

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TAQ POLIMERASA EN UN
BIORREACTOR DE 1L EN LA CORPORACIÓN CORPOGEN**

**LAURA ALEJANDRA CORONADO JIMENEZ
VALENTINA GONZALEZ MOYA**

Proyecto integral para optar al título de
Ingeniera Química

Orientador

Edgar Fernando Moreno Torres
Ingeniero Químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2021

NOTA DE ACEPTACIÓN

Dra. Diana Ramírez

Dr. Jurado 2

Dra. Diana Cuesta

Bogotá D.C., febrero de 2021

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claústro

Dr. MARIO POSADA GARCÍA-PEÑA

Consejero Institucional

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Investigaciones

Dra. MARIA CLAUDIA APONTE GONZÁLEZ

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. RICARDO ALFONSO PEÑARANDA CASTRO

Secretaria General

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN

Decano de la Facultad de Ingeniería

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director de Programa Ingeniería Química

Ing. NUBIA LILIANA BECERRA OSPINA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi Familia por ser siempre fuente de apoyo en cualquier momento, a mis amigas por regalarme los mejores momentos en esta etapa de mi vida y a cada persona que aportó un granito de arena para este proyecto.

Especialmente quiero agradecer a nuestra directora Diana Milena Morales Fonseca, por creer en nosotras desde el primer día y guiarnos en cada situación. A la profesora Luz Tinoco, por su apoyo en la realización de este trabajo en LaTeX y a todos los profesores de la Fundación Universidad de América.

También quiero agradecer a nuestra directora en Corpogen, Dayana Calderón, por su paciencia, apoyo constante y mostrarnos lo divertido de la ciencia.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a María Mercedes Zambrano, Patricia del Portillo y todo el equipo de investigación de Corpogen, sin ustedes este proyecto no hubiera sido posible.

Laura Alejandra Coronado Jiménez

Le agradezco a Dios por todo lo bueno y lo malo que me brindó a lo largo de este camino, por darme fortaleza y sabiduría siempre. Le agradezco a mi mamá y a mi hermana porque siempre han estado junto a mí, por confiar en todo momento y brindarme su amor y apoyo infinito, a mi papá por apoyarme siempre en vida y por cuidarme desde el cielo y guiarme, a mi tío por ser pieza fundamental en mi vida por su apoyo y amor, a mi familia, amigos, profesores y demás personas que me apoyaron y ayudaron a lo largo de este camino, a mi mejor amiga Dani por darme siempre ánimo y apoyarme.

También quiero agradecerle de forma especial a Diana Morales, nuestra directora de trabajo de grado, por confiar en nosotras, por acompañarnos durante todo este proceso y apoyarnos, a la profesora Luz Elena Tinoco, por guiarnos en la elaboración de este trabajo en LaTeX. A Dayana Calderón, nuestra directora en Corpogen por compartir todo su conocimiento con nosotras, por apoyarnos y por tenernos paciencia durante el desarrollo de este proyecto. Y a todos los investigadores de Corpogen por su compañía

y apoyo, especialmente a María Mercedes Zambrano y Patricia del Portillo quienes nos brindaron la oportunidad de desarrollar nuestro trabajo de grado en Corpogen y confiaron en nosotras.

Valentina González Moya

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	17
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. <i>Escherichia coli</i>	Error! Bookmark not defined.
1.1.1. Características generales de <i>E.coli</i>	19
1.1.2. Factores de crecimiento microbiano de <i>E.coli</i>	19
1.1.3. Fases de crecimiento microbiano	20
1.1.4. Huésped microbiano	22
1.2. Tecnología de ADN recombinante	24
1.2.1. Plásmido	26
1.2.2. Operón lac	27
1.2.3. Inductor IPTG	28
1.2.4. Gen	29
1.3. Taq polimerasa	29
1.3.1. Características generales de Taq Polimerasa	30
1.3.2. Aplicaciones de Taq Polimerasa en la industria	30
1.4. Proteínas recombinantes	32
1.4.1. Técnicas empleadas para la determinación del crecimiento celular	33
1.4.2. Tasa de expresión de proteínas recombinantes por <i>E.coli</i>	35
1.4.3. Actividad enzimática	35
1.5. Métodos de bioseparación	35
1.5.1. Métodos mecánicos	36
1.5.2. Métodos no mecánicos	36
1.6. Biorreactor	38
1.6.1. Reactores intermitentes	38
1.6.2. Reactores de flujo continuo	38
2. CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA A NIVEL MATRAZ	40

2.1.	Metodología para la identificación de las condiciones de operación para la producción de Taq polimerasa a escala matraz	40
2.2.	Resultados y discusión	41
2.2.1.	Producción de Taq polimerasa a escala matraz	45
2.2.2.	Cepa bacteriana y plásmido	45
2.2.3.	Medio de cultivo	46
2.2.4.	Condiciones de crecimiento	46
2.2.5.	Acondicionamiento de la bacteria	46
2.2.6.	Preparación del inóculo líquido	47
2.2.7.	Inducción de la enzima	47
2.2.8.	Lisis celular	47
3.	SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN UN BIORREACTOR DE AGITACIÓN CONTINUA PARA LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA	49
3.1.	Metodología	49
3.2.	Resultados y discusión	49
4.	EFFECTO DE LA AGITACIÓN Y FLUJO DE AIRE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA EN UN BIORREACTOR DE 1 L.	61
4.1.	Metodología para la producción de la enzima Taq polimerasa a escala biorreactor	62
4.1.1.	Activación de la cepa recombinante	63
4.1.2.	Preparación del preinóculo	64
4.1.3.	Producción de Taq polimerasa en biorreactor	65
4.1.4.	Extracción de Taq polimerasa	66
4.1.5.	Densidad óptica	68
4.1.6.	Cuantificación del contenido de proteína	69
4.1.7.	Electroforesis	71
4.1.8.	Scanner	73
4.2.	Resultados y Discusión	73
5.	CONCLUSIONES	90
	BIBLIOGRAFÍA	91
	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura No. 1. Curva de crecimiento bacteriano	21
Figura No. 2. Proceso de transformación	23
Figura No. 3. Procedimiento de clonación del ADN recombinante	25
Figura No. 4. Estructura típica de un plásmido	26
Figura No. 5. Manantial de agua caliente	29
Figura No. 6. Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
Figura No. 7. Publicaciones bajo distintas caracterizaciones	43
Figura No. 8. Diagrama de bloques del proceso	45
Figura No. 9. Publicaciones bajo distintas caracterizaciones	49
Figura No. 10. Comparación del potencial Hidrógeno	54
Figura No. 11. Reactor BioFlo/CelliGen	55
Figura No. 12. Comparación de la temperatura	57
Figura No. 13. Comparación del flujo de aire	57
Figura No. 14. Comparación de la agitación	58
Figura No. 15. Diagrama de bloques del proceso	63
Figura No. 16. Activación de la cepa recombinante	63
Figura No. 17. Preinóculo	64
Figura No. 18. Biorreactor inoculado	66

Figura No. 19. Muestra lisada	67
Figura No. 20. Espectrofotómetro Tecan	68
Figura No. 21. Placa de 96 pozos con las respectivas diluciones	69
Figura No. 22. Cubeta electroforética	72
Figura No. 23. Curvas de crecimiento a ambos niveles de agitación	73
Figura No. 24. Electroforesis en gel No. 1	77
Figura No. 25. Electroforesis en gel No. 2	78
Figura No. 26. Electroforesis en gel No. 3	80
Figura No. 27. Scanner	81
Figura No. 28. Agitación empleada en los experimentos	82
Figura No. 29. Temperatura empleada en los experimentos	83
Figura No. 30. pH a ambos niveles de agitación	84
Figura No. 31. Porcentaje de oxígeno disuelto a ambos niveles de agitación	86
Figura No. 32. Análisis de varianza de un solo factor	88

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla No. 1. Síntesis de datos a nivel matraz	41
Tabla No. 2. Síntesis de datos a nivel biorreactor	51
Tabla No. 3. Plantilla de diluciones para la técnica de Bradford	70
Tabla No. 4. Concentraciones de proteína iniciales y finales	75
Tabla No. 5. Producción a escala matraz	76
Tabla No. 6. Comparación de producción entre ambas escalas	76
Tabla No. 7. Resultados del scanner	82
Tabla No. 8. Datos empleados en el diseño de experimentos	88

RESUMEN

CorpoGen es un centro de investigación privado, sin ánimo de lucro, que trabaja desde 1995 en investigación científica y desarrollo tecnológico en Colombia. Tienen una variada oferta que incluye investigación en el área de microbiología, venta de algunos productos para área de biología molecular, servicios en tecnologías de punta y capacitaciones como pasantías, talleres, seminarios y entrenamientos en técnicas moleculares [1].

Uno de sus principales productos es la enzima Taq polimerasa, esta enzima se produce con tecnología de ADN recombinante, es una enzima identificada en la bacteria *Thermus aquaticus* y de gran importancia biotecnológica por su característica termófila, y *Escherichia coli* se utiliza como hospedero para la producción de Taq polimerasa por sus fáciles condiciones de crecimiento en el laboratorio y por ser un microorganismos de uso amplio en este tipo de tecnologías [2]. Esta enzima es muy utilizada en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Su producción es a nivel matraz bajo un protocolo estandarizado, sin embargo, existe la necesidad de monitorear y controlar diversos parámetros ambientales generando la implementación de biorreactores con el fin de incrementar la concentración de proteína final obtenida en el proceso de producción. En este proyecto se desarrolló un protocolo de producción de Taq polimerasa en un biorreactor de 1 L, se evaluó la influencia de cada parámetro sobre la expresión de la enzima. Así mismo, se seleccionaron los parámetros más variables en la producción mediante revisión bibliográfica y se realizó un diseño de experimentos de un factor con dos niveles, siendo la agitación el parámetro seleccionado debido a su influencia en los procesos de producción de proteínas recombinantes. Finalmente, se utilizaron diferentes técnicas moleculares cuantitativas y cualitativas, como lo son la técnica de Bradford, electroforesis en gel de poliacrilamida y densitómetro de electroforesis para determinar la concentración de proteína en ug/mL en ambos niveles de agitación, encontrando que la concentración de proteína total en el nivel de 350 rpm es mayor que la obtenida a escala matraz.

PALABRAS CLAVE: Taq polimerasa, biorreactor, agitación, *Escherichia coli*,

recombinante.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los productos obtenidos a través de bioprocesos son altamente utilizados en el mundo, principalmente en el campo de la salud humana y animal, dichos productos suelen ser medicamentos y métodos para identificar enfermedades virales, bacterianas y genéticas [3]. Existen numerosas enzimas y proteínas que se utilizan en procesos biotecnológicos, sin embargo, su obtención a escala laboratorio es costosa y demorada [1]. Una de las enzimas más utilizadas en los bioprocesos es Taq polimerasa, es de vital importancia su producción para trabajos de biología molecular en el mundo, su descubrimiento permitió automatizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction) utilizando un termociclador, así, esta enzima es el punto central para la realización de esa metodología [4]. Esta tecnología se considera como una clonación in vitro porque la amplificación del ADN se genera en un tubo de ensayo. Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula [5].

Taq polimerasa es una enzima termostable identificada en la bacteria *Thermus aquaticus* esta es una bacteria termófila, gramnegativa, aerobia y heterótrofa que vive en manantiales de agua caliente [6], fue aislada e identificada en el parque Yellowstone, su principal característica fisiológica es la capacidad que tiene de crecer en temperaturas de 70°C a 75°C [7].

La producción de Taq polimerasa hoy en día se realiza por medio de la tecnología de ADN recombinante, permitiendo combinar la característica termófila de la enzima con la producción de esta en el laboratorio empleando *E.coli* como hospedero versátil de fácil manipulación en el laboratorio.

Diferentes autores [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] han empleado protocolos para la producción de esta enzima a escala matraz, sin embargo, no hay evidencia de documentos que plasmen la producción de Taq polimerasa a escala biorreactor. El centro de investigación Corpogen produce la enzima Taq polimerasa a nivel matraz, sin embargo, la producción de productos comerciales suele tener un aumento de escala en biorreactor con el fin de poder monitorear constantemente los parámetros ambientales

que pueden influir en la producción como lo son el pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto. Para garantizar el seguimiento y control de los parámetros mencionados, se describió un protocolo de producción de Taq polimerasa en un biorreactor de 1 L.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la producción de la Taq polimerasa en un biorreactor de un 1 litro en la Corporación Corpogen.

Objetivos específicos

1. Identificar las condiciones de operación para la producción de Taq Polimerasa a escala laboratorio bajo revisión bibliográfica.
2. Seleccionar los parámetros de operación en un biorreactor de agitación continua para la producción de Taq polimerasa, a través de un análisis bibliométrico.
3. Establecer el nivel (agitación/ flujo de aire) para la producción de Taq Polimerasa en un biorreactor.

1. MARCO TEÓRICO

En Colombia son pocos los laboratorios que se dedican a la producción de proteínas de forma heteróloga como Taq polimerasa, uno de estos laboratorios es Corpogen, el cual se encuentra ubicado en la ciudad de Bogotá, y realiza este proceso a partir de una cepa recombinante de E.coli DH5 α que contiene un plásmido con el gen para la Taq DNA polimerasa [17].

Con base en lo anterior, se realizó una contextualización de la bacteria E.coli: Factores de crecimiento microbiano, huésped microbiano E.coli DH5 α . Luego, se describió la tecnología de ADN recombinante, posteriormente, se explicó la producción de la proteína Taq polimerasa empleando como organismo huésped a E.coli, y la aplicación de la enzima en la industria.

A continuación, se expuso lo concerniente a las proteínas recombinantes, enfocado en los métodos de cuantificación de la proteína, la tasa de expresión de proteínas recombinantes y la actividad enzimática. Finalmente, se especificó el biorreactor empleado en este proyecto, identificado como sistema BioFlo/CelliGen 115 con las diferentes partes que lo componen [18].

1.1. *Escherichia coli*

Es un microorganismo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacilo gran negativo de aproximadamente $<1 \mu\text{m}$ de diámetro, patógeno, principalmente encontrado en diversos ambientes de los que se destaca el intestino de mamíferos, aguas estancadas y suelo. Es un microorganismo de fácil manipulación en el laboratorio, de crecimiento rápido y de requerimientos nutricionales básicos, para su cultivo en el laboratorio se emplean diversos iones, oligoelementos y una fuente de energía como la glucosa. Posee una temperatura de crecimiento óptima a 37°C y un tiempo generacional en fase exponencial de 22 minutos, es un microorganismo versátil que puede crecer en condiciones de ausencia total de oxígeno o en presencia del mismo, sin embargo, para la producción de proteínas heterólogas, suele realizarse en presencia de oxígeno [19]

1.1.1. Características generales de *E.coli*

E.coli es una bacteria gram negativa por lo cual se caracteriza por tener membrana citoplasmática, membrana externa y entre estas membranas posee un espacio periplásmico que está conformado por peptidoglicano, es una bacteria con forma de bacilo, móvil por flagelos peritricos es anaerobio facultativo, no forma esporas y se caracteriza por fermentar la glucosa y la lactosa. [20]. Naturalmente, esta bacteria se encuentra en los intestinos de los seres humanos y por ende, en las heces fecales. [21] Es una bacteria termófila, su temperatura óptima para desarrollo es de 35-43°C, *E.coli* es sensible a temperaturas superiores a 70°C. El pH también es un factor importante para el crecimiento óptimo de esta bacteria, el cual es 7.2, el crecimiento de esta se detiene a un pH inferior a 3.8 y superior a 9.5 [22] En un laboratorio de investigación, empleando un cultivo simple que contenga fuente de carbono, sales y elementos traza se puede hacer crecer estas bacterias. En un medio rico como el Luria Bertani (LB), compuesto por aminoácidos, también se puede evidenciar el crecimiento bacteriano [20].

1.1.2. Factores de crecimiento microbiano de *E.coli*

Todos los microorganismos en general presentan una identidad propia, en este caso la bacteria *E.coli* ha tenido innumerables estudios respecto a su fisiología y cinética de crecimiento, entre otros. Existen diferentes variables que pueden incidir en su crecimiento, conocidas como factores de crecimiento microbiano, los cuales pueden afectar la producción de la proteína recombinante de forma sustancial [23].

1.1.2.i. Fuente de carbono y energía. El carbono constituye el 50 % del peso seco del material celular, gracias a este se originan las macromoléculas y estructuras de la célula. Un recurso común de carbono es la glucosa, aunque también se encuentra la sacarosa, fructuosa, galactosa, entre otros [23].

1.1.2.ii. Fuente de oxígeno. La respiración bacteriana puede ser un proceso complejo. Entre los microorganismos se encuentran los aerobios estrictos, microaerófilos, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos [23]. *E.coli*, es un organismo muy versátil, su capacidad para crecer con ausencia o presencia de oxígeno

la catalogan como un microorganismo anaerobio facultativo, esta es una de las razones por la cual *E.coli* es preferiblemente empleado como organismo para la expresión y obtención de proteínas heterólogas. [19].

1.1.2.iii. Temperatura. Todo microorganismo tiene un rango de temperatura para crecer de manera óptima. Generalmente, están clasificados en termófilos (45 a >90 °C), mesófilos (10-47°C) y psicrófilos (-5 a 20°C). *E.coli*, al ser una bacteria que crece generalmente alrededor de los 37°C es un microorganismo mesófilo. Esta característica permite que sea usada como vehículo para la producción de enzimas que son estables a altas temperaturas y son utilizadas con fines industriales o de laboratorio [19].

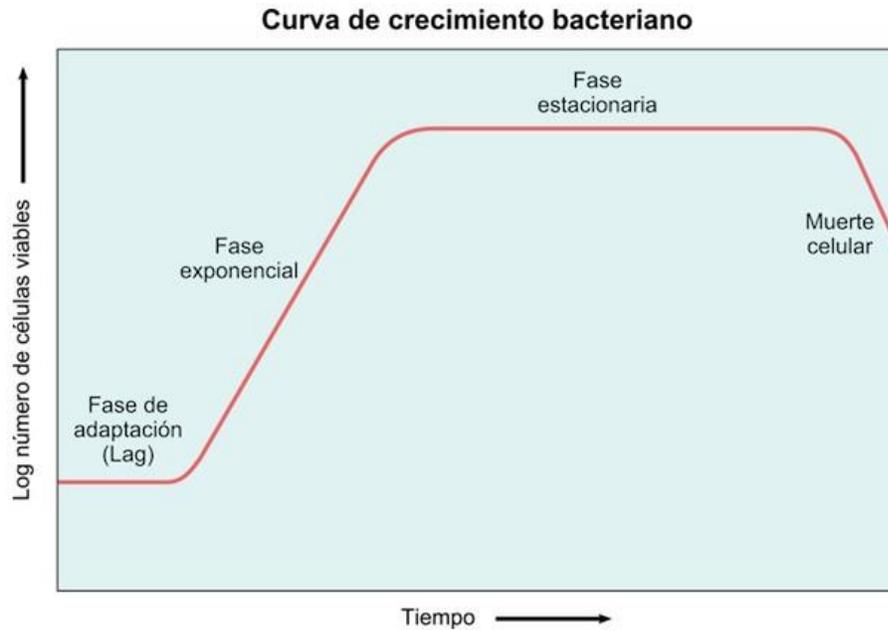
1.1.2.iv. pH. Generalmente las bacterias crecen a pH neutro, sin embargo, si no se controla el pH pueden existir afectaciones en la velocidad de crecimiento [23].

1.1.2.v. Fuente de nitrógeno. El nitrógeno constituye entre el 8-15 % del peso seco en el material celular, forma parte de los ácidos nucleicos, la pared celular, la membrana celular y otros componentes importantes. Los requerimientos de nitrógeno son costosos, por eso, se intenta suplir la demanda con subproductos industriales como suero de leche, soya o extracto de levadura [23]. En el caso particular de esta investigación se utiliza el extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo [1].

1.1.3. Fases de crecimiento microbiano

Figura No. 1.

Curva de crecimiento bacteriano



Nota. La figura representa la curva típica de crecimiento bacteriano. Tomado de: Lifeder. "Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores". En línea, <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>. Acceso: agosto 31, 2020.

La figura No. 1 representa una curva de crecimiento bacteriano, la cual se divide en cuatro fases: La fase de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y muerte celular.

- Fase de latencia: La fase de latencia es el tiempo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición, este periodo de latencia puede ser corto o largo dependiendo de los factores de la población y de los factores ambientales. En esta fase no hay aumento en el tamaño individual de las células y estas están metabólicamente activas ya que están sintetizando proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, etc. [24] [25]
- Fase exponencial o logarítmica: En esta fase, al pasar un tiempo de generación la población se duplica, y es por esto que el microorganismo crece exponencialmente,

para que esto suceda es necesario que las bacterias en el medio de cultivo tengan todos los nutrientes necesarios y las condiciones adecuadas para su crecimiento, ya que estas última afecta a la velocidad de crecimiento exponencial [24] [25].

- Fase estacionaria: En esta fase ocurre el agotamiento de nutrientes. El crecimiento exponencial no es infinito ya que el medio de cultivo es un sistema cerrado, entonces un mayor número de células en un espacio finito implica que no va a tener suficiente espacio estas, y así como algunas células continúan dividiéndose, otras comienzan a morir a una tasa similar y es por esto que la curva en esta fase se aplana [24] [25].
- Fase de muerte: En esta fase se observa una disminución progresiva en el número de células, y es por esto que se dice que la población entra en fase de muerte o declive [24] [25].

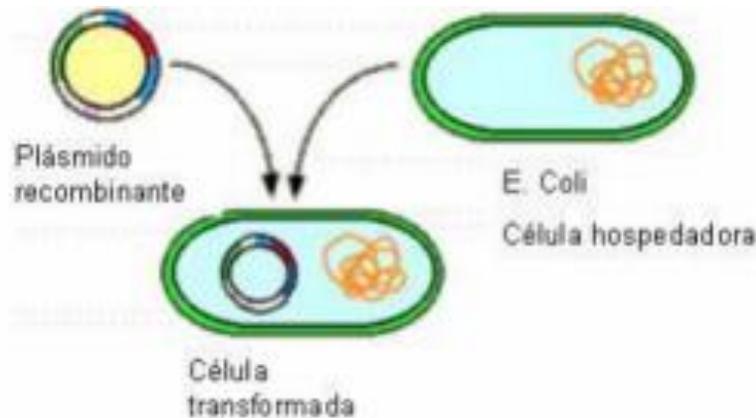
1.1.4. Huésped microbiano

Un huésped microbiano actúa como una entidad que puede albergar en su interior una sección de otro microorganismo, generalmente esa sección es ADN. Esto se logra con el fin de replicar esa sección de ADN [19]. Para lograr el ingreso del ADN exógeno, la célula se debe encontrar en un estado de competencia, ocurriendo en determinadas condiciones fisiológicas, generando alteraciones en la pared y membrana celular. Existen diferentes técnicas para lograr el estado de competencia, las cuales se basan en tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, lo que permite la introducción del ADN exógeno de forma bastante eficiente [26]. El proceso de introducir ADN exógeno en una célula, se llama transformación genética (ver Figura No. 2, para lograr dicha transformación, se necesita desarrollar el estado de competencia en la célula, generalmente, se emplea el uso de sustancias químicas como cloruro de calcio o un tratamiento físico como la electroporación [27]. La electroporación, se basa en someter la célula a breves impulsos de alto voltaje, provocando una dilatación en los poros de la célula para introducir el ADN exógeno. La eficiencia de la electroporación, depende de diferentes factores como la temperatura, el gradiente de voltaje, resistencia y capacitancia [28]. Por otro lado, también es posible el tratamiento químico descubierto

por primera vez por Mandel e Higa, donde se incuban las células a bajas temperaturas en presencia de cloruro de calcio [29]

Figura No. 2.

Proceso de transformación



Nota. La figura representa la introducción del plásmido recombinado a las bacterias (organismo huésped). Tomado de: B.R.Glick, J.J.Pasternak, and C.L.Patten. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. American Society for Microbiology (ASM), 4 edition, 1998.

Escherichia coli ha sido ampliamente utilizada como huésped industrial para la expresión de proteínas, cerca del 30 % de las proteínas terapéuticas son producidas por *E.coli*, incluyendo tratamientos como degeneración muscular, esclerosis múltiple, hepatitis C, entre otros [30]. Las ventajas de utilizar a *E.coli* en diferentes aplicaciones industriales, se debe a que ha sido estudiada detalladamente, por ejemplo, su genoma ha sido secuenciado al 100 %, la mayoría de enzimas y proteínas reguladoras de *E.coli* se han caracterizado a nivel de: mecanismo de reacción, regulación transcripcional y a nivel de sustrato. Adicionalmente, se tiene conocimiento sobre la comprensión del sistema, incluyendo la regulación y adaptación. Así mismo, se sabe de herramientas genéticas que permiten la transformación genética de *E.coli* o modificar su genoma con alta

precisión. Además, crece de manera rápida y es un microorganismo anaerobio facultativo, siendo ideal para procesos con o sin oxígeno, especialmente, existe una característica que la hace atractiva para los bioprocesos y es su capacidad de adaptarse al estrés metabólico [30].

La bacteria, en su hábitat original no se pueden utilizar para fines investigativos, porque es de vital importancia emplear cepas inocuas en el laboratorio con la propiedad de ser competente y poder transferir plásmidos con características específicas. Por eso, han surgido diferentes clones de esta bacteria que pueden ser usados en el laboratorio, uno de ellos y la cepa que se va a emplear en este proyecto es la DH5 α , la cual es una cepa no patógena, desarrollada por D. Hanahan con múltiples mutaciones, permitiendo transformaciones con gran eficiencia [31].

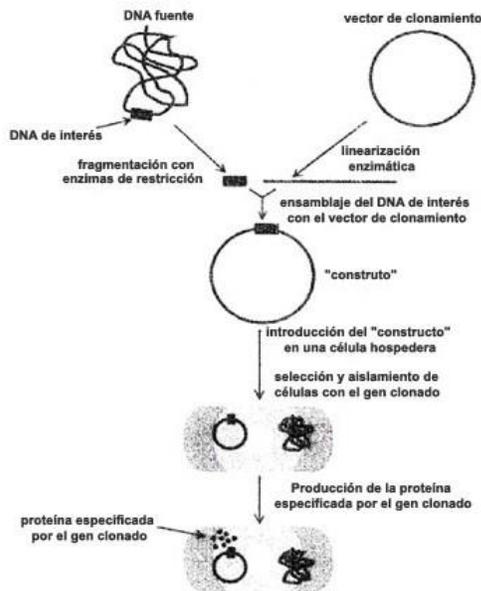
1.2. Tecnología de ADN recombinante

El ADN recombinante, es un término general que abarca una serie de protocolos experimentales que llevan a la transferencia de información genética de un organismo a otro. No hay un solo método que se pueda emplear para esto, pero normalmente sigue el siguiente formato, en la Figura No. 3 se plasma este procedimiento de manera sencilla [19]:

- El ADN de un organismo donante se extrae, se escinde enzimáticamente y se une a otra entidad de ADN (vector de clonación) para formar una nueva molécula de ADN recombinada [19].
- Esta construcción de ADN recombinante (gen insertado en un vector de clonación) se transfiere y se mantiene dentro de una célula huésped. La introducción de ADN a la célula de una bacteria huésped se llama transformación [19].
- Las células huésped que son transformadas son identificadas y seleccionadas (se separan) de aquellas que no, por lo general mediante el uso de antibióticos [19].

Figura No. 3.

Procedimiento de clonación del ADN recombinante



Nota. La figura representa el proceso típico para la clonación de ADN recombinante. Tomado de: B.R.Glick, J.J.Pasternak, and C.L.Patten. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. *American Society for Microbiology (ASM)*, 4 edition, 1998.

La tecnología recombinante hace referencia a la clonación molecular de ADN extraño en elementos de ADN extracromosómico bacteriano (es decir plásmidos) que se pueden propagar en un huésped bacteriano como *Escherichia coli*. La tecnología de ADN recombinante comprende una variedad de pasos experimentales que permiten la transferencia de información genética (ADN) de un organismo a otro, dentro de estos pasos se encuentran: primero, el ADN se corta en puntos específicos por las enzimas endonucleasas de restricción, este corte facilita el aislamiento y la manipulación de los genes de restricción. Después, se seleccionan pequeños fragmentos de ADN con

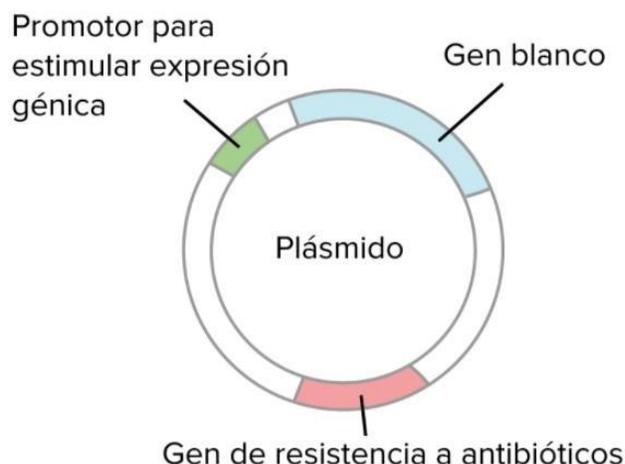
capacidad para autorreplicarse, conocidos como vectores de clonación (plásmidos). A continuación, se unen dos fragmentos de ADN por medio de las enzimas ADN ligasas por enlaces covalentes (ADN recombinante). Posteriormente, el ADN recombinante se lleva a una célula hospedera que permite la replicación. Finalmente, se seleccionan las células hospederas que contienen el ADN recombinante [32].

1.2.1. Plásmido

Los plásmidos (Figura No. 11) son moléculas de ADN que a menudo se encuentran en bacterias y en otras células, estos se separan del cromosoma bacteriano y se replican independientemente de ella [33]. Los cuales contienen un conjunto de genes beneficiosos para la vida de las bacterias, y estos otorgan a las bacterias virulencia y resistencia a los antibióticos, además, tienen la capacidad de transferirse de bacteria a bacteria, lo que expande la resistencia a antibióticos [34]. Para identificar que el plásmido ha sido transferido a la célula se utilizan marcadores que indican resistencia a ciertos antibióticos para que sólo crezcan las células transformadas, es decir, las que lograron internalizar el plásmido, un ejemplo de estos antibióticos es la ampicilina. La ampicilina es un derivado de la penicilina, por lo cual también es un betalactámico, considerado un antibiótico de amplio espectro, su fórmula química es $C_{16}H_{18}N_3O_4S$ [35].

Figura No. 4.

Estructura típica de un plásmido



Nota. La figura representa la estructura típica de un plásmido. El gen blanco hace referencia a la secuencia de ADN a clonar. Tomado de: Khan academy. “Reacción en cadena de la polimerasa (pcr)”. [En línea]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-h-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>. [Acceso: Septiembre 10, 2020]

Algunas de las características generales son:

- La mayoría son muy pequeños en comparación con el cromosoma bacteriano, son circulares, aunque algunos pueden ser lineales [36].
- Cada plásmido contiene al menos una secuencia de ADN que sirve como origen de replicación lo cual permite al ADN ser reproducido en forma independientemente del cromosoma [36].
- Poseen genes que brindan ventajas a la bacteria que lo contenga [36].

Los plásmidos tienen aplicación en ingeniería genética, se han construido incontables plásmidos artificiales en los laboratorios de biología molecular o de ingeniería genética llamados vectores, que son fáciles de manipular y a los que se les pueden introducir nuevos genes de interés [36]. Los vectores de clonación son plásmidos que llevan insertados fragmentos de ADN, típicamente un gen, el cual se busca introducir o expresar en el hospedador. Para poder ser insertado es necesario cortar el vector con enzimas de restricción y una vez introducido se denomina vector recombinante [37].

1.2.2. Operón *lac*

Un operón es un grupo de genes estructurales que permiten codificar proteínas en un solo camino metabólico, es decir, solo tiene un promotor para activar o desactivar su función [19]. Específicamente, el operón *lac* permite codificar proteínas para que la

bacteria *E.coli* utilice a la lactosa como fuente de energía. El operón *lac* de [*E.coli*] contiene los genes involucrados en el metabolismo de la lactosa. Se expresa solamente cuando la lactosa está presente y la glucosa está ausente. Dos reguladores “encienden” y “apagan” el operón en respuesta a los niveles de lactosa y de glucosa: el represor *lac* que actúa como un sensor de la lactosa, normalmente bloquea la transcripción del operón, pero deja de actuar como represor cuando la lactosa está presente. El represor *lac* detecta la lactosa indirectamente, a través de su isómero alolactosa y la proteína activadora por catabolito (CAP), esta actúa como un sensor de la glucosa, activa la transcripción del operón, pero solamente cuando los niveles de glucosa son bajos. CAP detecta la glucosa indirectamente, a través de la molécula de “señal de hambre” AMPc [38].

E.coli puede descomponer la lactosa, pero no es su alimento preferido. Si la glucosa está presente, la va a preferir ya que la glucosa requiere pocos pasos y menos energía para descomponerse que la lactosa, pero si esta es el único azúcar disponible, *E.coli* la utilizará como fuente de energía [38]. Para utilizar la lactosa, las bacterias deben expresar los genes del operón *lac*, que codifica enzimas para el consumo y el metabolismo de la lactosa. Para ser tan eficiente como sea posible, *E.coli* debe expresar el operón *lac* solamente cuando la lactosa está disponible y la glucosa no [38].

1.2.3. Inductor IPTG

El isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) es el análogo no hidrolizable de la lactosa, es un inductor altamente utilizado en el laboratorio. Su función es inducir la expresión de la proteína que está bajo el control del operón *lac* [19] “El IPTG es un reactivo de biología molecular. Este compuesto es una imitación molecular de la alolactosa, un metabolito de lactosa que desencadena la transcripción del operón *lac* y, por tanto, se utiliza para inducir la expresión de la proteína de *E.coli* donde el gen está bajo el control del operador *lac*” [39].

“Cuando el gen está bajo el control del operador *lac*, generalmente se agrega (IPTG) para inducir la expresión de proteínas. Este sistema es uno de los sistemas de expresión más utilizados en *E.coli* principalmente debido a sus altísimos niveles de expresión.” [40]

1.2.4. Gen

Un gen es un fragmento de ADN que contiene la información necesaria para que se fabrique una proteína [41]. Los genes ejercen su efecto principalmente determinando la estructura y función de miles de proteínas diferentes, que a su vez determinan las características de un organismo. Cada proteína está codificada por un gen, es necesario tener en cuenta que la producción de algunas proteínas requiere la cooperación de varios genes [42].

1.3. Taq polimerasa

Taq polimerasa es una enzima termoestable utilizada para la amplificación del ADN, específicamente, es una ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual es una bacteria termófila, gramnegativa, aerobia y heterótrofa que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente [6]. Fue aislada e identificada en el parque Yellowstone (Figura No. 5), su principal característica fisiológica es la capacidad que tiene de crecer en temperaturas de 70°C a 75°C [7].

Figura No. 5.

Manantial de agua caliente



Nota. La figura representa los manantiales de agua

caliente, típicos del Parque Nacional Yellowstone. Tomado de: David H. Gelfand. *Taq DNA Polymerase*, pages 17–22. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Palgrave Macmillan UK, London, 1989.

1.3.1. Características generales de Taq Polimerasa

Taq ADN polimerasa, es una proteína de 832 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 93.920 kDA (Unidad de masa atómica) y una actividad específica de 292.000 U/mg (Unidad de actividad enzimática). Se sabe que la temperatura donde se logra una polimerización óptima es en el rango de 75°C a 80°C [43]. Esta proteína, es considerada como la enzima que comúnmente se utiliza en la reacción de cadena polimerizada (PCR), debido a que es resistente al calor, con una vida media de 40 minutos a 95°C [44].

1.3.2. Aplicaciones de Taq Polimerasa en la industria

En el área de la biología molecular se han desarrollado varias técnicas revolucionarias que han permitido la fácil manipulación del ADN, así como el entendimiento de su función, dentro de las diferentes tecnologías empleadas para su manipulación y estudio se destaca la PCR [45]. Esta tecnología se conoce como reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), y se considera como una clonación in vitro porque la amplificación del ADN se genera en un tubo de ensayo. Esta técnica puede obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula [5].

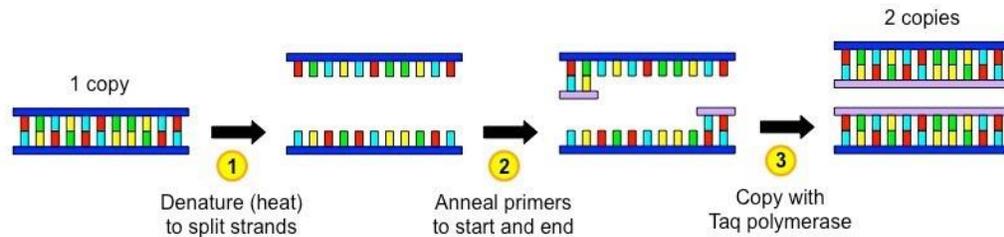
En 1988, se publicó el uso de una enzima termoestable para la amplificación de ADN, conocida como la Taq polimerasa [46]. Su descubrimiento permitió automatizar la técnica del PCR utilizando un termociclador, así, esta enzima es el punto central para la realización de esa metodología [4].

La técnica de PCR fue una invención de Kary Mullis en 1986 que tuvo un gran impacto en muchas áreas de investigación, incluyendo biotecnología molecular [46]. Es un

procedimiento efectivo, que permite generar grandes cantidades de secuencias específicas de ADN in vitro. Esta amplificación, se logra a través de tres pasos cíclicos que se muestran en la Figura No. 6 y se detallan a continuación:

Figura No. 6.

Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



Nota. La figura representa los tres pasos típicos de la PCR. Tomado de: R. K. Saiki *et al*, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science*, vol. 239, (4839), pp. 487-491, 1988.

- Denaturalización: El primer paso en el sistema de amplificación de la PCR, es la denaturalización térmica de la muestra de ADN elevando la temperatura dentro de un tubo de reacción a 95 °C durante 1 minuto. El tubo de reacción contiene la muestra de ADN, un exceso molar de los dos primers oligonucleótidos, una ADN polimerasa termoestable y cuatro desoxirribonucleótidos [19].
- Renaturalización: En el segundo paso, la temperatura de la mezcla se disminuye hasta 55°C [19]. Esta temperatura es la óptima para el anillaje de los primers, que sirven luego como cebadores para que inicie la síntesis del ADN [1].
- Síntesis: La temperatura de la mezcla se aumenta hasta 75 °C, la cual es óptima para el funcionamiento catalítico de la ADN Taq Polimerasa [19]. En la PCR, actúan varias proteínas, sin embargo, se ha considerado que la Taq Polimerasa es la más importante porque incorpora nucleótidos durante las síntesis de las nuevas cadenas de ADN [47].

La aplicación de la PCR es muy versátil, por ejemplo, en medicina permite la detección de bacterias y virus. Así mismo es posible el diagnóstico precoz de algunos tipos de cáncer, permitiendo a su vez el monitoreo de las quimioterapias, ya que es ideal detener el tratamiento cuando las células cancerosas han desaparecido o reiniciarlo cuando aparecen las recidivas [48]. Adicionalmente, con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa, es factible la detección de ADN en muestras de sangre y semen, los cuales pueden ser valiosos en casos de asaltos o violaciones; la técnica también ha permitido la reconstrucción de material genético fósil [48]. El uso de la PCR ha revolucionado las técnicas de biología molecular, tanto así, que hasta el año 2020 existían 593.199 publicaciones científicas que mencionan el uso de la técnica PCR, en el buscador bibliográfico PubMed [49].

1.4. Proteínas recombinantes

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de moléculas más pequeñas, conocidas como aminoácidos, los cuales poseen un grupo carboxilo, un grupo amino y un radical libre. Para conformar una proteína, es necesario que los aminoácidos se unan entre sí, mediante lo que se denomina un enlace peptídico, el cual se genera entre un grupo amino de un aminoácido junto con el grupo carboxilo de otro aminoácido. Según su estructura la función que ejerce cambia, aproximadamente, existen 20 aminoácidos distintos, los cuales componen las proteínas, algunos de ellos son: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina [21]. Las proteínas son las encargadas de catalizar reacciones químicas; además, son responsables de algunas funciones biológicas como el transporte de las moléculas entre las células, controlar la permeabilidad de la membrana, dar soporte a las células, órganos y estructuras del cuerpo, causar el movimiento, y proveen protección contra agentes infecciosos y toxinas [19]. La tecnología del ADN recombinante, abrió una nueva etapa en el mundo de la biotecnología, teniendo impacto en diferentes sectores como la medicina, agricultura, química, entre otros [50]. Sin embargo, la mayor influencia de la tecnología del ADN recombinante, fue en la biotecnología roja, la cual abarca todo lo relacionado con medicina, la terapia génica, la medicina regenerativa y las proteínas terapéuticas [51].

Las proteínas terapéuticas, son proteínas que se pueden obtener a través del ADN recombinante, y sirven como tratamiento para diferentes enfermedades. La obtención de estas moléculas mediante el empleo de este tipo de tecnología se conoce como proteínas recombinantes o proteínas heterólogas, la cual consiste en expresar un gen clonado en una especie celular distinta a la original. [19]. Por ejemplo, la producción recombinante de interferón para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la producción de insulina de forma heteróloga para el tratamiento de la diabetes, la hormona de crecimiento, entre otras. [51].

1.4.1. Técnicas empleadas para la determinación del crecimiento celular

Un paso importante en el desarrollo de experimentos para la obtención de proteínas recombinantes es poder cuantificar una proteína específica en una solución. Para esto, uno de los métodos para la identificación de la proteína es la electroforesis en gel [1].

- **Electroforesis en gel:** Es una técnica muy usada para identificar proteínas o ácidos nucleicos. En general, una muestra particular de una macromolécula (proteína, ADN O RNA) es colocada cerca del final de una matriz de gel. La composición del gel electroforesis es semisólida, una malla abierta de cadenas lineales interconectadas [19]. A la capa delgada del gel se le adicionan varias alícuotas de muestra. Se aplica un campo eléctrico a través del gel y las macromoléculas son conducidas en la dirección del ánodo a través del gel como bandas invisibles discretas de material. La distancia que una banda se mueve dentro del gel depende de la masa de sus macromoléculas y el tamaño de los poros en el gel. Las macromoléculas más pequeñas viajan más lejos que las más grandes. La poliacrilamida es el gel preferido para los sistemas de separación de proteínas. El tamaño del poro del gel poliacrilamida es determinado por la concentración de acrilamida [19]. Para muchas aplicaciones, una muestra de proteína es tratada con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio antes de la electroforesis (SDS, por sus siglas en inglés). El SDS se une a las proteínas y disocia la mayoría de las proteínas multicadena, eliminando la influencia de estructura y carga. Consecuentemente, durante la electroforesis, la separación de las cadenas de

proteína SDS se basa principalmente en el tamaño. La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS permite identificar proteínas en un rango desde 20 kDa hasta 200 kDa [19].

- Densidad óptica: Durante el registro y control de los procesos fermentativos, se necesita una estimación rápida del crecimiento bacteriano, para lo cual se han desarrollado métodos turbidimétricos que permiten medir la absorbancia de las bacterias en el cultivo [52]. Para la medición de la densidad óptica se emplea un espectrofotómetro, el cual es un instrumento que hace pasar la luz a través de una suspensión celular y mide la luz no dispersada que emerge, utilizando un prisma o una rejilla de difracción para generar luz incidente de una longitud de onda específica [53]. La medición de la densidad óptica con un espectrofotómetro es un modo rápido y fácil para obtener la curva de crecimiento de dicho microorganismo [52].
- Bradford: En las prácticas de laboratorio, la purificación de proteínas a menudo requiere un método rápido y sensible para la cuantificación de las mismas. Los métodos actualmente disponibles cumplen parcialmente el requisito para este tipo de cuantificación, por ejemplo, los ensayos de Lowry y Biuret, presentan problemas, y su tiempo de ejecución es bastante largo [54]. Por su parte el método de Bradford es sensible (1-15 ug), [55] este método se basa en la unión de un colorante, Azul de Coomassie G-250 a la proteína, se caracteriza por ser un proceso rápido de aproximadamente 2 min, y el complejo proteína-tinte permanece disperso en la solución durante un tiempo relativamente largo de aproximadamente 1 hora [54].
- Scanner: Es posible procesar las imágenes obtenidas por electroforesis en gel, existen diferentes programas de procesamiento de imagen digital disponible libre en la web, uno de ellos es ImageJ [56]. Este programa permite obtener una medida cualitativa de las bandas generadas en la electroforesis en gel. Su funcionamiento se basa en determinar la intensidad de cada banda según escala de grises, entre más oscura sea la banda significa que hay mayor presencia de la proteína o de la molécula a analizar. Este sistema se conoce como densitómetro de electroforesis.

1.4.2. Tasa de expresión de proteínas recombinantes por *E.coli*

E.coli es una plataforma ampliamente usada para la producción de proteínas recombinantes, ya que presenta una serie de ventajas importantes [57]: i) su genoma es conocido desde hace varios años, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, ii) existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo, iii) se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de proteínas recombinantes, iv) puede crecer rápido en medios muy simples, con altos niveles de producción de proteínas recombinantes [58]. Otra de las ventajas que un sistema de expresión de *E.coli* ofrece sobre otros sistemas es que es de fácil manejo, su proceso de fermentación es simple y tiene una buena capacidad para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes rentables y asequibles [59].

1.4.3. Actividad enzimática

La actividad enzimática viene limitada por diferentes factores como puede ser la concentración de enzimas, sustrato y la disponibilidad de cofactores. Diferentes factores ambientales pueden afectar la actividad enzimática, por ejemplo, la temperatura es uno de estos. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Es importante mencionar que a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas se produce un notable descenso de la actividad cuando se alcanza una temperatura crítica [60].

1.5. Métodos de bioseparación

En los procesos biotecnológicos, existen dos maneras de obtener un producto de interés: dentro de la célula (intracelular) o por fuera de esta (extracelular). Los bioprocesos en donde el metabolito de interés se produce por fuera de la célula son de particular interés industrial, porque en los pasos posteriores son menos complicados y a menor costo. Sin embargo, es muy común encontrar que el metabolito de interés se desarrolle dentro del citoplasma, la pared celular, el periplasma y las membranas celulares. Para este último caso es necesario utilizar los métodos de ruptura celular, dentro de estos métodos se encuentran los métodos mecánicos y los no mecánicos [61].

1.5.1. Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos también conocidos como intensos o fuertes, debido a que no son específicos y están basados en principios mecánicos, los cuales propician la ruptura de la pared celular incluyendo la destrucción de muchos de los componentes que proveen fuerza a la célula. Este tipo de métodos son ampliamente utilizados por su factibilidad de ser escalados, su eficiencia, y su bajo costo operacional. Dentro de estos métodos se encuentra el ultrasonido y el homogeneizador de alta presión, entre otros [61].

1.5.1.i. Ultrasonido. Esta técnica consiste en inducir una fuerza de cizallamiento a través de ondas sónicas, generando el fenómeno de cavitación, el cual involucra la formación, crecimiento y el colapso de las burbujas de vapor. Al colapsar las burbujas, provoca una onda elástica muy fuerte que llega a romper la pared celular debido a la alta presión, hasta 200 MPa. Los parámetros más relevantes en el ultrasonido son la intensidad acústica, la concentración celular, la temperatura y el tiempo de tratamiento. El ultrasonido ha sido ampliamente estudiado debido a su alta escalabilidad y bajos costos operativos [61].

1.5.1.ii. Homogeneizador de alta presión. La técnica HPH por sus siglas, se basa en el cizallamiento líquido y es estudiado por su eficiencia principalmente en muestras grandes. Esta técnica se basa en presurizar la muestra entre 20-120 MPa por una bomba de desplazamiento positivo a través de un espacio estrecho, lo que causa velocidades después del espacio de hasta 400 m/s. Después de que las células han pasado el espacio estrecho se genera la ruptura celular [61].

1.5.2. Métodos no mecánicos

Los métodos no mecánicos o suaves consumen menos energía que los métodos mecánicos, son menos agresivos con las células, y tienen mayor selectividad y especificidad. Actúan permeabilizando las membranas celulares, es decir que permiten el paso de solutos de bajo peso molecular dentro y fuera de las células. Dentro de los métodos no mecánicos se encuentran: Choque osmóticos, lisis química, lisis enzimática, termólisis [61].

1.5.2.i. Choque Osmótico. En esta técnica un cambio de presión osmótica promueve una lesión mecánica de la pared celular y por ende aumenta su permeabilidad liberando contenido periplásmico y citoplasmático, incluidos iones, metabolitos, lípidos y proteínas. El choque osmótico puede aplicarse en la permeabilización de la membrana celular, principalmente en las bacterias Gramnegativas. Debido a la alta presión osmótica interna, las bacterias Gram positivas no son susceptibles al método. Para llevar a cabo este método a gran escala es necesario emplear grandes volúmenes de agua y la necesidad de un sistema de enfriamiento, y esto genera altos costos, es por esto que el choque osmótico no se ha aplicado a gran escala [61].

1.5.2.ii. Lisis Química. Para promover la rotura celular o la permeabilización celular, se pueden emplear varios solventes químicos, como el alcohol isoamílico, tolueno, amoniaco, benceno, hidróxido de sodio, metanol, hexano, y detergentes como Triton X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS) y N-lauroilsarcosina (sarcosil). Se pueden usar tampones que contengan solventes orgánicos, detergentes y álcalis para promover la liberación de biomoléculas variando el pH de la membrana celular. La elección del producto químico depende del tipo de biomolécula, microorganismo y de la ubicación en la célula microbiana. Esta técnica requiere bajo aporte energético, pero aun así se considera limitada ya que tiene alto riesgo de degradación de los compuestos, principalmente de enzimas y pigmentos [61].

1.5.2.iii. Lisis Enzimática. Las enzimas se pueden utilizar como sustituto de los métodos mecánicos cuando la molécula se ve afectada fácilmente por las fuerzas de presión y velocidad. Realizar la lisis enzimática tiene grandes ventajas, como la alta selectividad, pH y temperatura. Las enzimas que promueven la degradación de la capa de peptidoglicano en bacterias se conocen como hidrolasas de peptidoglicano. Según su especificidad de enlace estas enzimas se pueden clasificar como glicosidasas (lisozimas o muramidasa y glucosaminidasas), endopeptidasas y amidasa. La lisozima es la más conocida y la que mejor está descrita para la alteración de las células bacterianas. Las bacterias gramnegativas generalmente no son susceptibles al tratamiento con lisozima, por lo tanto, se desarrolló una combinación con Triton X-100 o EDTA para expandir el uso de lisozima a bacterias gramnegativas [61].

1.5.2.iv. Termólisis. Este método se basa en la descomposición térmica, en la que el reactivo se descompone en dos o más sustancias nuevas cuando se aplica calor. Este método se puede aplicar a gran escala, principalmente cuando se usa para liberar enzimas [61].

1.6. Biorreactor

Es un aparato o sistema que sirve como medio de cultivo para la producción de sustancias bioquímicamente activas. El proceso que se lleva a cabo dentro del biorreactor puede ser anaerobio o aerobio, lo que se busca con el biorreactor es mantener las condiciones ambientales correctas para llevar a cabo un determinado proceso [62]. Generalmente los biorreactores se clasifican como intermitentes o continuos, esto depende si el proceso se realiza por lotes o de forma continua.

1.6.1. Reactores intermitentes

Un reactor intermitente o Batch, se emplea para operaciones a pequeñas escalas para probar nuevos procesos que aún no se han desarrollado en su totalidad, generalmente se emplean en química fina y para procesos difíciles de convertir en operaciones continuas. Este tipo de reactores permite una conversión alta, que se puede obtener dejando el reactivo en el reactor por periodos prolongados de tiempo, sin embargo, una de sus desventajas es el alto costo de mano de obra por lote, la variabilidad del producto de un lote a otro y la producción a gran escala [63]. Una característica particular de este tipo de reactores es que no tiene flujo de entrada de reactivos ni flujo de salida de productos, por lo tanto, el reactor se carga una vez, la reacción ocurre y finalmente se descarga.

1.6.2. Reactores de flujo continuo

Los reactores de flujo continuo se caracterizan por operar en estado estacionario, lo que significa que las variables no cambian con el tiempo. Se pueden encontrar dos tipos de reactores: Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR) y reactor de flujo tapón (PFR).

1.6.2.i. Reactores continuos de mezcla perfecta. Los reactores CSTR son uno de los tipos de reactores más utilizados en la industria, en especial para reacciones en fase líquida. Generalmente su operación es en estado estacionario y se asume que produce una mezcla perfecta. La temperatura, concentración o la velocidad de reacción son independientes del tiempo o de la posición en este reactor, por lo tanto, la temperatura y concentración dentro de cualquier punto del reactor es la misma, así mismo que en el punto de salida [63]. Sus principales ventajas son un control óptimo de la temperatura, de fácil construcción, bajo costo, fácil de manipular y de limpiar. Su principal desventaja es el tener que realizar varios experimentos en sucesión para poder caracterizar datos de un modelo matemático [62]. En este proyecto se va a emplear un tanque continuamente agitado y la marca es BioFlo/CelliGen 115 es un biorreactor/fermentador versátil, que provee un sistema totalmente equipado en un aparato compacto. Puede ser utilizado para operación batch, alimentación batch o continua, con un control de procesos para el pH, oxígeno disuelto (OD), agitación, temperatura, nivel de espuma [18].

1.6.2.ii. Reactor tubular Los reactores tubulares constan de un tubo cilíndrico, con un flujo de entrada y de salida. El reactor tubular, también conocido como reactor PFR, es muy utilizado en la industria debido a que en él se realizan las reacciones en fase gaseosa [63]. Con los reactores PFR se asume que la corriente de mezcla de la reacción tiene la misma velocidad a través del área de la sección transversal del reactor, es decir no hay variación radial en la velocidad. Así mismo no hay mezcla axial [64].

2. CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA A NIVEL MATRAZ

La tecnología de ADN recombinante ha permitido avances significativos en la ciencia, especialmente en el campo de la salud humana y la biotecnología agrícola, una de las grandes ventajas ha sido la estandarización de la PCR, técnica que permite la amplificación de una secuencia de ADN millones de veces, para ello se utiliza una proteína heteróloga llamada Taq polimerasa. Para la producción de esta proteína recombinante, y en general para cualquier bioproceso, es importante conocer los factores que influyen en la obtención del producto de interés. Por eso, el primer paso es dilucidar los fenómenos que puedan tener lugar a escala laboratorio con el fin de controlar, modificar y mejorar el proceso.

2.1. Metodología para la identificación de las condiciones de operación para la producción de Taq polimerasa a escala matraz

En este capítulo, se describe la metodología para obtener la enzima Taq polimerasa a escala matraz a través de un análisis bibliométrico, dando como resultado un protocolo para la producción de la enzima. Para estandarizar la producción a escala laboratorio se realizó una búsqueda de referentes teóricos en cuanto a la producción de la enzima en diferentes bases de datos, especialmente Scopus, la cual contiene un amplio portafolio de investigaciones en diferentes campos de la ciencia, tecnología, entre otros. Adicionalmente, se consultaron bases de datos como PubMed, siendo un recurso gratuito en investigaciones en biomédica con más de 30 millones de citas [49]. Esencialmente, se seleccionaron los documentos que fueran relevantes para el proceso a través del resumen o del título del artículo o libro, debido a que en estos se encontró similitud con los protocolos empleados en la Corporación Corpogen. Posteriormente, se analizó la información basada en las variables más repetidas de los artículos consultados, infiriendo que estas tienen una mayor relevancia en el proceso, como el tipo de inductor, temperatura, pH, agitación, medio de cultivo, tiempo de inducción y al final se sintetizó toda la información en la Tabla No. 1.

2.2. Resultados y discusión

Tabla No. 1.

Síntesis de datos a nivel matraz

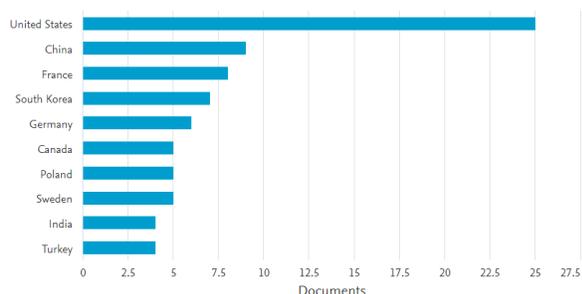
Ref	Volumen de trabajo (L)	Tipo de agitación	Medio de cultivo	Técnica verificación enzima	Método de bioseparación	T (°C)	Inductor
[65]	0,5	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	30	IPTG-0,5 mM-16 horas
[20]	1	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-0,5 mM-18 horas
[66]	1	Matraz-shaker	LB o TB	SDS page	Lisis	37	IPTG-84 mM-18 horas
[67]	0,5	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-1mM
[68]	-	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-1mM
[69]	0,2	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-0.5 mM-Overnight
[70]	0,4	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-0.5 mM-16 horas
[71]	1	Matraz-shaker	TB	SDS page	Lisis	37	IPTG-100 mM
[72]	0,2	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-1mM-18 horas
[73]	0,2	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-0.2 mM-12-16 horas
[17]	0,4	Matraz-shaker	LB	SDS page	Lisis	37	IPTG-0.5 mM-16 horas

Nota. Esta tabla representa los datos recopilados para la producción de Taq polimerasa a escala matraz a través de un análisis bibliográfico.

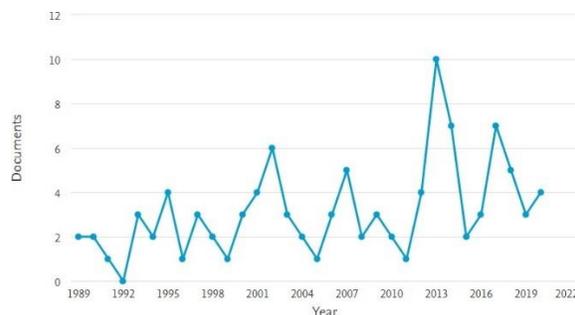
Para realizar un análisis de la información recopilada, se utilizó la herramienta de análisis de datos de Scopus conocida por su capacidad de realizar análisis estadísticos. Con la ayuda de Scopus, se encontraron 101 artículos que tenían relación con el motor de búsqueda escogido para esta investigación, en el cual se emplearon las siguientes palabras: Taq polimerasa, *Escherichia coli*, expresión y purificación. Con el uso de la herramienta de análisis de Scopus se realizaron distintos análisis, teniendo como parámetro comparativo los países en donde hay publicaciones, en la gráfica 2.1 (a) se observa que los países de suramérica están ausentes, pero esto no significa que no existan publicaciones relacionadas al tema, sino que estadísticamente el número de publicaciones realizadas no son significativas respecto a los países mostrados en la gráfica. También se puede observar en el gráfico 2.1 (b) la cantidad de publicaciones por año, a medida que pasan los años se evidencia un mayor interés en investigaciones de este tema y se evidencia que en el 2020 han habido más publicaciones respecto al 2019, 4 y 3 publicaciones, respectivamente. Por último, la gráfica 2.1 (c) muestra los documentos según el área a la que pertenecen, se destaca la presencia de 4 grupos que reúnen la mayor cantidad de documentos, aproximadamente el 80 % de las publicaciones, el área de biología molecular, genética y bioquímica lideran este porcentaje, seguido de inmunología, medicina e ingeniería química. Por lo anterior es claro que aspectos relacionados con la ingeniería del bioproceso de la producción de esta enzima aún no son materia de investigación de forma significativa, siendo una buena oportunidad para que por medio de este estudio se pueda empezar a responder dicha falencia

Figura No. 7.

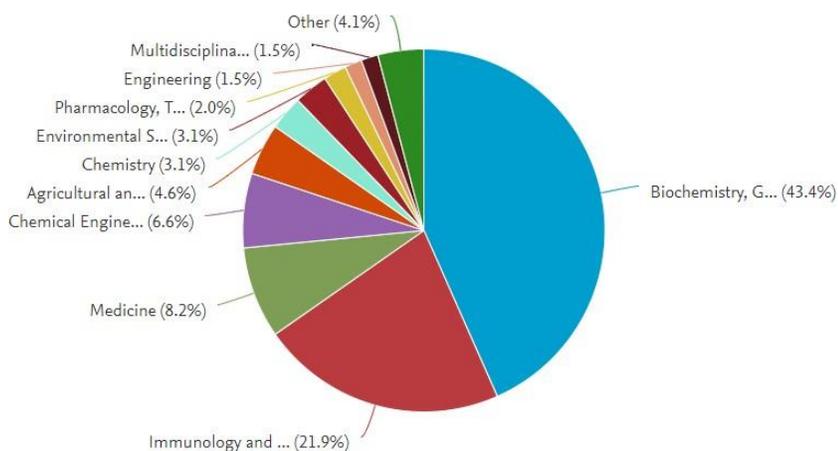
Publicaciones bajo distintas caracterizaciones



(a) Publicaciones por país



(b) Publicaciones por año



(c) Publicaciones por área

Nota. La figura representa los países con mayores publicaciones (a), el número de publicaciones cada año (b) y el porcentaje de publicaciones(c)

Con base en las variables de mayor relevancia mencionadas previamente, una de estas es el medio de cultivo. Siendo fundamental para el desarrollo de la cepa en el bioproceso, el medio seleccionado puede interferir en la actividad enzimática, según [66] el medio Luria Bertani (LB) genera mayor actividad enzimática, que el Caldo Terrific (TB), lo anterior es acorde a lo manifestado por el resto de autores plasmado en la Tabla No. 1, donde se utiliza el medio LB en el proceso. Adicionalmente, este medio tiene un pH que tiende a ser ácido-neutro, ya que se encuentra dentro de un rango de 6.5-7.4. Según los

documentos estudiados se observó que esta variable (pH), no es un factor de modificación, ya que el pH del medio se mantiene constante en este rango, por eso no se observa en la Tabla No. 1.

La temperatura también es catalogada como una variable de importancia, debido a que cada microorganismo maneja una temperatura óptima de crecimiento y emplear otra temperatura puede generar variaciones negativas en el proceso. En los documentos consultados, el autor [65] emplea una temperatura menor (30°C) comparada con la de los demás autores, la cual es de 37°C. Uno de los parámetros afectados por la variación de la temperatura fue el peso molecular de la enzima, determinado por la técnica SDS-PAGE, este peso disminuyó un 10 % respecto al valor teórico de 94 kDA y un 6 % respecto a lo descrito por [67] y [2]. Es por esto que se asume que la temperatura óptima para este proceso es de 37 °C, resaltando el carácter mesófilo de *Escherichia coli*.

Además de las variables analizadas, el tipo de inductor utilizado indica bajo qué promotor se activa el gen. En la Tabla No. 1, se evidencia que en los documentos seleccionados se emplea el inductor IPTG porque trabajan con un plásmido que contiene el operón lac, el cual se activa a través del IPTG. Se resalta la importancia de utilizar el IPTG, debido a que la adición de este inductor genera una mayor expresión de la proteína recombinante comparado con su ausencia en el proceso [74]. Así mismo, el tiempo de inducción se evidencia constante, aunque la concentración varíe como lo muestra [68] y [67] al usar una concentración dos veces mayor que la usada por [69], [20], [65], [2], [70] el tiempo de inducción se mantuvo entre 16 a 18 horas, tal como se evidencia en la Tabla No. 1.

Como se muestra en la Tabla No. 1, la agitación también se incluye como una variable significativa, porque gracias a esta se genera una mezcla homogénea y permite el crecimiento celular [20]. De igual manera, los documentos expuestos en la Tabla No. 1 emplean una incubadora con agitación, la cual tiene la capacidad de agitar y mezclar, y así mantener las condiciones óptimas para incubar microorganismos [75]. Esto quiere decir que los autores utilizaron agitación mecánica en los ensayos de laboratorio

Al analizar los documentos seleccionados se pudieron estudiar las variables más relevantes para el proceso, seleccionadas por ser repetidas en todos los artículos consultados que se muestran en la Tabla No. 1, de esta manera se pudo comparar con

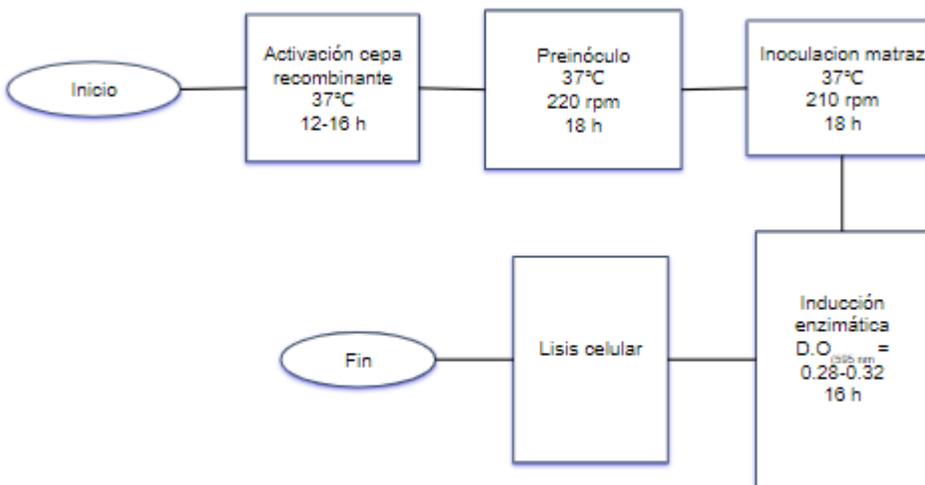
el protocolo suministrado por Corpogen para la producción de Taq polimerasa. Es importante enunciar la similitud entre las variables del protocolo y las variables de la tabla, por lo cual a continuación se expone el protocolo empleado por Corpogen, en donde se evidencia la relación con los diferentes autores.

2.2.1. Producción de Taq polimerasa a escala matraz

En la Figura No. 8, se plasma el diagrama de bloques del proceso para la producción de Taq polimerasa a escala matraz. En los numerales siguientes se describe cada etapa del proceso con las respectivas variables del proceso y los reactivos empleados en cada etapa.

Figura No. 8.

Diagrama de bloques del proceso en matraz



Nota. La figura representa el diagrama de bloques del proceso.

Fuente: Propia.

2.2.2. Cepa bacteriana y plásmido

La bacteria *Escherichia coli* ha sido ampliamente conocida por su facilidad para ser usada en bioprocesos. Sus características la hacen atractiva para ser usada en la tecnología del ADN recombinante, tales como la temperatura de crecimiento, 37°C,

requerimientos nutricionales no complejos y ser un organismo anaerobio facultativo. La función de *E.coli* es expresar de manera sencilla y segura la enzima Taq polimerasa que proviene originalmente de una bacteria *Thermus aquaticus*. Para esta investigación se va a utilizar la cepa DH5 α de *E.coli* que posee un plásmido con el gen de la ADN polimerasa Taq bajo el control del promotor lac [17]

2.2.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la producción de la Taq Polimerasa es el LB, este medio es uno de los más utilizados para el crecimiento de bacterias pertenecientes al grupo Enterobacteriaceae, grupo al que pertenece *E.coli*. Principalmente, este medio de cultivo provee todos los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento celular, ya que está compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de cloruro de sodio [76]. Al medio de cultivo, se le adiciónó ampicilina para asegurar el crecimiento de las células que contenían el elemento genético específico (plásmido) [20]

2.2.4. Condiciones de crecimiento

Según la revisión bibliográfica realizada y recopilada en la Tabla No. 1, los autores enuncian que la temperatura óptima para el crecimiento de la bacteria es de 37 °C, por ser una bacteria mesófila. Por otro lado, los mismos autores de la Tabla No. 1 mencionan que el pH óptimo para el crecimiento celular es de 7, porque generalmente el medio de cultivo provee un pH ácido a neutro, entre 6.8 a 7.2 [76], para un mejor desarrollo de las bacterias.

2.2.5. Acondicionamiento de la bacteria

Según [20], [17], la bacteria se debe mantener congelada a -80°C en glicerol, para evitar que pierda sus propiedades. Mediante revisión bibliográfica, se determinó que es necesario acondicionar la bacteria para promover el crecimiento exponencial, por tanto, se sembró *E.coli*, en una placa LB-ampicilina agar y se incubó a 37°C durante 12 a 16 horas.

2.2.6. Preparación del inóculo líquido

Después del acondicionamiento de la bacteria, se empezó a preparar el inóculo líquido, donde se utilizaron dos tubos de ensayo, los cuales tendrán 2 ml del medio de cultivo LB- Ampicilina en cada tubo. Luego, se inocularon con una colonia obtenida de acuerdo al numeral anterior. Posteriormente, se incubaron a 37°C a 220 rpm aproximadamente durante 18 horas [17].

2.2.7. Inducción de la enzima

Previo a la inducción de la enzima, se emplearon Erlenmeyers de 1000 mL, con un volumen efectivo de trabajo de 200 mL de caldo LB-Ampicilina, luego, se inocularon con 200 uL de la suspensión celular del paso inmediatamente anterior (numeral 2.4) y se llevaron a incubación a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm entre 0.28-0.32, generalmente se alcanzó entre 4 o 5 horas iniciada la incubación. Posterior a alcanzar el rango de la OD, se procedió a realizar la inducción de la enzima, utilizando el inductor IPTG, agregando 0.5 mM a cada erlenmeyer e incubando a 37 °C agitando a 210 rpm durante 16 horas. [17]

2.2.8. Lisis celular

Al finalizar las 16 horas de inducción se dividieron los cultivos en tubos falcon de 50 mL, posteriormente se centrifugó a 5.000 g a 4 °C, durante 15 min y se desechó el sobrenadante por inversión. En condiciones de esterilidad se mezcló el Tampón A, el cual generalmente se compone de 50 mM Tris-HCl, 50 mM de dextrosa y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [69], [66], [73]; y la lisozima en un tubo falcon. Los precipitados se agitaron con vortex fuerte antes de seguir con la digestión, a continuación, se resuspendió uno de los precipitados con la mezcla de Tampón A y Lisozima, posteriormente, se transfirieron las células resuspendidas a otro tubo falcon y se continuó hasta resuspender todos los precipitados. Se incubó a 37 °C por 30 minutos, al finalizar este tiempo se dividió el digerido de lisozima en dos tubos falcon en partes iguales, se añadió a cada tubo tampón de lisis compuesto por 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton x-100 [69]; más fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por su nombre en inglés) y se agito fuertemente con vortex durante dos o tres minutos, después

de agitar se llevó a incubación en un baño de agua durante 1 hora a 75 °C con agitación manual. Se transfirió el lisado a los tubos de centrifuga y se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 8.000 g. Por último, se pasó por inversión el sobrenadante a un tubo falcon y se guardó el lisado en refrigeración.

Teniendo en cuenta el protocolo anteriormente descrito, el cual es hasta el momento el implementado por Corpogen a escala matraz, se identificaron las variables de mayor relevancia en el proceso. Posteriormente en el capítulo 2, se realizó un análisis bibliométrico, en donde se evaluaron las variables temperatura, pH, agitación y flujo de aire, para determinar cuáles podrían ser los parámetros más influyentes al momento de realizar la producción en un biorreactor según su similitud o diferencia frente a lo estipulado en este capítulo.

3. SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN UN BIORREACTOR DE AGITACIÓN CONTINUA PARA LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA

Para la obtención de un producto de interés, como lo son las proteínas recombinantes, generalmente se realizan una serie de pasos para lograr una producción más eficiente y efectiva. Como primer paso se estableció la producción a una escala matraz, descrito en el primer capítulo, y posterior a ello surge la necesidad de escalar este bioproceso a escala biorreactor, para este fin se investigan los parámetros más relevantes en la producción de proteínas recombinantes en un biorreactor y se seleccionaron los dos más influyentes.

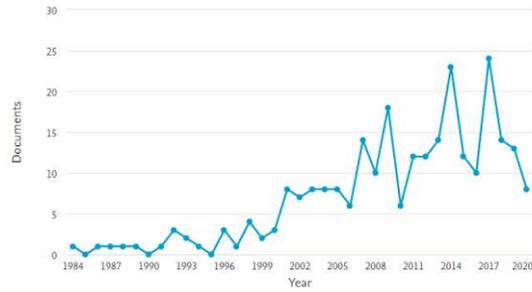
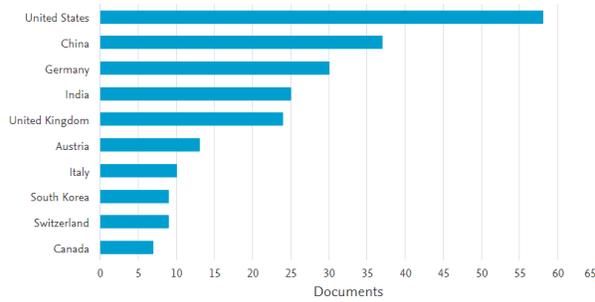
3.1. Metodología

La búsqueda de los parámetros se realizó con las mismas bases de datos utilizadas en el primer capítulo, Scopus y PubMed, sin embargo, el motor de búsqueda implementado fue diferente con las siguientes palabras empleadas: Scale up, *Escherichia coli* y recombinant protein. El total de la información recolectada se analizó bajo la misma herramienta de análisis de datos de Scopus, con un total de 260 documentos. De los 260 documentos, se seleccionaron los de mayor interés para la investigación, generalmente, enfocados en la producción de una proteína recombinante empleando como hospedero a *Escherichia coli*. Los artículos seleccionados describen los parámetros significativos para realizar el proceso a una escala mayor (biorreactor), generalmente realizaron escalados entre matraz a biorreactor o entre biorreactores. Al igual que en el desarrollo del primer objetivo, se realizó una tabla con los parámetros encontrados en los documentos para desarrollar un análisis posterior de cada parámetro.

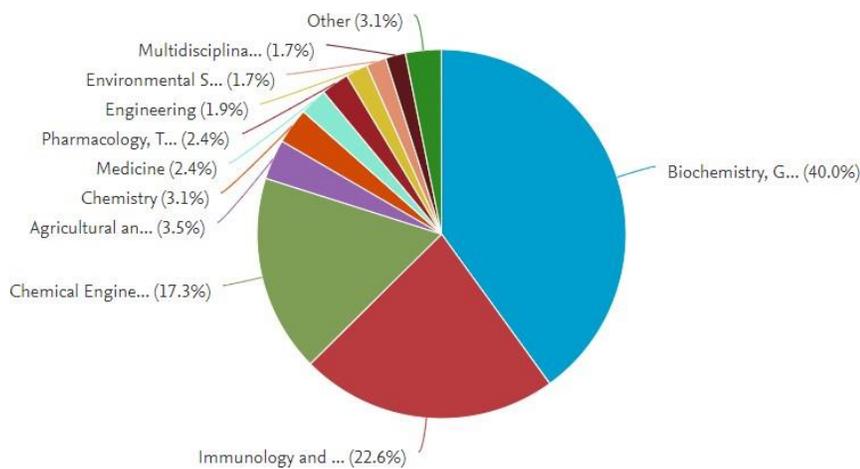
3.2. Resultados y discusión

Figura No. 9.

Publicaciones bajo distintas caracterizaciones



(a) Publicaciones por país (b) Publicaciones por año



(c) Publicaciones por área

Nota. La figura representa los países con mayores publicaciones (a), el número de publicaciones cada año (b) y el porcentaje de publicaciones(c)

Al hacer el análisis de los 260 documentos, se observa un cambio en los documentos por área, ver Figura No. 9 (c), donde el área de ingeniería química adquiere mayor relevancia con un 17,3 % de participación comparado con el 6,6 % de la Figura No. 7 (c) del capítulo II, este aumento se debe a la implementación de biorreactores en los procesos de obtención de proteínas heterologas. En la Figura No. 9 (a) se sigue evidenciando la ausencia de países latinoamericanos, al igual que en la Figura No. 7 (a) del capítulo II, estadísticamente las publicaciones realizadas por los países de sur américa no son significativas respecto a las publicadas por los países presentes en la gráfica. Esta similitud refleja la oportunidad de empezar a desarrollar investigaciones

relacionadas con el escalonamiento de proteínas recombinantes en países latinoamericanos como Colombia.

Existen diferentes parámetros que se pueden controlar y modificar con el uso de un biorreactor, siendo este su principal objetivo. Sin embargo, la selección de los parámetros de mayor importancia se debe principalmente al producto de interés y sus condiciones de crecimiento [77]. Dentro de los parámetros a controlar, se puede encontrar la temperatura, la agitación, el oxígeno disuelto y el pH, debido a que son parámetros que generalmente se miden en un biorreactor para la producción de proteínas recombinantes. En la Tabla No. 2, se muestran los documentos seleccionados con los diferentes parámetros de interés, es importante resaltar que cada documento se desglosa entre el nivel matraz o biorreactor, considerada la escala menor, y el nivel biorreactor, considerada la escala mayor. Cuando el escalamiento es entre biorreactores el volumen efectivo empleado aumenta considerablemente, esto con el fin de poder entender de manera más clara si existía o no una variación en el parámetro descrito.

Tabla No. 2.

Síntesis de datos a nivel biorreactor

Ref	Volumen efectivo (L)	Volumen del reactor (L)	Oxígeno disuelto (vvm)	Tiempo de incubación (horas)	Tiempo de agitación	pH	T (°C)	Rendimiento
[78]	1,5	2,5	1	10	700 rpm Turbina	7	37	0.028 g P/g S
	50	70	1	10	320 rpm Turbina	7	37	0.054 g P/g S
[79]	1,5	N/A	1	12	350 rpm Turbina	7	37	0.042 g P/g S
	50	N/A	1	12	205 rpm Turbina	7	37	0.052 g P/g S
[8]	0,05	0,250	Matraz agitado	12 – 16	150 rpm Matraz agitado	7	30	-
	0,750	1	0,7	12 - 16	260 rpm Turbina rushton	7	30	-

Tabla No. 2. Continuación

[9]	0,5	0,250	Matraz agitado	60	150 rpm Matraz agitado	7,2	30	-
	0,950	1,5	0,5	60	300 rpm Turbina rushton	7,2	30	-
[80]	2	3,6	1	16	-	7	37	0,098 g P/g S
	40	100	1	16	-	6,5	37	0,224 g P/g S
	500	1200	1	16	-	7	37	0,132 g P/g S
[10]	0,05	0,5	Matraz agitado	18	250 rpm Matraz agitado	7,2	37	-
	0,1	6	1	18	250 rpm Turbina	7,2	37	-
[81]	0,01	N/A	1	6	3000 rpm Turbinas Rushton	7	30	-
	1	1,5	1,5	6	12000 rpm Turbinas Rushton	7	30	-
[82]	2	3	1	100	900 rpm Turbinas Rushton	5,5	30	0,6 g P/g S
	10	14	1	100	500-1000 rpm Turbinas Rushton	5,5	30	-
	30	42	1	100	500-1000 rpm Turbinas Rushton	5,5	30	-
[11]	0,2	N/A	Matraz agitado	22	200 rpm Matraz agitado	7	25	1 u/ml-6ml 20 ml de cultivo
	1,5	N/A	2	7	200 rpm Matraz agitado	7	37	5,81 u/ml- 450ml-1,5L

Tabla No. 2. Continuación

[12]	0,05	0,250	Matraz agitado	12	250 rpm Matraz agitado	7	37	0,041 P41/glucosa
	5	7	1	12	350 rpm Turbina	7	37	0,064 P41/glucosa
[13]	N/A	N/A	Matraz agitado	12	250 rpm Matraz agitado	7	37	35 mg/L*h
	50	N/A	1	12	350 rpm Turbina	7	37	34 mg/L*h
[14]	0,2	1	Matraz agitado	10	180 rpm Matraz agitado	7	37	-
	1,5	2,5	1	10	600 rpm Turbina	7	37	-
[83]	1	2	1	18	Turbina	7	37	22 g PT/L
	8	13	1	18	Turbina	7	37	19 g PT/L
[15]	N/A	N/A	Matraz agitado	48	-	7,2	37	-
	1,5	3	1	48	500 rpm Turbina	7	37	-
[16]	N/A	N/A	Matraz agitado	48	180 rpm Matraz agitado	6	25	-
	0,7	N/A	2	48	180 rpm Turbina	5	25	-
[84]	3,6	N/A	1	18	130 rpm Turbina	7	37	-
	10	20	1	18	180 rpm Turbina	7	37	-
[85]	2,5	N/A	1	18	250 rpm Turbina	6	25	0,76 g/L
	2,7	N/A	1	18	1000 rpm Turbina	6	30	0,93 g/L

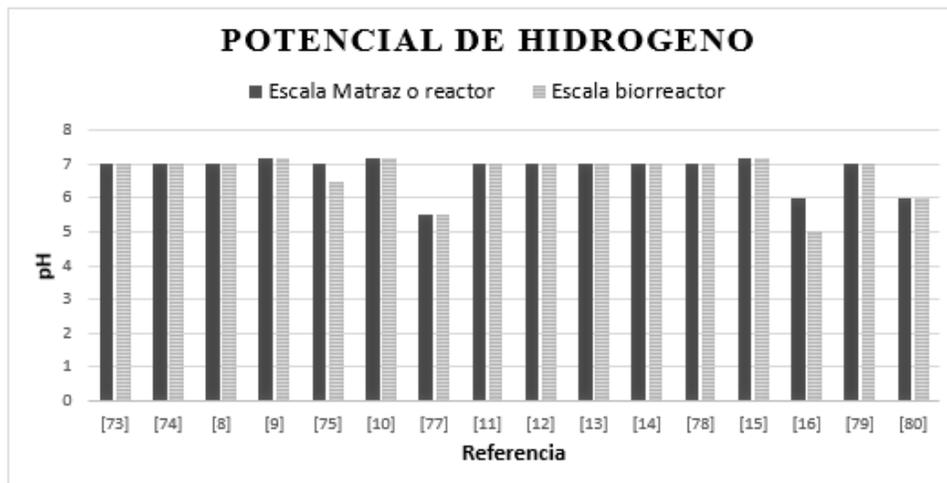
Es importante mencionar que, dentro del total de investigaciones consultadas para este estudio, en donde emplearon como organismo huésped E coli para la producción de proteínas recombinantes; el rango de volumen efectivo utilizado es desde 0.1 L hasta 500 L, el 46,16 %, emplearon un volumen entre 0.1-5 L, el 30.76 % entre 10-50 L, el

15.38 % entre 5-10 L y el 7.69 % mayor a 50 L. Conforme a lo desarrollado por los diferentes autores de la Tabla No. 2 las proteínas recombinantes producidas en estos estudios no corresponden específicamente a Taq polimerasa, ya que hay carencia de información respecto a la producción de esta proteína en un biorreactor y a una escala mayor a un matraz. Debido a lo expuesto anteriormente, es claro que existe una necesidad de potenciar la investigación dirigida a la producción de la proteína recombinante Taq polimerasa en biorreactores a escalas superiores a 5 L, es por esto que este proyecto pretende empezar a responder dicha carencia aportando una primera noción respecto a la producción de esta enzima en un biorreactor de 1 L.

Uno de los parámetros que no sufre una variación considerable entre escalas es el pH, siendo comúnmente medido en los procesos, es de vital atención mantener un ambiente óptimo para el microorganismo que se va a desarrollar, de no ser así, se podrían ocasionar reacciones indeseadas [86]. Como se muestra en la Figura No. 10, el pH se mantiene constante porque el medio de cultivo utilizado en ambas escalas es el mismo, generalmente, el hospedero utilizado son bacterias, las cuales crecen en un pH neutro. Para lograr mantener este pH, se puede adicionar una sustancia básica o ácida para establecer un rango neutro en el proceso. Una de las ventajas de desarrollar el proceso en un biorreactor, es la capacidad de mantener un parámetro en un valor fijo, esto se logra gracias a un control PID (controlador proporcional, integral y derivativo), el cual permite calcular la diferencia entre el valor actual y el valor fijado y realizar la corrección del valor en el menor tiempo posible. Para lograr medir y controlar el pH se utiliza un transductor, como el electrodo de vidrio, que permite ofrecer una señal eléctrica a partir de una señal física, como lo es el pH. La esencia del electrodo de vidrio, es medir la diferencia entre un tampón estándar, el cual ofrece los valores de pH estándar a través de disoluciones con pH conocido [86].

Figura No. 10.

Comparación del Potencial de Hidrógeno



Nota. La figura representa el potencial de hidrógeno a escala menor (matraz o biorreactor) y a escala mayor (biorreactor) medido con un pHmetro. Fuente: Propia

Así mismo, la temperatura al igual que el pH, también es un parámetro que se mantiene constante o su variación no es muy significativa sin importar el cambio de escala. Tal como se muestra en la Figura No. 12 el 68.75 % de los documentos de la Tabla No. 2 utilizan una temperatura de 37 °C, debido a que el vector de clonación utilizado en los documentos posee la característica de ser un organismo mesófilo. Según el manual de operación para el reactor que se va a emplear en este proyecto identificado como Sistema BioFlo/CelliGen 115 (Figura No. 11), el cual fue proporcionado por Corpogen, este posee un rango de temperatura desde 20 °C hasta 70 °C como temperatura máxima, la cual es medida con un sensor RTD (Sensores de Temperatura Resistiva) en platino, y es controlada por el software de control de procesos enviando información a una manta calefactora y un serpentín de enfriamiento o a una camisa de agua [87].

Figura No. 11.

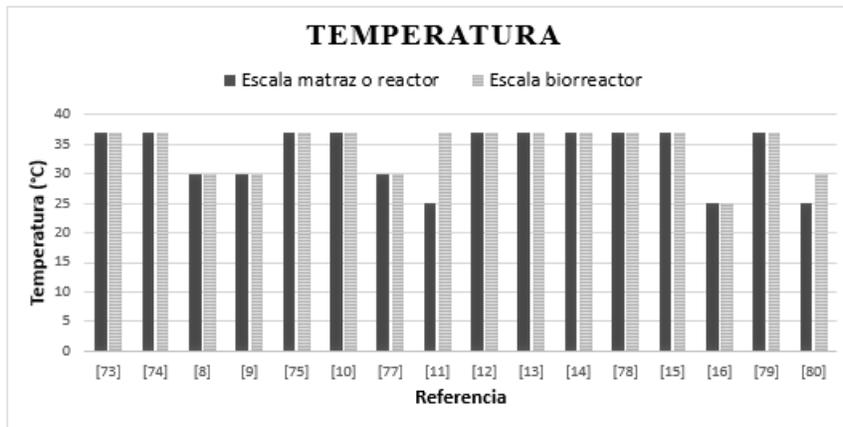
Reactor BioFlo/CelliGen 115



Nota. La figura representa el biorreactor empleado en este proyecto identificado como Bio- Flo/CelliGen 115. Tomado de: D. Totaro *et al.* Microscale perfusion-based cultivation for pichia pastoris clone screening enables accelerated and optimized recombinant protein production processes. *Biotechnology Journal*, n/a:2000215, 2020. doi: 10.1002/biot.202000215; 02.

Figura No. 12.

Comparación de la Temperatura

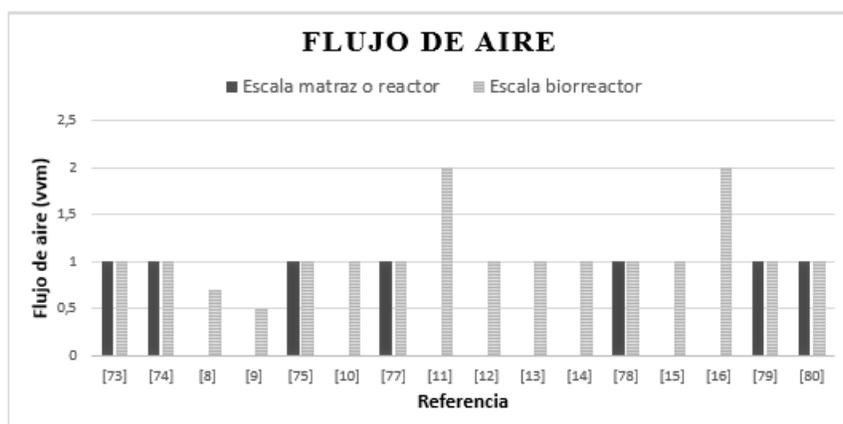


Nota. La figura representa la temperatura a escala menor (matraz o biorreactor) y a escala mayor (biorreactor) medido con un sensor de temperatura. Fuente: Propia

A diferencia de los parámetros analizados anteriormente, el flujo de aire (Figura No. 13) y la agitación (Figura No. 14) son parámetros que suelen variar de manera importante entre las dos escalas, uno de los principales motivos es la imposibilidad de medir y controlar estos dos parámetros a escala matraz. Como se muestra en la tabla No. 2, los autores [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] al emplear un matraz muestran un mayor cambio, principalmente en el flujo de aire, comparado con [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] los cuales emplearon un biorreactor tanto para la escala menor como para la escala mayor. La imposibilidad de poseer los valores de agitación y flujo de aire a nivel matraz, permite entender la necesidad de utilizar biorreactores, además, su implementación permite disminuir los costos de un bioproceso, esto se plasma en su diseño para maximizar la transferencia de oxígeno, satisfaciendo la demanda de oxígeno del microorganismo [88]. Como se evidencia en la Figura No. 13, la mayoría de autores no reportan valores del flujo de aire a escala matraz, esto permite identificar una de las ventajas al emplear biorreactores en los procesos y es el control del oxígeno disuelto en el medio durante todo el lote de producción.

Figura No. 13.

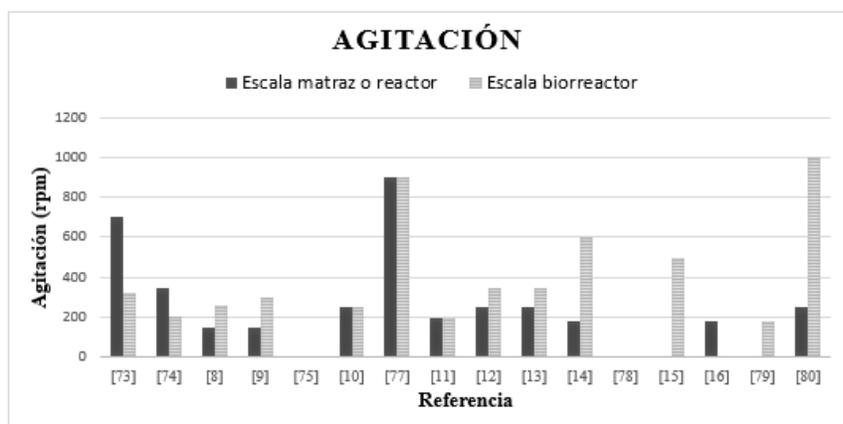
Comparación del Flujo de Aire



Nota. La figura representa el flujo de aire a escala menor (matraz o biorreactor) y a escala mayor (biorreactor) medido con un sensor de oxígeno disuelto. Fuente: Propia.

Figura No. 14.

Comparación de la agitación



Nota. La figura representa la agitación a escala menor (matraz o biorreactor) y a escala mayor (biorreactor). Fuente: Propia.

El oxígeno tiene baja solubilidad en el agua, debido a que no reacciona químicamente con la misma. La solubilidad puede llegar a depender también de la temperatura, a mayor

temperatura menor solubilidad [89]. La baja solubilidad crea una limitante a la hora de diseñar el bioproceso, por eso surge la necesidad de inyectar oxígeno puro o en forma de aire al biorreactor. Esta transferencia se logra con dispositivos sumergidos, formando pequeñas burbujas, entre más pequeñas sean las burbujas se crea una mayor área de contacto y por ende la difusión del oxígeno en el medio de cultivo será más eficiente [90]. Por lo tanto, se ha demostrado que el oxígeno disuelto recibe particular atención, principalmente debido a que la ausencia de éste podría generar fermentación alcohólica o ácida en la bacteria [77]. Generalmente, la tasa de oxígeno disuelto por encima del 20 %, con respecto a la saturación del aire, no limita el crecimiento. Es importante destacar que los efectos de la privación o sobre exposición de oxígeno pueden influir en el crecimiento celular, la inestabilidad del plásmido y el rendimiento de la proteína recombinante [77]. La inyección de oxígeno en el biorreactor empleado en este proyecto, se logró mediante un difusor en anillo, el oxígeno viene directamente del aire y se controla manualmente a través de rotámetros o automáticamente a través de un controlador de flujo másico térmico (TMFC), y se regula según los valores establecidos a través de la pantalla táctil de la estación del control [87].

Conforme a lo mencionado por [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [16] la agitación puede ser medida a escala matraz, sin embargo, se evidenció la ausencia de este valor en el documento del autor [15] que no menciona el valor de agitación empleado en el matraz, como se muestra en la Tabla No. 2. Esta discrepancia muestra la necesidad de realizar el proceso en un biorreactor para poder medir y controlar el nivel de agitación en el medio todo el tiempo, esto permite aumentar el área de transferencia de oxígeno por la formación de pequeñas burbujas y a su vez incrementar la tasa de transferencia de nutrientes del medio a las células [91]. En la Figura No. 14 se plasma los diferentes valores de agitación utilizados en los documentos analizados.

El biorreactor de este proyecto, posee turbinas tipo Rushton para los sistemas de fermentación (células vegetales) y para el cultivo de células animales turbinas tipo Pitched blade. Sin embargo, solo se usaron las turbinas tipo Rushton porque las bacterias se catalogan como células vegetales. [87].

De acuerdo con la información bibliográfica consultada, los procesos para la producción de proteínas recombinantes bajo la acción de *Escherichia coli*, se realizan en ambientes neutros y una temperatura similar a la del cuerpo humano. Adicionalmente, se ha estudiado que la agitación y la aireación tienden a variar según la escala del bioproceso. Según lo descrito anteriormente, la agitación y flujo de aire son los parámetros de operación más relevantes, y por lo tanto escogidos para llevar a cabo la producción de Taq polimerasa en un biorreactor de agitación continua de manera efectiva. Sin embargo, cabe resaltar la importancia de medir y controlar la temperatura y el pH en el proceso porque son parámetros que afectan la producción celular.

Para este proyecto se realizó el proceso manteniendo constante el flujo de aire y modificando la agitación. Con base en diferentes referentes bibliográficos, la agitación tiene mayor influencia entre el cambio de escalas de matraz a reactor [78] [79] [92], además, un exceso en la velocidad del impulsor puede generar estrés hidrodinámico a la célula pudiendo provocar su muerte [93] porque la membrana celular se somete a fuerzas de cizallamiento mayores a lo que puede soportar una bacteria [94].

Es por esto, que en el siguiente capítulo se exponen los valores de agitación que se establecieron en el diseño de experimentos para la producción de Taq polimerasa en un biorreactor y el valor de flujo de aire escogido, soportados en diferentes fuentes bibliográficas.

4. EFECTO DE LA AGITACIÓN Y FLUJO DE AIRE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TAQ POLIMERASA EN UN BIORREACTOR DE 1 L.

Una de las etapas fundamentales en un bioproceso es el diseño experimental, el cual permite identificar la influencia de los parámetros de operación y determinar cuál combinación genera la mayor concentración de proteína en el proceso. Para esto, se estableció un diseño experimental de un factor con dos niveles, cada nivel con dos replicas, donde previamente se seleccionó el parámetro más influyente en el capítulo III, siendo este la agitación. Se observó que a escala biorreactor a 350 rpm se generó mayor concentración de Taq polimerasa durante el proceso.

En el presente capítulo se expone el protocolo de producción de Taq polimerasa en el biorreactor, así como las diferentes técnicas moleculares cualitativas y cuantitativas para determinar la concentración de proteína de interés.

Como se vio en el capítulo III, existen diferentes parámetros que pueden llegar a incidir en la expresión de la proteína Taq polimerasa, tales como pH, temperatura, agitación y flujo de aire. Conforme al análisis bibliográfico la agitación es uno de los factores de mayor relevancia al realizar un cambio de escala entre matraz y biorreactor. Para la realización del diseño experimental se escogió el factor que más variaba entre la escala matraz y la escala biorreactor. Aunque en esta investigación no se utilizó un criterio de escalado, sino un escalamiento empírico, basado en la información suministrada por diferentes autores que realizaron el escalamiento de proteínas recombinantes a escala biorreactor, existen diferentes criterios de escalado, algunos son el número de Reynolds, velocidad constante de la punta del impulsor (n di constante), consumo de energía constante por unidad de volumen de líquido (constante P / V) y coeficientes de transferencia de oxígeno volumétrico constante (constante KLa / k). La elección de un parámetro de escalado permite generar mejores rendimientos o disminuir el tiempo de producción [78].

Para determinar los niveles de agitación utilizados en el diseño de experimentos, se tuvieron en cuenta los siguientes autores [10] [11] [12] [13] [14] y [15], en donde el 66 %

emplean el medio de cultivo LB y el 100 % utilizan como organismo huésped E.coli. El rango de agitación en las publicaciones varía entre 180 rpm a 600 rpm, teniendo en cuenta que estos autores manejan la producción de diferentes proteínas recombinantes y el escalamiento fue de matraz a biorreactor, de esta forma, existe entre ellos una similitud a la hora de modificar la agitación a escala biorreactor y es la tendencia a aumentar este parámetro frente a la escala matraz. El aumento generado en el biorreactor se debe a que el oxígeno en el medio es mayor que el oxígeno empleado en un matraz, lo que provoca mayores niveles de agitación para poder transferir todo el oxígeno a las células de manera homogénea. La variación de la agitación puede conllevar a un aumento en la tasa de cizallamiento, lo que genera un posible daño celular y una disminución en la producción de la proteína recombinante [94].

Adicionalmente, el flujo de aire se fijó en 1 vvm, esto debido a que el 83 % de los autores utilizan este valor en sus investigaciones y reflejan buenos resultados de producción. Para el diseño de experimentos desarrollado en este trabajo, se estableció un diseño de un factor con dos niveles, los niveles estipulados fueron de 220 rpm y 350 rpm, debido a que la agitación empleada en el protocolo de producción de Taq polimerasa en matraz de Corpogen es de 210 rpm, y como se mencionó anteriormente la agitación suele ser mayor a escala biorreactor.

En relación con el protocolo de producción de Taq polimerasa a escala matraz expuesto en el Capítulo II, en este capítulo se describe el protocolo de producción para esta enzima a escala biorreactor, existen similitudes entre ambos protocolos como lo es la activación de la cepa recombinante, la preparación del preinóculo, los tiempos de incubación y la extracción de la enzima. A continuación, se presenta el protocolo desarrollado en esta investigación a escala biorreactor.

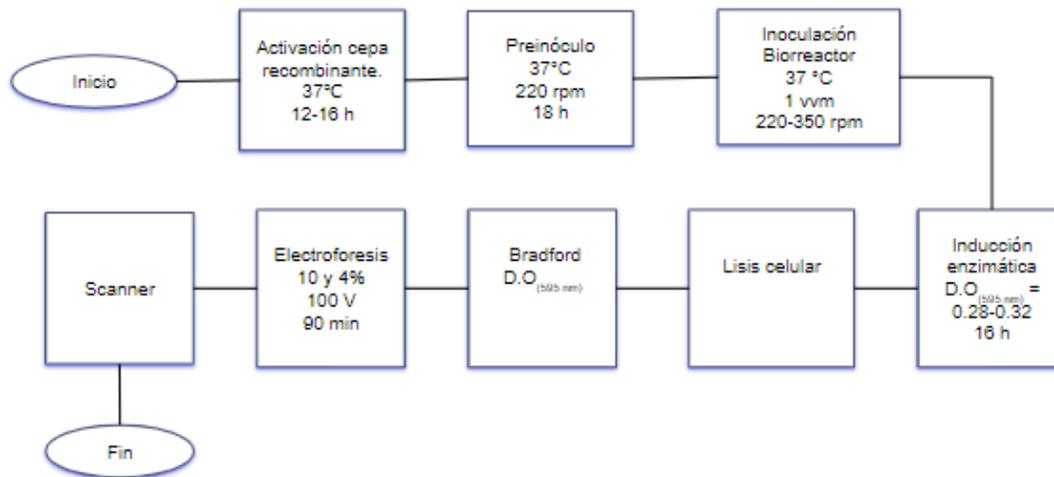
4.1. Metodología para la producción de la enzima Taq polimerasa a escala biorreactor

La metodología para la producción de Taq polimerasa a escala biorreactor se plasma en la Figura No. 15, correspondiente al diagrama de bloques del proceso. En los siguientes numerales se describe el procedimiento con las respectivas variables de operación,

como el pH, temperatura, agitación, tiempos de incubación y los reactivos empleados en cada sección.

Figura No. 15.

Diagrama de bloques del proceso en biorreactor



Nota. La figura representa el diagrama de bloques del proceso. Fuente: Propia.

4.1.1. Activación de la cepa recombinante

Figura No. 16.

Activación de la cepa recombinante



Nota. La figura representa la activación de la cepa recombinante en caja petri. Fuente: Propia.

La cepa recombinante utilizada para la expresión y purificación de Taq polimerasa es E.coli DH5 α , la cual posee un plásmido con el gen de Taq bajo el promotor lac. Para la activación de la cepa, se debe sembrar mediante aislamiento la bacteria que contiene el plásmido, en una caja petri (Figura No. 16) que contiene LB-agar suplementado con ampicilina 100 ug/mL a partir de un stock congelado. Luego, se procede a incubar durante 12 a 16 horas a 37°C

4.1.2. Preparación del preinóculo

Después de la activación de la bacteria, se preparó el preinóculo tomando una colonia aislada del numeral 4.1.1., en 3 tubos falcon (Figura No. 17) de 15 ml, con 4 ml de LB y 4uL de ampicilina. Un último tubo falcon se utilizó como control negativo, es decir, no posee colonias de la siembra realizada en el numeral 4.1.1. Los 4 tubos falcon fueron incubados a 37°C, 220 rpm durante toda la noche. Al día siguiente de la incubación, se midió la densidad óptica (DO) de cada uno de los tubos para determinar cuál poseía la DO más alta para ser utilizado como preinóculo. Todos los montajes fueron inoculados con 400 uL de cultivo previamente crecido a las condiciones previamente descritas.

Figura No. 17.

Preinóculo



Nota. La figura representa el preinóculo realizado en tubos falcon. Fuente: Propia.

4.1.3. Producción de Taq polimerasa en biorreactor

En el biorreactor (Figura No. 18) se trabajaron con 400 mL de caldo LB, como volumen efectivo de trabajo, posteriormente se añadieron 250 uL de antiespumante y se esterilizó a 121°C, 15 psi durante 20 min. Finalizado el proceso de esterilización, y en cuanto la temperatura se encuentra a 37 °C se agregan 400 uL de ampicilina y se realiza el proceso de inoculación conforme al numeral 4.1.2. Luego de esto, se configuraron las condiciones de operación del biorreactor, siendo estas:

- Aireación: 1 vvm
- Temperatura: 37°C
- pH inicial: 6,5
- Agitación: 220 rpm y 350 rpm

Durante las primeras nueve horas, se monitoreo la densidad óptica (DO) del cultivo a 595 nm, en intervalos de una hora hasta obtener una DO entre 0.28-0.32. Dadas estas

condiciones se realizó el proceso de inducción, agregando 4 ml de IPTG al medio y dejando en incubación durante 16 horas. La variación del pH fue monitoreada pero no controlada, a lo largo de la operación los valores estuvieron entre 6 a 8.

Figura No. 18.

Biorreactor inoculado



Nota. La figura representa el biorreactor empleado en el proyecto.

Fuente: Propia.

4.1.4. Extracción de Taq polimerasa

Finalizado el proceso de producción de Taq polimerasa en el biorreactor se procede a recuperar el contenido del mismo bajo condiciones asépticas en tubos falcon de 50 ml. Para la extracción de la proteína es necesario realizar la lisis celular, lo cual inicia con la centrifugación de los tubos falcon a 4500 rpm, durante 15 min a 4°C. Posteriormente se

desechó el sobrenadante por inversión y se resuspendieron los precipitados con la mezcla de 27,5 ml de tampón A + 2,5 ml de lisozima, por agitación con vortex fuerte, para ser llevados a incubación a 37°C por 30 minutos. Obtenido el digerido, este fue dividido en tubos falcon de 50 ml a los cuales les fue añadido 15 ml de volumen final de tampón de lisis con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se agitó en vortex fuerte por 3 minutos. Luego, se incubó en un baño de agua a 75°C, durante 1 hora agitando manualmente. Finalmente, se transfirió el lisado (Figura No. 19) a tubos de centrifuga y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y se pasó el sobrenadante por inversión a tubos falcon de 50 ml nuevos, este lisado se refrigeró a 4°C.

Figura No. 19.

Muestra Lisada



Nota. La figura representa una muestra lisada producida en el biorreactor. Fuente: Propia.

4.1.5. Densidad óptica

Para determinar el crecimiento microbiano, se toma una muestra del caldo de fermentación y se mide la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro (Figura No. 20) a 595 nm. La medición de la absorbancia se realizó por duplicado cada hora desde el inicio de la fermentación hasta 9 horas después, para cada réplica de cada nivel. En la curva de crecimiento bacteriano se graficaron los promedios de cada duplicado frente al tiempo.

Figura No. 20.

Espectrofotómetro Tecan



Nota. La figura representa el equipo implementado para la medición de densidad óptica en todo el proceso. Fuente: Propia.

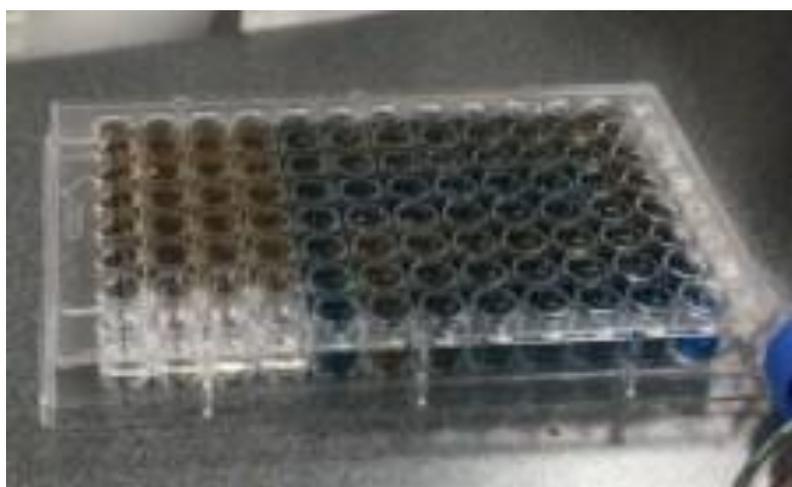
Durante el crecimiento exponencial todos los componentes celulares aumentan en proporción al aumento del número de células. Uno de estos componentes es la propia masa celular, las células dispersan la luz y un método práctico y rápido de estimación de la masa celular es la medición de la turbidez. Una suspensión de células tiene un aspecto nebuloso turbio a la vista porque las células dispersan la luz que pasa a través de la suspensión, cuantas más células hay, más se dispersa la luz y más turbia es la suspensión, como la masa celular es proporcional al número de células, se puede usar la turbidez para estimarlo y es una técnica muy utilizada en microbiología [53]

4.1.6. Cuantificación del contenido de proteína

Para su realización es necesario establecer una curva patrón con una proteína de concentración conocida, en este proyecto se utilizó Gammaglobulina a una concentración de 640 ug/ml, se realizaron diluciones con tampón A en base 2 para tener una curva que va desde 320 ug/ml a 2,5 ug/ml en una placa de 96 pozos (Figura No. 21).

Figura No. 21.

Placa de 96 pozos con las respectivas diluciones



Nota. La figura representa la placa de 96 pozos implementada para la medición de densidad óptica con sus respectivas diluciones. Fuente: Propia.

Así mismo, para las muestras iniciales, las cuales fueron obtenidas antes de realizar la inducción en el proceso y se identifican a lo largo del proyecto como no inducido. Para las muestras finales, las cuales fueron obtenidas después del proceso de lisado y se identifican como Lisado en el proyecto. A estas muestras se le realizaron diluciones con tampón A y en base 2, tal como se muestra en la siguiente plantilla, en donde:

- IgG: Gammaglobulina
- L1: Lisado 1

- N1: No inducido 1
- L2: Lisado 2
- N2: No inducido 2
- L3: Lisado 3
- N3: No inducido 3
- L4: Lisado 4
- N4: No inducido 4
- B: Blanco-Tampón A

Tabla No. 3.

Plantilla de diluciones para la tecnica de Bradford

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG 320	L1 1:10	L2 1:10	L3 1:10	L4 1:10	B	-	-	-	-	-	-
B	IgG 160	L1 1:20	L2 1:20	L3 1:20	L4 1:20	B	-	-	-	-	-	-
C	IgG 80	L1 1:40	L2 1:40	L3 1:40	L4 1:40	B	-	-	-	-	-	-
D	IgG 40	L1 1:80	L2 1:80	L3 1:80	L4 1:80	B	-	-	-	-	-	-
E	IgG 20	N1 1:10	N2 1:10	N3 1:10	N4 1:10	-	-	-	-	-	-	-
F	IgG 10	N1 1:20	N2 1:20	N3 1:20	N4 1:20	-	-	-	-	-	-	-
G	IgG	N1	N2	N3	N4	-	-	-	-	-	-	-

	5	1:40	1:40	1:40	1:40							
H	IgG	N1	N2	N3	N4	-	-	-	-	-	-	-
	2,5	1:80	1:80	1:80	1:80							

Siguiendo la plantilla anteriormente descrita, las diluciones se deben hacer en un volumen final de 200 uL (volumen final de dilución), teniendo en cuenta que se tienen que utilizar 100 uL para hacer la dilución siguiente. A la dilución se le añadió 150 uL de reactivo azul de Coomassie G-250 para que el volumen final del pozo sea de 250 uL. Posteriormente, se realizó la lectura de la absorbancia a 595 nm debido a que la unión entre el colorante y la proteína causa un cambio en la absorción máxima del colorante desde 465 nm hasta 595 nm. Finalizada la lectura de la absorbancia se procedió a realizar la curva patrón, con los datos de absorbancia obtenidos vs la concentración de la gammaglobulina, y después con la ecuación de la curva verificando que el R², el cual es el coeficiente de determinación e indica que tan dispersos están los datos de la línea de regresión ajustada, entre más cercano a la unidad indica que mejor será el ajuste del modelo a los datos, se calculan las concentraciones obtenidas de las muestras de lisados (L) y las no inducidas (N), y de esta manera se obtuvo la concentración de la proteína final.

4.1.7. Electroforesis

Para realizar la electroforesis en gel se realizan dos geles, el primero conocido como gel concentrador o stacking y gel separador o separating [95]. Ambos geles están compuestos por persulfato de amonio al 10 %, tetrametiletilendiamina (TEMED), dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %, acrilamida al 30 % y agua dd (destilada y desionizada), únicamente difieren en la concentración molar del tris(hidroximetil)aminometano (Tris), el cual es de 1.5 M para el gel separador con pH de 8.8 y 0.5 M con pH de 6.8 para el gel concentrador [96]. Después de realizar estos geles, se procede al montaje de los respectivos geles, teniendo en cuenta que el gel separador se agrega primero y posteriormente el gel concentrador. Una vez polymerizados los geles, estos se introducen dentro de la cámara de electroforesis (Figura No. 22), agregando el buffer de corrida, el cual se compone de Tris 25mM, Glicina 190mM y SDS al 10 % [97]. A continuación se realizaron la diluciones con las

muestras de lisado (final) y las no inducidas (inicial), tomando 10uL de cada muestra con 10 uL de buffer Laemmli o tampón de ruptura, compuesto de SDS al 4 %, mercaptoetanol al 10 %, glicerol al 20 %, azul de bromofenol 0.0004 % y 0.125 M de Tris-HCL con pH de 6.8 [98], este buffer es el encargado de teñir la muestra de un color azul para que sea de fácil reconocimiento durante la electroforesis y además genera la desnaturalización de las proteínas por la presencia del SDS y mercaptoetanol [99].

Figura No. 22.

Cubeta electroforética



Nota. La figura representa la cubeta electroforética empleada en este proyecto.

Fuente: Propia.

Al tener las diluciones listas, se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, luego, se calentaron a 95 °C por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y el DNA, y son centrifugadas nuevamente a 13000 rpm durante 3 minutos. Al finalizar, las diluciones son agregadas a cada pozo correspondiente en gel. Una vez sembradas las diluciones, la corrida se lleva a cabo por una hora y media con un voltaje constante de 100 V. Luego de correr las muestras, los geles fueron puestos en un recipiente con solución de fijado compuesta de 50 % de metanol, 10 % de ácido acético y agua dd (destilada y desionizada) para ser llevados a incubación durante 30 minutos, a 20°C y

50 rpm, con el fin de fijar las proteínas al gel. Al terminar la incubación, se desechó la solución de fijado por inversión y el gel fue hidratado con agua e incubado durante 1 hora, 20°C y 50 rpm. Después, se desechó el agua y se adiciono azul de Coomassie para teñir las proteínas presentes en el gel, incubándolo a 1 hora, 20°C y 50 rpm. Finalmente, se desechó el azul de Coomassie para agregar la solución de desteñido al gel, la cual es la misma solución de fijado. El gel se lavó con esta solución durante tres horas o hasta obtener un gel más claro.

4.1.8. Scanner

Para realizar el scanner o densitograma, se debe descargar el programa ImageJ, una vez descargado, se abren las imagenes de la electroforesis en gel obtenidas en el numeral 4.1.7., y en el programa se tranforma a 16 bits, ya que la foto debe quedar a blanco y negro, posteriormente se ajusta el brillo y el contraste, ya que el programa lee las escalas de grises. Con la imagen editada, se realiza la marcación de los carriles inducidos (finales) y los no inducidos (iniciales), la marcación se debe hacer desde la primera banda hasta el frente de corrido. Como su principio de funcionamiento se basa en la intensidad de cada banda, los picos generados son proporcionales a esta intensidad, es decir, entre más pronunciado sea el pico, la intensidad de la banda es mayor.

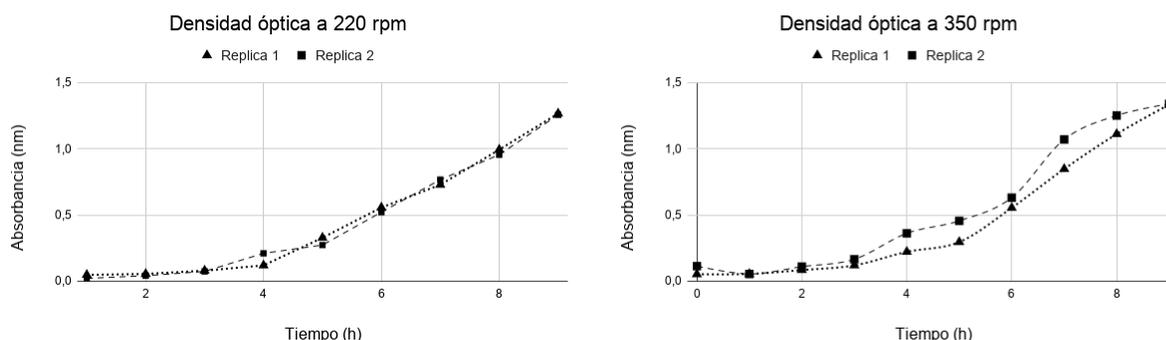
Con esta metodología es posible inferir la posible cantidad de proteína obtenida en cada banda, en este proyecto se puede calcular de manera indirecta la cantidad de proteína presente en cada banda de los lotes inducidos correspondientes a la enzima Taq polimerasa, siguiendo la premisa de la intensidad de la escala de grises, el color negro corresponde a un valor de 250 y el color blanco a un valor de 0 [56], si se resta el color negro a la intensidad del color arrojada por el programa se obtiene un valor que indica mayor o menor presencia de la enzima.

4.2. Resultados y Discusión

Siguiendo el protocolo de producción y conforme al numeral 4.1.5., las mediciones de la densidad óptica para cada nivel de agitación se plasman en las Figuras No. 23(a) y 23(b).

Figura No. 23.

Curvas de crecimiento a ambos niveles de agitación



(a) Curva de crecimiento a 220 rpm

(b) Curva de crecimiento a 350 rpm

La figura representa las curvas de crecimiento obtenidas a 220 rpm y 350 rpm

Conforme al Marco teórico, este proyecto de investigación se basa en una fermentación batch, en este tipo de fermentación la composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa, y la composición química interna de los microorganismos, así como el aumento de la proteína de interés o de los metabolitos, cambian como consecuencia del estado del crecimiento celular, del metabolismo celular y de la disponibilidad de nutrientes. Bajo estas condiciones, en las curvas de crecimiento celular para ambos niveles de agitación se evidencian dos fases, fase de latencia y fase exponencial, correspondiente a las primeras nueve horas de muestreo. En las curvas de crecimiento, se observa una fase de latencia durante las primeras cuatro horas de incubación, durante este periodo de tiempo el aumento del número de células después de la inoculación en el medio de cultivo esterilizado no es inmediato porque las células necesitan tiempo para ajustar sus sistemas metabólicos a las nuevas condiciones ambientales, como el pH y la cantidad de nutrientes disponibles. Cuando esto ocurre se empieza a generar el crecimiento celular de manera exponencial, gracias a que hay un exceso de sustrato, y no hay inhibición del crecimiento por componentes presentes en el medio. A las 9 horas de incubación se obtuvo que, para el nivel de 220 rpm, hubo un crecimiento celular levemente menor respecto al nivel de 350 rpm. El incremento en el crecimiento celular con el mayor nivel de agitación se debe a las condiciones de aireación y mezcla proporcionadas en el biorreactor. Aunque en las gráficas 4.9(a) y 4.9(b), no están presentes las últimas dos fases de crecimiento, es importante

mencionar que al final las reservas de energía están completamente agotadas y la actividad metabólica cesa. Para la mayoría de procesos comerciales, las reacciones fermentativas son detenidas y las células son recolectadas antes de que la fase de muerte comience.

Según el numeral 4.1.6. del protocolo de producción, en la Tabla No. 4, se plasman los resultados correspondientes a la producción de proteína en biorreactor bajo los dos niveles de agitación utilizados en este proyecto. La cuantificación de la concentración de proteína se obtuvo por la técnica de Bradford para ambos niveles de agitación, en el nivel de 220 rpm se evidencia menor concentración de proteína con un valor de 1465,83 ug/mL, respecto al nivel de 350 rpm con una concentración de 2973,5 ug/mL, lo que corresponde a un 149 % de producción de la enzima respecto al porcentaje no inducido (inicial) de este último nivel. El cálculo se realizó teniendo en cuenta las curvas patrón obtenidas por cada duplicado de la muestra (Anexo A).

Tabla No. 4.

Concentraciones de proteína iniciales y finales

Agitación (rpm)	T (°C)	pH inicial	Réplica	Conc. Inicial (µg/mL)	Prom i (µg/mL)	Conc. Final (µg/mL)	Prom f (µg/mL)	(%)	Prom (%)
220	37	6,82	1	857	883,25	1352,66	1465,83	57,837	65,724
		6,96	2	909,5		1579		73,612	
350		6,97	1	1141	1197,75	3071	2973,5	169,15	149,202
		6,99	2	1254,5		2876		129,255	

Nota. Esta tabla muestra las concentraciones de proteína en ug/mL de las muestras no inducidas (iniciales) y lisadas (finales) para ambos niveles de agitación y sus respectivas replicas.

Por otro lado, en la Tabla No. 5, se recopilan los datos de los últimos 5 lotes de producción de la enzima Taq polimerasa a nivel matraz, producida en Corpogen. Estos datos son de gran utilidad debido a que permiten calcular los incrementos o disminuciones en la concentración de proteína respecto a escala biorreactor.

Tabla No. 5.

Producción a escala Matraz

Agitación (rpm)	T (°C)	Lote de producción	Concentración Lisado-final (µg/mL)	Promedio de producción lisado-final (µg/mL)
210 (orbital)	37	64	1204	1633
		65	1855	
		66	1953	
		67	1891	
		68	1262	

Nota. Esta tabla muestra las concentraciones de proteína en µg/mL de los últimos 5 lotes de producción de TucanTaq. *Los datos fueron suministrados por Corpogen.

El sistema de producción original de Corpogen para Taq polimerasa se realiza en un matraz de capacidad de 1000 mL con un volumen efectivo de 400 mL con agitación orbital de 210 rpm, el promedio de producción del lisado (final) es de 1633 µg/mL. En relación con este promedio de producción y conforme se muestra en la Tabla No. 6, la concentración del lisado (final) en el nivel de 350 rpm, presentó un aumento del 82 % en la producción, lo que es igual a 2973,5 µg/mL, comparado con la escala matraz, este incremento en la producción es generado por la correcta transferencia de oxígeno a las células aportando los nutrientes necesarios para la expresión enzimática. En el nivel de 220 rpm se presentó una disminución en la concentración de proteína, debido a que el sistema de mezcla y aireación en el biorreactor pudieron no haber sido suficientes para la generación de mayores concentraciones de enzima comparadas con la escala matraz. Sin embargo, esta disminución corresponde al -10 %, con una concentración de proteína de 1455,83 µg/mL, siendo un valor que se podría encontrar dentro del rango de error experimental.

Tabla No. 6.

Comparación de producción entre ambas escalas

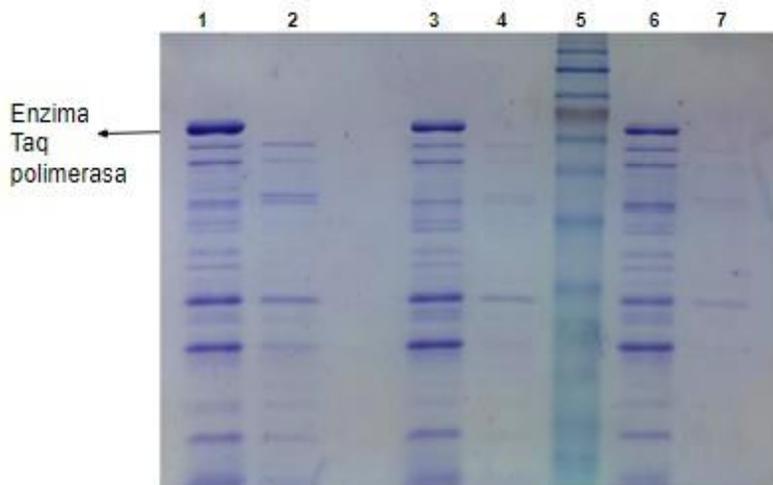
Escala	Agitación	Producción de Taq polimerasa (µg/mL)	Incremento de producción de Taq polimerasa (%)
Matraz	210 (orbital)	1633	-
Biorreactor	350	2973,5	82,088
	220	1465,83	-10,237

Nota. Esta tabla representa la concentración de proteína en ug/mL en la escala matraz y escala biorreactor.

Según el numeral 4.1.7. expuesto en la metodología, la técnica electroforesis en gel permite obtener resultados cualitativos respecto al peso molecular de la proteína de interés, en la Figura No. 24 y 25 se presentan los resultados obtenidos por esta técnica, en donde los carriles, 1, y los carriles 2, 4 y 6 de las figuras No. 24 y 25 respectivamente, muestran la proteína de interés, y se evidencia un peso molecular similar entre estos, cerca de los 80kD.

Figura No. 24.

Electroforesis en gel No.1



Nota. Carril 1: muestra lisado (final) replica 1 del nivel 220 rpm. Carril 2: muestra no inducido (inicial) réplica 1 del nivel

220. Carril 3,4, 6 y 7: muestra Tucan Taq. Carril 5: marcador de peso.

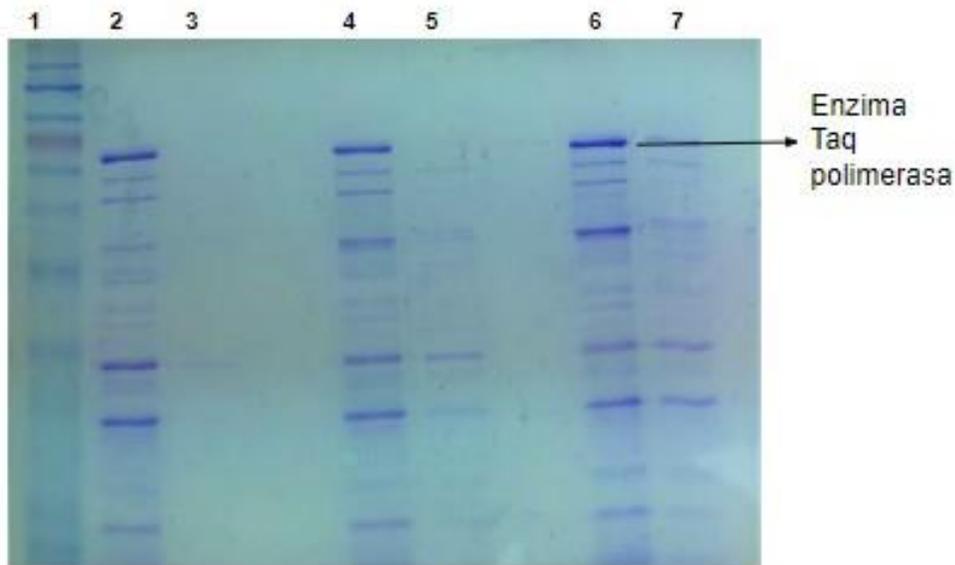
Así mismo, en la Figura No. 26 se observa la comparación entre la proteína producida a nivel matraz por Corpogen, representada en el carril 2, y el primer lote de producción generado en el biorreactor de este proyecto corresponde al carril 5 mostrando un peso molecular similar de 80 kD, indicando que la producción a nivel biorreactor genera una enzima con un peso molecular acorde a lo obtenido en matraz. La intensidad del carril 2, de la Figura No. 25 correspondiente a la enzima producida en matraz es leve, debido a que la muestra empleada fue sometida a todos los procesos de purificación, mientras que la muestra del carril 5, correspondiente a la enzima producida en biorreactor es más intensa, debido a que esta no se sometió a los procesos de purificación, solo fue llevada al proceso de lisado. La similitud en las bandas de la electroforesis, tanto a nivel biorreactor como a nivel matraz, indica que el protocolo de producción para la enzima en biorreactor fue apto.

En relación con la electroforesis en gel, la densitometría generó resultados concordantes a los obtenidos por electroforesis, tal como se muestra en la Figura No. 153 el sector A1 corresponde al lisado (final) de la corrida 1 y el sector B1 corresponde al no inducido (inicial) de la corrida 1, esta analogía se mantiene para el resto de sectores.

Cada pico inicial de los sectores de los lisados (A, C, E y G) corresponde a la primera banda de cada carril de la electroforesis en gel (carril 1 de la Figura No. 24 y carriles 2, 4 y 6 de la Figura No. 25), esta banda representa la enzima Taq polimerasa, la cual se encuentra únicamente en las muestras de lisado y no en las bandas no inducidas (B, D, F y H) debido a que estas muestras fueron tomadas antes de inducir.

Figura No. 25.

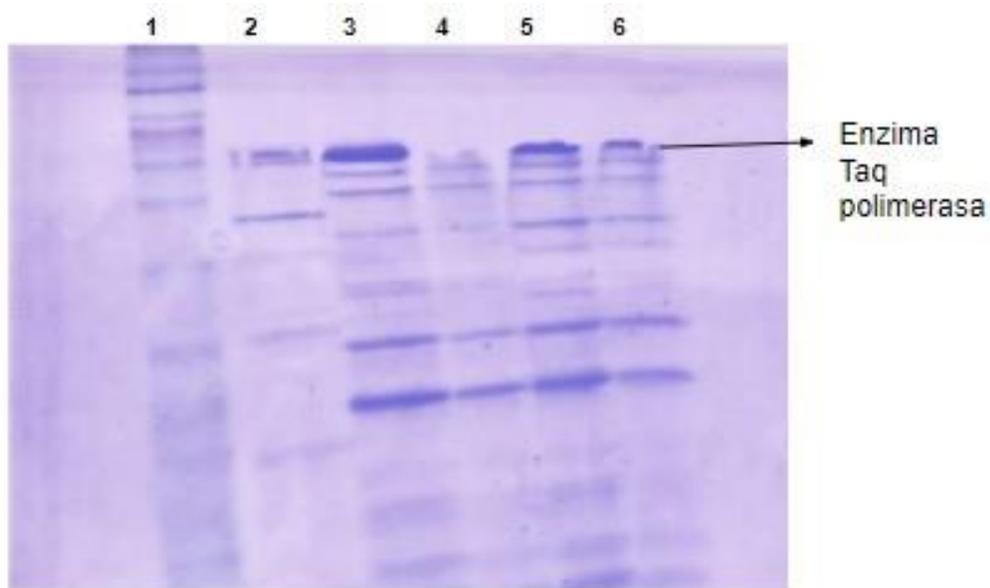
Electroforesis en gel No.2



Nota. Carril 1: marcador de peso; carril 2: muestra lisado (final), replica 1 del nivel 350 rpm, carril 3: marcador de muestra no inducida (inicial) réplica 1 del nivel 350 rpm; carril 4: muestra lisado, replica 2 del nivel 350 rpm, carril 5: muestra no inducida, réplica 2 del nivel 350 rpm; carril 6: muestra lisado, replica 2 del nivel 220 rpm, carril 7: muestra no inducida, réplica 2 del nivel 220 rpm

Figura No. 26.

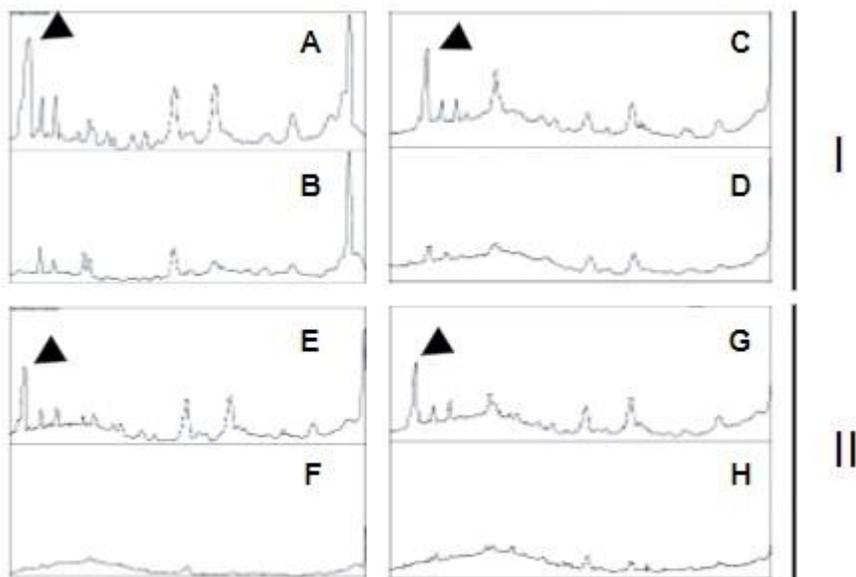
Electroforesis en gel No. 3.



Nota. Carril 1: marcador de peso; carril 2: muestra Taq polimerasa Corpogen lote 68 (purificada); carril 3 y 4: muestra tucan taq; carril 5 y 6: muestra lisado replica 1 del nivel 220 rpm

Figura No. 27.

Scanner



Nota. Sector A-I: muestra lisisado (final), réplica 1 del nivel 220 rpm. Sector B-I: muestra no inducido (inicial), réplica 1 del nivel 220 rpm. Sector C-II: muestra lisisado, réplica 2 del nivel 220 rpm. Sector D-II: muestra no inducido, réplica 2 del nivel de 220 rpm. Sector E-III: muestra lisisado, réplica 1 del nivel 350 rpm. Sector F-III: muestra no inducido, réplica 1 del nivel 350 rpm. Sector G-III: muestra lisisado, réplica 2 del nivel 350 rpm. Sector H-III: muestra no inducido, réplica 2 del nivel 350 rpm.

Esta técnica, permite inferir que la inducción en el proceso fue exitosa, generando un pico que sobresale de las demás muestras y adicionalmente se observa que antes de inducir no hay expresión de Taq polimerasa. Además, esta técnica puede proveer un valor cuantitativo de manera indirecta sobre la cantidad de proteína presente en cada banda, como se mencionó en el numeral 4.1.8., la intensidad de la escala de grises se mide desde 0 hasta 250, siendo blanco y negro respectivamente. Al realizar el cálculo, restando el color negro con la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés arrojada por el programa, se obtuvo que a 350 rpm existe mayor contenido de

proteína Taq polimerasa comparado con el nivel de 220 rpm, siendo 11,96 % mayor que este, tal como se plasma en la Tabla No. 7.

Tabla No. 7.

Resultados del Scanner

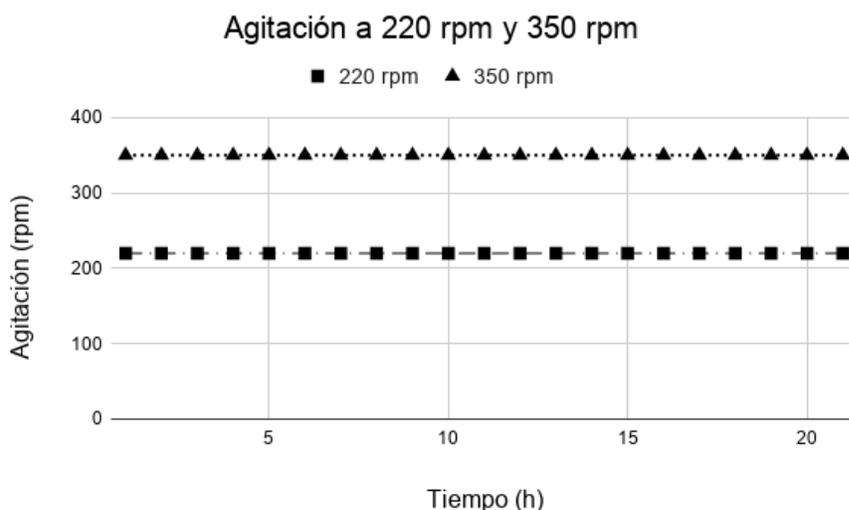
Agitación (rpm)	Réplica	Intensidad del color	Promedio de intensidad
220	1	125	130,0095
	2	135,019	
350	1	151,187	145,564
	2	139,941	

Nota. La tabla representa los resultados obtenidos por la técnica de Scanner. Fuente: Propia

Dentro de los parámetros monitoreados, se observan variaciones para el pH y el oxígeno disuelto, mientras que la temperatura y la agitación (ver Figura No. 28) se mantuvieron constantes durante las 21 horas de incubación de cada proceso experimental.

Figura No. 28.

Agitación empleada en los experimentos

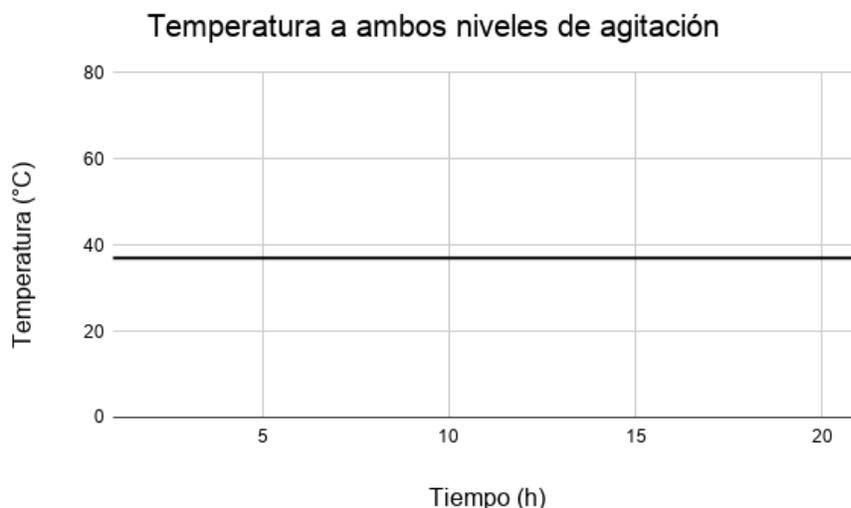


Nota. La figura representa los valores de agitación empleados en los experimentos, estos fueron 220 rpm y 350 rpm.

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afecta el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Esta influencia se puede percibir cuando la temperatura aumenta, la velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa y el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de una temperatura determinada, las proteínas y otros componentes celulares pueden desnaturalizarse o dañarse irreversiblemente [53]. La enzima producida en este proyecto, Taq polimerasa, al ser una enzima termoestable puede sobrevivir en ambientes con cambios bruscos de temperatura, lo cual indica que a pesar de tener una temperatura óptima de crecimiento para el microorganismo huésped, la enzima puede resistir temperaturas más altas.

Figura No. 29.

Temperatura empleada en los experimentos



Nota. La figura representa la temperatura empleada en todos los experimentos realizados, la cual fue de 37 °C

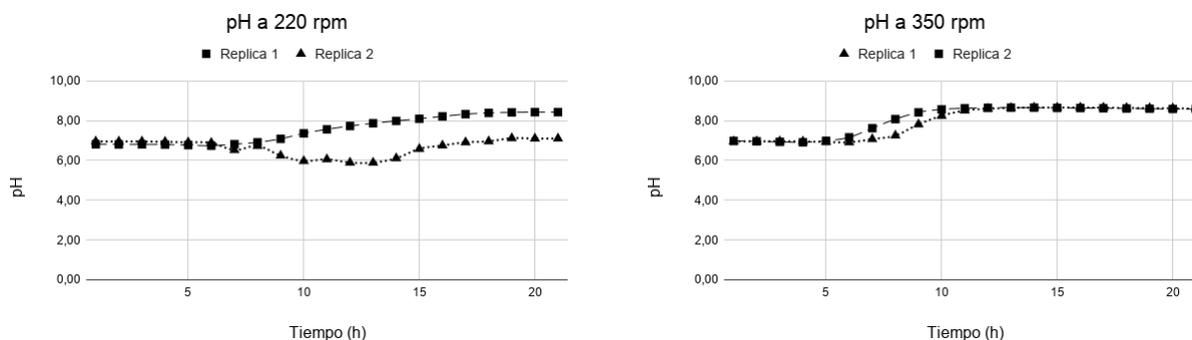
Es importante aclarar que la temperatura óptima de crecimiento para *Escherichia coli* está en el rango de 37°C a 39°C [19], por esto la temperatura empleada en el lote de

operación se mantuvo en 37 °C, siendo un parámetro constante gracias al sistema PID del biorreactor utilizado en este proyecto, tal como se muestra en la Figura No. 32, durante las 21 de horas de incubación la temperatura no sufrió variación alguna.

Cada microorganismo tiene un intervalo de pH, normalmente de entre 2 y 3 unidades, dentro del cual es posible el crecimiento. Los organismos que crecen de manera óptima a un valor de pH en el intervalo neutro (5.5-7.9) se llaman neutrófilos y el ejemplo más común de este grupo es *E.coli*. El pH óptimo para el crecimiento de un organismo se refiere únicamente al ambiente extracelular, mientras que el pH intracelular debe permanecer cerca de la neutralidad para impedir la destrucción de las macromoléculas [53]. En la figuras 4.16(a) y 4.16(b) se observa el pH obtenido a ambos niveles de agitación, en la mayoría de los experimentos el rango de pH estuvo entre 6 a 8.6, lo cual es un rango óptimo para el crecimiento de *E.coli*. Además, el medio de cultivo LB, el cual fue utilizado en todas las réplicas confiere un pH de 6.8 a 7.2 [76], lo que significa que el rango de pH fue en su mayoría neutro y se mantuvo dentro de los valores sin ser necesario la regulación por adición de ácidos o bases.

Figura No. 30.

pH a ambos niveles de agitación



(a) pH a 220 rpm

(b) pH a 350 rpm

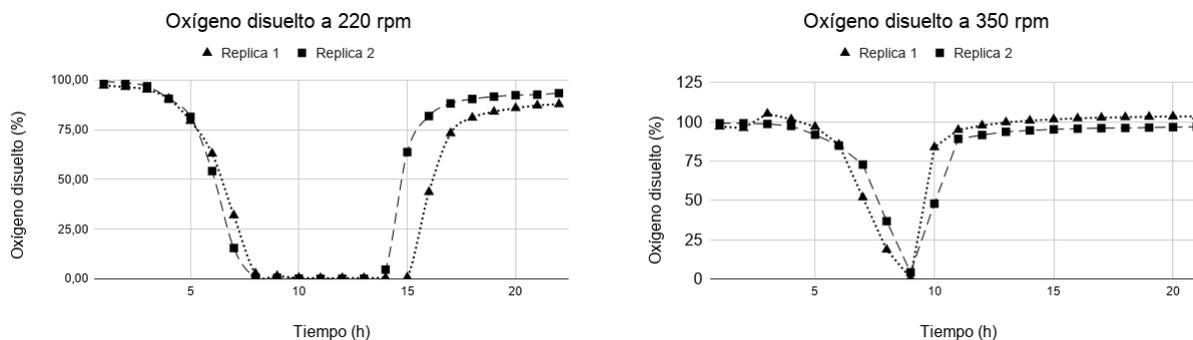
Nota. La figura representa el pH obtenido a 220 rpm y 350 rpm

Conforme con el numeral 4.1.3., la inducción es una etapa fundamental en el proceso, debido a que el inductor permite regular la expresión génica a nivel transcripcional, es decir cuando la transferencia de información genética del ácido desoxirribonucleico

(ADN) el ácido ribonucleico (ARN) se efectúa [53] En relación con lo expuesto en el primer capítulo, la síntesis de Taq polimerasa es posible gracias a la tecnología de ADN recombinante, es decir expresar ADN de un microorganismo en otro. En este proyecto, el ADN foráneo se entiende como el plásmido que contiene el gen de Taq polimerasa y el organismo huésped es *E.coli* ; la expresión de este plásmido impone una carga metabólica, es decir, los recursos necesarios como nutrientes y energía para el mantenimiento y expresión del ADN foráneo [100]. Esta carga metabólica es significativa, generalmente cuando el crecimiento celular se genera en presencia de esta hay una disminución de los niveles de energía disponibles, para las diversas funciones celulares, como lo son la fijación de nitrógeno y la síntesis de proteínas se ven severamente afectadas [19]. Tal como se observa en las figuras No. 31(a) y 31(b), después de la inducción generalmente realizada a las 5 horas de adicionar el preinóculo al biorreactor, el oxígeno disuelto en el medio tiende a disminuir debido a que en ese momento el organismo huésped se encuentra en fase exponencial, es decir, a nivel respiratorio las células demandan una mayor tasa respiratoria por el aumento de biomasa gracias a los procesos de replicación, transcripción y traducción de la proteína [100] Los procesos de transcripción y traducción suelen ser los de mayor demanda energética, especialmente la traducción porque en ella se genera la expresión enzimática, sin embargo, el éxito de la transcripción promueve mayor ARN mensajero (mRNA), el cual queda disponible para la traducción y por tanto más cantidad del producto proteico en la célula [53].

Figura No. 31.

Porcentaje de oxígeno disuelto a ambos niveles de agitación



(a) Oxígeno disuelto a 220 rpm

(b) Oxígeno disuelto a a 350 rpm

Nota. La figura representa el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio obtenido a 220 rpm y 350 rpm

La cantidad de oxígeno disuelto en un medio generalmente es insuficiente para ambos metabolismos de la célula huésped y el plásmido, lo que provoca una disminución considerable en el porcentaje de oxígeno disuelto que se encuentra en el medio [19]. Es importante mencionar que en la réplica 2 del nivel de 350 rpm, el porcentaje de oxígeno disuelto se posicionó por encima del 100 %, lo que significa una sobresaturación de oxígeno, sin embargo, este fenómeno no es usual en un proceso biotecnológico como el realizado en este proyecto. Esto permite inferir que la calibración del sensor de oxígeno disuelto fue ineficiente, lo que generó medidas erróneas y por fuera del límite superior permisible, este imprevisto se soluciona con la correcta calibración estipulada en el manual del biorreactor empleado. Cabe resaltar la influencia de la agitación al momento de realizar los procesos moleculares de la proteína, en la Figura No. 31(a) se observa que, en el nivel de 220 rpm, el cultivo sufre durante aproximadamente 5 horas una carencia significativa de oxígeno y su recuperación es lenta, debido a que el tamaño de burbuja en el medio no es lo suficientemente pequeño como para transferir la cantidad de oxígeno necesario para poder suplir la demanda respiratoria de las células. Por otro lado, en el nivel de 350 rpm (Figura No. 31(b)), la caída de oxígeno en el medio es durante 1 hora y su aumento es rápido respecto al nivel de 220 rpm, debido a que al ser una

velocidad de agitación mayor, promueve un tamaño de burbuja mucho menor lo que incrementa el oxígeno disuelto en el medio permitiendo suplir la demanda respiratoria tanto del organismo huésped como del plásmido y es por esto que no se evidencia una caída prolongada del porcentaje de oxígeno disuelto en el medio al nivel de 350 rpm.

Al realizar un diseño de experimentos, es importante analizar los resultados obtenidos en los experimentos, para este proyecto se determinó que la variable respuesta era la concentración de proteína en el lisado (final) y la variable independiente fue la agitación. El diseño de experimentos permite estudiar el efecto del factor agitación sobre la concentración de proteína obtenida en cada tratamiento. En la tabla 4.6 se presentan los datos empleados para el análisis de varianza de un factor, en donde el factor seleccionado fue la agitación y los niveles fueron: 220 rpm y 350 rpm.

Las hipótesis generadas para el factor de agitación fueron:

- Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$ en donde μ es la variabilidad en resultado en ug/mL de la concentración de proteína.
- Hipótesis alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu$

La hipótesis nula hace referencia a que el factor de agitación no genera ningún efecto en la concentración de proteína en ug/mL, mientras que la hipótesis alternativa sugiere que la agitación influye significativamente en la concentración de proteína. A nivel estadístico esto se determina con el valor de la distribución F, obtenido del ANOVA, el cual significa el cociente de dos varianzas, las cuales indican que tan dispersos están los datos con respecto a la media, por lo tanto, una varianza con valores altos representa mayor dispersión, en este caso el nivel de 220 rpm muestra mayor dispersión que el de 350 rpm. En el diseño experimental, el valor de $F_o (F) > F\alpha$ (Valor de crítico para F) lo que indica que el factor de agitación influye significativamente en la concentración de proteína y por ende la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa. Por lo tanto, se puede afirmar que existe variabilidad generada por el nivel de agitación. Así mismo, el valor de la probabilidad es menor al 0,05 y se puede decir que para la agitación existe una diferencia significativamente estadística, por eso

esta genera un efecto considerable sobre la concentración de proteína e influye en el experimento.

Finalmente, el efecto de la agitación en la expresión de la enzima Taq polimerasa fue descrito con las diferentes pruebas cuantitativas y cualitativas desarrolladas a lo largo de este capítulo. Evidentemente la producción de Taq polimerasa se ve favorecida a 350 rpm con un incremento del 82 % respecto al sistema de producción original de Corpogen. El aumento en la agitación permite homogeneizar el medio e incrementar la transferencia de oxígeno disuelto, lo cual es esencial para los procesos metabólicos de la célula, especialmente la traducción por el nivel de energía requerido por el organismo huésped y el plásmido. Es importante mencionar que la carga metabólica se genera en ambos niveles de agitación, sin embargo, con el nivel de 350 rpm se evidencia una recuperación más rápida de las células a nivel respiratorio.

Tabla No. 8.

Datos empleados en el diseño de experimentos

Agitación	Conc. de proteína en el lisado-final producida (µg/mL)	
	Réplica 1	Réplica 2
220	1352,66	1579
350	3071	2876

Nota. Esta tabla representa los datos empleados para el análisis de varianza de un solo factor, siendo la concentración de proteína en el lisado (final) en ug/mL la variable de respuesta.

Figura No. 32.

Análisis de varianza de un solo factor

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
220 rpm	2	2931,66	1465,83	25614,9
350 rpm	2	5947	2973,5	19012,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2273068,829	1	2273069	101,8688	0,009674	18,51282
Dentro de los grupos	44627,3978	2	22313,7			
Total	2317696,227	3				

Nota. La figura representa el análisis de varianza para el factor de agitación sobre la concentración de proteína de producida en ug/mL

5. CONCLUSIONES

- Se identificó la relación entre el protocolo de producción de Taq polimerasa a escala matraz proporcionado por Corpogen con los diferentes protocolos de producción obtenidos por revisión bibliográfica, encontrando la similitud entre la práctica (protocolo empleado por Corpogen) y la teoría.
- Se seleccionaron los parámetros de operación más influyentes para la producción de proteínas recombinantes a escala biorreactor, siendo estos la agitación y flujo de aire a través de un análisis bibliométrico.
- Se establecieron los niveles de agitación de 350 rpm y 220 rpm, obteniendo que el nivel de 350 rpm para la producción de Taq polimerasa en un biorreactor de 1 L presenta un incremento del 82,088 % respecto al sistema original de producción de Corpogen (escala matraz).
- Se evidenció la importancia de medir y controlar los diferentes parámetros de operación para la producción de Taq polimerasa, logrando incrementar la concentración de proteína obtenida, mediante el uso de un biorreactor.
- Se demostró que estadísticamente la agitación genera variabilidad significativa en la concentración de proteína

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Zambrano. "RE:taq polimerasa", jun 10 2020. Email personal.
- [2] Roayaei, M. and H. Galehdari, (2008). "Cloning and Expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*." *Jundishapur Journal of Microbiology*.
- [3] López, C. R., (2019). "Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial." *Tecnología En Marcha*.
- [4] R. K. Saiki *et al*, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science*, vol. 239, (4839), pp. 487-491, 1988.
- [5] A. S. Díaz *et al*, "PCR: reacción en cadena de la polimerasa," *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos*, pp. 53, 2014.
- [6] J. Cortes Cerna, J. F. Cortes Cerna & M. Vargas. Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia. *Temas de ciencia y tecnología*, 18(54):52–57, 2014.
- [7] David H. Gelfand. *Taq DNA Polymerase*, pages 17–22. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Palgrave Macmillan UK, London, 1989.
- [8] R. A. Gamboa-Suasnavart *et al*. "Volumetric power input as a reliable parameter for scale-up from shake flask to stirred-tank bioreactor: Production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans*" *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3):1085–1099, 2019. Cited By :2.
- [9] R. A. Gamboa-Suasnavart, L. D. Marín-Palacio, J. A. Martínez-Sotelo, C. Espitia,
- [10] L. Servín-González, N. A. Valdez-Cruz & M. A. Trujillo-Roldán. Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant apa (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8):1421–1429, 2013.

- [11] A. I. Kanno, L. C. C. Leite, L. R. Pereira, M. J. R. de Jesus, R. Andreato-Santos,
- [12] R. P. S. Alves, E. L. Durigon, L. C. S. Ferreira, and V. M. Gonçalves. Optimization and scale-up production of zika virus ns1 in *Escherichia coli*: application of response surface methodology. *AMB Express*, 10(1), 2020.
- [13] L. A. Zapata Urrutia, "Escalamiento y optimización de la producción de enzimas alginato liasas recombinantes," PhD Tesis. 2017.
- [14] R. E. Narciandi, J. Motolongo, L. Pérez, and R. Díaz. Induction optimization and scale-up of the fermentative process for the p-41 protein expressed in *Escherichia coli*. *Biotecnología Aplicada*, 22(4):285–296, 2005.
- [15] R. E. Narciandi Díaz, J. M. Viquillon, and L. P. Figueroa. High level production of the recombinant gag24 protein from hiv-1 in *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 5(2):103–107, 2006. Cited By :3.
- [16] E. Toksoy, Z. Í. Önsan, and B. Kirdar. High-level production of taqi restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the t7 phage promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3):239–245, 2002.
- [17] Z. Fang, C. Sha, Z. Peng, J. Zhang, and G. Du. Protein engineering to enhance keratinolytic protease activity and excretion in *Escherichia coli* and its scale-up fermentation for high extracellular yield. *Enzyme and microbial technology*, 121:37–44, 2019.
- [18] D. Totaro *et al.* Microscale perfusion-based cultivation for pichia pastoris clone screening enables accelerated and optimized recombinant protein production processes. *Biotechnology Journal*, n/a:2000215, 2020. doi: 10.1002/biot.202000215; 02.
- [19] Protocolo de producción tucan Taq, Corporación Corpogen, Bogotá, 2008.
- [20] Eppendorf. Bioflo®/celligen® 115, Apr 1, 2009.
- [21] B.R.Glick, J.J.Pasternak, and C.L.Patten. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. *American Society for Microbiology*

- (ASM), 4 edition, 1998.
- [22] C.J. Bognanni and M.V.Lazzarini. Producción y enriquecimiento de la enzima *Taq polimerasa* en el marco de un laboratorio autosustentable, tesis pre. En línea. Disponible <http://hdl.handle.net/123456789/4012>, 2015. Acceso: Abril 20, 2020.
- [23] Universidad de Chile. Libro de estructura de proteínas y enzimas para profesores de educación media. Chile, 2016.
- [24] BETELGEUX-CHRISTEYNS. “*Escherichia coli: características, patogenicidad y prevención (I)*”. En línea. Disponible en: <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/>. Acceso: Agosto 31, 2020.
- [25] J.García *et al.* “Strategies to obtain recombinant proteins in *Escherichia coli*”. *VaccinMonitor*, 22(2):30–39, May 2013. Acceso: Abril 10, 2020.
- [26] R. Junco Díaz and C. Pérez. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. [En línea]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/288670374>, 2001.
- [27] Lifeder. “*Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores*”. En línea, <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>. Acceso: agosto 31, 2020.
- [28] A. Galván Cejudo, M. Tejada, A. Camargo, J.J.Higuera, and E. Fernández Reyes. “Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante”. [En línea]. Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/48%20TRANSFORMACION%20E%20COLI%20CON%20PLASMIDO%20RECOMBIN>
- [29] Y. Serrano-Rivero, A. Hernández-García, and R. Fando-Calzada. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. 2013.
- [30] Y. Sheng, V. Mancino, and B. Birren. Transformation of *Escherichia coli* with large dna molecules by electroporation. *Nucleic acids research*, 23(11):1990–1996, 1995.

- [31] D. Hanahan, J. Jessee, and F. R. Bloom. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria, volume 204 of Methods in Enzymology. 1991.
- [32] Matthew Theisen and James Liao. Industrial Biotechnology: *Escherichia coli* as a Host: Microorganisms, pages 149–181. 11 2016.
- [33] R. G. Taylor, D. Walker, and R. Mcinnes. *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid dna preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*, 21 7:1677–8, 1993.
- [34] Ciencia y cultura. “La tecnología de adn recombinante”. [En línea]. <https://www.revistac2.com/la-tecnologia-de-adn-recombinante/>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [35] Natual Human Genome Research Institute. “Plásmido”. [En línea]. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Plasmido>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [36] Institute for research in biomedicine. “Explican cómo se inicia la replicación de los plásmidos bacterianos”. [En línea]. <https://www.irbbarcelona.org/es/news/explican-como-se-inicia-la-replicacion-de-los-plasmidos-bacterianos>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [37] La guía. “Antibióticos: Ampicilina”. [En línea]. <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/antibioticos-ampicilina>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [38] Saber más. “Plásmidos bacterianos” [En línea]. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/283-numero-33/510-plasmidos-bacterianos.html>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [39] IBIAN Technologies. “Vectores de clonación”. [En línea]. <https://www.ibiantech.com/vectores-de-clonacion/>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [40] Khan academy. “El operón lac”. [En línea]. <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-regulation/gene-regulation-in->

- bacteria/a/the-lac-operon. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [41] Biologics International Corp. "IPTG induction theory". [En línea]. <https://www.biologicscorp.com/blog/iptg-induction-protein-expression/.X2Kpx2hKjIW>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [42] L. Gomes, G. Monteiro, and F. Mergulhão. The impact of iptg induction on plasmid stability and heterologous protein expression by *Escherichia coli* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 2020.
- [43] Biología-Geología. "¿Qué es un gen?". [En línea] https://biologia-geologia.com/BG4/23_concepto_de_gen.html. Acceso: Agosto 09, 2020.
- [44] Britannica. "Expression of the genetic code: transcription and translation". [En línea]. <https://www.britannica.com/science/heredity-genetics/Human-evolution>. [Acceso: Agosto 09, 2020].
- [45] R. D. Abramson. 4 - Thermostable dna polymerases, 1995. ID: 276054.
- [46] Gregory A. Denomme, Maria Rios, and Marion E. Reid. *Part 2 - General Considerations*, pages 9–18. *Molecular Protocols in Transfusion Medicine*. Academic Press, London, 2000. ID: 274717.
- [47] Gabriel Dorado Pérez. 44. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadenade la Polimerasa). PhD thesis.
- [48] K. B. Mullis. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4):36, Apr 1990.
- [49] R. Bohinski. *Bioquímica*. Pearson Education, México, 1991.
- [50] A. P. Amado. Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista archivo médico de Camaguey*, 3(2), 1999
- [51] National Library of Medicine. "*PubMed Overview*". [En línea]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/about/>. [Acceso: Septiembre 1, 2020].
- [52] Wei-Shou Hu. *1.1.1 Classical Biotechnology*. *Engineering Principles in Biotechnology*. John Wiley & Sons.

- [53] D. Fernandez-Vecilla. *Diseño de proteínas terapéuticas*. PhD thesis.
- [54] A. T. Acebo-González, DayanaHernández-García. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2013.
- [55] M.T. Madigan. Brock, *Biología de los microorganismos*. 2004.
- [56] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.
- [57] R.E. Fernandez and Galvan C. A. Métodos para la cuantificación de proteínas. 2010.[Acceso: Diciembre 1, 2020].
- [58] IMAGEJ. “*Image J*”. [En línea]. Disponible en: <https://imagej.net/Welcome>, note =[Acceso: Diciembre 05, 2020].
- [59] Arnold L. Demain and Preeti Vaishnav. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3):297–306, 2009. ID: 271336.
- [60] Alvaro Lara. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(02), 2011.
- [61] G. Rosano and E.Ceccarelli. Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*: avances y desafíos. *Frontiers in Microbiology*, Abril, 17 2014.
- [62] Alicia De Lera Santin. Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa. PhD thesis, 2011.
- [63] T. A. Gomes, C. M. Zanette, and M. R. Spier. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(7):635–654, 2020.
- [64] D. I. Galarce-Castro. CONCEPCIÓN, DISEÑO, IMPLEMENTACIÓN Y OPERACIÓN DE UN BIORREACTOR CONTINUO PARA CARACTERIZACIÓN

DE PARÁMETROS DINÁMICOS DE SISTEMAS ELICITOR-PROMOTOR-EFECTOR EN BIOLOGÍA SINTÉTICA. PhD thesis, 2017.

- [65] L. D. Schmidt. Engineering of chemical reactions (2nd edition).
- [66] S. Simons. 2.3.1.4 *Plug Flow Reactor*. Concepts of Chemical Engineering for Chemists (2nd Edition). Royal Society of Chemistry.
- [67] E. Olivares Barrios. Escalamiento de un Bioprocesos para la producción de Taq polimerasa. PhD thesis, Junio 2009.
- [68] Jorge G. Gomez Gutierrez, Luis Bermudez, Juan Adame, and Roberto Montes de Oca. Produccion y purificacion de la taq dna polimerasa a partir de *E.coli* recombinante. 316-321, 03, 2002.
- [69] Sung-Gun Kim and Jong-Tae Park. Production of dna polymerase from thermus aqua- ticus in recombinant *Escherichia coli*. *CNU Journal of Agricultural Science*, 41:245–249,09 2014.
- [70] Fateme Moazen *et al*. Optimization of taq dna polymerase enzyme expres- sion in *Escherichia coli*. *Advanced biomedical research*, 1:82, 2012. undefined; J2: Adv Biomed Res.
- [71] T. Farazmandfar. A simplified protocol for producing taq dna polymerase in biology laboratory. *Research in Molecular Medicine*, 1:3, 09 2013.
- [72] S.Abeldenov and B.Khassenov. “Cloning, expression and purification of recombinant analog of taq dna polymerase”. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 13(1):1–3, Jan 2014. [Acceso: Septiembre 10, 2020].
- [73] J. Olivares and B. Caromel. Production et purification rapide d’une taq polymérase pour les applications routinières de biologie moléculaire. page 9, 01 2016.
- [74] Na Fang, Niannian Zhong, Yueyang Yang, Yujian Guo, and Shaoping Ji. Data of expression and purification of recombinant taq dna polymerase. *Data in Brief*, 9:81–84, 12 2016.

- [75] Philip Ferralli, John Egan, and Floyd Erickson. Making taq dna polymerase in the undergraduate biology laboratory. *BIOS*, 78:69–74, 01 2009.
- [76] ResearchGate. “*What is the exact role of iptg for protein induction*”. [En línea] Disponible en: [researchgate.net/post/what_is_the_exact_role_of_iptg_for_protein_induction](https://www.researchgate.net/post/what_is_the_exact_role_of_iptg_for_protein_induction). [Acceso: Septiembre 1, 2020].
- [77] Kalstein. “*Elija el shaker adecuado para su laboratorio*”. [En línea]. Disponible en: <https://www.buisar.net/single-post/2019/01/18/ELIJA-EL-SHAKER-ADECUADO-PARA-SU-LABORATORIO>. [Acceso: Septiembre 10, 2020].
- [78] MERCK. “*Caldo LB Miller*”. [En línea]. Disponible en: https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/LBbrothMILLER,MDA_CHEM-110285anchor_TI. [Acceso: Octubre 10, 2020].
- [79] L. A. Palomares, Sandino Estrada-Moncada, and Octavio T. Ramírez. *Production of Recombinant Proteins*, pages 15–51. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. ID: Palomares2004.
- [80] R. Espinosa Pérez, J. G. Suárez, E. N. Diaz, R. Silva Rodríguez, E. Caballero Menéndez, H. D. Balaguer, and A. Musacchio Lasa. Scaling-up fermentation of *Escherichia coli* for production of recombinant p64k protein from neisseria meningitidis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 33:29–35, 2018.
- [81] R. E. Pérez, A. M. Lasa, R. S. Rodríguez, E. C. Menéndez, J. G. Suárez, and H. D. Balaguer. Scale-up of recombinant opc protein production in *Escherichia coli* for a meningococcal vaccine. *Journal of Biotechnology*, 127(1):109–114, 2006.
- [82] K. Jing, Y. Tang, C. Yao, E. A. del Rio-Chanona, X. Ling, and D. Zhang. Overproduction of l-tryptophan via simultaneous feed of glucose and anthranilic acid from recombinant *Escherichia coli* w3110: Kinetic modeling and process scale-up. *Biotechnology and bioengineering*, 115(2):371–381, 2018. Cited By :19.
- [83] A. Schmideder and D. Weuster-Botz. High-performance recombinant protein production with *Escherichia coli* in continuously operated cascades of stirred-

- tank reactors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(7):1021–1029, 2017.
- [84] M. Muñoz and M. Ángel. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{la}) y potencia gaseada volumétrica (pg/v) como criterios de escalamiento del bioproceso para la producción de dextranasa recombinante en *pichia pastoris*. 2019.
- [85] V. Babaeipour, M. R. Mofid, S. Khanchezar, F. Faraji, and S. Abolghasemi. Bench- scale overproduction and purification of recombinant gcsf in *Escherichia coli* fed-batch process. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(8):149–155, 2017.
- [86] M. Lemmerer, J. Mairhofer, A. Lepak, K. Longus, R. Hahn, and B. Nidetzky. Deco- upling of recombinant protein production from *Escherichia coli* cell growth enhances functional expression of plant leloir glycosyltransferases. *Biotechnology and bioenginee- ring*, 116(6):1259–1268, 2019.
- [87] G. E. Anasontzis, M. S. Penã, O. Spadiut, H. Brumer, and L. Olsson. Effects of tem- perature and glycerol and methanol-feeding profiles on the production of recombinant galactose oxidase in *pichia pastoris*. *Biotechnology progress*, 30(3):728–735, 2014.
- [88] A. Hernández *et al.* Medición en línea de ph, temperatura y agitación de medio de cultivo en fermentación utilizando *saccharomyces cerevisiae*. *ECORFAN*, 6:162–173, 09 2014.
- [89] New brunswick bioflo®/celligen®115 benchtop fermentor bioreactor, 2013.
- [90] J. L. Jimenez-Álvarez. "la transferencia de gases en procesos biotecnologicos", 2014.
- [91] Rodolphe Sardeing, Joelle Aubin, Martine Poux, and Catherine Xuereb. Gas- liquid mass transfer: Influence of sparger location. *Chem Eng Res Des.*, 82, 09 2004.
- [92] Anand Kulkarni, Shrikant Badgandi, and Jyeshtharaj Joshi. Design of ring and spider type spargers for bubble column reactor: Experimental measurements and cfd simula- tion of flow and weeping. *Chemical Engineering Research Design - CHEM ENG RES DES*, 87:1612–1630, 12 2009.

- [93] Anónimo "biorreactores". [En línea]. Disponible en:[http://www0.unsl.edu.ar/organica/archivos/Documento %20didactico.pdf](http://www0.unsl.edu.ar/organica/archivos/Documento%20didactico.pdf). [Acceso: Abril 12, 2020].
- [94] M. A. Trujillo-Roldán, N. A. Valdez-Cruz, C. F. Gonzalez-Monterrubio, E. V. Acevedo- Sánchez, C. Martínez-Salinas, R. I. García-Cabrera, R. A. Gamboa-Suasnavart, L. D. Marín-Palacio, J. Villegas, and A. Blancas-Cabrera. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22):9665–9674, 2013.
- [95] N. Valdez-Cruz and Mauricio Trujillo-Roldán. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 1958.
- [96] C. Peña, Mauricio A. Trujillo-Roldán, and E. Galindo. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *azotobacter vinelandii*. *Enzyme and microbial technology*, 27(6):390–398, 2000. ID: 271361.
- [97] M. Salvan. "SDS-PAGE: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA". [En línea]. Disponible en: <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>. [Acceso: Diciembre 4, 2020].
- [98] CYTOGRAPHICA. "Calculate Polyacrylamide gel recipes for SDS-PAGE". [En línea]. Disponible en:<http://www.cytographica.com/lab/acryl2.html>. [Acceso: Octubre 28, 2020].
- [99] BIORAD "General protocol for Western Blotting". [En línea]. Disponible en:<https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin6376.pdf>. [Acceso: Noviembre 28, 2020].
- [100] MERCK. "Sample Buffer, Laemmli 2x Concentrate". [En línea]. Disponible en:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3401?lang=en®ion=CO>. [Acceso: Diciembre 02, 2020].
- [101] BIOMODEL. "Reactivos empleados en la electroforesis de DNA y de proteínas". [En línea]. Disponible en:
<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/reactivos/reactivos.htm>. [Acceso:

Noviembre 28, 2020].

- [102] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2):113–128, 2005.
- [103] Khan academy. “Reacción en cadena de la polimerasa (pcr)”. [En línea]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>. [Acceso: Septiembre 10, 2020]

ANEXOS

ANEXO 1

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de otros niveles de flujo de aire sobre la expresión de Taq polimerasa a escala Biorreactor.
- Realizar de manera adecuada y eficiente la calibración de los sensores de oxígeno disuelto y pH, para evitar medidas erróneas.
- Elaborar más réplicas por cada nivel de agitación empleado para obtener resultados más reproducibles y confiables.
- Desarrollar un diseño de experimentos de un factor con más niveles de agitación.
- Se recomienda que a los lotes de Taq polimerasa producidos en biorreactor se les realice el proceso completo de purificación, y posteriores análisis de funcionalidad

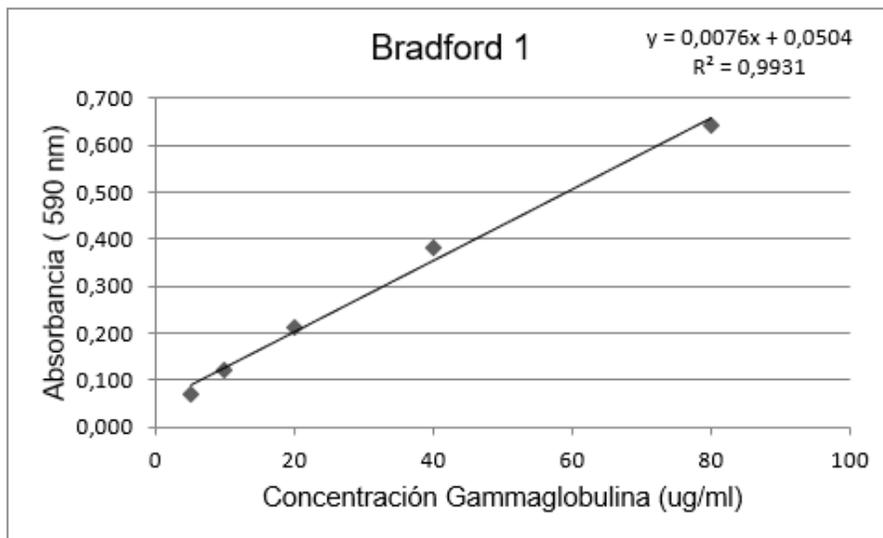
ANEXO 2.

BRADFORD

En las siguientes figuras se muestran las curvas patrón empleadas para el cálculo de la concentración de proteína con las respectivas ecuaciones de la recta y el R². La técnica de Bradford se realizó por duplicado para cada nivel de agitación y cada replica experimental. Con la ecuación de cada recta es posible extrapolar los datos, el valor de "x" despejado de cada ecuación representa la concentración de proteína ug/mL y el valor de z representa la absorbancia medida a 590nm para cada muestra

Figura No. 33.

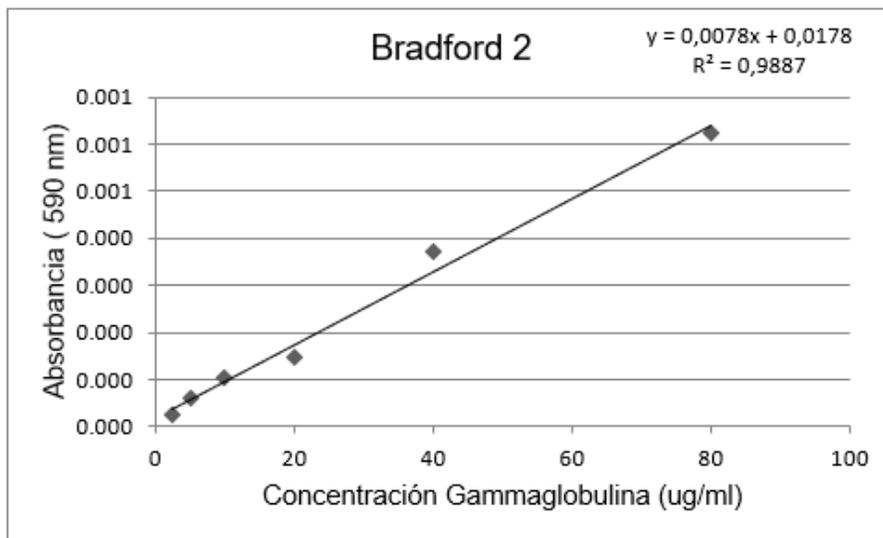
Curva patrón 1



Nota. La figura representa la curva patrón empleada para el cálculo de la concentración de proteína. Fuente: Propia

Figura No. 34.

Curva patrón 2



Nota. La figura representa la curva patrón empleada para el cálculo de la concentración de proteína.

Fuente: Propia

ANEXO 3

SCANNER

A continuación, se plasman los datos implementados para determinar de forma indirecta y cualitativamente la posible presencia de proteína en las muestras lisadas. El ítem de área hace referencia al sector que se tuvo en cuenta para medir la intensidad del color, pretendiendo que este valor sea lo más parecido posible en todas las mediciones. Mean significa la intensidad del color en escala de grises, mientras que el ítem de intensidad del color hace referencia a la intensidad obtenida después de que se le resta el color negro, como se mencionó en el capítulo corresponde a un valor de 250, entre más cerca este del color negro significa que posiblemente hay mayor presencia de enzima.

Ecuación para determinar la intensidad del color
$$\text{Intensidad del color} = \text{Negro} - \text{Mean}$$

Tabla No. 9.

Intensidad del color medida con la herramienta ImageJ

Agitación (rpm)	Réplica	Área	Mean	Intensidad del color	Promedio intensidad del color
220	1	1760	125	125	130,01
	2	1720	114,98	135,02	
350	1	1720	98,81	151,19	145,56
	2	1720	110,06	139,94	