de un epítopo de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína en una sola etapa mediante el uso de la técnica cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (por sus siglas en inglés IMAC). Realizaron esta modificación por mutagénesis dirigida mediante el alineamiento con otra globulina 11S. Así, con esta estrategia los investigadores lograron una proteína soluble que se acumuló de forma estable en *E. coli*.

En algunas proteínas recombinantes existen fragmentos que provocan inestabilidad a la estructura proteica. La causa más común de inestabilidad es provocada por la existencia de un número elevado o un fragmento consecutivo de residuos hidrofóbicos, en consecuencia algunos investigadores han realizado la delección de fragmentos en proteínas mutantes (Kamionka, 2011). En el 2006, Hsu y col. expresaron con mayor estabilidad una variante del factor de crecimiento de queratinocito (KGF); el KGF mostró una gran inestabilidad cuando fue almacenado a temperaturas moderadas y esto se observó por la formación de agregados y la pérdida de proteína monomérica. Entonces, los científicos mejoraron la estabilidad sin pérdida de la actividad biológica, ya que eliminaron 23 residuos de aminoácidos de la región N-terminal de la estructura original. El KGF es utilizado para la prevención de la mucositis que se genera en personas que son sometidas a quimioterapia o radioterapia; éste existe en el mercado con el nombre comercial Biovitrum® (Blijlevens y Sonis, 2007).

En el laboratorio de biotecnología de alimentos del Cinvestav se mejoraron las propiedades nutraceuticas de la amarantina mediante la inserción

de los péptidos IPP y VYVYVYVY, además de un epítipo de seis histidinas con el vector pET-AC-M3. El péptido IPP se insertó en el extremo carboxilo terminal de la subunidad ácida de la amarantina porque en estudios *in vivo* mostró actividad antihipertensiva (Nakamura y col., 1996; Yamamoto y col., 1999). El péptido VYVYVYVY también se reportó como un péptido antihipertensivo (Kawasaki y col., 2000) y se insertó en la región variable III de la subunidad ácida de la amarantina, mientras que el epítipo de seis histidinas se insertó justo antes del péptido IPP. La inserción del epítipo se realizó con la intención de purificar de forma más sencilla la proteína a través de la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (Immobilized metal ion affinity chromatography IMAC). Los péptidos antihipertensivos se insertaron en sitios de corte para las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina (Cuadro 8).

Cuadro 8. Secuencia de aminoácidos de la subunidad ácida de la amarantina con los péptidos IPP y VYVYVYVY
M E G R F R E F Q Q G N E C Q I D R L T A L E P T N R I Q A E A G L T E V
W D S N E Q E F R C A G V S V I R R T I E P H G L L L P P F T S A P E L I Y
I E Q G N G I T G M M I P G C P E T Y E S G S Q Q F Q G G E D E R I R E Q
G S R K F G M R G D R F Q D Q H Q K I R H L R E G D I F A M P A G V S H
W A Y N N G D Q P L V A V I L I D T A N H A N Q L D K N F P T R F Y L A G
K P Q Q E H S G E H Q F S R V Y V Y V Y V Y E S R R G E R N T G N I F R
G F E T R L L A E S F G V S E E I A Q K L Q A E Q D D R G N I V R V Q E G
L H V I K P P S R A W E E R E Q G S R G S R Y L P N H H H H H R I P P
Stop

Luna-Suárez, 2008.

En el 2010 Luna-Suarez y col. realizaron la modificación de la subunidad ácida de la amarantina mediante la inserción de cuatro péptidos VY en serie con el propósito de aumentar el efecto inhibitor de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) responsable del aumento de la presión arterial. La modificación de la proteína se realizó en el dominio variable III y el sistema de

expresión que utilizaron fue *E. coli* Origami (DE3). Los autores concluyeron que la proteína mutante se expresó de forma estable y el efecto inhibitor sobre la ECA aumentó ocho veces más comparado con proteína no modificada

7. Factores implicados en la expresión proteica

Los promotores constitutivos proveen una forma sencilla de sobreexpresión continua de proteínas recombinantes, tal es el caso del promotor *lac* que es comúnmente usado para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias como *E. coli*. Desafortunadamente, en muchos de los casos, los altos niveles de expresión continua causan en las células bacterianas una carga metabólica extra que reduce o inhibe el crecimiento celular y dado que el rendimiento total de las proteínas recombinantes está en función del rendimiento celular (g de célula por L de cultivo) y del rendimiento de proteína expresada por cada célula, entonces la obtención de proteína total por litro de medio de cultivo tiende a disminuir. En muchos casos, el nivel de transcripción de los genes foráneos se puede regular con el uso de un nivel apropiado de diferentes estímulos que influyen en la inducción, tales como la temperatura, la composición del medio de cultivo, la concentración de inductor, el momento en el que se realiza la inducción, la duración de la fase de inducción; además, factores regulables en el proceso de fermentación como la velocidad de agitación, el pH y el flujo de aire. En combinación estos factores pueden provocar altos rendimientos en los niveles de expresión de proteínas recombinantes (Donovan y col., 1996).

7.1. Regulación de la transcripción del operón *lac*

El operón está definido como un grupo de genes que codifican para un grupo de enzimas o proteínas que controlan procesos metabólicos celulares. Está formado por genes que controlan la transcripción (promotor y operador) y genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas. El operón lactosa (*lac*) está constituido por tres genes estructurales (*lacZ*, *lacY* y *lacA*) que codifican para proteínas responsables del metabolismo del carbohidrato lactosa. El gen *lacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa, que hidroliza la lactosa y provoca la

formación de glucosa y galactosa; el gen *lacY* codifica para la síntesis de la enzima lactosa permeasa, responsable de transportar la molécula de lactosa al interior de la célula a través de la membrana citoplasmática, y el gen *lacA* codifica para la enzima transacetilasa, que desintoxica a la célula por la producción de algunos análogos de la lactosa (Lewis, 2005). Los genes que controlan la transcripción del operón *lac* son el gen promotor y el gen operador. El gen promotor es la zona de reconocimiento de la RNA polimerasa; por lo tanto, es el sitio de inicio de la transcripción de genes. El gen operador es un fragmento de ADN al que se enlaza una proteína conocida como represor *lac*, esta proteína es codificada por el gen *lac I* (gen regulador) que se encuentra aguas arriba de los genes controladores (promotor y operador). La proteína represora *LacI*, en ausencia de una sustancia inductora (IPTG o lactosa), inhibe la transcripción porque permanece enlazado a la región del operador del operón *lac*, esto bloquea la función de la RNA polimerasa y; por lo tanto, no se puede transcribir el resto del vector de expresión (Figura 4) (Tortora y col., 2007). En presencia de sustancias inductoras en el medio de cultivo, las células incrementan hasta 1000 veces la expresión de los genes *lac* y esto sucede porque una vez que la célula introduce una molécula de lactosa, la β -galactosidasa (sintetizada por expresión basal) provoca la formación de un intermediario conocido como alolactosa que al unirse a la proteína represora provoca cambios estructurales en ella y al mismo tiempo genera la liberación de la zona del operador *lac*. Por lo tanto, sin la proteína represora en la región del operador *lac* la RNA polimerasa puede transcribir todo el vector de expresión (Snyder y Chapness, 2007).

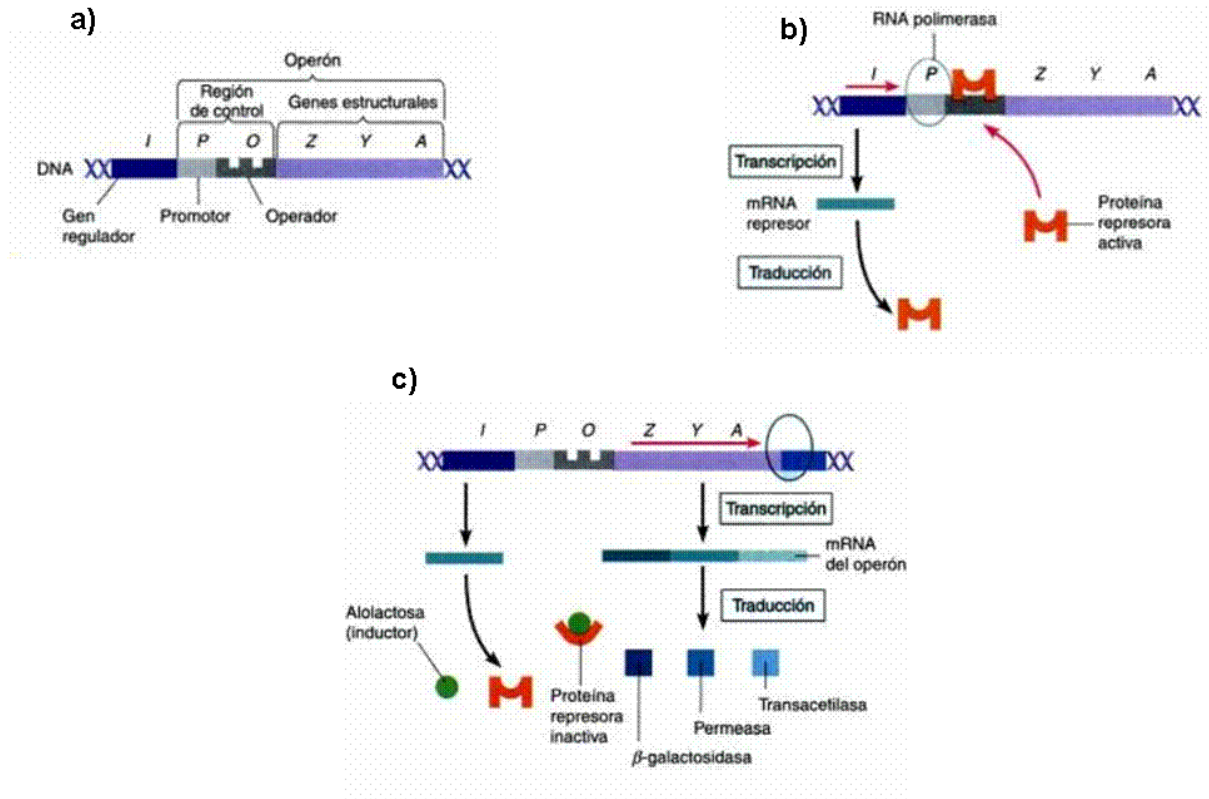


Figura 4. Funcionamiento del operón *lac*. a) Genes controladores y estructurales que conforman el operón y gen que lo regula. b) Transcripción del operón bloqueada por la proteína represora LacI. c) Transcripción de los genes estructurales por inactivación de la proteína represora Lac I mediante un derivado de lactosa. Figura adaptada de Tortora y col., 2007.

7.2. Efecto de la concentración de inductor

A pesar del uso frecuente del sistema de expresión *lac* en la expresión de productos recombinantes, algunas investigaciones han enfocado sus esfuerzos para determinar de una forma óptima la concentración necesaria de inductor (IPTG o lactosa). El uso de IPTG en el laboratorio es muy frecuente y se utiliza a una concentración de 1 mM L⁻¹. Cuando se usan concentraciones elevadas de IPTG no necesariamente se incrementa el nivel de expresión de productos recombinantes y esto es porque en las células se provoca un incremento en la carga metabólica y con ello la disminución de la biomasa. Por lo tanto, en muchos casos la concentración óptima de inducción debe ser elegida tomando en cuenta la fase de crecimiento del microorganismo. Por ejemplo, en 1991 la investigación realizada por Bentley y col. para observar la dinámica de expresión de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) con el uso del promotor *tac*, demostró que si

se realiza la inducción con IPTG en el punto medio de la fase logarítmica de crecimiento, la productividad específica (g CAT sintetizada g⁻¹ de biomasa) de CAT disminuye junto con la tasa de crecimiento específico. También observaron que a altas concentraciones del agente inductor (3.4 mM IPTG L-1) se reduce aproximadamente 80% la tasa de crecimiento específico y se provoca la muerte celular en un tiempo muy corto. Además, los investigadores notaron que la tasa de crecimiento disminuyó en un 60% con concentraciones menores de inductor (2.1 mM de IPTG /L de cultivo). Con estos resultados los investigadores observaron que existe una relación entre el aumento de la concentración de inductor, la expresión de la proteína y el rendimiento en el crecimiento celular. Entonces, gracias a sus observaciones optaron por utilizar una concentración de 0.8 mM IPTG con lo que lograron minimizar el efecto de la disminución celular e incrementar los niveles de expresión de la proteína recombinante.

Wood y Paretti, en 1991 analizaron los cambios en la transcripción y traducción de β -galactosidasa recombinante al cambiar los niveles de la concentración de IPTG, las concentraciones utilizadas oscilaron entre 0.01 a 7.5 mM de IPTG L-1. Observaron que la síntesis del ARNm y la actividad de la enzima recombinante incrementaron de manera lineal hasta una concentración de 1 mM de IPTG L-1, además se percataron de que incrementos mayores no siguieron el mismo comportamiento, lo que sugiere que la degradación del ARNm de la β -galactosidasa limitó la expresión de la proteína. Según los autores, este fenómeno es provocado porque la célula tiende a conservar un equilibrio para mantener estables los procesos celulares y administrar los recursos energéticos.

La inducción con IPTG causa una gran variedad de respuestas por estrés celular, en algunos casos se observa un incremento de proteínas de choque térmico cuando se realiza la inducción con bajos niveles de IPTG (Kosinski y col., 1992), asimismo se ha observado la degradación anormal de proteínas provocada por el nivel de IPTG. El incremento de la expresión de proteínas recombinantes por el uso de IPTG también induce una gran cantidad de proteasas en medios de cultivo donde la concentración de ciertos aminoácidos es limitada, lo que provoca la degradación de productos recombinantes (Glick, 1995). La localización celular

de una proteína recombinante también está afectada por la concentración de IPTG, se ha observado que la solubilidad y un apropiado plegamiento mejoran cuando se utilizan concentraciones menores a 1 mM de IPTG porque disminuye la tasa de transcripción. Entonces, la concentración óptima de IPTG para la expresión de productos recombinantes es dependiente de varios factores como: la fuerza del promotor, la presencia de genes represores en el plásmido, la localización deseada del producto de expresión, la respuesta celular al mismo, la solubilidad y las características de la proteína recombinante; por lo tanto, su uso se debe evaluar dependiendo de cada sistema de expresión (Donovan y col., 1996).

La lactosa es una sustancia disponible en grandes cantidades y su costo es menor al del IPTG; sin embargo, muy pocas investigaciones han examinado las condiciones para usar esta sustancia como inductor. Esto se debe a que optimizar las condiciones de expresión es mucho más complejo debido a la respuesta fisiológica de la célula al metabolizar este carbohidrato. El uso de lactosa como inductor para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor *lac* se debe hacer tomando en cuenta las características genéticas de la cepa de expresión. Es decir, la cepa que se utilizará debe contar con la maquinaria genética necesaria para el metabolismo de la lactosa; ya que a diferencia de lo que sucede con el IPTG, la célula debe generar un intermediario conocido como alolactosa que lo sintetiza enzimáticamente la β -galactosidasa; por lo tanto, células deficientes en actividad β -galactosidasa no podrán utilizar la lactosa como inductor. La lactosa es tan efectiva como el IPTG para la expresión de proteínas recombinantes, pero al igual que en su homólogo sintético, el uso de la lactosa se ve afectado por factores similares. Además se ha reportado que algunas sustancias como el glicerol, que está presente en algunos medios de cultivo, puede disminuir la eficiencia de la lactosa como inductor porque las dos sustancias compiten por el mismo grupo de enzimas transportadoras que se encuentran en la membrana celular (Donovan y col., 1996).

7.3. Efecto de la temperatura

La temperatura óptima para obtener la máxima actividad del operón *lac* es entre 37 y 39°C, pero se ha reportado que el uso de temperaturas subóptimas de crecimiento disminuye respuestas metabólicas no deseadas para la expresión de proteínas recombinantes y como consecuencia, aumenta el rendimiento y/o solubilidad de la proteína. Por ejemplo, en la síntesis de β -galactosidasa al realizar la expresión con IPTG y reducir la temperatura del cultivo de 37°C a 30°C, se observó la disminución de la síntesis de proteínas de choque térmico y por lo tanto, se redujo la proteólisis del producto recombinante (Surek y col., 1991).

La disminución de la temperatura en los medios de cultivo puede minimizar algunas rutas celulares que provocan la degradación de productos recombinantes. Se ha observado que la proteína sufre cambios conformacionales cuando la temperatura de inducción es mayor a 30°C, esto provoca la exposición de sitios de corte y por lo tanto, un aumento en la actividad proteolítica. La formación de agregados insolubles, conocidos como cuerpos de inclusión, también disminuye por el uso de niveles bajos de temperatura (Hartl y col., 1994).

7.4. Composición del medio de cultivo

Para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del gen *lac* se han utilizado diferentes medios de cultivo complejos y medios mínimos. Los medios de cultivo complejos son aquellos que proveen una gran cantidad de aminoácidos, vitaminas y elementos traza para soportar el crecimiento celular y la expresión de la proteína de interés. Los medios mínimos son aquellos que contienen mínimas cantidades de fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y elementos traza. Un medio mínimo tiene un costo menor que un medio complejo. La composición del medio de cultivo puede afectar la expresión de proteínas porque en algunos casos provoca la disminución de la biomasa y por lo tanto, el rendimiento total del producto recombinante (Donovan y col., 1996).

La composición del medio de cultivo es vital durante el proceso de inducción de proteínas porque al sobreexpresarlas se puede provocar estrés

celular con el aumento de la carga metabólica; este efecto se puede potenciar si las fuentes de carbono y nitrógeno son escasas (Harcum y Bentley, 1993).

7.5. El momento y duración de la inducción

Generalmente la expresión de proteínas recombinantes provoca una carga metabólica a las células huésped, lo cual puede provocar la disminución del crecimiento celular, menor rendimiento del producto recombinante e inestabilidad del vector de expresión. Para disminuir estos efectos se deben controlar factores como los mencionados anteriormente. Sin embargo, otro factor de interés es el punto en el cual se realiza la inducción de acuerdo a la fase de crecimiento del cultivo que comúnmente se determina mediante la densidad óptica del caldo de cultivo a una absorbancia de 600nm (DO_{600}).

En algunas cepas se ha reportado que el crecimiento y/o la viabilidad celular se ve afectada cuando se realiza la inducción; por lo tanto, se recomienda que se realice la inducción durante la fase de crecimiento log o en la fase estacionaria con la finalidad de lograr en el medio de cultivo la mayor cantidad de células y así, incrementar el nivel de producto recombinante. Sin embargo, se deben tomar en cuenta otros factores durante el proceso de fermentación; por ejemplo, cuando se usa un medio mínimo y se realiza la inducción en etapas tardías, los nutrientes en el medio de cultivo comienzan a disminuir, esto provoca la síntesis de proteasas, proteínas que pueden disminuir los niveles de expresión de proteína recombinante. En estos casos, se puede alcanzar un alto nivel de expresión con una inducción al inicio de la fase log.

Para obtener un nivel óptimo de proteína recombinante también es importante la duración de la inducción, se ha reportado que puede mejorar la liberación de proteína al periplasma celular (Shibui y Nagahari, 1992). Otros reportes indican que periodos largos de inducción generan la síntesis de proteínas de choque térmico y de proteasas que disminuyen los rendimientos de proteína recombinante. También, cuando se expresan cantidades elevadas de proteína al interior de la célula se puede provocar lisis porque se debilita la membrana celular.

8. Herramientas estadísticas para la mejora de un proceso

En cualquier proceso productivo es común que intervengan dos o más factores, en el caso de la expresión de proteínas heterólogas se han descrito aquellos factores que impactan directamente en los niveles de expresión proteica. En casos como estos “es necesario diseñar estrategias eficientes para el estudio de dos o más factores mediante los llamados diseños factoriales” (Castaño y Domínguez, 2010) que permiten encontrar condiciones óptimas en cada factor que benefician la variable respuesta. En situaciones experimentales donde interviene un gran número de factores se incrementa el número de tratamientos y en consecuencia, aumenta el gasto en los recursos humanos, económicos y el tiempo. En circunstancias como estas, existen herramientas estadísticas que permiten aplicar sólo una fracción de los tratamientos mediante el uso de los diseños factoriales fraccionados que generan la suficiente información para optimizar algún proceso científico o tecnológico. Tal es el caso de los diseños Plackett-Burman, diseños que pueden ser aplicados para el análisis de seis o más factores con un mínimo número de ensayos. Con este tipo de diseños se puede determinar la importancia de efectos principales provocados por los factores a la variable respuesta de interés.

Chaiyaso y col. (2011) optimizaron el proceso de obtención de una xilanasa aislada de *Streptomyces thermovulgaris* mediante el uso de un medio basal que contenía paja de arroz como única fuente de carbono. En el experimento se evaluaron los componentes del medio de cultivo constituido por nueve factores y cada factor en dos niveles. Los científicos realizaron 12 tratamientos mediante un diseño Plackett-Burman y concluyeron mediante el uso de este diseño que el extracto de levadura y el contenido de paja de arroz son los factores que más influyen en la producción de la xilanasa.

En otro estudio se mejoró la producción de inulinasas de *Streptomyces sp.* a partir de ajo como fuente de carbono. Los investigadores evaluaron el efecto que provocan 18 factores del medio de cultivo en la producción de inulinasas mediante 20 tratamientos diseñados con la metodología Plackett-Burman. Concluyeron que la producción estaba influenciada por cuatro efectos principales,

entre las variables destacan NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y soya fueron las variables mas significativas (Dilipkumar y col., 2011).

9. Escalamiento de la expresión de proteínas

En la expresión de proteínas recombinantes se busca la optimización con el fin de disminuir costos de producción y al mismo tiempo mejorar los niveles de expresión. Una vez que se tiene identificado el mejor sistema de expresión de la proteína de interés, el siguiente paso es el escalamiento a niveles mayores con la finalidad de obtener una mayor producción de esta proteína. Yiran y Zhang (2009) reportaron que hay un aumento significativo en la expresión de una proteína recombinante y disminución de costos cuando se sustituye el inductor IPTG por lactosa, se controlan las condiciones de cultivo y se evalúan diferentes vectores de expresión.

Chi y col. (2009) probaron diferentes medios de cultivo en los que se modificaron las fuentes de carbono y nitrógeno y reportaron el aumento de 4.1 veces más la expresión de una proteína recombinante. Por su parte, Ma y col. (2006) probaron diferentes condiciones de cultivo, utilizaron diferentes medios de cultivo, modificaron el pH y la temperatura del medio y sustituyeron el inductor IPTG por lactosa, como resultado de estas condiciones obtuvieron un incremento en la expresión de una proteína heteróloga, lograron tres veces más expresión de proteína.

Dentro del vector diseñado para la expresión de la proteína modificada por Luna-Suárez (2008) se encuentra insertado el gen *lac* que es inducido mediante el agente IPTG, mismo que desencadena la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada impidiendo que el represor *lac* se una al operador. Además, el vector cuenta con el promotor T7 que permite la síntesis de la RNA polimerasa que a su vez permite la síntesis de un elevado número de copias y, por lo tanto, altos niveles de expresión. El inductor (en este caso el IPTG) se une al represor *lac* provocando cambios conformacionales que disocian al represor *lac* del ADN y entonces, con el lugar del operador desocupado, la RNA polimerasa puede transcribir el resto del vector de expresión (Stryer y col., 2008).

El IPTG es un análogo sintético de la lactosa y es el agente inductor utilizado frecuentemente para la expresión de proteínas heterólogas por las siguientes razones: es efectivo en dosis pequeñas, la inducción no se afecta por la presencia de glucosa y no es metabolizado por las células huésped. Sin embargo, el costo del IPTG es muy elevado y es tóxico al ser humano (Donovan y col., 1996). Por ello el uso de lactosa como agente inductor de proteínas recombinantes tiende a tomar importancia.

En la última investigación realizada por Arano en 2010 en el laboratorio de Biotecnología del Cinvestav-UI se transformó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) con el vector de expresión pET-AC-M3 y se comparó el nivel de expresión con la cepa *E.coli* Origami (DE3) transformada con el mismo vector. Los resultados indicaron que la cepa Rosetta expresó 3.5 veces más la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos. Cabe señalar que el medio de cultivo que se utilizó en esta investigación para la expresión de la proteína fue el medio Terrific que es considerado un medio enriquecido y que, para la sobreexpresión de la proteína de interés, eleva el costo, por esta razón es importante probar diferentes medios de cultivo que permitan obtener niveles de expresión similares pero con disminución en los costos.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, debido al elevado índice de hipertensión en la población se han desarrollado fármacos antihipertensivos que provocan reacciones secundarias para el consumo humano. Por lo tanto, es necesario desarrollar productos que controlen este padecimiento y que al mismo tiempo no provoquen efectos adversos a la salud.

El bajo costo en la expresión de proteínas es primordial y en este sentido, en esta investigación pretendemos lograr altos niveles de expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos con un menor costo y sin toxicidad.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

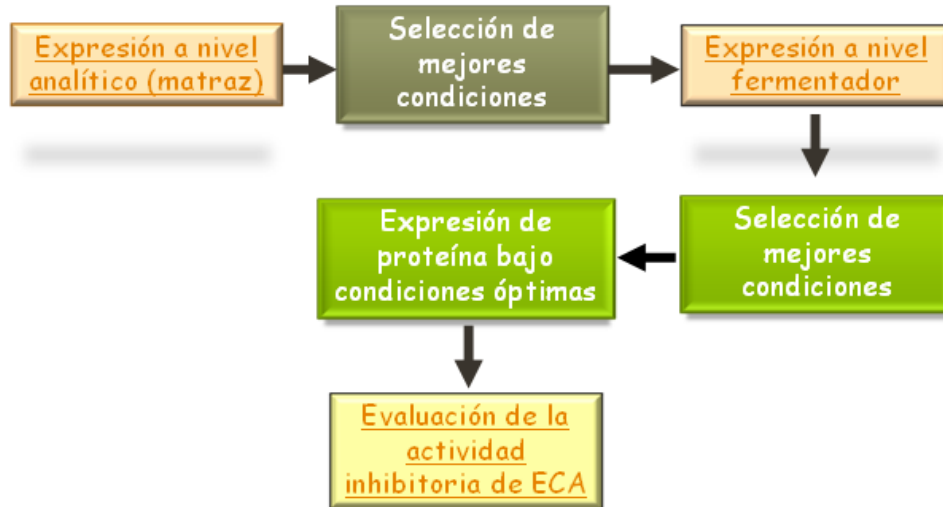
Optimizar la expresión de la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas en *E. coli*.

2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas.
- Estimar el efecto de la lactosa como sustituto del IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) en la expresión de la proteína de interés.
- Sobreexpresar en un fermentador la proteína recombinante con el mejor medio y con la lactosa como inductor.
- Evaluar la actividad inhibitoria que posee la proteína obtenida sobre la enzima convertidora de angiotensina I.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

En la siguiente Figura se muestra el esquema general del proceso que se siguió para la investigación.



Evaluación de la capacidad inhibitoria de ECA por la subunidad ácida de la amarantina modificada



Figura 5. Estrategia experimental

1. Microorganismo y condiciones de cultivo

En este trabajo se empleó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen, Markham, Ontario, Canadá) que contiene el vector de expresión pET-AC-M3 (Luna-Suárez, 2008) que codifica para la síntesis de la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas. La transformación de esta cepa fue realizada por Arano (2010).

El cultivo inicial se realizó en un matraz de 250 mL mediante la inoculación con una colonia de *E. coli* Rosetta en 50 mL de caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con 110 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol. El cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm y a una temperatura de 37 °C durante una noche.

2. Expresión de la proteína a nivel analítico

2.1. Medios de cultivo

Se realizaron fermentaciones en ocho medios de cultivo con la finalidad de observar la mayor expresión de la proteína de interés. Los experimentos se llevaron a cabo en una relación de 1:6 (volumen medio/volumen de matraz) de acuerdo a los reportes de Arano (2010); es decir, en 42 mL de medio estéril suplementados con 110 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol. La composición de los medios se puede observar en el Cuadro 9. Para iniciar la fermentación, los medios se inocularon con el 2.5% (v/v) del cultivo inicial en matraz de 250 mL y se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm en un agitador orbital Gytratory® Shaker G2 (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, NJ, EUA). Todos los medios contenían infusión de papa que se preparó con trozos de papa de 3 cm. aproximadamente que se mantuvieron en ebullición durante 20 minutos en agua destilada de acuerdo a su composición (Cuadro 9).

Durante el proceso fermentativo se monitoreó la DO₆₀₀ de los cultivos con el espectrofotómetro Benchmark Plus (Bio-Rad Hercules, CA, EUA) para realizar la inducción de acuerdo a los tratamientos (Cuadro 10). A lo largo del proceso, se colectaron muestras de 1 mL de caldo de cultivo en diferentes intervalos de tiempo para observar la expresión de la proteína. Las muestras de 1 mL de caldo se

centrifugaron a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. La pastilla celular resultante del proceso de centrifugación se almacenó a -20 °C para el posterior análisis de la expresión de la proteína recombinante. Es importante indicar que el medio A8 se utilizó solo como control positivo a nivel matraz porque este medio ya ha sido utilizado en investigaciones anteriores. Cabe señalar que para estimular la expresión de la proteína se utilizaron diferentes agentes inductores (en el siguiente apartado se especificarán sus características).

Cuadro 9. Medios de cultivo y composición		
Código	Medio de cultivo	Composición
A1	IPgli	200 g/L de papa, 4 mL/L de glicerol
A2	IPglis	200 g/L de papa, 4 mL/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄
A3	IPglu	200 g/L de papa, 10 g/L de glucosa
A4	IPGpglis	200 g/L de papa, 10 g/L de glucosa, 12 g/L de peptona, 4 ml/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄
A5	IPGtglis	200 g/L de papa, 10 g/L de glucosa, 12 g/L de triptona, 4 ml/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄
A6	IPpglis	200 g/L de papa, 12 g/L de peptona, 4 mL/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄
A7	IPtglis	200 g/L de papa, 12 g/L de triptona, 4 mL/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄
A8	Terrific	12 g/L de triptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ y 72 mM K ₂ HPO ₄

2.2. Agente Inductor

En este estudio se utilizaron dos agentes inductores: IPTG a una concentración de 0.3 mM y lactosa a 2 diferentes concentraciones 0.5% y 2% (m/v). La inducción comenzó cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0.3-0.4, punto donde comienza la fase exponencial (Arano, 2010). Hasta aquí concluyó la primera etapa del proyecto y, una vez obtenidos los resultados, se llevó a cabo la expresión de la proteína a nivel fermentador.

Cuadro 10. Diseño factorial y tratamientos			
Medio de cultivo	Inductores		
	0.3 mM IPTG	0.5% Lactosa	2% Lactosa
A1	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
A2	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
A3	Tratamiento 7	Tratamiento 8	Tratamiento 9
A4	Tratamiento 10	Tratamiento 11	Tratamiento 12
A5	Tratamiento 13	Tratamiento 14	Tratamiento 15
A6	Tratamiento 16	Tratamiento 17	Tratamiento 18
A7	Tratamiento 19	Tratamiento 20	Tratamiento 21
A8	Tratamiento 22	Tratamiento 23	Tratamiento 24

3. Expresión de la proteína a nivel fermentador

La segunda etapa consistió en realizar la expresión de la proteína de interés a nivel fermentador. Los tratamientos se realizaron de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la primera etapa. Se evaluaron diferentes condiciones para observar el efecto que tiene la composición del medio de cultivo, el pH del medio, la agitación, el flujo de aire, el momento de la inducción (expresada como DO_{600}), la temperatura posterior a la inducción y el agente inductor (Cuadro 11 y 12). Se realizó la expresión de la proteína mutante en un

fermentador modelo BIOFLO IIc (New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, NJ, EUA) con una capacidad de 5 L. El volumen de trabajo del fermentador fue del 70%, es decir, 3.5 L de medio de cultivo que se esterilizaron en autoclave junto con el tanque de fermentación. Los parámetros fijos fueron: la concentración de preinóculo (2.5% v/v), los antibióticos con los que se suplementaron los medios (ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL), la temperatura inicial y la agitación a 37 °C y 200 rpm, respectivamente. Una vez que se realizó la inducción, se ajustó la agitación y la temperatura de acuerdo al Cuadro 4. Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de 1 mL a diferentes intervalos de tiempo, mismas que fueron centrifugadas a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. La pastilla celular resultante del proceso de centrifugación se almacenó a -20 °C para el posterior análisis de la expresión de la proteína recombinante.

Cuadro 11. Factores y niveles para el medio A6

Factores	Niveles		
	-1	0	1
A. Infusión de papa (g/L)	150	200	250
B. Peptona (g/L)	10	12	14
C. Glicerol (mL)	3	4	5
D. pH	6.5	7	7.5
E. Agitación (rpm)	260	300	340
F. Flujo de aire (vvm)	0.05	0.1	0.15
G. Densidad óptica (DO600)	0.3	0.4	0.5
H. Inductor	0.5% Lactosa	1% Lactosa	0.3 mM IPTG
J. Temp. de inducción (°C)	25	30	35

Cuadro 12. Factores y niveles para el medio A7

Factores	Niveles		
	-1	0	1
A. Infusión de papa (g/L)	150	200	250
B. Triptona (g/L)	10	12	14
C. Glicerol (mL)	3	4	5
D. pH	6.5	7	7.5
E. Agitación (rpm)	260	300	340
F. Flujo de aire (vvm)	0.05	0.1	0.15
G. Densidad óptica (DO ₆₀₀)	0.3	0.4	0.5
H. Inductor	0.5% Lactosa	1% Lactosa	0.3 mM IPTG
J. Temp. de inducción (°C)	25	30	35

4. Análisis y diseño estadístico de los experimentos

La primera etapa del proyecto se realizó mediante un diseño factorial simple para observar el efecto en la expresión de la proteína mutante. En este diseño, los factores de interés fueron los “medios de cultivo” y los “agentes inductores”, y la variable respuesta fue la expresión de la proteína reportada como miligramos de proteína por litro de cultivo (mg/L). Así, se realizaron todos los tratamientos y fue posible establecer conclusiones generales sin perder de vista los factores de interés que afectan la expresión de la proteína. Los tratamientos fueron realizados al azar.

Para llevar a cabo los tratamientos a nivel fermentador, se realizó el diseño experimental tomando en cuenta nueve factores. El nivel bajo, medio y alto de cada factor se designó como -1, 0 y 1, respectivamente (Cuadro 11 y 12). Mediante un diseño Plackett-Burman se realizaron los tratamientos para observar los factores que tenían un mayor efecto en la expresión de la proteína heteróloga y, posteriormente, optimizar el proceso de producción, dentro de este diseño también se realizaron 2 tratamientos en los puntos centrales. La estructura de

tratamientos del diseño Plackett-Burman y los puntos centrales se pueden observar en el Cuadro 13. Al igual que en la primera etapa, todos los tratamientos se realizaron al azar. El siguiente modelo de regresión permitió cuantificar la aportación de cada factor en la expresión de la proteína con los diferentes tratamientos (medios A6 y A7):

$$Y_{op} = \bar{A}_i + \bar{B}_i + \bar{C}_i + \bar{D}_i + \bar{E}_i + \bar{F}_i + \bar{G}_i + \bar{H}_i + \bar{J}_i - 8\bar{Y} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde Y_{op} es la expresión de la proteína optimizada, los términos A, B, C, D, E, F, G, H y J son las variables independientes que corresponden a cada factor, y el subíndice i corresponde a los niveles donde se obtiene el mayor efecto en la variable respuesta. El término \bar{Y} es el promedio de la variable respuesta.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el Design Expert 7.0.1 (Stat-Ease, Minneapolis, MIN, EUA), este programa permitió determinar la significancia de los factores y; por lo tanto, desarrollar un modelo ajustado a los datos obtenidos mediante la experimentación.

Cuadro 13. Estructura de tratamientos a nivel fermentador para A6 y A7

TRATAMIENTO	FACTOR									
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

5. Análisis de la proteína recombinante

5.1. Electroforesis

El tamaño esperado de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos es de 32 kDa (Luna-Suárez 2008), esto se observó mediante electroforesis SDS-PAGE con las muestras almacenadas durante los procesos de fermentación (nivel matraz y nivel fermentador), es decir, se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%. En este método, se utilizó un amortiguador de carga compuesto por Tris-HCl 24 mM, pH 6.8; glicerol 10%; SDS 0.8%; 2- β -mercaptoetanol 5.76 mM; azul de bromofenol 0.04% (Laemmli, 1970). En este amortiguador se resuspendieron las pastillas celulares de acuerdo al volumen original de muestra y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R-250 para poderlas

visualizar en el gel. Se utilizaron los marcadores de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™ Co. Carlsbad, California, USA). El proceso de electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V por dos horas a temperatura ambiente en una cámara Mini PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Hercules, CA, EUA).

5.2. Análisis tipo Western blot

Se realizó la detección inmunológica de la proteína de acuerdo con Dumbroff y Gepstein (1993). Se separaron las proteínas en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF Sequi-Blot™ (Bio-Rad Hercules, CA, EUA), y mediante una cámara Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Hercules, CA, EUA) se utilizó el marcador de peso molecular BenchMark™ prestained Protein Ladder (Invitrogen™ Co. Carlsbad, California, USA). Una vez realizada la transferencia, se lavó la membrana con TTBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0.5%) por 15 minutos en agitación, después, la membrana se bloqueó con TTBS más seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (p/v) por dos horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados a la membrana con el amortiguador TTBS, cada lavado duró 15 minutos, en seguida, se añadió el primer anticuerpo (anti-amarantina) (Osuna-Castro y col., 2000) diluido en relación 1:60000 (anticuerpo:amortiguador) en amortiguador TTBS y se incubó con la membrana a temperatura ambiente con agitación suave por una hora. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana en tres ocasiones con TTBS por 15 minutos cada lavado y se adicionó el segundo anticuerpo: anti-conejo (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, EUA). Después, se lavó la membrana con TTBS en tres ocasiones por 15 minutos y TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM) en tres ocasiones por 15 minutos cada lavado. Más tarde, se reveló con los sustratos BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato-toluidina) y NBT (cloruro de *p*-nitraziltetrazolio) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, EUA) en amortiguador (Tris-HCl 100 mM pH 9.0, NaCl 100 mM), con esto se pudo observar la detección inmunológica de la proteína recombinante.

5.3. Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de proteína total se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) que se basa en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con el cobre (Cu) en condiciones alcalinas. Esta reacción provoca la conversión de Cu^{+2} a Cu, cuando este producto reacciona con BCA provoca la aparición de un color púrpura intenso con una absorbancia máxima a 562 nm. Las lecturas se realizaron mediante el espectrofotómetro Benchmark Plus (Bio-Rad Hercules, CA, EUA). Para esta determinación se usó el Kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois, EUA) y la albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar. Para la cuantificación de la proteína de interés, se utilizó el densitómetro GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). La cuantificación mediante el densitómetro es una forma de medir la porción de una proteína de interés presente en una cantidad conocida de proteína total respecto a una proteína de concentración conocida (comúnmente BSA). En forma práctica, se determinó la concentración de proteína total por BCA en mg/mL con las muestras que se colectaron durante el proceso de fermentación. Una vez conocido este dato, se hicieron las determinaciones para cargar una cantidad conocida de proteína total en geles SDS-PAGE, al mismo tiempo se cargaron cantidades conocidas de BSA para generar una curva estándar. Después de realizar la electroforesis, los geles se tiñeron y se escanearon para realizar la cuantificación. La Figura 6 ilustra la cuantificación por densitómetro.

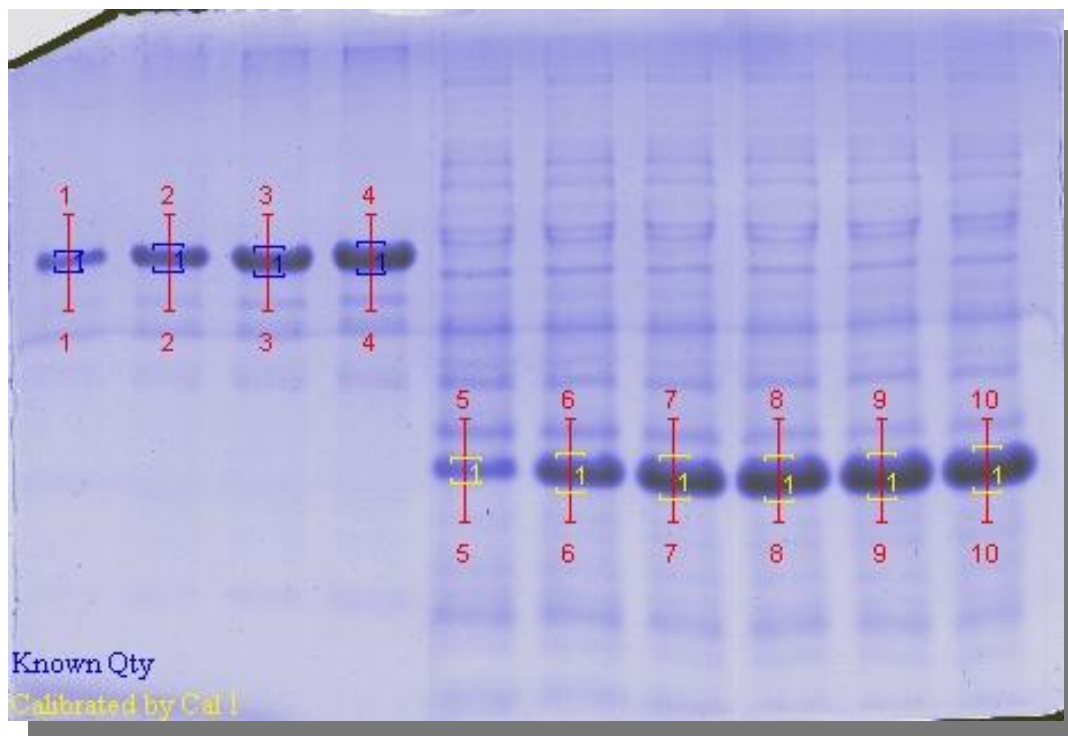


Figura 6. Cuantificación por densitómetro. Carriles: 1-4: 0.5, 1, 1.5 y 2 μ g de BSA, respectivamente; 5-10: diferentes muestras para determinar la proteína de interés (entre líneas amarillas).

6. Purificación de la proteína recombinante

6.1. Proteínas solubles e insolubles

Las fermentaciones que se realizaron para confirmar el proceso óptimo para la expresión de la proteína de interés se realizaron durante 24 horas de inducción, posteriormente, se cosecharon 200 mL de caldo de cultivo, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. a temperatura ambiente, y las pastillas resultantes se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. Para determinar en qué fracción se encontraba la proteína mutante, las pastillas celulares se resuspendieron en amortiguador de lisis (0.5 M NaCl, 5 mM imidazol y 20 mM de Tris-HCl pH 7.5) con un homogenizador Ultra-Turrax[®] (Ika-Works Wilmington, NC, EUA) en relación 1:4 (peso de la pastilla: volumen de buffer). Posteriormente, las células resuspendidas se sometieron durante 5 minutos a sonicación a una amplitud del 50% con el sonicador GE 750 (Ultrasonic Processor), seguido de un periodo de reposo de 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, este proceso se repitió por seis ciclos. Al terminar la sonicación, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante

30 minutos. En seguida, se separó el sobrenadante (fracción de proteína soluble) de la pastilla (fracción de proteína insoluble y restos celulares). La pastilla resultante se resuspendió en amortiguador de extracción (0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 20 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 6 M Urea) en relación 1:3 (peso de la pastilla: volumen de buffer) y se mantuvo en agitación por 4 horas a 200 rpm en un agitador orbital Gyratory[®] Shaker G2 (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, NJ, EUA) a una temperatura de 4 °C. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 16,000 rpm a 4 °C, posteriormente, se recuperó el sobrenadante porque ahí se encontraba la fracción de proteína insoluble al igual que la proteína de interés. El proceso de centrifugación se realizó en una centrifuga modelo Sorvall[®] SUPER T21 (Kendro Laboratory Products Newtown, CT, EUA).

6.2. Saturación con sulfato de amonio

Como primera etapa de purificación, la proteína total insoluble extraída se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) sólido. Inicialmente, la muestra se saturó a una concentración de 0-10% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se agitó suavemente en una parrilla con agitación magnética durante 30 minutos a 4 °C. Cumplido el tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 rpm a 4 °C. Al terminar el proceso de centrifugación, el sobrenadante y la pastilla se separaron, la pastilla se almacenó a -20 °C para su análisis posterior. El sobrenadante se sometió a saturación a una concentración del 10-20% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se repitió el proceso descrito anteriormente. Al igual que en las fracciones anteriores, las muestras se saturaron al 20-30%, 30-40%, 40-60%, 60-80% y 80-100% de sulfato de amonio. Después de la saturación con sulfato de amonio, todas las pastillas se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8 y 100 mM de NaCl, y se dializaron en un sistema de microdiálisis BRL-1200 (Invitrogen Rockville, MD, USA) contra el mismo amortiguador para eliminar el exceso de sales. Posteriormente, se analizaron cada una de las fracciones mediante SDS-PAGE y se identificaron las proteínas recombinantes mediante análisis tipo Western *blot*.

6.3. Purificación por electroelución

La fracción precipitada con sulfato de amonio que contenía la mayor proporción de la subunidad ácida con péptidos antihipertensivos se aplicó a geles preparativos de acrilamida y se corrió electroforesis SDS-PAGE. Después de realizar la electroforesis, los geles se sumergieron en agua destilada por 10 minutos y, posteriormente, se sumergieron en una solución de sulfato cúprico a una concentración de 0.3 M por 10 minutos para identificar las bandas de la proteína de interés, las bandas teñidas se cortaron del gel y se destiñeron con una solución de EDTA 100 mM por 60 minutos, después se lavaron tres veces con agua desionizada. En seguida, la proteína de interés se electroeluyó del gel con el equipo Whole Gel Eluter (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) por 30 minutos a 250 mA en amortiguador de elución (50 mM Tris y 25 mM Ácido bórico). Finalmente, las muestras se dializaron en un sistema de microdiálisis BRL-1200 (Invitrogen Rockville, MD, USA) contra amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8.

6.4. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés

Se determinó el pI de la proteína de interés purificada mediante la técnica de enfoque isoeléctrico (IEF) (Katsube y col., 1994), se utilizaron tiras de acrilamida con valores de 3-10 unidades de pH de 7 cm. de longitud (IPG strip, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y se enfocaron en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) con 10 µg de proteína pura suspendida en 50 µL de amortiguador (Tris-HCl 100 mM pH 8.2). Estas muestras se precipitaron con el kit 2-D clean up (Amersham-Pharmacia Biotech NJ, EUA) al adicionar y mezclar con agitación vigorosa 300 µL de precipitante, posteriormente, la muestra se incubó en hielo por 15 min., finalmente, se adicionaron a la mezcla 300 µL de co-precipitante y el volumen total se agitó. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante de la pastilla. Al precipitado se le agregaron 40 µL de co-precipitante y se incubó en hielo por 5 min. A continuación, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente y, una vez más, se separó el sobrenadante de la pastilla. A la fracción precipitada se le agregaron 25 µL de agua destilada y se mezcló con agitación

vigorosa por 10 seg. En seguida, se adicionó 1 mL de amortiguador de lavado (previamente enfriado a -20 °C) y 5 µL de aditivo de lavado, esta mezcla se agitó en vortex hasta que la pastilla se dispersó; la muestra se almacenó a -20 °C por 30 min. con agitación cada 10 min. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante, la pastilla resultante se secó al aire por 5 min. Cumplido el tiempo, se resuspendió en 125 uL de amortiguador de solubilización (Urea 8 M, CHAPS 4%, anfolitos acarreadores pH 3-10 0.5%, DTT 40 mM y azul de bromofenol 0.002%), esta mezcla se aplicó a la tira de acrilamida y se realizó una hidratación activa a un voltaje constante de 50 V por 12 h a 20 °C. Tras la rehidratación, se aplicó un acondicionamiento de la tira a 250 V por 15 min., posteriormente, se realizó un incremento de voltaje lineal a 4000 V en 2 h y, finalmente, el enfoque a 12,000 V-h. Después del proceso de enfoque, las tiras se equilibraron durante 10 min. en amortiguador de equilibrio (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, glicerol 20% y 130 mM DTT), que reduce los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Posteriormente, las tiras se incubaron con un segundo amortiguador de equilibrio (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, glicerol 20% y 135 mM iodoacetamida), que previene la reoxidación proteica durante la electroforesis y alquila los grupos sulfhidrilo residuales del DTT. Tras este tratamiento, la tira se colocó en la parte superior de los geles de SDS-PAGE al 12% de acrilamida para separarlas de acuerdo a su peso molecular y visualizarlas al momento de teñir el gel con azul de Coomassie R-250.

7. Evaluación de la actividad inhibitoria que posee la proteína recombinante sobre la enzima convertidora de angiotensina I (IECA)

7.1. Digestión enzimática

Para determinar la eficiencia de la proteína de interés en la IECA, se llevó a cabo una hidrólisis de la proteína purificada que se obtuvo como producto de las fermentaciones confirmatorias. La hidrólisis se realizó mediante la acción de las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. Este método se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Mallikarjun y col. (2006), de esta forma, se incubaron las enzimas

digestivas con la proteína purificada con agitación a 700 rpm a 37 °C en una relación de 1:10 (enzima:sustrato) por 6 horas, posteriormente, se detuvo la reacción al desnaturalizar las enzimas por efecto de la temperatura a 95 °C por 10 min., finalmente, se filtró la mezcla con filtros para centrifuga Ultrafree® -MC centrifugal (Millipore) de 10,000 NMWL (límite de peso molecular nominal por sus siglas en inglés) a 4000 rpm por 5 min., así, con la solución filtrada se determinó la IECA.

7.2. Determinación del IC₅₀ sobre la ECA

La actividad IECA se determinó mediante el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (1971), no obstante, se tomaron en cuenta las modificaciones propuestas por Luna-Suárez y col. (2010). Entonces, se realizó de manera análoga la acción de la ECA sobre la angiotensina I que libera la angiotensina II y el dipéptido His-Leu. En este caso, la enzima actuó sobre el sustrato Hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma) que es el compuesto empleado en el método. Posteriormente, se hizo la medición espectrofotométrica con el espectrómetro DU640 (Beckman Fullerton, CA, EUA) de los productos de la reacción a una absorbancia de 228 nm, longitud de onda con la que se detecta el ácido hipúrico formado en la reacción. Los resultados se expresaron en IC₅₀ que se define como la cantidad de péptido necesaria para inhibir la actividad de la ECA en un 50%. En seguida se detalla el método.

A 200 µL de la solución de sustrato, constituido por HHL (Sigma) a una concentración de 5 mM en amortiguador 0.1 M de borato de sodio y 0.3 M de NaCl pH 8.3, se agregaron 80 µL de muestra y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción enzimática se inició por la adición de 5 mU de ECA (EC 3.4.1 5.1 UI/mg) (Sigma), la mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Más tarde, se adicionó una cantidad de 250 µL de ácido clorhídrico a una concentración 1N y se inactivó la enzima por descenso del pH. Cumplida esta etapa, tras la adición de 1500 µL de acetato de etilo, se realizó la extracción del ácido hipúrico formado por la reacción mediante agitación vigorosa durante 10 segundos y, después, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a

temperatura ambiente, posteriormente, se tomaron 1.2 mL de la fase orgánica. La eliminación de acetato de etilo se llevó a cabo por calentamiento a 95 °C durante 10 minutos en campana de extracción. El residuo obtenido de ácido hipúrico se disolvió en 1 mL de agua destilada y, tras ser agitado, se midió la absorbancia a 228 nm en el espectrofotómetro. Se llevó a cabo un blanco de reacción en el que se añadió el ácido clorhídrico previo a la acción de la ECA.

Se determinó el % de inhibición mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición de ECA} = (A-C)/A-B * 100$$

Donde:

A: Absorbancia en presencia de ECA (100% de actividad de ECA)

B: Absorbancia del blanco de reacción (0% de actividad de ECA)

C: Absorbancia de muestras con inhibidor y ECA

El análisis de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Expresión a nivel matraz

Para evaluar el efecto de los medios propuestos y el uso de lactosa como inductor de la proteína mutante se realizó la expresión a nivel matraz. En las Figuras 7 y 8 se pueden observar un conjunto de geles SDS-PAGE que de forma cualitativa ilustran el perfil electroforético de los tratamientos a nivel analítico y la expresión de la proteína recombinante (resaltada en recuadro rojo).

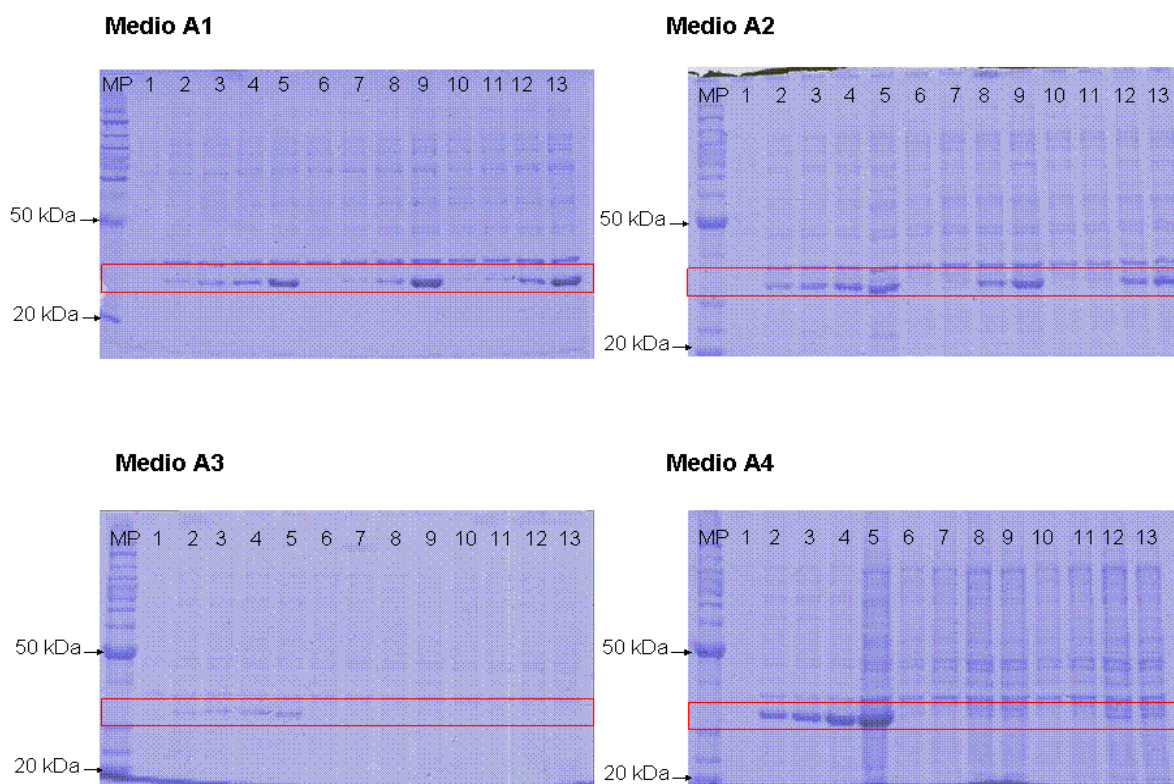


Figura 7. SDS-PAGE de los tratamientos a nivel matraz con diferentes medios y agentes inductores. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1**, control negativo; **2-5**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con IPTG; **6-9**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con 0.5% lactosa; **10-13**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con 2% lactosa. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

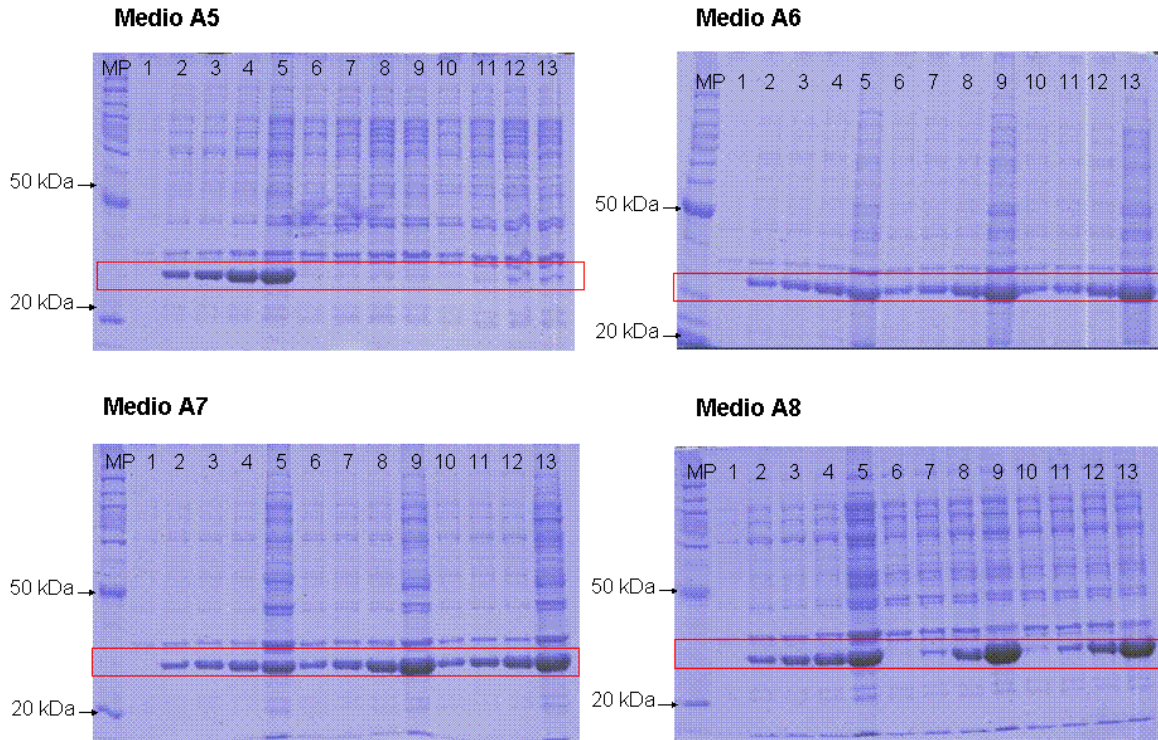


Figura 8. SDS-PAGE de los tratamientos a nivel matraz con diferentes medios y agentes inductores. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1**, control negativo; **2-5**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con IPTG; **6-9**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con 0.5% lactosa; **10-13**, 3, 4, 6 y 24 h después de la inducción con 2% lactosa. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

En las imágenes anteriores se aprecia que en los medios de cultivo A3, A4 y A5 (que contenían glucosa) que fueron inducidos con lactosa no se expresó la proteína de interés (carriles 6 al 13). Este fenómeno se debe a un efecto conocido como represión por catabolito que se produce cuando la célula encuentra en el medio de cultivo un carbohidrato (glucosa) que es fácilmente metabolizado (en comparación con lactosa) y opta por utilizarlo como fuente de carbono primaria, lo cual responde a un ahorro de energía celular (Tutar, 2008). Sin embargo, si se disminuyen los niveles de glucosa, las células tienden a utilizar la segunda fuente de carbono, en este caso lactosa. Esta capacidad de las bacterias se conoce como crecimiento diauxico (Lewis, 2005). A pesar de haber mantenido las fermentaciones hasta por 24 h de inducción en los medios con glucosa, no se observó expresión de la proteína de interés; por lo tanto, para fines de optimización se descartó el uso de estos medios de cultivo.

También se puede observar que existe una mayor acumulación de la proteína de interés conforme pasa el tiempo de inducción. La expresión de proteína que se pudo constatar mediante los geles SDS-PAGE en los medios A1, A2, A6, A7 y A8 a las 24 h de inducción muestran que la proteína de interés se expresa de una forma estable (carriles 5, 9 y 13). El IPTG se mostró efectivo en todos los medios porque provocó la expresión de la proteína de interés y es que a diferencia de la lactosa, las células bacterianas no metabolizan esta sustancia; es decir, no provoca un gasto de energía para su uso a nivel celular (Donovan y col., 1996).

Otro fenómeno que explica la baja expresión de la proteína de interés cuando se usa glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo y lactosa como inductor es la generación de un nivel bajo de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que es una molécula que actúa como mensajero y activa la expresión del operón *lac* mediante la unión a la proteína represor *lac*; por lo tanto, niveles bajos de AMPc provocan una baja expresión de proteínas recombinantes (Cunningham y col 2009).

La cuantificación de la subunidad ácida modificada con péptidos antihipertensivos a nivel matraz después de 6 h de inducción se resume en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Concentración de la proteína de interés* (6 h de inducción)			
Medio de cultivo	Inductores		
	0.3 mM IPTG	0.5% Lactosa	2% Lactosa
A1	23.5	21.8	44.2
A2	29.8	36.7	29.7
A3	25.5	0	0
A4	81.9	0	0
A5	282.5	0	0
A6	221.8	303.2	266.4
A7	171	363.4	245.8
A8	375.6	390.9	365.6

*Concentración expresada en miligramos de proteína por litro de cultivo (mg/L).

Los resultados de la expresión de la proteína indicaron que en los medios A6, A7 y A8 se produjo mayor cantidad de la proteína de interés. En los medios A3, A4 y A5 se observó la proteína de interés solamente mediante la inducción con IPTG y en los medios A1 y A2 se produjeron muy bajas concentraciones de la misma; por lo tanto, sólo se realizaron 3 réplicas en los medios A6, A7 y A8 porque mostraron resultados satisfactorios.

En la Figura 9 se puede apreciar que en los medios A6, A7 y A8 la inducción con 0.5% de lactosa generó una mayor acumulación de proteína, además el uso del inductor IPTG en los medios mínimos (A6 y A7) producía menor cantidad de proteína. Esto es porque la lactosa funcionó como una fuente de carbono extra, que además de provocar la expresión de la proteína, soporta el desarrollo celular. En cambio, el IPTG no provee una fuente de nutrientes, y al inducir la expresión proteica a nivel celular se genera un gasto extra de energía por lo tanto, con menor cantidad de nutrientes en los medios A6 y A7 se desarrollan menos células y con ello el nivel de proteína disminuye (Ramchuran y col., 2005). El uso de lactosa al 2% no incrementó los niveles de expresión porque posiblemente la maquinaria de expresión se satura (Farrel y col., 2005).

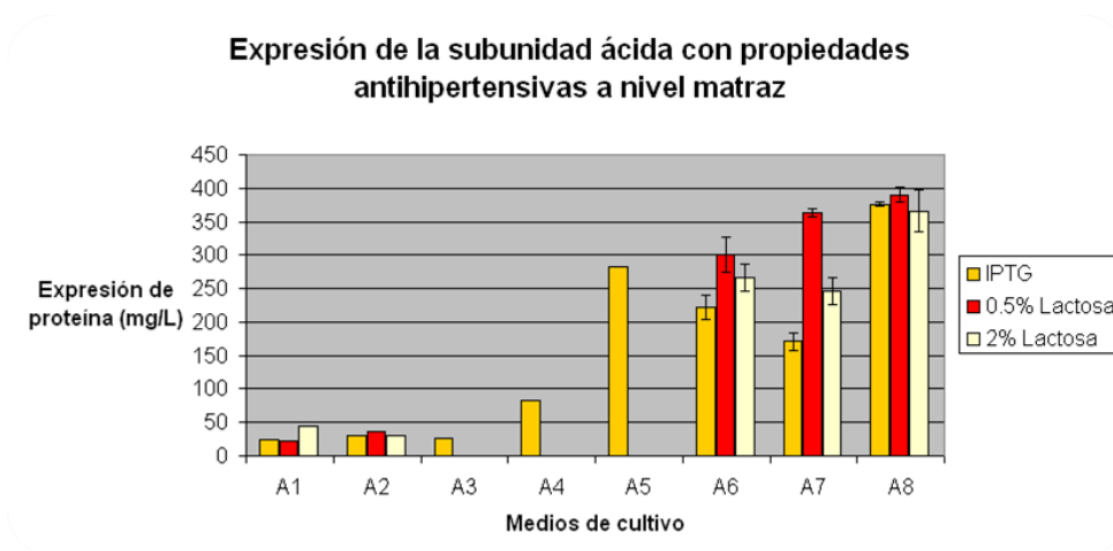


Figura 9. Expresión a nivel matraz de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos.

Para confirmar la presencia de la proteína modificada con péptidos antihipertensivos, se realizó la detección tipo Western *blot* a los productos de las fermentaciones con los medios A6, A7 y A8 después de 6 h de inducción con 0.5% de lactosa (Figura 10).

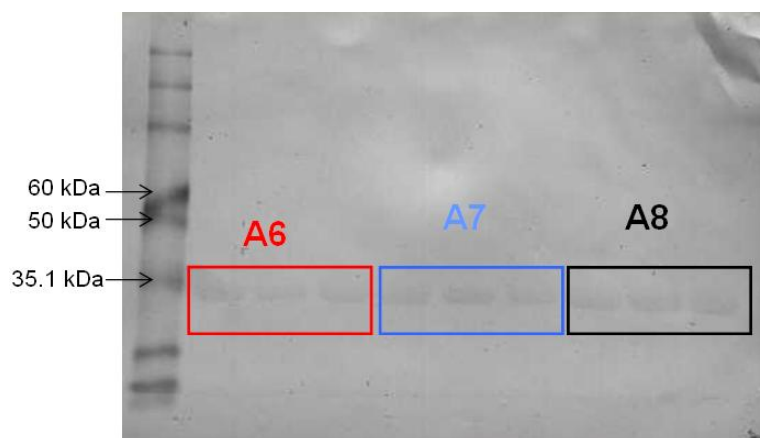


Figura 10. Western *blot* de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos.

2. Expresión a nivel fermentador con el medio de cultivo A6

La expresión a nivel fermentador se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa anterior, es decir, se llevaron a cabo las fermentaciones con los medios mínimos A6 y A7 porque en estos medios junto con el control (A8) fue mayor el nivel de expresión de la proteína recombinante. Dado que a nivel matraz, la inducción con el 2% de lactosa no aumentó la expresión de la proteína de interés, se determinó usar el 0.5% y 1% de lactosa (p/v) para explorar un nivel intermedio de este inductor y evaluar su efecto en la acumulación de la proteína recombinante.

Para definir el momento oportuno de la inducción se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* Rosetta en los medios de interés. En la Figura 11 se presenta las cinéticas de crecimiento de Rosetta en los dos medios mínimos. El monitoreo se realizó por 24 h y se puede observar que la bacteria muestra un comportamiento similar en ambos medios. A partir de las 2.5 h comienza la fase log y entre las 11 y 12 h de cultivo el crecimiento comienza a presentar una curvatura, es decir, inicia la fase de la tencia en ambos medios.

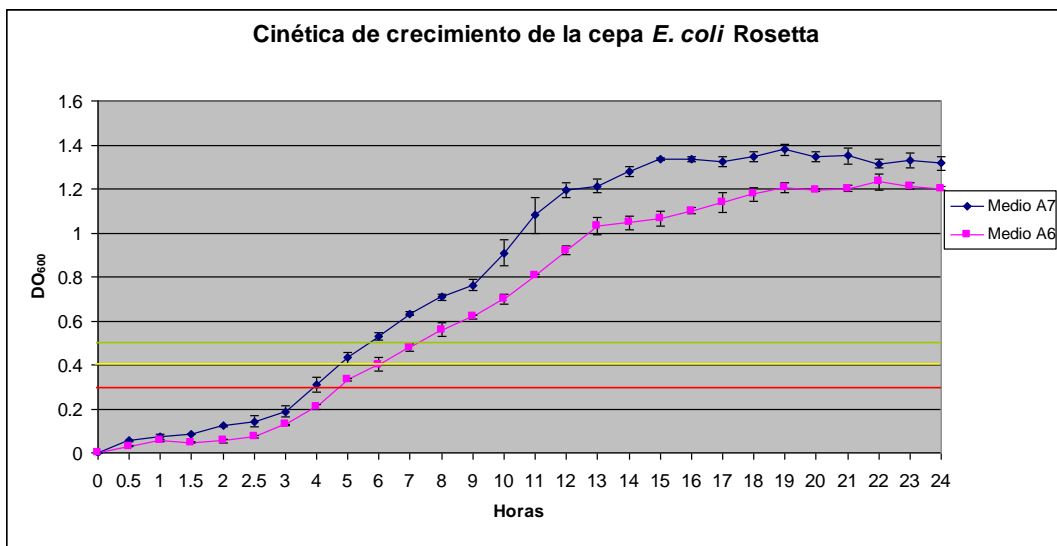


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* Rosetta.

Con base en la cinética de crecimiento del microorganismo se decidió realizar la inducción en una etapa temprana de la fase log (líneas roja amarilla y verde), de esta forma, si usamos medios mínimos se reducirá el riesgo de una carga metabólica mayor y en consecuencia, también disminuirá la posible actividad proteolítica (Ramchuran y col., 2005). Entonces, se realizaron 14 tratamientos de acuerdo a la estructura presentada en el Cuadro 13. En la Figura 12 se puede observar la expresión de la proteína de interés con el medio A6 de una forma estable hasta por 24 h después de inducción.

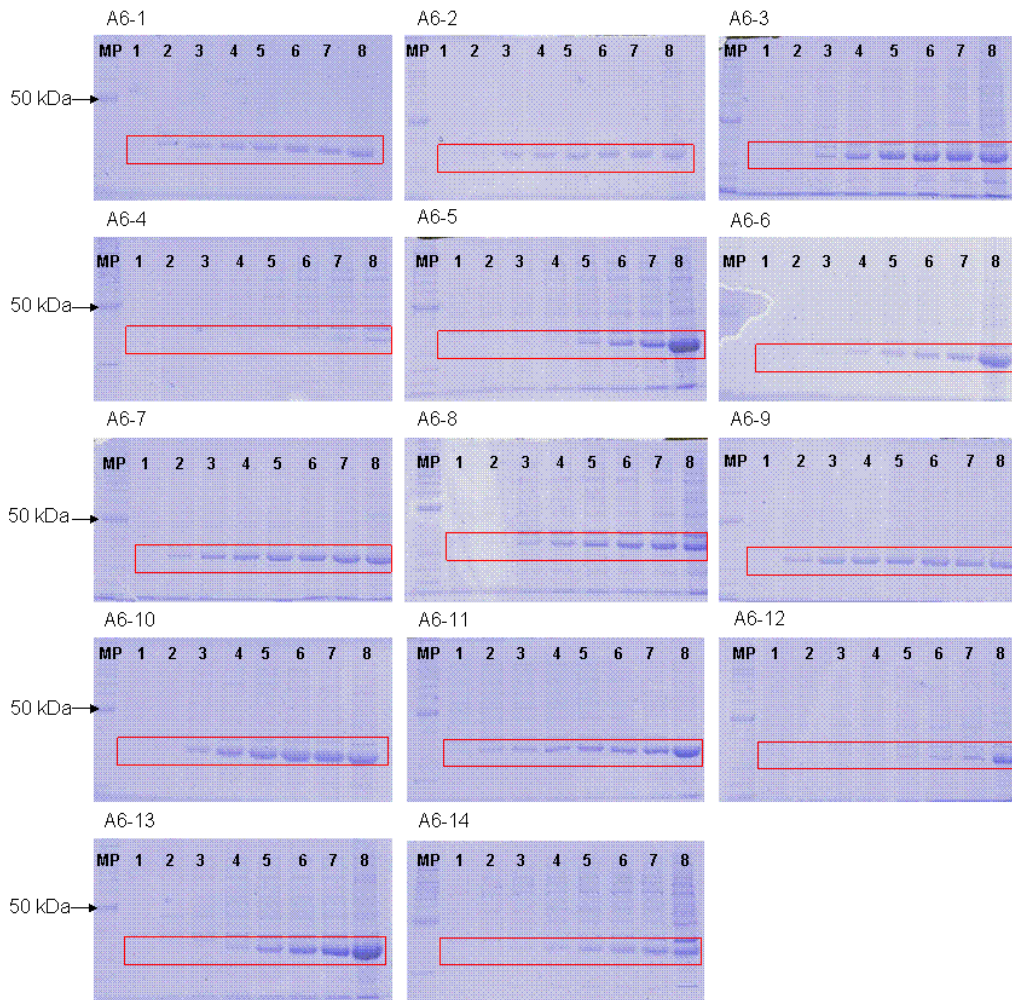


Figura 12. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos a nivel fermentador con el medio A6. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1-7,** 0-6 h de inducción; **8,** 24 h de inducción. A6-1 a A6-14 corresponden a cada uno de los tratamientos de acuerdo al diseño Plackett-Burman y DCC. La casilla roja señala la subunidad ácida de la amarantina modificada. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

En la imagen anterior también se puede constatar que los tratamientos aplicados causaron diferencias en la expresión de la proteína porque se observa discrepancia en la acumulación de la proteína heteróloga respecto al tiempo de inducción. Por lo tanto, realizamos la cuantificación de la proteína de interés y los resultados mostraron que a las 24 h de inducción se acumuló una mayor cantidad de proteína recombinante (Cuadro 15 y Figura 13).

Cuadro 15. Expresión de la subunidad de la amarantina modificada en el medio A6 (24 h de inducción)

Tratamientos	Factores									Proteína de interés (mg/L)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	
1	250	10	5	6.5	260	0.05	0.5	0.3 mM	35	389.9
2	250	14	3	7.5	260	0.05	0.3	0.3 mM	35	167.2
3	150	14	5	6.5	340	0.05	0.3	0.5%	35	761.5
4	250	10	5	7.5	260	0.15	0.3	0.5%	25	282.1
5	250	14	3	7.5	340	0.05	0.5	0.5%	25	865.5
6	250	14	5	6.5	340	0.15	0.3	0.3 mM	25	829.1
7	150	14	5	7.5	260	0.15	0.5	0.5%	35	540.8
8	150	10	5	7.5	340	0.05	0.5	0.3 mM	25	646.7
9	150	10	3	7.5	340	0.15	0.3	0.3 mM	35	325.4
10	250	10	3	6.5	340	0.15	0.5	0.5%	35	892.6
11	150	14	3	6.5	260	0.15	0.5	0.3 mM	25	552.6
12	150	10	3	6.5	260	0.05	0.3	0.5%	25	401.5
13	200	12	4	7	300	0.1	0.4	1%	30	769.7
14	200	12	4	7	300	0.1	0.4	1%	30	704.8

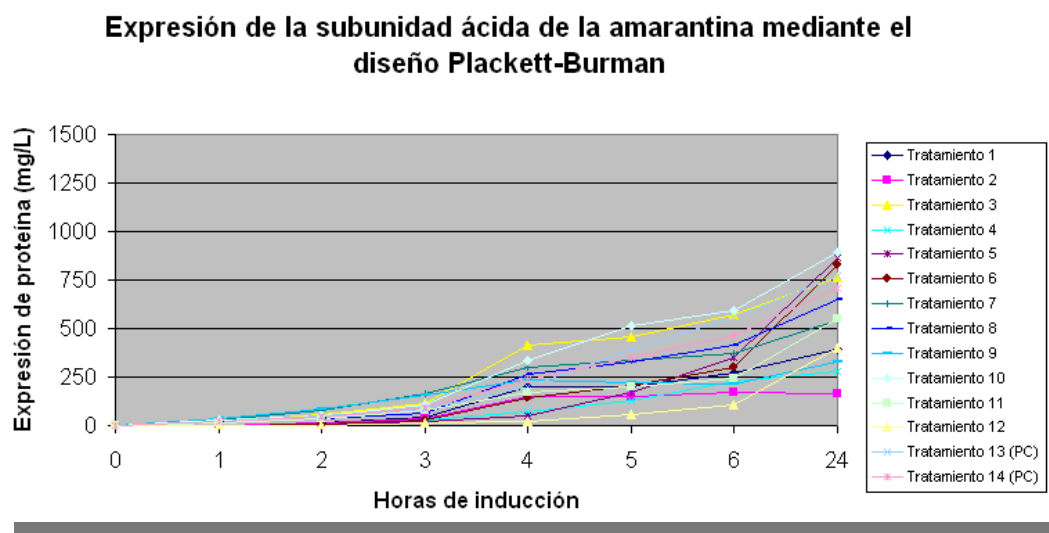


Figura 13. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada (mg/L) con el medio A6.

Según el análisis de los resultados anteriores, se observó que los tratamientos 3, 5, 6, 10, 13 y 14 tuvieron un mayor nivel de expresión,

posiblemente este fue el resultado de niveles altos de agitación que provocaron un incremento en el oxígeno disuelto y por lo tanto en la síntesis de la proteína recombinante (Reddy y col., 2002). Otra observación importante fue que en los tratamientos (3, 5, 10, 13 y 14) donde se utilizó lactosa como inductor en combinación con niveles elevados en la agitación, la producción de la proteína heteróloga fue mayor. Este comportamiento pudo ser provocado por la presencia de una fuente de carbono extra que provee nutrientes para el desarrollo del microorganismo (Wang y col., 2010).

2.1. Análisis estadístico

La cuantificación de la proteína de interés mostró que la subunidad ácida de la amarantina modificada se acumuló en mayor cantidad a las 24 h; por lo tanto, en este análisis estadístico se tomó en cuenta este tiempo de inducción para estimar los factores que provocan un efecto significativo en la producción de la proteína recombinante. En el Cuadro 16 se expone el resultado del análisis.

Cuadro 16. Estimación de efectos de los factores para la expresión a nivel fermentador con el medio A6

Factores	Efecto	Coefficient e	Error estándar	Valores -F	Valores P
Papa (A)	49.48	24.74	14.33	1.73	0.183
Peptona (B)	146.58	73.29	14.33	5.12	0.014
Glicerol (C)	24.05	12.02	14.33	0.84	0.463
pH (D)	-183.42	-91.71	14.33	-6.40	0.008
Agitación (E)	314.62	157.31	14.33	10.98	0.002
Flujo de aire (F)	48.22	24.11	14.33	1.68	0.191
DO ₆₀₀ (G)	170.38	85.19	14.33	5.95	0.010
Inductor (H)	-155.35	-77.68	14.33	-5.42	0.012
Temp. de inducción (J)	-66.52	-33.26	14.33	-2.32	0.103

$R^2 = 0.9898$; $R^2_{aj.} = 0.9556$

Cuando se analizaron los datos, se observó que el coeficiente R^2 (0.9898) indicó que los datos tienen un buen ajuste, además la diferencia entre R^2 y el valor R^2 ajustado (0.9556) es pequeña y; por lo tanto, se encuentran razonablemente de

acuerdo. Los resultados del análisis estadístico indicaron que los factores peptona (B), pH (D), agitación (E), DO (G) e inductor (H) son los que provocan efectos significativos en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada ($p < 0.05$) con un error estandar de 14.33. En el diagrama de Pareto se pueden observar estos resultados (Figura 14).

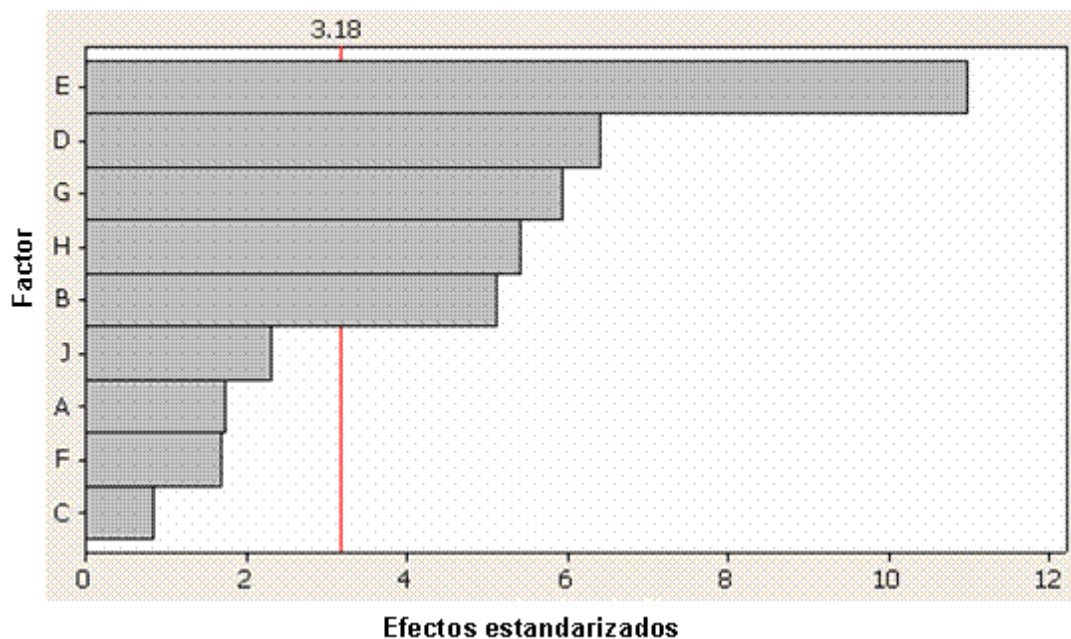


Figura 14. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A6.

El diagrama de Pareto ilustra la importancia de cada uno de los factores. Se observa que la longitud de las barras es proporcional a la incidencia en la variable respuesta, es decir, aquellas barras que sobrepasan la línea de referencia en rojo (con un valor de 3.18 $\alpha=0.05$) son los factores que más inciden en la expresión de la subunidad ácida modificada.

Las gráficas de efectos (Figura 15 y 16) ilustran la incidencia que tiene cada factor en la variable respuesta. Aquellos factores que mostraron una pendiente más pronunciada son los que tuvieron mayor efecto en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada.

Gráfica de efectos principales en A6

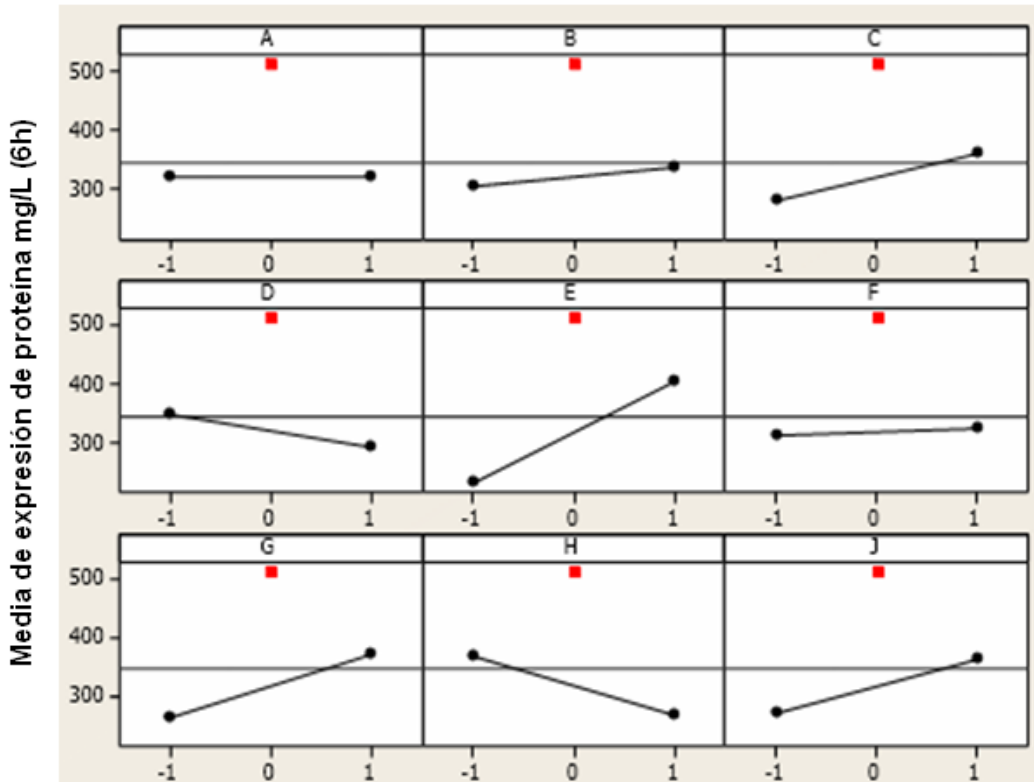


Figura 15. Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 6 h de inducción.

Gráfica de efectos principales en A6

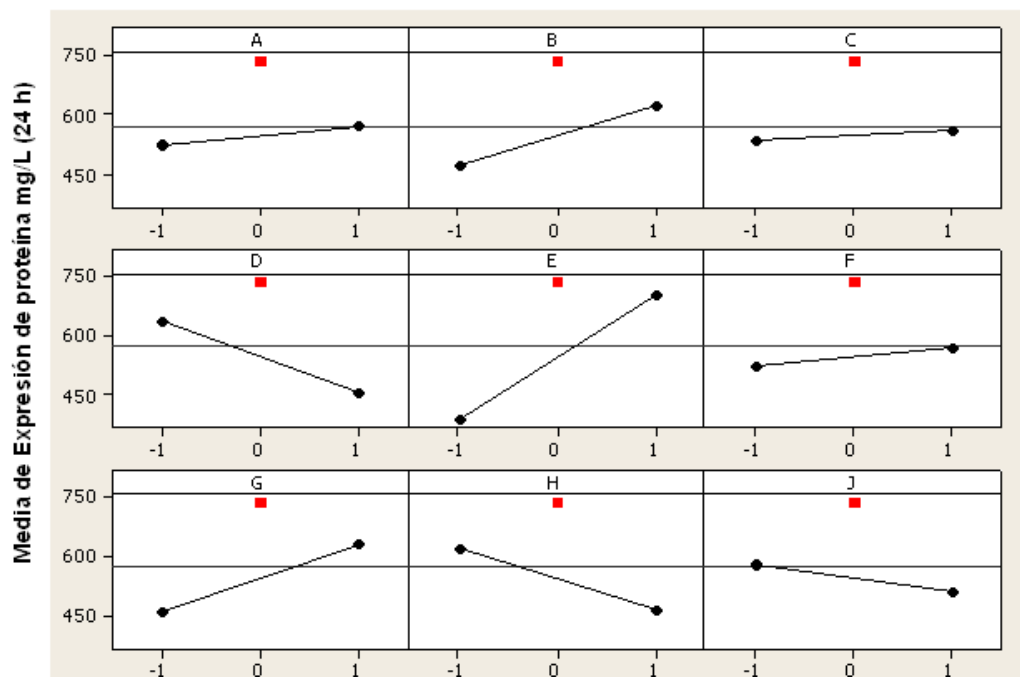


Figura 16. Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 24 h de inducción.

La línea central en cada una de las gráficas de los factores indica la media de la variable respuesta. Los niveles que rebasan esta línea generan una acumulación mayor de proteína. Con base en los resultados anteriores se pudo observar que los factores B, G y E en su nivel mayor (1) en combinación con los factores D y H en su nivel menor (-1) generan un incremento en la expresión de la proteína mutante. El efecto del factor J (Figura 16) muestra que en su nivel menor obtendría un incremento en la expresión de proteína, sin embargo, en el diagrama de Pareto (Figura 14) y en la estimación de efectos (Cuadro 16) este factor no tuvo un efecto significativo. Además, por los resultados gráficos de la Figura 15 se optó por posicionar el factor J en su nivel central (0). Respecto a los factores A, F y C, se determinó mantenerlos en sus niveles centrales (0), de esta forma se generó el siguiente modelo:

$$Y_{op} = 546.16 + 24.74\bar{A}_0 + 73.29\bar{B}_1 + 12.02\bar{C}_0 - 91.71\bar{D}_{-1} + 157.31\bar{E}_1 + 24.11\bar{F}_0 + 85.19\bar{G}_1 - 77.68\bar{H}_{-1} - 33.26\bar{J}_0$$

(Ec. 2)

El soporte del análisis estadístico de este modelo se muestra en el Cuadro 17 del análisis de varianza (ANDEVA). Los resultados obtenidos del análisis de varianza indican que el modelo fue significativo ($p > 0.05$), es decir, los resultados muestran que el modelo obtenido puede explicar de forma satisfactoria los efectos de los factores evaluados sobre la variable respuesta.

Cuadro 17. Análisis de varianza para el modelo generado con el medio A6					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valores F	Valores p
Efectos principales	9	651157	72351	29.37	0.009
Curvatura	1	62599	62599	25.41	0.015
Error residual	3	7390	2463		
Falta de ajuste	2	5284	2462	1.25	0.534
Error puro	1	2106	2106		
Total	13	721174			

3. Expresión a nivel fermentador con el medio de cultivo A7

Las fermentaciones con el medio A7 se realizaron de acuerdo a la estructura de tratamientos. Cuando se finalizaron los experimentos, se corrieron electroforesis SDS-PAGE para observar la expresión de la proteína de interés y los resultados se pueden ver en la Figura 17.

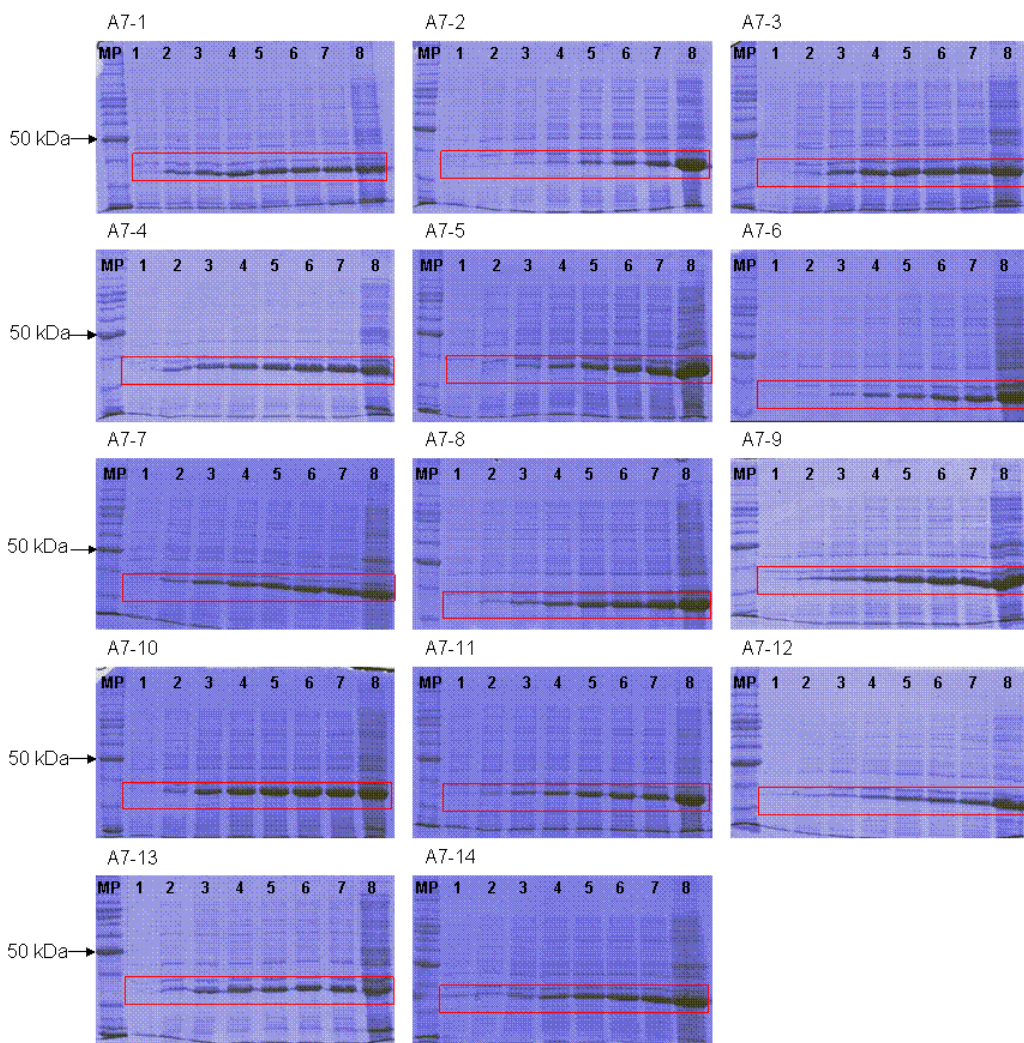


Figura 17. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos a nivel fermentador con el medio A7. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1-7**, 0-6 h de inducción; **8**, 24 h de inducción. A6-1 a A6-14 corresponden a cada uno de los tratamientos de acuerdo al diseño Plackett-Burman y DCC. La casilla roja señala la subunidad ácida de la amarantina modificada. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

De forma similar a lo observado con el medio A6, el perfil electroforético de los tratamientos aplicados con el medio A7 mostró diferencias en la expresión de la proteína de interés. En la imagen anterior se puede observar que en el tratamiento

A7-2 la proteína de interés se expresó en niveles muy bajos durante las primeras horas de inducción y a las 24 horas la acumulación de proteína recombinante aparenta ser similar a otros tratamientos. Este fenómeno lo pudo provocar el bajo nivel celular en el medio de cultivo al momento de la inducción. Para observar y analizar de mejor forma la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada, se realizó la cuantificación de la proteína de interés y los resultados se reportan en el Cuadro 17 y Figura 18.

Cuadro 18. Expresión de la subunidad de la amarantina modificada en el médio A7 (24 h de inducción)

Tratamientos	Factores									Proteína de interés (mg/L)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	
1	250	10	5	6.5	260	0.05	0.5	0.3 mM	35	380.8
2	250	14	3	7.5	260	0.05	0.3	0.3 mM	35	478.6
3	150	14	5	6.5	340	0.05	0.3	0.5%	35	944.9
4	250	10	5	7.5	260	0.15	0.3	0.5%	25	669.9
5	250	14	3	7.5	340	0.05	0.5	0.5%	25	1453.0
6	250	14	5	6.5	340	0.15	0.3	0.3 mM	25	1175.6
7	150	14	5	7.5	260	0.15	0.5	0.5%	35	610.2
8	150	10	5	7.5	340	0.05	0.5	0.3 mM	25	1066.3
9	150	10	3	7.5	340	0.15	0.3	0.3 mM	35	467.4
10	250	10	3	6.5	340	0.15	0.5	0.5%	35	772.5
11	150	14	3	6.5	260	0.15	0.5	0.3 mM	25	979.3
12	150	10	3	6.5	260	0.05	0.3	0.5%	25	677.7
13	200	12	4	7	300	0.1	0.4	1%	30	1476.8
14	200	12	4	7	300	0.1	0.4	1%	30	1521.7

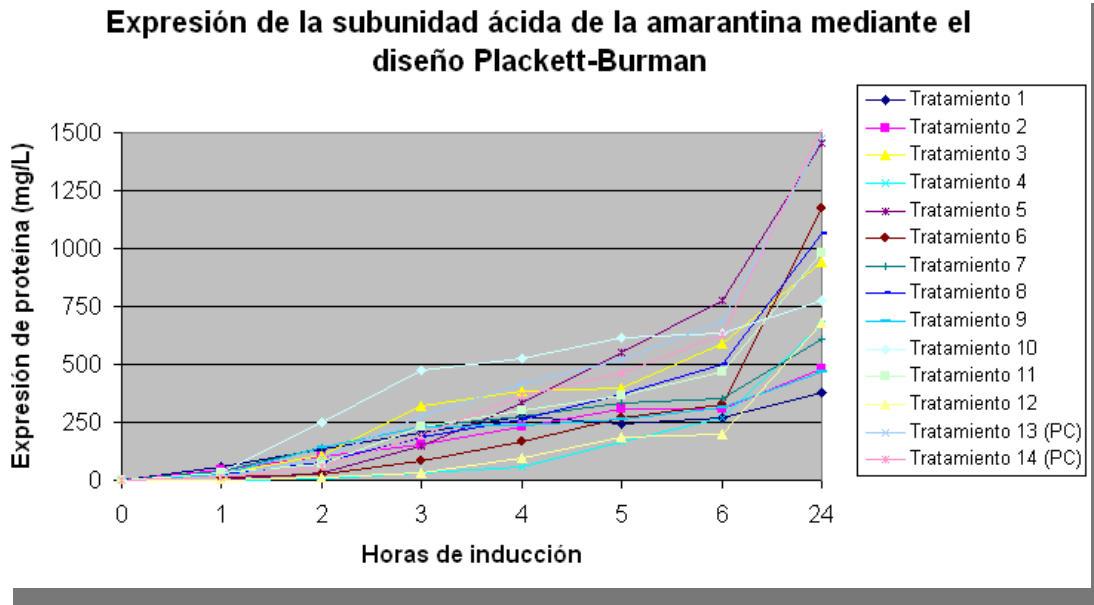


Figura 18. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A7 (mg/L).

Los resultados de la cuantificación muestran que mediante los tratamientos 5, 13 y 14 se produce una mayor cantidad de proteína recombinante, esto pudo provocarse por la inducción con lactosa que funcionó como una fuente extra de carbono. Además, a estos tratamientos se les aplicó un nivel alto y un nivel medio de agitación (tratamientos centrales y tratamiento 5, respectivamente) lo cual genera un incremento en el oxígeno disuelto y por lo tanto, el aumento de la expresión de la proteína (Reddy y col., 2002). Caso contrario, en los tratamientos 1, 2 y 9 se notó menor expresión de proteína recombinante, posiblemente por los bajos niveles de agitación y flujo de aire (tratamientos 1 y 2), además del uso de IPTG (tratamientos 1, 2 y 9) como inductor ya que esta sustancia al no ser metabolizada por la célula no provee de nutrientes al microorganismo y en muchos casos genera una carga metabólica y, por ende, disminuye la expresión de proteínas recombinantes. Los tratamientos 6, 8 y 11 muestran niveles elevados de proteína recombinante mediante el uso del inductor IPTG, esto se pudo provocar por la disminución en la temperatura de inducción (25 °C) que genera una menor carga metabólica al microorganismo; es decir, si se disminuye la temperatura, los requerimientos energéticos disminuyen y con ello

decrecen la síntesis de proteínas de choque térmico y la proteólisis (Donovan y col., 1996).

3.1. Análisis estadístico

Una vez que se finalizaron los tratamientos con el medio A7 y se cuantificó la proteína de interés, se observó una mayor acumulación a las 24 h de inducción. Con esos resultados se realizó el análisis estadístico. Los resultados del análisis estadístico se exponen en el Cuadro 18.

Cuadro 19. Estimación de efectos de los factores para la expresión a nivel fermentador con el medio A7

Factores	Efecto	Coeficiente	Error estándar	Valores - F	Valores P
Papa (A)	30.8	15.4	10.4	1.48	0.236
Triptona (B)	267.8	133.9	10.4	12.88	0.001
Glicerol (C)	3.2	1.6	10.4	0.15	0.888
pH (D)	-30.9	-15.5	10.4	-1.49	0.234
Agitación (E)	347.2	173.6	10.4	16.69	0.000
Flujo de aire (F)	-54.4	-27.2	10.4	-2.62	0.079
DO ₆₀₀ (G)	141.3	70.7	10.4	6.79	0.007
Inductor (H)	-96.7	-48.4	10.4	-4.65	0.019
Temp. de inducción (J)	-394.6	-197.3	10.4	-18.97	0.000

$R^2 = 0.998$; $R^2_{aj.} = 0.9614$

Para el caso de los experimentos con el medio A7 el valor de R^2 fue de 0.998 y el valor R^2 ajustado fue de 0.9916, lo cual se puede interpretar como el 99.16% de correlación entre la variabilidad de la respuesta experimental y los valores teóricos. De acuerdo a la cuadro anterior, los factores triptona (B), agitación (E), DO (G), inductor (H) y temperatura de inducción (J) provocaron efectos significativos en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada ($p < 0.05$) lo cual se constató con el diagrama de Pareto (Figura 19).

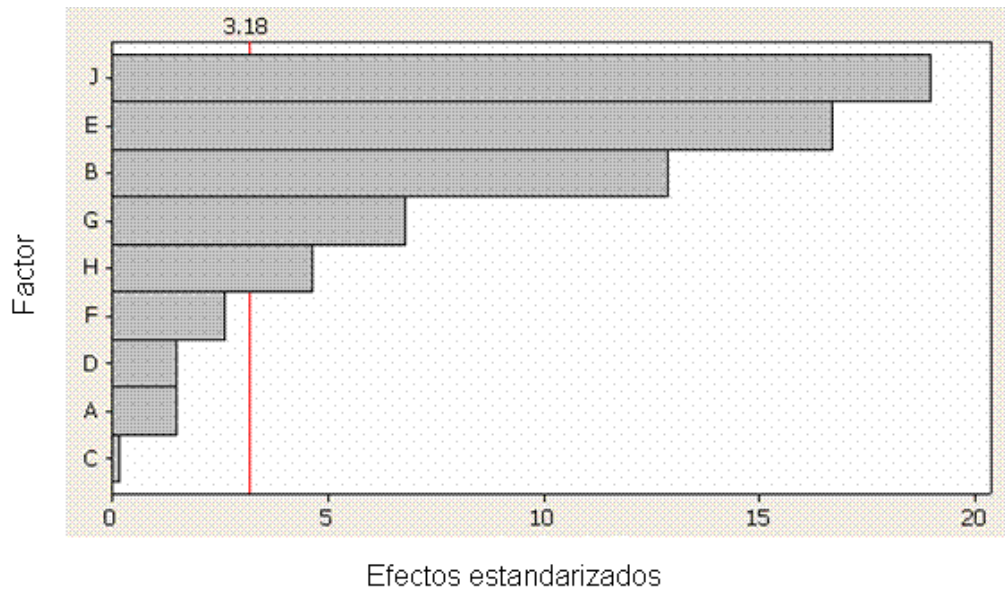


Figura 19. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con el medio A7.

En el diagrama anterior se observan los factores que tienen efecto significativo en la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada (J, E, B, G y H), los cuáles tienen un error estandar de 10.4.

Con base en los resultados anteriores (Cuadro 18 y Figura 19) y la gráfica de efectos de la Figura 20, se determinó que los factores B, E y G deben estar en el nivel 1; los factores A, C, D, F y J en el nivel 0; y el factor H en el nivel -1.

Gráfica de efectos principales en A7

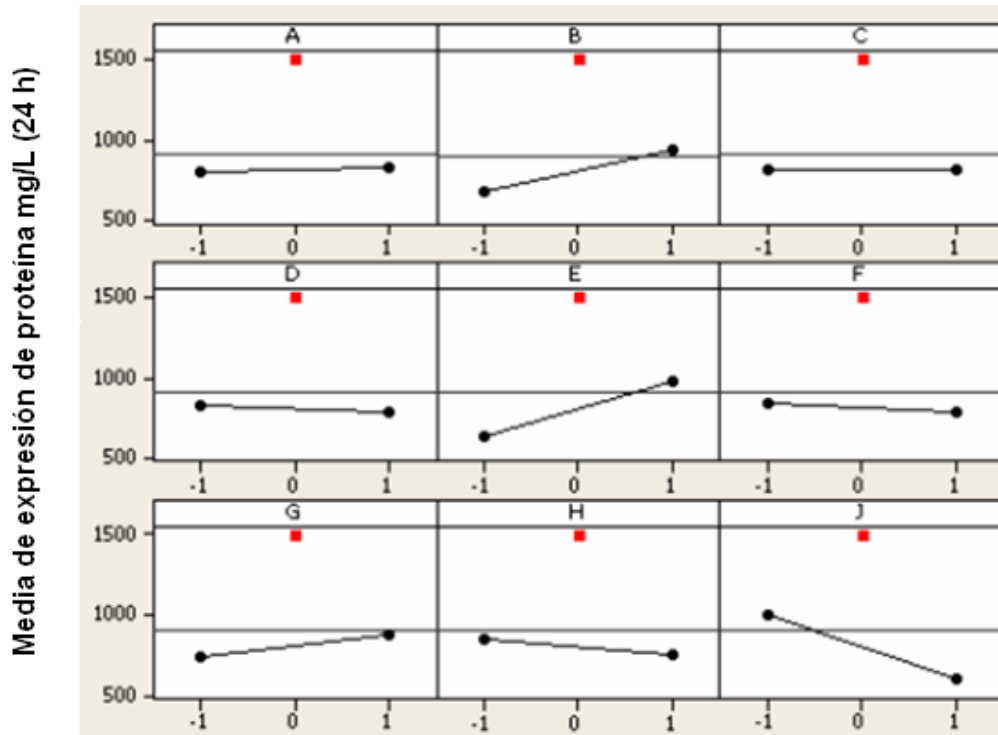


Figura 20. Gráfica de efectos principales a nivel fermentador a las 24 h de inducción.

Entonces, según el análisis estadístico, se generó el siguiente modelo con el que se optimizó la expresión de la proteína con el medio A7:

$$Y_{op} = 806.4 + 15.4\bar{A}_0 + 133.9\bar{B}_1 + 1.6\bar{C}_0 - 15.5\bar{D}_0 + 173.6\bar{E}_1 - 27.2\bar{F}_0 + 70.7\bar{G}_1 - 48.4\bar{H}_{-1} - 197.3\bar{J}_0$$

(Ec. 3)

El modelo mostró ser adecuado para la prueba de F con un nivel de significancia del 5%. En el Cuadro 18 se muestran los resultados para el ANDEVA del modelo. Al igual que en el modelo para A6, se observa que el modelo obtenido para A7 explica de forma satisfactoria los efectos de los factores evaluados sobre la producción de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos a nivel fermentador.

Cuadro 20. Análisis de varianza para el modelo generado con el medio A7.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valores F	Valores p
Efectos principales	9	1146487	127387	98.13	0.002
Curvatura	1	823046	823046	634.01	0.000
Error residual	3	3894	1298		
Falta de ajuste	2	2886	1443	1.43	0.509
Error puro	1	1008	1008		
Total	13	1973428			

4. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina con los modelos generados

La evaluación de los modelos generados se realizó bajo las condiciones predichas en Ec. 1 y Ec. 2. Los resultados que se reportan en la Figura 21 son el promedio de tres pruebas realizadas. El monitoreo de la expresión de la proteína se realizó durante 24 h.

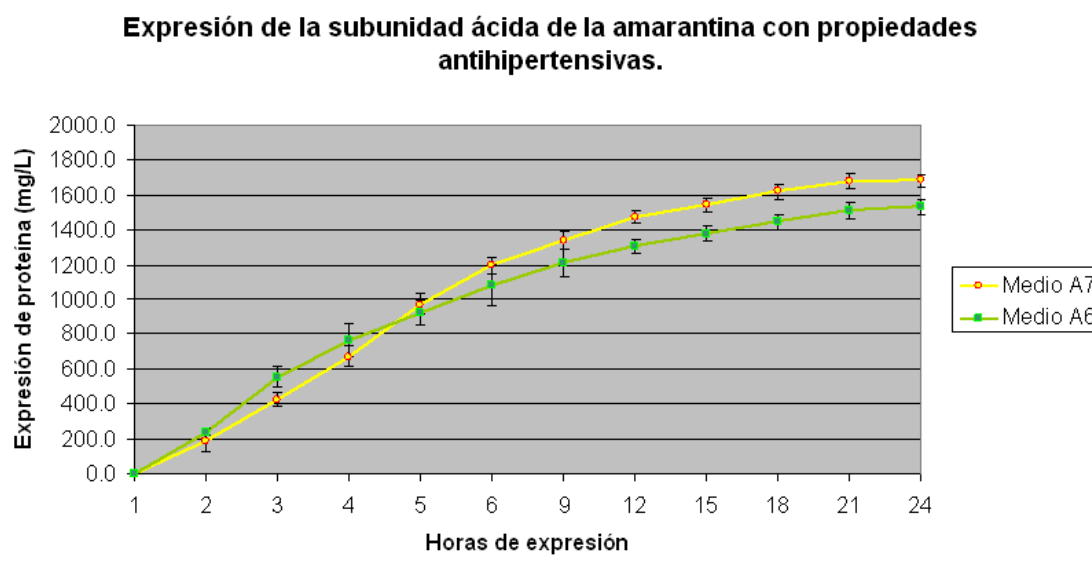


Figura 21. Optimización de la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada.

El máximo nivel de expresión que se registró fue de 1,681(\pm 47.75) mg/L en el medio A7 a las 24 h de inducción, mientras que en el medio A6 el máximo nivel fue de 1,531 (\pm 42.21) mg/L.

En la Figura 21 se observa una mayor expresión en el medio A6 al inicio de la curva. Este efecto se pudo provocar por la composición de la fuente de nitrógeno que se utilizó para la preparación del medio A6 (Chaiyaso y col. 2011). Esta fuente de nitrógeno es la peptona extraída de hidrolizados de caseína, y de acuerdo al certificado de análisis otorgado por el proveedor, puede contener azúcares fermentables que inducirían una mínima expresión de la proteína recombinante. En cuanto a la fuente de nitrógeno del medio A7, se utilizó triptona extraída de hidrolizados de carne y, según el certificado de análisis otorgado por el proveedor, no contiene azúcares fermentables. Entonces, una vez que los azúcares del medio A6 comienzan a disminuir, la expresión de la proteína en ese medio de cultivo se reduce y por lo tanto, tiende a disminuir poco antes de las 5 h de inducción.

El incremento en la acumulación de la subunidad ácida de la amarantina modificada en los dos medios de cultivo también pudo ser provocado por la disminución de la temperatura porque se ha reportado que la tasa de degradación proteolítica de productos recombinantes disminuye cuando baja la temperatura de inducción. Además, cuando la temperatura disminuye, se evita un inapropiado plegamiento de la proteína recombinante porque se impide el daño por calor o se disminuye la tasa de síntesis proteica que minimiza la interacción entre proteína recombinante (Ruiz y col., 2009). Los valores de pH en los tratamientos de optimización para A6 y A7 (6.5 y 7, respectivamente) oscilaron entre los óptimos para el crecimiento y la expresión de proteínas mediante el uso de células de *Escherichia coli*, además durante todos los procesos fermentativos no se notaron cambios drásticos en los valores de pH (Krause y col., 2010). Por lo tanto, en combinación con los factores anteriores se logró un incremento en la expresión de la proteína de interés.

Los tratamientos predichos mediante el análisis de efectos condujeron de forma satisfactoria a la sobreexpresión de la subunidad ácida de la amarantina con

propiedades antihipertensivas porque se logró un incremento de 2.4 y 2.1 (A7 y A6, respectivamente) veces más con respecto al rendimiento de 700 mg/L que obtuvo Arano (2010) en su estudio.

Cuando se analizó la productividad, definida como miligramos de proteína producida por litro de cultivo por hora (mg/L h), mediante los modelos optimizados, se observó que con el medio A7 se alcanza un máximo a las 6 h de inducción. Mientras que en el medio A6 el máximo es a las 4 h de inducción (Figura 22). Posteriormente, en ambos casos la productividad disminuye.

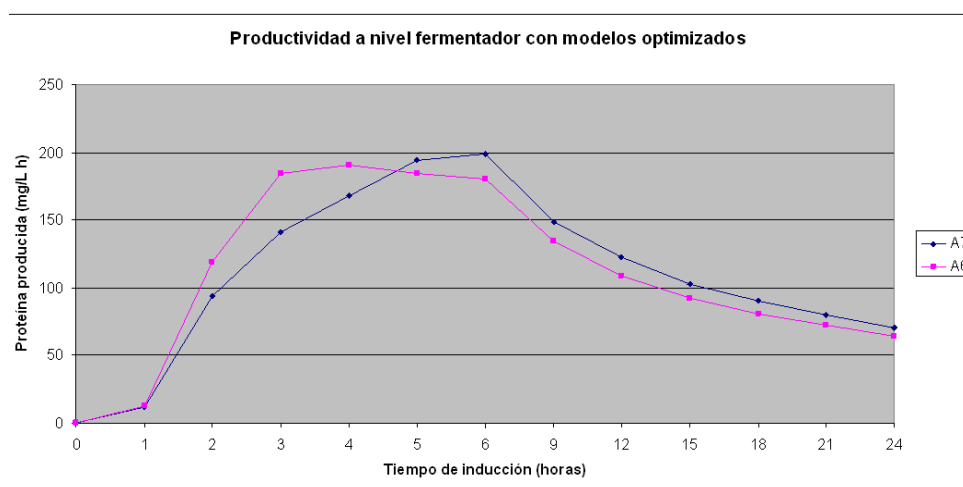


Figura 22. Productividad de *E. coli* Rosetta para la expresión de la subunidad ácida de la amarantina mediante los modelos optimizados. En el eje de las abscisas t0, t1, t2, etc. corresponde a las 0, 1, 2, etc. horas de inducción.

4.1 Análisis de la expresión de proteína en los procesos optimizados

Después de realizar las pruebas para sobreexpresar la proteína recombinante, se llevaron a cabo electroforesis de las muestras colectadas durante los procesos fermentativos. Los resultados obtenidos muestran que la proteína heteróloga mostró estabilidad en ambos tratamientos hasta por 24 h de expresión porque en las imágenes se observan claramente bandas que corresponden al peso molecular (geles SDS-PAGE) y con los análisis inmunológicos (*Western blot*) se confirmó la presencia de la proteína recombinante (Figura 23 y 24).

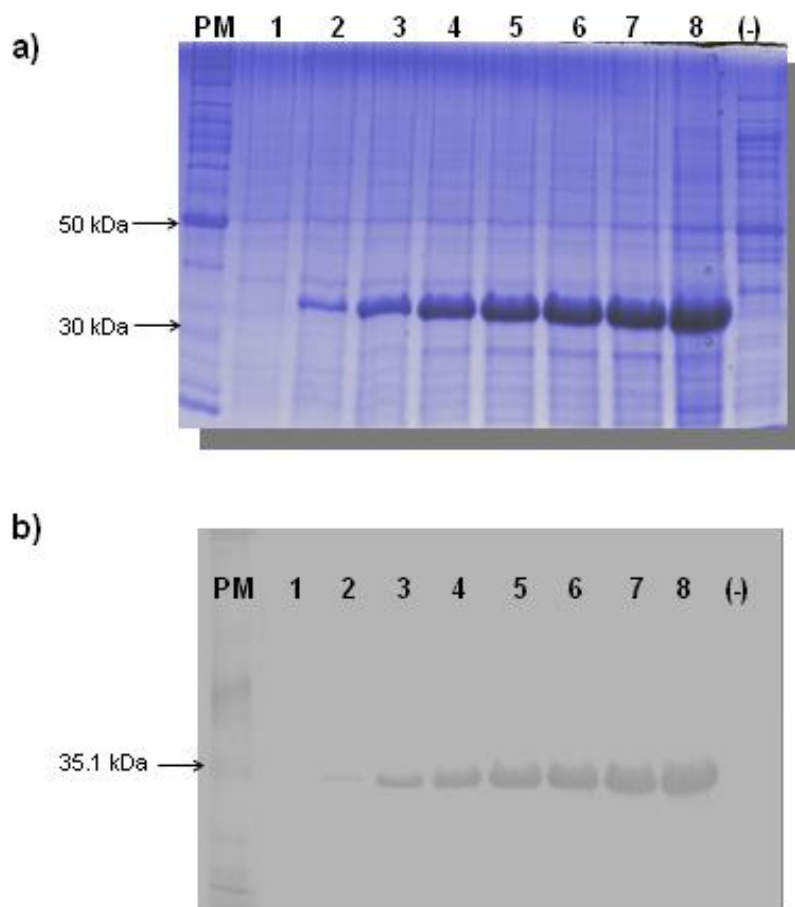


Figura 23. Análisis de la expresión de proteína en el medio A6 con el modelo optimizado. a) SDS-PAGE; b) Western *blot*. **Carrilios:** MP, marcador de peso molecular; 1-7, 0-6 h de inducción; 8, 24 h de inducción; (-), *E. coli* Rosetta sin transformar. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

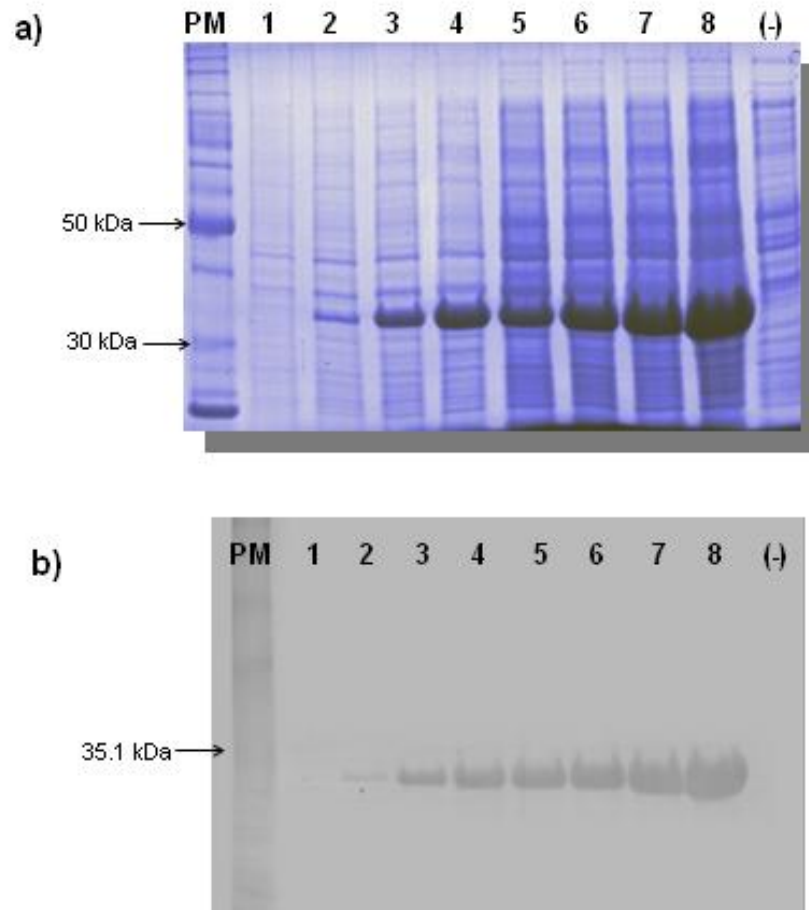


Figura 24. Análisis de la expresión de proteína en el medio A7 con el modelo optimizado. a) SDS-PAGE; b) Western blot. **Carrilios:** **MP**, marcador de peso molecular; **1-7**, 0-6 h de inducción; **8**, 24 h de inducción; **(-)**, *E. coli* Rosetta sin transformar. En cada carril se cargaron 13 μ L de muestra.

5. Purificación de la proteína recombinante

Posteriormente, con las muestras colectadas a lo largo del proceso optimizado de expresión se realizó el análisis de las proteínas solubles e insolubles (Figura 25) y se observó que la proteína heteróloga se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble (más del 95%) lo cual concuerda con Arano (2010). Este comportamiento se pudo provocar porque si se sobreexpresa en *E. coli* Rosetta un alto nivel de proteína recombinante, se induce la formación de agregados insolubles por la interacción estructural que se genera entre las moléculas de proteína (Donovan y col., 1996). Sin embargo, los agregados insolubles pueden beneficiar la sobreexpresión de proteínas recombinantes porque de esta forma las estructuras son relativamente más resistentes a la proteólisis (Lesley y col., 2002).

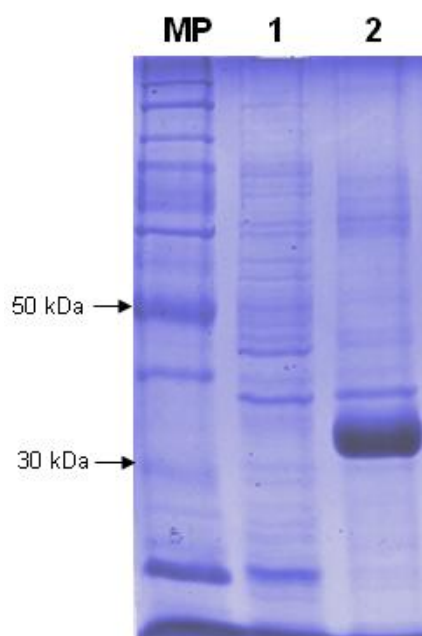


Figura 25. Proteínas solubles e insolubles en *E. coli* Rosetta. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; 1, proteínas solubles; 2, proteínas insolubles. Se cargaron 5 ug de proteína.

Cuando se identificó que la subunidad ácida de la amarantina modificada se encontraba de forma mayoritaria en la fracción insoluble, se continuó trabajando con esa fracción para las etapas posteriores de purificación. Entonces, como

primera etapa de purificación, las muestras que se colectaron de los tratamientos optimizados para A6 y A7 se sometieron a precipitación con sulfato de amonio. En la Figura 26 se observa que la mayor cantidad de proteína recombinante precipitó en la fracción 20-30% (carril 3) de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, esto se confirmó mediante *Western blot*. Cabe señalar que este comportamiento fue similar en ambos tratamientos (A6 y A7) y, en consecuencia, las muestras de proteína que precipitaron en ese rango se utilizaron para realizar la purificación por electroelución.

Probablemente la proteína recombinante que precipita en las fracciones 0-10 y 10-20% (carriles 1 y 2 de la Figura 26) es consecuencia de interacciones con otras proteínas debido a la elevada producción de la subunidad ácida de la amarantina modificada al interior celular (Luna-Suárez y col., 2010).

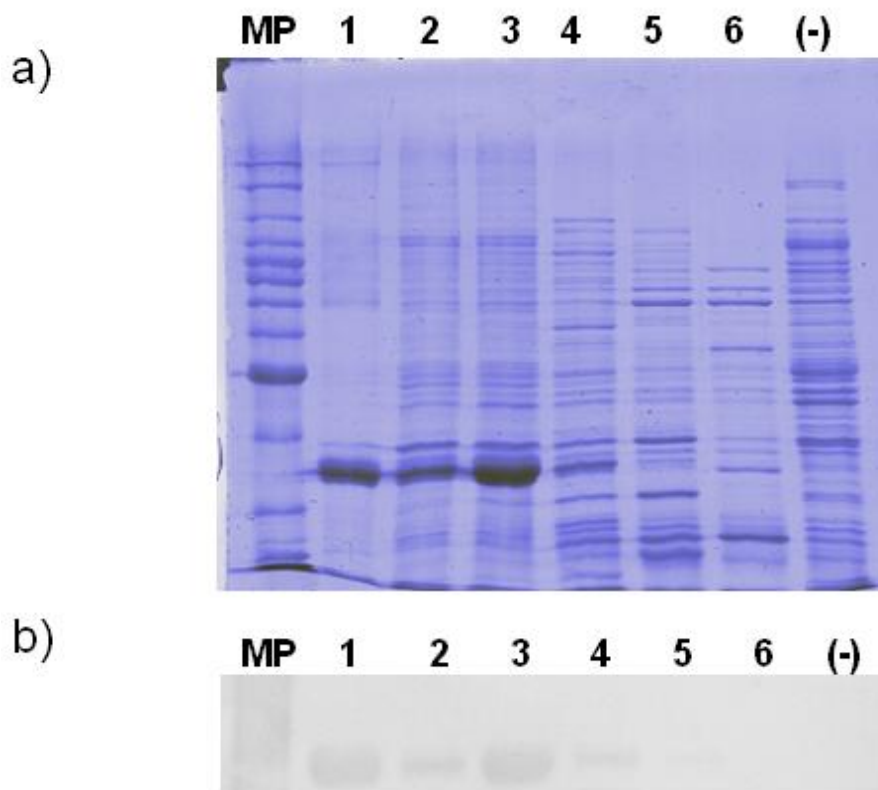


Figura 26. Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; 1, 0-10%; 2, 10-20%; 3, 20-30%; 4, 30-40%; 5, 40-60%; 6, 60-80%; (-), *E. coli* Rosetta sin transformar. Se cargaron 5 μg de proteína.

5.1. Purificación por electroelución

Después de dializar las muestras de proteína que precipitaron con el 20-30% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el concentrado proteico se separó mediante geles de poliacrilamida al 12 %. Se aplicaron 250 μg de proteína total a cada gel y se llevaron a cabo electroforesis en una cámara Mini PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad Hercules, CA, EUA). La Figura 27 muestra el resultado de la electroforesis SDS-PAGE y la detección mediante Western *blot* que confirma la subunidad ácida de la amarantina modificada, en las imágenes se observa la proteína de interés resaltada con el recuadro rojo.

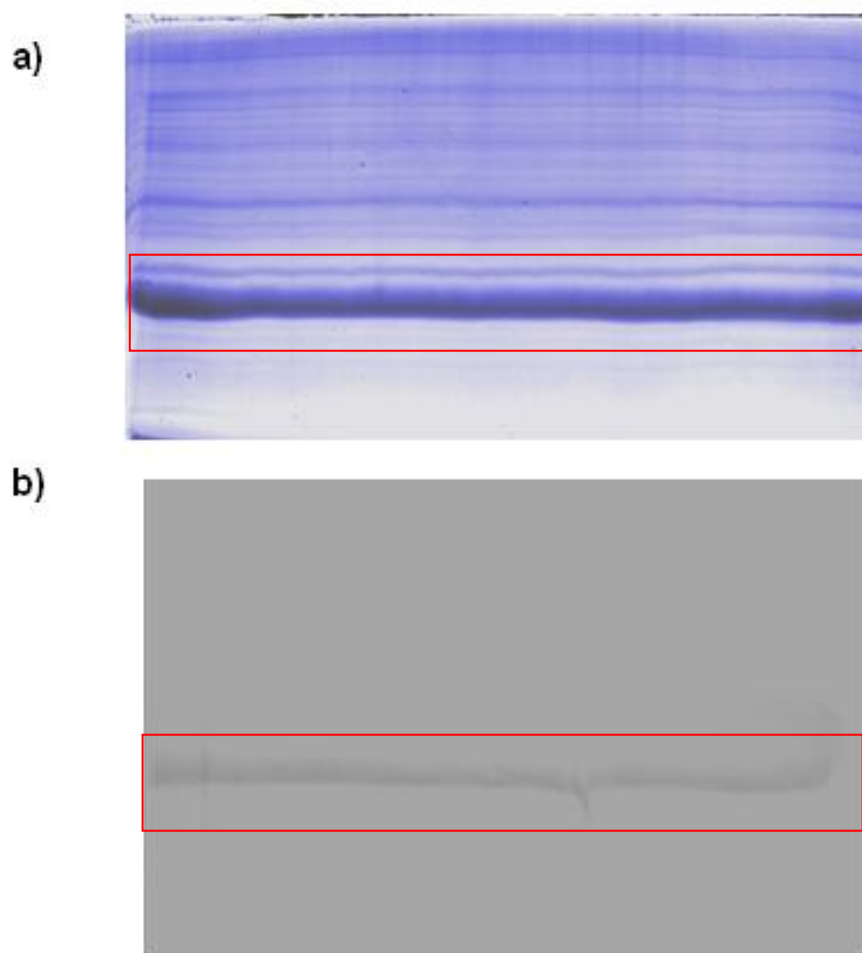


Figura 27. Preparación de muestras proteicas para electroeluir. a) SDS-PAGE b) Western *blot*.

La purificación mediante electroelución se realizó con la finalidad de medir la actividad antihipertensiva que posee la subunidad ácida de la amarantina

modificada. Para estandarizar la técnica de purificación se probaron diferentes factores como el amortiguador de elución, el tiempo y la intensidad de la corriente eléctrica para extraer la proteína del gel. La Figura 28 muestra un gel que se electroeluyó con la técnica estandarizada, y comparado con la Figura 27 se observa que además de la proteína de interés otras proteínas migran hacia el amortiguador de elución; por lo tanto, en lugar de utilizar todo el gel, las bandas de la proteína de interés se identificaron mediante tinción con sulfato cúprico y se cortaron del gel para evitar contaminación con otras proteínas. Posteriormente, las bandas cortadas se destiñeron con EDTA y, finalmente, se purificaron bajo las condiciones apropiadas. En las Figuras 29 y 30 se muestra el resultado del proceso de purificación para las muestras obtenidas con A6 y A7. En los carriles 5 de ambas Figuras se muestra la proteína purificada, la cual se obtuvo en una concentración de 300 mg/L, aproximadamente diez veces más comparado con el rendimiento de proteína pura que obtuvo Luna-Suárez (2008).

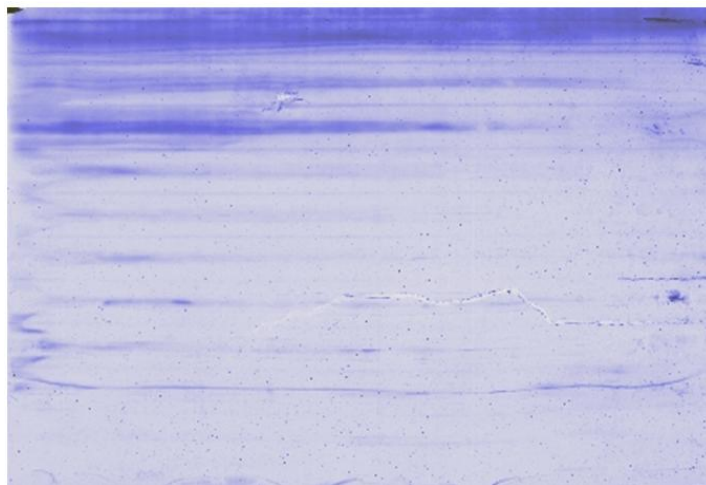


Figura 28. Gel de acrilamida electroeluido.

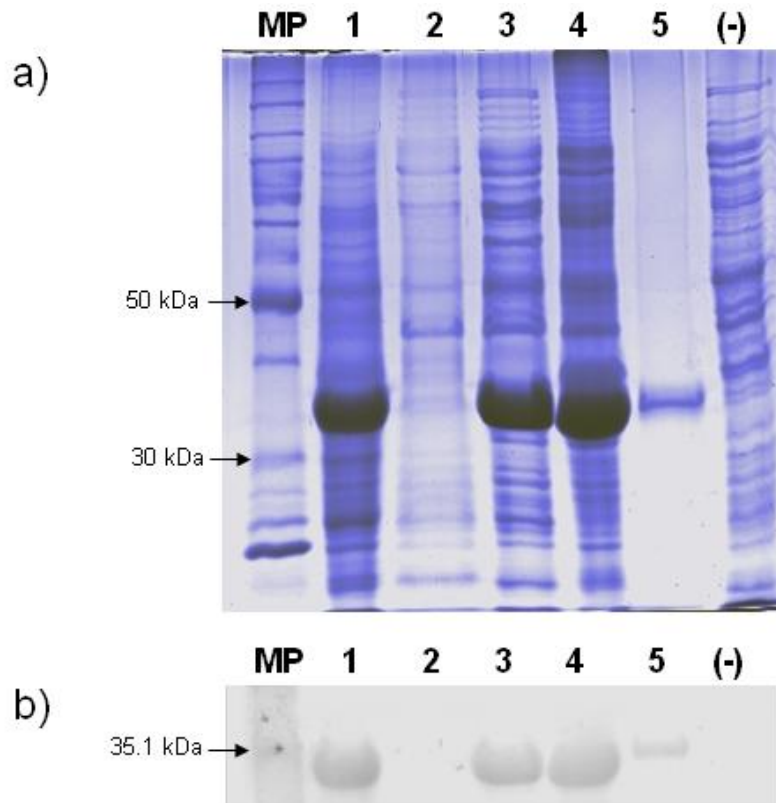


Figura 29. Proceso de purificación de la proteína que se expresó en el medio A6. a) SDS-PAGE; b) Western *blot*. **Carriles:** **MP**, marcador de peso molecular; **1**, extracto de proteína total; **2**, extracto de proteína total soluble; **3**, extracto de proteína total insoluble; **4**, proteína precipitada con el 20-30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **5**, proteína pura.; **(-)** células de *E. coli* Rosetta sin transformar.

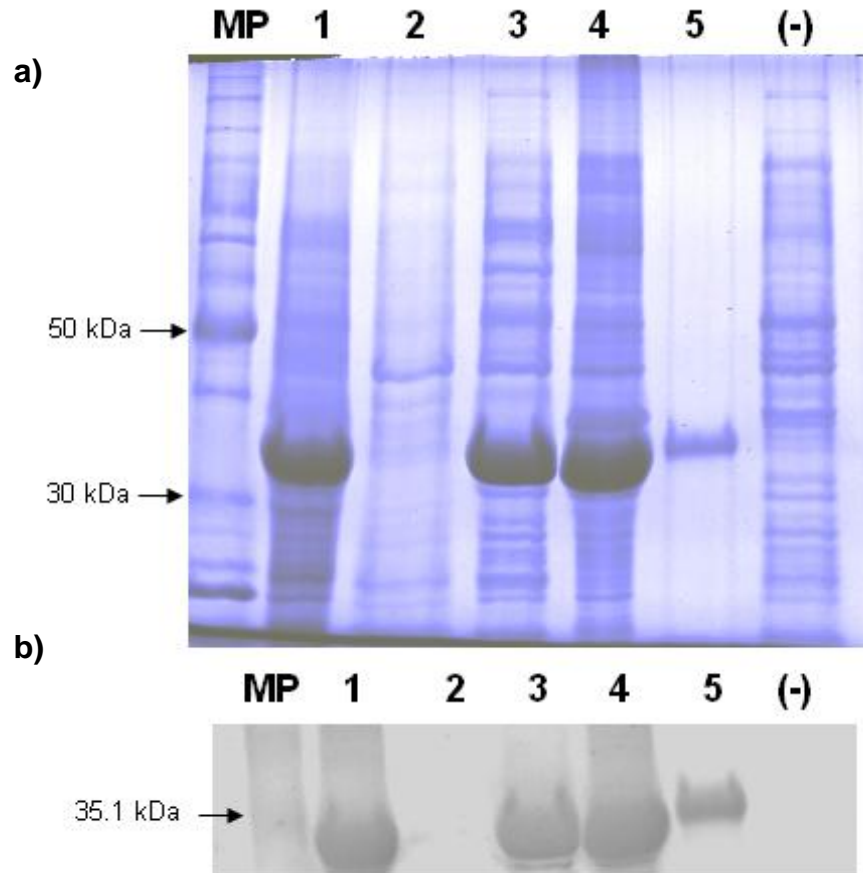


Figura 30. Proceso de purificación de la proteína que se expresó en el medio A7. a) SDS-PAGE; b) Western *blot*. Carriles: MP, marcador de peso molecular; 1, extracto de proteína total; 2, extracto de proteína total soluble; 3, extracto de proteína total insoluble; 4, proteína precipitada con el 20-30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5, proteína pura.; (-), células de *E. coli* Rosetta sin transformar.

5.1.1. Determinación del punto isoeléctrico

Como estrategia para observar que las bandas de la proteína de interés no se traslapaban con otras del mismo peso molecular en los geles preparativos electroeluidos y/o descartar la posible contaminación de la subunidad ácida de la amarantina durante el proceso de purificación, se realizó la determinación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína heteróloga por electroforesis bidimensional. Los resultados experimentales mostraron que la proteína heteróloga posee un pI de 6 que difiere por 0.07 unidades respecto al valor de pI predicho por la herramienta ExPASy: get pI/Mw (www.expasy.org) (Figura 31). Como se puede observar en las Figuras 32 y 33, el pI experimental fue similar en ambos medios de cultivo (A6 y A7); esto muestra que la proteína se expresa de forma estable

independientemente del medio de cultivo y da cuenta de que el proceso de purificación se realizó exitosamente.

Una vez que la técnica para el pI se estandarizó, se realizaron las pruebas experimentales a la subunidad ácida de la amarantina modificada por triplicado. El programa que finalmente se aplicó fue el siguiente:

- a) Hidratación activa de las tiras a 50 V por 12 horas;
- b) Acondicionamiento a 250 V por 15 min;
- c) Incremento del voltaje lineal a 4,000 V por 2:30 h;
- d) Enfoque a 4,000 V hasta acumular 12,000 V-h.

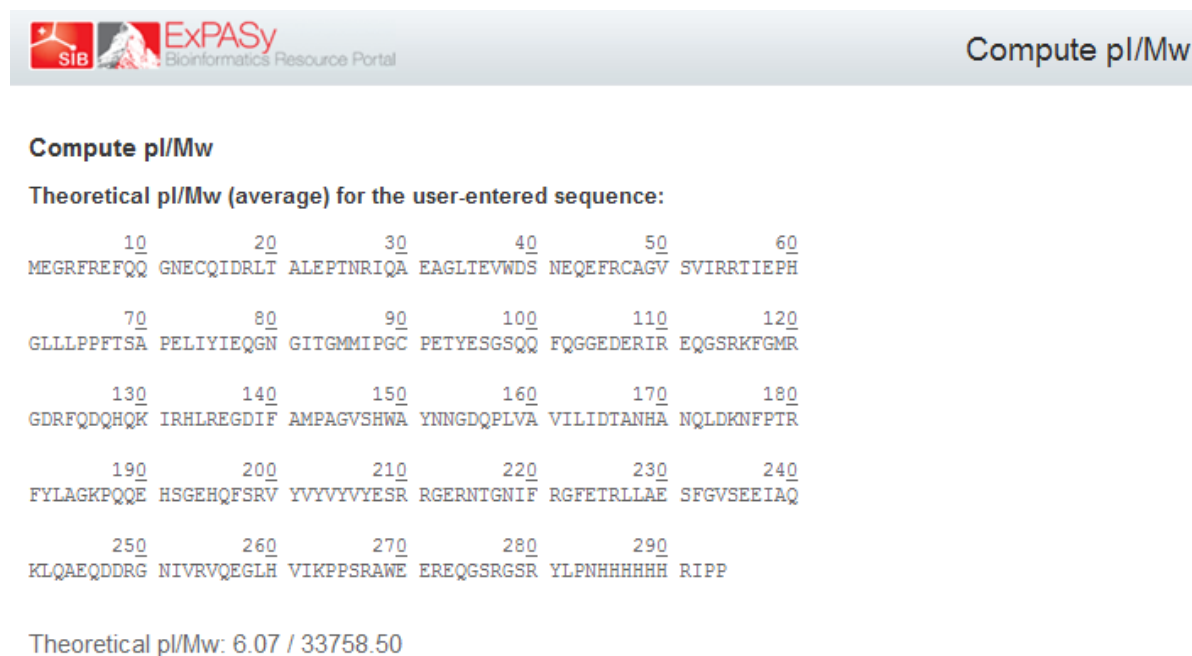


Figura 31. Punto isoeléctrico (pI) teórico de la subunidad ácida de la amarantina modificada.

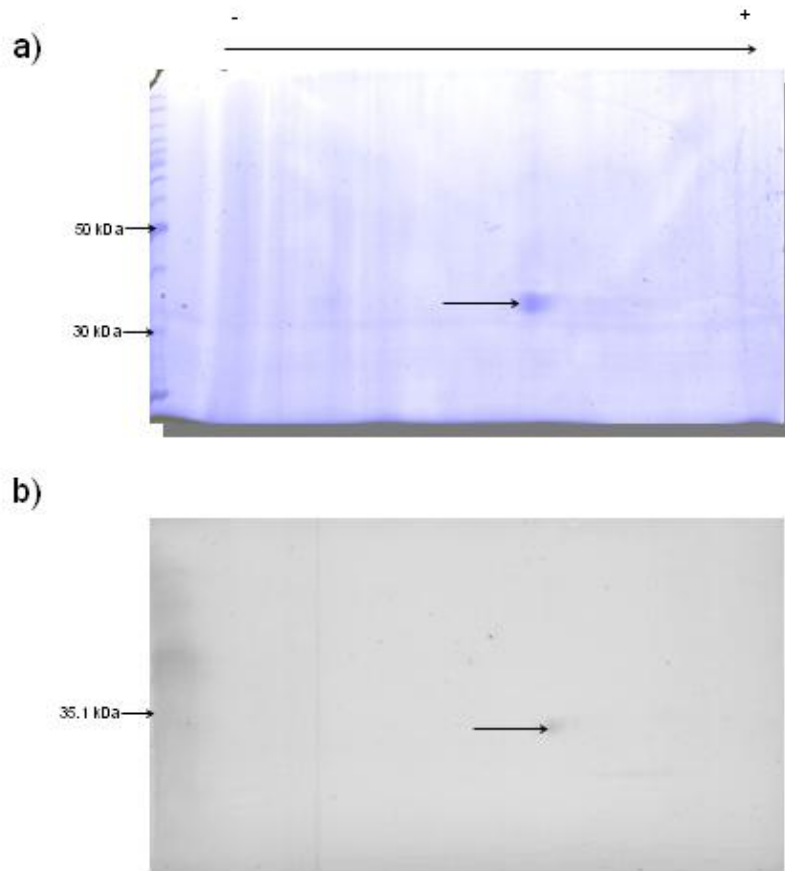


Figura 32. pl experimental de la subunidad ácida de la amarantina modificada expresada en el medio A6. a) SDS-PAGE; b) Western *blot*. Se cargaron 3 μg de proteína. Las flechas sobre las imágenes indican la proteína de interés.

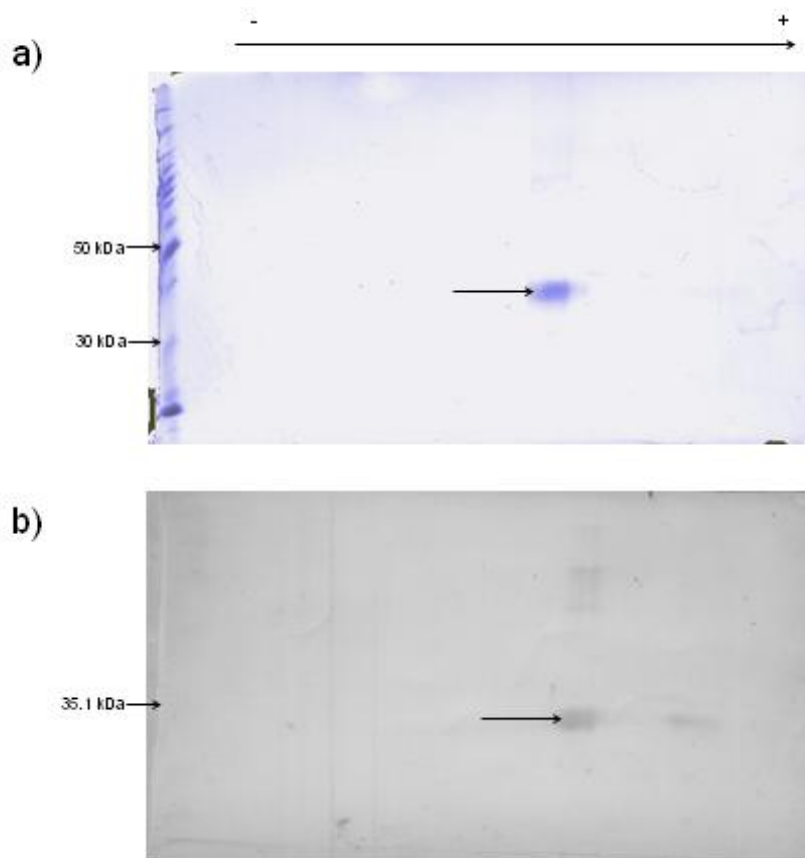


Figura 33. pl experimental de la proteína expresada en el medio A7. a) SDS-PAGE; b) Western blot. Se cargaron 6 µg de proteína. Las flechas sobre las imágenes indican la proteína de interés.

Con el resultado experimental de la electroforesis bidimensional se observa que la proteína tiene un comportamiento similar. La discrepancia que existe entre el pI teórico y el pI experimental puede ser el resultado de una incompleta desnaturalización de la proteína (Medina-Godoy y col., 2005). La coincidencia entre el pI teórico y el pI experimental sugiere que la estructura de la proteína de interés está conservada independientemente de los tratamientos (Luna-Suárez y col., 2010)

6. Determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

Para realizar las pruebas de IECA, se llevó a cabo la hidrólisis de la proteína purificada (de A6 y A7) con las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina para liberar los péptidos IPP, los cuatro péptidos VY y los péptidos que se generan

del resto de la subunidad ácida de la amarantina (Luna-Suárez y col., 2010). Esto se realizó con la finalidad de evaluar la actividad antihipertensiva que posee la proteína recombinante producida. En la Figura 34 se observan los péptidos que se generaron por el proceso de hidrólisis, se aprecia que no se generan cambios a las 6 y 9 h de hidrólisis, es decir, no se producen más péptidos y, por lo tanto, se determinó que para liberar los péptidos antihipertensivos era suficiente un tiempo de 6 h de incubación de la proteína recombinante con las enzimas digestivas.

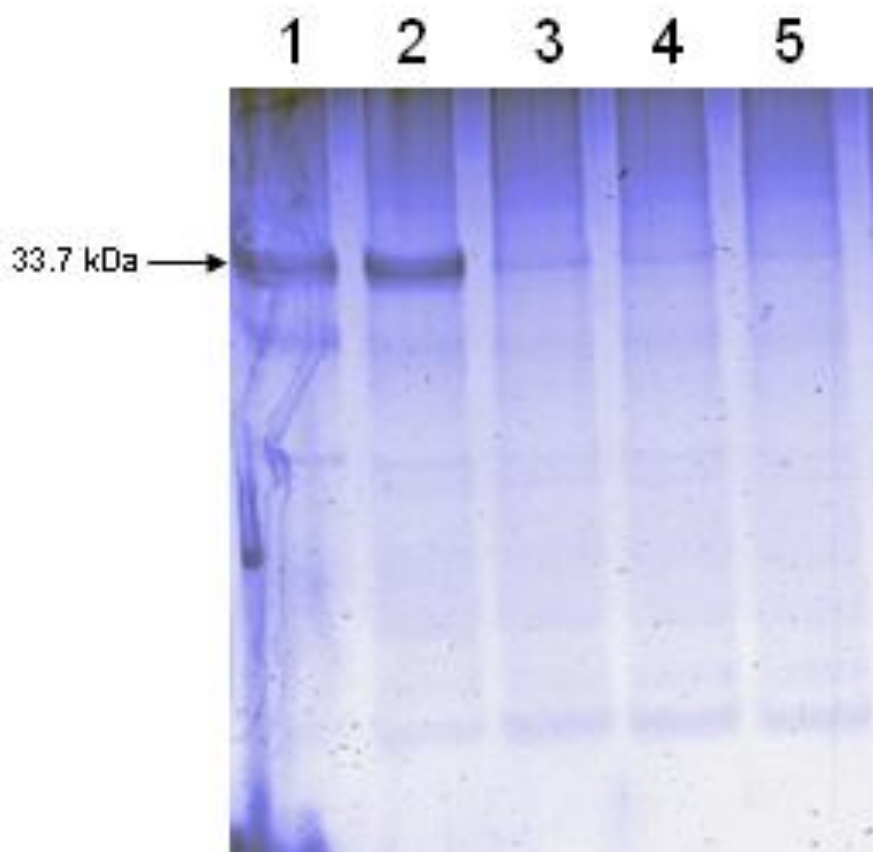


Figura 34. SDS-PAGE de los hidrolizados de la subunidad ácida de la amarantina. Carriles: 1, 1 h de hidrólisis; 2, 2 h de hidrólisis; 3, 3 h de hidrólisis; 4, 6 h de hidrólisis y 5, 9 h de hidrólisis.

Para medir la IECA se utilizó como control positivo el captopril. El IC_{50} en este caso se define como la cantidad de sustancia inhibidora que disminuye al 50% la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I. El IC_{50} del captopril fue de 3.96 ng/mL, muy similar a lo reportado por otros autores para este compuesto (Vechi y Añón, 2009; Barba de la Rosa y col., 2010) mientras que el IC_{50} para la

proteína purificada fue de 0.043 mg/mL y 0.041 mg/mL expresada con el medio A7 y A6, respectivamente (Figura 35). El análisis de varianza aplicado para evaluar diferencias en la actividad inhibitoria por los tratamientos para la expresión o producción de la proteína no reveló diferencia significativa ($p > 0.05$). Por lo tanto, la actividad inhibitoria de la proteína sobre la enzima convertidora de angiotensina I no es afectada cuando es expresada en los diferentes medios de cultivo (A6 y A7).

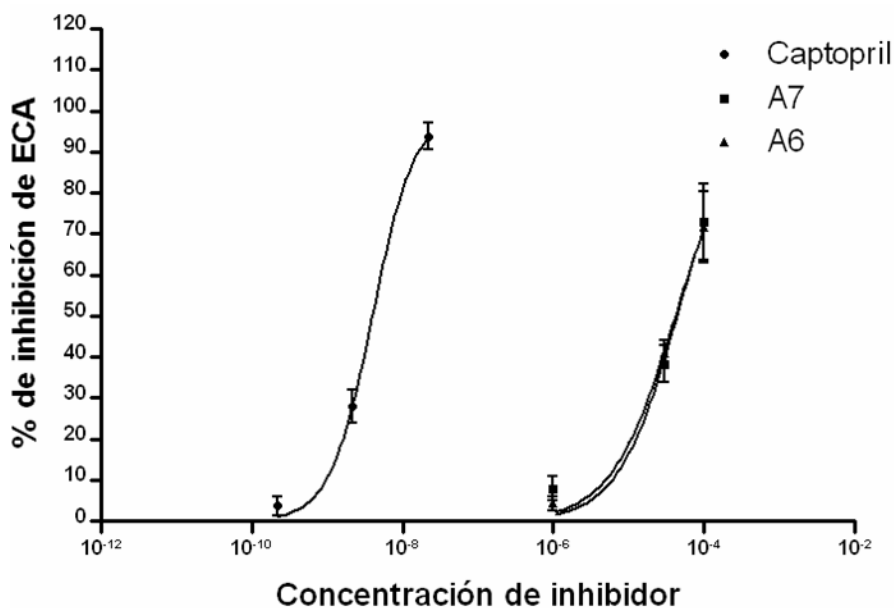


Figura 35. Actividad IECA del captopril y de la subunidad ácida de la amarantina modificada.

La actividad inhibitoria de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos antihipertensivos es mayor que el efecto reportado para un multímero de péptidos antihipertensivos expresado en *E. coli* BL21 que mostró un IC₅₀ de 0.1 mg/mL (Rao y col., 2009). También el efecto inhibitorio de la proteína de interés es mayor que lo reportado para hidrolizados de proteína de amaranto que mostraron un IC₅₀ de 0.12mg/mL (Fritz y col., 2011), esto es evidencia de que las modificaciones a la proteína de interés pueden mejorar el efecto antihipertensivo.

VII. CONCLUSIONES

- La inducción con lactosa al 0.5% (p/v) permitió una mayor expresión de la proteína de interés.
- El uso de papa en la formulación de los medios mínimos (A6 y A7) permitió el crecimiento de *E. coli* Rosetta y altos rendimientos de la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas.
- Mediante la metodología multifactorial propuesta que incluyó la manipulación de factores fisicoquímicos a nivel fermentador, la composición del medio de cultivo y el momento de la inducción con lactosa se logró el aumento de la producción de la subunidad ácida de la amarantina hasta por 24 h.
- La productividad de *E. coli* Rosetta respecto la subunidad ácida modificada mostró un máximo a las 4 y 6 h de inducción con 0.5% (p/v) de lactosa en los medios A6 y A7, respectivamente.
- Las propiedades antihipertensivas de la proteína recombinante se mantuvieron independientemente de los tratamientos aplicados para su producción.
- Los costos para la expresión de la proteína disminuyeron sensiblemente en relación a investigaciones previas, además a nivel fermentador se logró una expresión de 2.1 y 2.4 veces más (medios A6 y A7, respectivamente) en comparación con trabajos anteriores.

VIII. PERSPECTIVAS

- Optimizar el proceso de purificación de la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas mediante técnicas convencionales.
- Realizar ensayos *in vivo* con la subunidad ácida de la amarantina modificada para evaluar su efecto antihipertensivo.
- Formular un producto nutracéutico con la subunidad ácida de la amarantina con propiedades antihipertensivas y evaluar su estabilidad en el alimento y efecto en el consumidor.
- Mediante el mejoramiento de proteínas y con la estrategia aplicada se podría producir péptidos con diferentes propiedades nutracéuticas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Agyei, D., and M. Danquah. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 29(3):272-277.
- Ahmed, A. M., and M. Muguruma. 2010. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science* 86:110-118.
- Arano-Varela, H. 2010. Sobreexpresión de una globulina de amaranto con propiedades nutraceuticas en dos cepas de *E.coli*. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, Irapuato.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10:411-421.
- Barba de la Rosa, A. P., J. Gueguen, O. Paredes-López, and G. Viroben. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:931-936.
- Barba de la Rosa, A. P., A. Herrera, S. Utsumi, and O. Paredes-López. 1996. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology* 149:527-532.
- Barba de la Rosa, A. P., A. Barba Montoya, P. Martínez Cuevas, B. Hernández Ledezma, M. F. León Galván, A. De León Rodríguez, and C. González. 2010. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amarant peptides. *Nitric Oxide* 23:106-111.

- Bentley, W. E., R. H. Davis, and D. S. Kompala. 1991. Dynamics of CAT expression in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38:749-760.
- Blijlevens, N., and S. Sonis. 2007. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy and radiotherapy induced mucositis. *Annals of Oncology*, 18(5):817-826.
- Casey, R. 1999. Distribution and some properties of seed globulins. En *Seed Proteins*. p 159 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Castaño Tostado, E. y J. Domínguez Domínguez. 2010. Estructura factorial fraccionada. En *Diseño de experimentos: estrategias y análisis estadístico en ciencia y tecnología* (1ª. Ed.). p 139 Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Chaiyaso, T., A. Kuntiya, C. Techapun, N. Leksawasdi, Seesuriyachan, and Hanmoungjai. 2011. Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75(3):531-537.
- Comma-Canella, I., S. Castaño, and E. Nasarre. 2005. Insuficiencia cardiaca. Tratamiento farmacológico actual. *Revista Medica Universitaria Navarra*. 49(3):41-47.
- Córdova-Villalobos, J. A., J. A. Barriguete-Meléndez, A. Lara-Esqueda, S. Barquera, M. Rosas-Peralta, M. Hernández-Ávila, M. E. De León-May, y C. A. Aguilar-Salinas. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México* 50:419-427.

- Chi, W. J., J. H. Song, E. A. Oh, S. W. Park, Y. K. Chang, E. S. Kim, and S. K. Hong. 2009. Medium optimization and application of affinity column chromatography for Trypsin production from recombinant *Streptomyces griseus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(10):1191–1196.
- Cunningham, D. S, Z. Liu, N. Domagalski, R. R. Koepsel, M. Mohammad, M. M. Ataa, and M. M. Domach. 2009. Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels. *Journal of Bacteriology* 191(9):3041-3049.
- Cushman, D. W., and H. S. Cheung. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20:1637-1648.
- Danielsson, C. E. 1949. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. *Biochemical Journal* 44:387-400.
- Delgado-Vargas, F., and O. Paredes-López. 2000. *Natural colorants for foods and nutraceutical uses*. p 259 CRC PRESS, United States of America.
- Dilipkumar, M., M. Rajasimman, and Rajamohan N. 2011. Optimization of inulinase production from garlic by *Streptomyces sp.* in solid state fermentation using statistical designs. *Biotechnology Research Internacional* (en prensa).
- Donovan, R. S., C. W. Robinson, and B. R. Glick. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 16:145-154.

- Dumbroff, E. B., and F. Gepstein. 1993. Immunological methods for assessing protein expression in plants. En: *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. P 207 CRC Press, United States of America.
- El-zahar, K., M. Sitohy, Y. Choiset, F. Metro, T. Haertlé, and J. Chobert. 2004. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hidrolysates. *Milchwissenschaft* 59:653-656.
- Epping-Jordan, J., G. Galea, C. Tukuitonga, and R. Beaglehole. 2005. Preventing chronic diseases: taking stepwise action. *Lancet* 366:1667-1671.
- Erdmann, K, B. Cheung, and H. Shroder. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:643-654.
- Farrel, M. C., A. D. Grossman, and R. T. Sauer. 2005. Cytoplasmatic degradation of *ssrA*-tagged proteins. *Molecular Microbiology* 57:1750-1761.
- Fitzgerald, R. J., and B. A. Murray. 2006. Bioactive peptides in lactic fermentations. *Journal of Dairy Technology* 59:118-125.
- Ferreira, S. H., D. C. Bartet, and L. J. Greene. 1970. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Nature* 24:379-380.
- Fritz, M., B. Vecchi, G. Rinaldi, and M. C. Añón. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry* 126:878-884.
- Fukushima, D. 1991. Structure of plant storage protein and their functions. *Food Reviews International* 7:353-381.

- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365-378.
- Glick, B. R. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* 13:247-261.
- Gorinstein, S. 1993. Relationship between amino acid sequence and secondary structures of proteins in plants and cereals. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57:1617-1623.
- Gokce, N. 2004. L-arginine and hypertension. *Journal of Nutrition*, 2807S-2811S.
- Guidelines Comitee. 2003. European society of Hypertension-European society of cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension* 21:1011-1053.
- Goldberg, I. 1994. *Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. p 571 Aspen publishers, United States of America.
- Hancock, R., and H-G. Sahl. 2006 Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24 (12):1551-1557.
- Harcum, S. W., and W. E. Bentley. 1993. Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54- y 80-kDa proteases in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 42:675-685.
- Hartl, F. U., R. Hlodan, and T. Langer. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends in Biochemical Sciences* 18:21-25.

- Hartmann, R., and H. Meisel. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18:163.
- Hayes, M., C. Stanton, H. Slattery, O. O'Sullivan, C. Hill, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2007. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4658-4667.
- Hernández, A. (2003). Fermentación. En *Microbiología Industrial* (1ª. Ed.). p 35 EUNED, Costa Rica.
- Hernández-Ledesma, B., P. J. Martín-Alvarez , and E. Pueyo. 2003. Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16:4175-9.
- Hernández-Ledesma, B., I. Recio, and L. Amigo. 2008. β -Lactoglobulinas como fuente de péptidos bioactivos. *Amino Acids* 35:257-265.
- Hernández-Ledesma, B., M. Contreras, and I. Recio. 2010. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165:23-35.
- Herman, E. M., and B. A. Larkins. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell* 11:601-613.
- Higgins, T. J. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of plant Physiology* 35:191-221.

- Hsu, E., T. Osslund, R. Nybo, B. Chen, W. Kenney, C. Morris, T. Arakawa, and L. Narhi. 2006. Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis Protein Engineering. Design and Selection, 19(4):147-153.
- Hurst, J. W. (2002). *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. p 399 CRC PRESS, United States of America.
- Kamionka, M. 2011. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. Current Pharmaceutical Biotechnology 12:268-274.
- Katsube, T., A. B. Gidamis, J. Kanamori, I. J. Kang, S. Utsumi, and M. Kito. 1994. Modification tolerability of the hypervariable region of soybean proglycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42:2639-2645.
- Kawasaki, T., E. Seki, K. Osajima, M. Yoshida, K. Asada, and T. Matsui. 2000. Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived. Journal of Human Hypertension 14:519-523.
- Kim, C. S., S. Kamiya, T. Sato, S. Utsumi, and M. Kito. 1990. Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin by protein engineering. Protein Engineering 3:725-731.
- Kim, Y. K., B. Lonnerdal, S. Yoon, D. Y. Yu, and B. H. Chung. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α 1-casein expressed in *Escherichia coli*. Journal of Dairy Research 66:431-439.
- Kim, S-K, and I. Wijesekara. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. Journal of Functional Foods 2 (1):1-9.

- Kitts, D. D., and K. Weiler. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309-23.
- Konishi, Y., and H. Yoshimoto. 1989. Amaranth globulins as a heat-stable emulsifying. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:3327-3328.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297-1308.
- Kosinski, M. J., U. Rinas, and J. E. Bailey. 1992. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 36:782-784.
- Krause, M., K. Ukkonen, T. Haataja, M. Ruottinen, T. Glumoff, A. Neubauer, P. Neubauer., and A. Vasala. 2010. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories* 9:11.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lesley, S., J. Graziano, C. Cho, M. Knuth M, and H. Klock. 2002. Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Engineering Design and Selection* 15:153-160.
- Lewis, M. 2005. The *lac* repressor. *Comptes Rendus Biologies* 328:521-548.
- Lohner, K., and S. Blondelle. 2005. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in

the design of novel peptides antibiotics. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screen* 8:241-256.

López, A. D., and C. C. Murray. 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Medicine* 4:1241-3.

Luna-Suárez, S. 2008. Introducción de péptidos bioactivos de interés nutracéutico en una globulina de amaranto. Tesis de doctorado, CINVESTAV-IPN, Irapuato.

Luna-Suárez, S., S. Medina-Godoy, A. Cruz-Hernández, and O. Paredes-López. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal* 3:209-219.

Luna-Suárez, S., S. Medina-Godoy, A. Cruz-Hernández, and O. Paredes-López. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 148:240-247.

Ma, X., W. Zheng, T. Wang, D. Wei, and Y. Ma. 2006. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and GM1 binding ability of purified rHLT-B. *The Journal of Microbiology* 44:293-300.

Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 60, 512.

Mallikarjun, G. K. G., L. R. Gowda, A. Rao, and V. Prakash. 2006. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4568-4573.

- Martínez, A. O., and E. Martínez. 2006 Proteins and peptides in enteral nutrition. *Nutrición hospitalaria* 21:1-14.
- Marx, V. 2005. Watching paptides grow up. *Chemical and Engineering News* 83(11):17-24.
- Matoba, N., N. Doyama, Y. Yamada, N. Maruyama, S. Utsumi, and M. Yoshikawa. 2001. Design and production of genetically modified soybean protein with antihypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Letters* 497:50-54.
- McNeil, B., and L. Harvey. 2008. Modes of fermenter operation. En *Practical Fermentation Technology*. p 69 John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra.
- Medina-Godoy, S. 2005. Producción de la globulina 11S de amaranto en *E. coli* y *Pichia pastoris* y modificación de la estructura primaria mediante ingeniería de proteínas. Tesis de doctorado, CINVESTAV-IPN, Irapuato.
- Medina-Godoy, S., A. Valdez-Ortiz, M. A. Valverde, and O. Paredes-López. 2006. Endoplasmic reticulum-retention C-terminal sequence enhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal* 1:1085-1092.
- Meisel, H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21:55-61.
- Meisel, H. 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry* 12:1905-1919.
- Moore, J. 2005. Hipertensión: Catching the silent killer. *The Nurse Practitioner* 30:16-18.

Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai, and T. Takano. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science* 78:1253-1257.

National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Health Statistics. Hyattsville, Maryland: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2007. American Journal of Health-System Pharmacy Society Logo. 2010.

Nagaoka, S., Y. Futamura, K. Miwa, T. Awano, K. Yamauchi, Y. Kanamaru, K. Tadashi, and T. Kuwata. 2001. Identification of novel hypocholesterolaemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research and Communications* 281:11-17.

Nielsen, N. C., R. Jung, Y. W. Nam, T. W. Beaman, L. D. Oliveira, and R. Bassüner. 1995. Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* 145:641-647.

Novy, R., D. Drott, K. Yaeger, and R. Mierendorf. 2001. Overcoming the codon bias of *E.coli* for enhanced protein expression. *in* *Novations* 12:1-3.

Nurminen, M. L., M. Sipola, H. Kaarto, A. Pihlanto-Leppälä, K. Piilola, and R. Korpela. 2000. Alpha-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science* 66:153.

Osborne, T. B. 1924. *The vegetable proteins*, Longmans Green and Co, London.

Osuna-Castro, J. A., Q. Rascón Cruz, J. Napier, R. J. Fido, P. R. Shewry, and O. Paredes-López. 2000. Overexpression, purification and *in vitro* refolding of

the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. Journal and Agricultural and Food Chemistry 48:5249-5255.

Paredes López, O., A. P. Barba de la Rosa, D. Hernández López, y A. Carabez Trejo. 1990. *Amaranto-características alimentarias y aprovechamiento industrial*. p 2 Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, DC.

Paredes López O., F. Guevara Lara y L. A. Bello Pérez. 2006. Amaranto. En *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. p 88 Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Pérez Caballero, M. D. 2008. La prehipertensión. *Revista Cubana de Medicina* 47:1.

Ramchuran, S. O., O. Holst, and E. N. Karlsson. 2005. Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch cultivations. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 5:477-484.

Rao, S., S. Yujie, L. Junhua, X. Censen, and Y. Yanjun. 2009. Design and expression of recombinant antyhipertensive peptide miltimer gene in *Escherichia coli* BL21. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:1620-1627.

Reddy, V., P. Reddy, B. Pillay, and S. Sinigh. 2002. Effect of aireation on the production of hemicellulases by *T. lanuginosus* SSBP in a 30 l bioreactor. *Process Biochemistry* 37:1221-1228.

- Romero-Zepeda, H., and O. Paredes-López. 1996. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *Journal of Food Biochemistry* 19:329-339.
- Rosano, G., and E. Ceccarelli. 2009. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories* 8:41.
- Ruiz, J., J. Pinsach, G. Álvaro, G. González, C. de Mas, D. Resina, and J. López-Santín. 2009. Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry* 44:1039–1045.
- Sanfeng, C., and O. Paredes-López. 1997. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *Journal of Food Biochemistry* 21:53-65.
- Secretaría de Salud. 2007. Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. p 28 México, D.F.
- Segura-Nieto, M., A. P. Barba de la Rosa, and O. Paredes López. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. En *Amaranth-Biology, Chemistry and technology*. p 76 CRC Press, United States of America.
- Shewry, P. R. 1995. Plant storage proteins. *Biology Review* 70:375-426.
- Shibui, T., and Nagahari K. 1992. Secretion of a functional Fab fragment in *Escherichia coli* and the influence of culture conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:352-357.

- Snyder, L., and W. Chapness. (2007). Regulation of gene expression: Operons. En *Molecular of genetics of bacteria*. (3a. Ed.) p 499 American Society for Microbiology, Estados Unidos de América.
- Sorensen, H. P., and K. K. Mortensen. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 4:1.
- Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen. 2005. Fermented functional Foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology* 16:198-203.
- Staswick, P. E., M. A. Hermodson, and N. C. Nielsen. 1984. Identification of the cystines which link acidic and basic components of the glycinin subunits. *Journal of Biological Chemistry* 259:13431-13435.
- Stryer, L., J. M. Berg, and J. Timoczko. 2008. El control de la expresión genica. En *Bioquímica* (6a. Ed.) p 898 Reverte, España.
- Surek, B., M. Wilhelm, and W. Hillen. 1991. Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34:484-494.
- Tortora, G. J., B. R. Funke, and C. L. Case. 2007. Genética microbiana. En *Introducción a la microbiología* (9ª Ed.). p 214 Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Tutar, Y. 2008. Syn, anti, and finally both conformations of cyclic AMP are involved in the CRP-dependent transcription initiation mechanism in *E. coli lac* operon. *Cell Biochemistry and Function* 26:399–405.

- Tresguerres, J. F., V. Martínez y V. Navas. 2003. Introducción a la biotecnología y generalidades. En *Biotecnología aplicada a la medicina* (1ª. Ed.). p 140
Díaz de Santos, S.A., España.
- Vechi, B., and M. C. Añón. 2009. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry* 70:864-870.
- Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition* 92:357-366.
- Vioque, J., and F. Millán. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación* 26:103-107.
- Wang, D., Q. Li, Y. Mao, J. Xing, and Z. Su. 2010. High-level succinic and production and yield by lactose-induced expresión of phosphoenolpyruvate carboxylase in ptsG mutant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 87:2025-2035.
- Winter, J., P. Neubauer, R. Glockshuber, and R. Rudolph R. 2001. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal Biotechnology* 84(2):175-181.
- Wood, T. K., and Paretti. 1991. Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38:397-412.

- Yamaguchi, N., K. Kawaguchi, and N. Yamamoto. 2009. Study of the mechanism of antihypertensive peptide VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *European Journal of Pharmacology* 620:71.
- Yamamoto, N., M. Maeno, and T. Takano. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science* 82:1388-1391.
- Yiran, W., and Y-H. Zhang. 2009. Overexpression and simple purification of the *Thermotoga maritime* 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Escherichia coli* and its application for NADPH regeneration. *Microbial Cell Factories* 8:30.
- Zhou, Z., P. Schnake, L. Xiao, and A. Lal. 2004. Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. *Protein Expression and Purification* 34(1):87-94.