



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Diseño y evaluación de un medio de cultivo tipo
industrial para la producción heteróloga de un péptido
con actividad antimicrobiana en *Streptomyces lividans*
TK24”**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
I.B.I. Fernanda Jocely Calderón de la Sancha.**

**Director
Dr. Armando Mejía Álvarez
Asesores
Dr. Javier Barrios González
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado**

Ciudad de México.

Agosto 2017.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ingeniería genética y Metabolitos secundarios que pertenece al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa en Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. Armando Mejía Álvarez. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada número 718101 para realizar los estudios de Maestría.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00235

Matrícula: 2153804161

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN MEDIO TIPO INDUSTRIAL PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE UN PÉPTIDO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN *Streptomyces lividans* TK24

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD A
Casa abierta

30 AGO 2017

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: FERNANDA JOCELY CALDERON DE LA SANCHA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO

SECRETARIO

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Cd. México, a 28 de Agosto del 2017.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Diseño y evaluación de un medio tipo industrial para la producción heteróloga de un péptido con actividad antimicrobiana en *Streptomyces lividans* TK24.

que presentó:

I.B.I. FERNANDA JOCELY CALDERÓN DE LA SANCHA

Comité Tutorial:

Director: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesor: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado

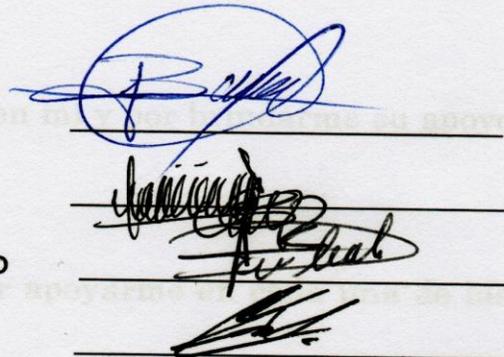
Jurado

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado

Vocal: Dr. Ulises Carrasco Navarro



The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. A large, stylized signature in blue ink at the top. 2. A signature in black ink. 3. A signature in black ink. 4. A signature in black ink.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Armando Mejía Álvarez por el apoyo brindado, las herramientas, los conocimientos y experiencias que ha compartido conmigo a lo largo de mi formación académica, pero sobre todo por los consejos y la confianza que siempre ha puesto en mi persona en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio Omar y Gerardo, por compartir su experiencia y conocimientos, por su apoyo y disponibilidad. A mis compañeros de generación, por ser parte de una etapa importante de mi vida, gracias por su amistad, en especial a ti amiga Carolina Franco, por tu amistad y apoyo incondicional.

Mamá y papá, por creer en mí, por su apoyo incondicional, su confianza, sus consejos y sobre todo por su amor. Gracias por ser el motor de mi vida.

Hermanas, por ser parte esencial de mi vida y por ser ustedes quienes me han motivado a crecer emocional y profesionalmente.

A mis *Abuelitos (as) y tíos (as)*, por siempre creer en mí y por brindarme su apoyo incondicional.

Eloino, por estar en todo momento a mi lado y por apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado.

Por último, pero más importante, *GRACIAS A DIOS*, por permitirme llegar hasta donde estoy y por siempre hacerme ver que tus tiempos son perfectos.

DEDICATORIA

*A todos los que siempre han creído en mí y
me han brindado su apoyo, comprensión y cariño.*

En especial a mis padres.

Con cariño y gratitud infinita.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Actinomicetos	11
1.1.1. Requerimientos nutricionales	11
1.2. <i>Streptomyces</i>	12
1.2.1. <i>S. lividans</i> TK24 como hospedero.....	13
1.3. Péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs)	15
1.3.1. Mecanismo de acción de CAMPs.....	16
1.4. Producción heteróloga.....	17
1.4.1. Producción heteróloga de AMPs	18
1.5. Medios de cultivo.....	18
2. ANTECEDENTES.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
4.1. Hipótesis	24
4.2. Objetivo general.....	24
4.3. Objetivos particulares.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Microorganismos empleados	25
5.1.1. <i>Streptomyces lividans</i> TK24 (NCBI: 457428).....	25
5.1.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25
5.2. Medios de cultivo.	26
5.2.1. Medio Phage.....	26
5.2.2. Medio R ₂	26
5.2.3. Medio UP (PGA).....	26
5.2.4. Medio Luria-Bertani (LB)	27
5.2.5. Medio MS	27
5.3. Re-activación de <i>S. lividans</i> TK24-PepB15 a partir de un liofilizado	27
5.4. PCR por colonia.....	28
5.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	29

5.6. Producción y secreción del péptido en el medio extracelular.	29
5.6.1. Actividad antimicrobiana.....	30
5.7. Edad del cultivo	30
5.8. Fermentación con diferentes medios de producción	31
5.8.1. Fraccionamiento por tamaño molecular.....	32
5.9. Fermentación con fuentes de carbono diferentes.....	33
5.10. Fermentación con fuentes de nitrógeno grado industrial.	33
5.11. Fermentación por cultivo semi-continuo.....	34
5.12. Prueba de sensibilidad.....	34
5.13. Pruebas piloto en biorreactor	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Re-activación de la cepa transformante y selección de colonias aisladas	36
6.2. PCR por colonia y electroforesis.....	37
6.3. Evaluación de la edad del cultivo	37
6.4. Ensayos de producción en diferentes medios de cultivo	38
6.5. Fraccionamiento por tamaño molecular.	41
6.6. Sustitución de la fuente de carbono en el medio de producción UP.	42
6.7. Sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio de producción UP.	42
6.8. Efecto de la fuente de carbono sobre la molécula bioactiva	44
6.9. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la molécula bioactiva.....	44
6.10. Pruebas de sensibilidad ante la misma cepa productora.	45
6.11. Pruebas piloto en biorreactor	47
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIÓN	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

RESUMEN

La producción heteróloga de péptidos antimicrobianos (AMPs) actualmente, es una herramienta muy atractiva en procesos industriales; los AMPs son una alternativa prometedora por poseer principalmente actividad antimicrobiana en una amplia gama de microorganismos. Sin embargo, a pesar de este amplio espectro de acción, el cual es debido a su mecanismo de acción, estos no afectan a las células eucarióticas haciéndolos biotecnológicamente atractivos para su producción. En este sentido, los sistemas de expresión heteróloga son utilizados frecuentemente para la producción de moléculas de importancia industrial debido a que pueden alcanzar mayores niveles de producción que la fuente original, sin embargo, los rendimientos de las proteínas recombinantes varían dependiendo de la proteína específica y del sistema de expresión seleccionado.

Actualmente, se ha logrado diseñar un sistema de expresión de un AMP catiónico en *S. lividans* TK24, basado principalmente en el uso de un péptido señal (*vs1*) el cual, mostró ser eficaz para la secreción de grandes cantidades de AMPs. El péptido de interés (PepB15); cuya secuencia es Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala no es tóxico para plantas y animales, tiene una actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos. El interés principal sobre PepB15 es implementarlo contra fitopatógenos en el sector agrícola.

En el presente trabajo se diseñó un medio de cultivo tipo industrial que cumpliera con los factores nutricionales requeridos por la cepa modelo de estudio *S. lividans* TK24 (cepa parental y cepa transformante) en la etapa de producción. El medio de producción UP (DGA) fue el medio probado en la etapa de producción de PepB15 con la cepa transformante, los resultados obtenidos muestran que es un medio que induce

la producción de PepB15 mostrando incluso mayor actividad antimicrobiana que con el medio R₂ (comparación de halos de inhibición) tomado como control positivo. Como control negativo se cultivó a la cepa parental (*S. lividans* TK24).

Para la cepa transformante, se evaluó el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno para la biosíntesis de PepB15 en *S. lividans* TK24-PepB15. Modificar la fuente de carbono no resulta favorable para la producción del péptido ya que se presenta menor actividad si es modificada por glucosa o sacarosa, por otro lado, se observa mayor actividad antimicrobiana al cambiar la fuente de nitrógeno original (triptona) por extracto de levadura grado industrial.

Se realizaron pruebas piloto en biorreactores de 14 L para la producción de PepB15 utilizando medio UP como medio de producción y empleando las siguientes condiciones: aireación 1vvm, agitación de 150 rpm, 30 °C, pH constante de 7 ± 0.2 . Bajo estas condiciones se comprobó actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*.

Se determinó la razón por la cual la producción de PepB15 se detiene y disminuye a determinado tiempo. Con base en los resultados obtenidos al realizar cultivos por lote alimentado, se determinó que la producción de PepB15 disminuye debido a que la cepa hospedera resultó ser sensible a determinadas concentraciones de este péptido presente en el medio extracelular.

Por otro lado, con la cepa parental (*S. lividans* TK24) se obtuvieron resultados totalmente inesperados al realizar bioensayos de actividad, donde se observó actividad antimicrobiana. Para ello, se evaluó el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la expresión de la molécula con actividad antimicrobiana; modificar tanto la fuente de carbono como la fuente de nitrógeno desfavorece la biosíntesis de esta molécula que de forma natural es secretada al medio extracelular utilizando el medio UP sin ninguna modificación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, aerobias facultativas, que se caracterizan por formar filamentos ramificados, su pared celular está compuesta por peptidoglicano y presentan un alto contenido de Guanina y Citosina en su ADN siendo este superior al 55% (Hopwood, 2006). Abarcan una gran proporción de biomasa microbiana presente en el suelo, la mayoría de los actinomicetos usualmente aislados del suelo pertenecen al género de *Streptomyces*, siendo este el género que crece con mayor facilidad en medios sintéticos (Farfán y col., 2009).

Las células de los actinomicetos químicamente están compuestas por un 45% de carbono y un 10% de nitrógeno, el contenido lipídico varía de un 12 a un 65% (Titus y col., 2007).

1.1.1. Requerimientos nutricionales

En términos nutricionales, el suelo conforma uno de los ambientes más complejos y variables, por esta razón los actinomicetos que habitan en él han desarrollado una serie de ciclos biológicos complejos, producción de enzimas extracelulares y metabolitos, los cuales ayudan para su supervivencia (Bentley y col., 2002; Hopwood, 2006). Además, estas bacterias son heterótrofas por lo cual, tienen la capacidad de utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Farfán y col., 2009).

1.2. *Streptomyces*

Los *Streptomyces* son bacterias aerobias estrictas, Gram positivas, que exhiben un ciclo de vida morfológico y fisiológico complejo. Crecen en la superficie de medios simples o complejos formando filamentos ramificados (hifas) aéreos, que poseen cadenas de conídias que no se fragmentan (Hidrín y col., 2001). Son encontrados abundantemente en los suelos donde degradan varios biopolímeros y gran cantidad de materiales orgánicos, su metabolismo y regulación están fuertemente relacionados con este ambiente de suelo rico en carbono, pero con poca disponibilidad de nitrógeno y fósforo (D´Huys y col., 2011). Sus paredes celulares están compuestas de una capa simple de peptidoglicano de cuya organización se considera que facilita la liberación de proteínas al medio extracelular al carecer de membrana externa.

Son considerados un reservorio de productos naturales debido a la amplia variedad de metabolitos que secretan, dentro de los cuales se incluyen: antimicrobianos, antifúngicos, inmunosupresores, enzimas hidrolíticas, inhibidores enzimáticos proteicos, entre otros (Gilbert y col., 1995). Los buenos resultados obtenidos en la producción de proteínas homólogas y algunas heterólogas han estimulado que en los últimos años se hayan realizado considerables investigaciones dirigidas a explotar la habilidad natural de algunas especies de *Streptomyces* capaces de secretar proteínas biológicamente activas con marcada eficiencia (Pimienta y col., 2009).

Actualmente, se han incrementado los estudios reportados que proponen a los *Streptomyces* como hospederos ideales en la producción de proteínas extracelulares. Los péptidos señal son un factor importante en la producción extracelular de proteínas, y están siendo extensamente estudiados (Lammertyn y col., 1998). Existen sistemas de secreción desarrollados para los *Streptomyces* que han sido utilizados exitosamente en la producción de proteínas eucarióticas (Fornwald y col., 1993; Mellaert y col., 1994), lo que hace de los *Streptomyces* muy buenos hospederos en la producción de proteínas heterólogas.

1.2.1. *S. lividans* TK24 como hospedero

Streptomyces lividans TK24 ha sido extensamente utilizada como cepa hospedera debido a que posee relativamente baja actividad de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar la integridad y los rendimientos de las proteínas producidas (Gilbert y col., 1995).

Streptomyces lividans puede secretar proteínas biológicamente activas en cantidades relativamente elevadas que son fácilmente recuperables a partir de medios de fermentación y además es una cepa biológicamente segura (D´Huys y col., 2011).

Para obtener una expresión y secreción eficiente se requiere de una sucesión de eventos coordinados. A continuación, se describen los elementos moleculares más importantes que pueden influir en la capacidad secretora en *S. lividans* TK24.

El vector de clonación juega un papel muy importante para la producción heteróloga, en general, se prefieren plásmidos de alto número de copias, el cual es función del origen de replicación del plásmido. Normalmente el plásmido de expresión contiene un gen que proporciona resistencia a antibiótico, esto permite emplear una presión de selección para asegurar que se cultivan únicamente las células que contienen plásmidos, ya que, debido a efectos de segregación, el plásmido podría perderse y las células libres de plásmido crecerían más rápido (al carecer de la carga metabólica impuesta por el plásmido), desplazando a las células portadoras del mismo, con la consecuente pérdida de productividad (Rozkov y col., 2004). Para *Streptomyces* los plásmidos pueden dividirse en dos clases: plásmidos replicativos y plásmidos integrativos. Los vectores de bajo número de copias por célula, basados en el replicón SLP1.2, así como derivados del plásmido pIJ101, de alto número de copias, se han utilizado en la clonación de genes y *cassete* de expresión-secreción (Pimienta y col., 2009). El plásmido PIJ486, derivado de PIJ101, es un plásmido de expresión para *Streptomyces* de alto número de copias, que contiene un gen de resistencia al

thiostrepton y con un tamaño de 6.2 Kb (Ward y col., 1986).

Generalmente se asume que un alto número de copias del plásmido resulta en un alto número de copias del gen de interés y, por lo tanto, la cantidad de proteína recombinante (PR) producida será mayor cuanto mayor sea el número de copias. Sin embargo, el empleo de plásmidos con alto número de copia también induce una alta carga metabólica para la célula (Lara, 2011).

La elección del promotor también es esencial para un sistema de expresión efectivo, debe ser cuidadosamente seleccionado con el fin de poder regular la intensidad de inducción. Para la expresión de genes heterólogos en *S. lividans*, el promotor nativo generalmente es reemplazado por un promotor eficiente de *Streptomyces* como el promotor *aph* (gen de la aminoglucósido fosfotransferasa de *S. fradiae*), el promotor *ermEp** (promotor mutante del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*), el promotor del gen Tn5 neo (neomicina fosfotransferasa), el promotor *vsj* (del gen inhibidor de la subtilisina en *S. venezuelae* CBS762.70), el promotor de la β -galactosidasa de *S. lividans* (Gilbert y col., 1995). El promotor *vsj* es reportado con una efectiva iniciación de transcripción 1.5 y 1.9 veces mayor que los promotores *aph* y *ermEp*, respectivamente (Pimienta y col., 2009).

Otra herramienta molecular de gran importancia, considerada para facilitar la secreción de proteínas al medio extra celular son los péptidos de señalización, estos tienen como función mediar la translocación de la proteína por el aparato secretor. Después de la translocación de la proteína precursora, el péptido señal es normalmente removido por las peptidasas señales tipo I (SPasas) (Pimienta y col., 2005). Los péptidos señal de *Streptomyces* tienen un promedio de 35.5 ± 7.9 aminoácidos, mientras la longitud promedio de los péptidos señal de otras bacterias Gram-positivas es 29.2 ± 5.6 y los de las bacterias Gram-negativas es 23.6 ± 3.4 aminoácidos. En *S. lividans* la estrategia ha sido fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción *Sec* (Gilbert y col., 1995;

Binnie y col., 1997). Lammertyn y col. (1997) reportan una efectiva secreción de mTNF utilizando el péptido señal *vs1* conformado por 28 aminoácidos que lleva 3 residuos cargados positivamente (dos argininas y una lisina) contenidos en la región amino-terminal.

1.3. Péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs)

Todos los organismos vivos, desde los microorganismos hasta las plantas y animales, han desarrollado mecanismos de defensa propios que les otorgan ventajas frente a los microorganismos presentes en sus nichos ecológicos. Los mecanismos más sofisticados de defensa consisten en la producción de anticuerpos y células asesinas naturales, que reconocen y eliminan invasores específicos, estos componen la denominada Respuesta Inmune Adaptativa (RIA), exclusiva de los vertebrados superiores (Thomma y col., 2002). Existe también la Respuesta Inmune Innata (RII), mucho más antigua y distribuida entre los organismos que, a diferencia de la inmunidad adaptativa, carece de la especificidad de reconocimiento de antígenos, pero es capaz de exhibir actividad diferencial contra diferentes tipos de invasores y es el principal sistema de defensa encontrado en las plantas (Tavares y col., 2008). Los péptidos antimicrobianos son parte esencial de la RII, fungen como primera línea de defensa y actúan como un escudo de moléculas que limita el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos infecciosos y no infecciosos que conviven diariamente con una amplia gama de organismos (Boman, 2000). Actualmente constituyen una alternativa a la difícil situación manifestada por la aparición de resistencias a los antibióticos clásicos.

Los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs, del inglés *cationic antimicrobial peptides*) son moléculas bioactivas de bajo peso molecular lineales o circulares, su tamaño varía entre 12 y 50 aminoácidos, presentan una carga neta positiva y son altamente anfipáticos con extremos hidrofóbicos, estos son pre-requisitos para

interaccionar con las membranas bacterianas cargadas negativamente (Gutiérrez y col., 2003).

1.3.1. Mecanismo de acción de CAMPs

El mecanismo de acción de los CAMPs difiere totalmente al de un antibiótico tradicional, este último actúa como inhibidor específico de enzimas o receptores en las células blanco o en rutas metabólicas importantes. En cambio, la actividad de los CAMPs no está dirigida a blancos celulares, su objetivo es provocar una lisis total o parcial en las membranas (Gutiérrez y col., 2003).

El mecanismo de acción general de los CAMPs (Fig. 1) se describe a continuación:

1. *Atracción*: interacción péptido-membrana por medio de uniones electrostáticas entre los péptidos catiónicos y las estructuras de la superficie bacteriana, por ejemplo, de los grupos fosfato presentes en la membrana (fosfato de los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas, o ácidos lipoteicoicos presentes en la superficie de bacterias Gram-positivas (Hancock, 1997).
2. *Adhesión*: a baja relación péptido-lípido, los péptidos son orientados hacia el centro del poro, atrapando agua se unen paralelamente a la bicapa lipídica quedando en un estado inactivo (Chen y col., 2003).
3. *Inserción y permeabilización*: al incrementar la relación péptido-lípido, los péptidos se orientan perpendicularmente a la membrana, formando poros transmembranales (Yang y col., 2001) o bien desorganizándola y formando micelas.

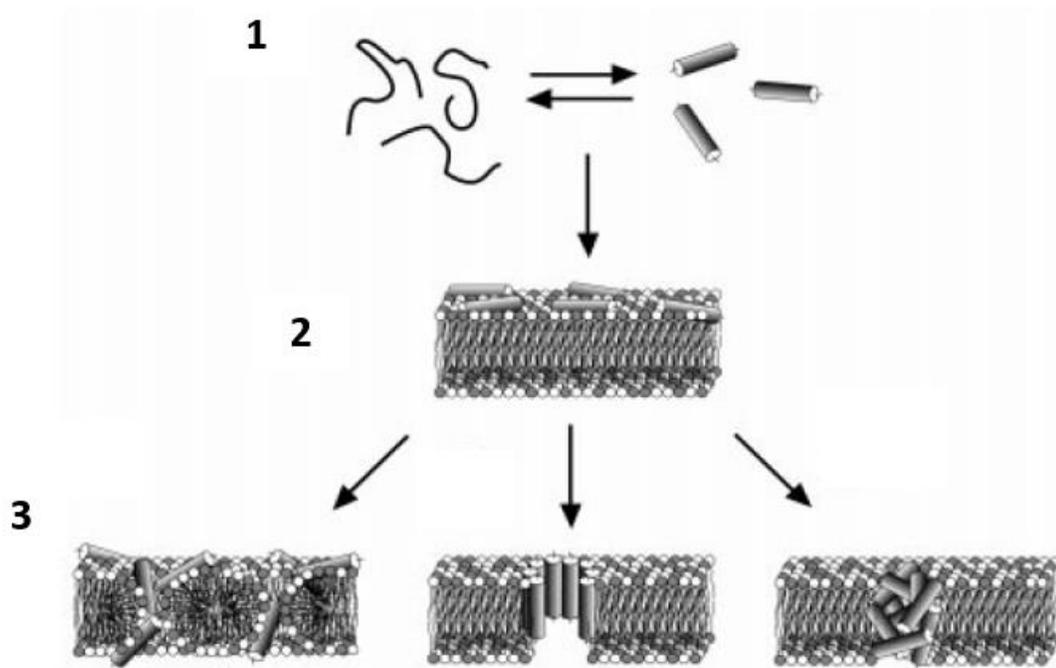


Figura 1. Mecanismo de acción general de péptidos antimicrobianos 1. Atracción, 2. Adhesión, 3. Inserción y permeabilización (Gutiérrez y col., 2003).

1.4. Producción heteróloga

La tecnología del ADN recombinante juega un papel muy importante en la biotecnología, estos avances han permitido obtener la sobre expresión de moléculas de interés tales como proteínas, péptidos antimicrobianos, metabolitos secundarios, entre otras. Muchas de estas moléculas se encuentran de forma natural en el ambiente, pero en bajas concentraciones (Guerrero y col., 2004), sin embargo, con la manipulación de genes se han logrado obtener en grandes cantidades. Se considera producción heteróloga a aquella molécula cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo.

El desarrollo de bioprocesos con organismos recombinantes ofrece una amplia gama de posibilidades para la producción de moléculas nativas o modificadas con nuevas y mejores propiedades (Guerrero y col., 2004).

1.4.1. Producción heteróloga de AMPs

La producción heteróloga de péptidos antimicrobianos (AMP) actualmente es una herramienta muy atractiva en procesos industriales, sin embargo, para lograr una eficiente producción, se deben diseñar y construir sistemas de expresión adecuados conformados por un organismo hospedero y un vector de expresión que contenga el gen o fragmento de interés, así como los elementos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero.

1.5. Medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos. Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos, ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos. Por otro lado, las condiciones de cultivo tales como la composición del medio, el oxígeno disponible, la temperatura y la agitación deben ser optimizadas ya que tienen un impacto significativo en la producción de proteínas.

La selección del medio depende del tipo de microorganismo empleado y del producto que se desea obtener, también depende de la etapa del proceso en el que se desea utilizar. Si lo que se desea es producir biomasa, se debe emplear un medio de cultivo que incentive la reproducción del microorganismo, pero si el objetivo o etapa del proceso de fermentación es la producción de moléculas bioactivas, el medio de cultivo debe tener los componentes que promuevan su producción (Hernández y col., 2003). Los principales componentes incluyen la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, y magnesio. Algunos microorganismos requieren de cofactores enzimáticos como Mb, Co, Ni, Fe, Ca, Cu, Mn, entre otros. Los factores de crecimiento como la tiamina también son necesarios para un adecuado crecimiento (Lara, 2011).

El constituyente principal de los microorganismos es el carbono con aproximadamente 50% de peso seco de su material celular, por lo que en todo medio de cultivo debe existir un sustrato que proporcione el esqueleto carbonado básico para la síntesis de las unidades estructurales que dan origen a las macromoléculas y estructuras de la célula. Las fuentes de carbono más comunes, considerando el aspecto económico son melazas de caña y de remolacha, granos de cereales, almidón, sacarosa, lactosa, glucosa, glicerol (Hernández y col., 2003).

La velocidad con la que se metaboliza la fuente de carbono puede influenciar la formación de biomasa y el o los productos de interés. De esta manera también reportan que, si hay azúcares fácilmente metabolizables se da un rápido crecimiento celular, pero hay baja productividad de metabolitos secundarios, sin embargo, esto no se generaliza, ya que depende del tipo de microorganismo.

Por otro lado, el nitrógeno es el segundo elemento más importante en la composición de los microorganismos. Los requerimientos orgánicos de nitrógeno son relativamente caros, por lo que a veces se trata de encontrar la satisfacción de esta demanda en subproductos industriales (suero de leche) o en productos más baratos (extracto de levadura, extracto de carne, soya), los cuales además de la fuente de nitrógeno aportan algunos factores del crecimiento que se requieren en cantidades muy reducidas (Konstantin y col., 1990). Sin embargo, por ser extractos de origen natural su composición química no está del todo definida.

Diversos estudios que utilizan diferentes fuentes de carbono y/o condiciones de cultivo para procesos de producción de proteínas nativas o heterólogas en *Streptomyces* reportan diferencias significativas en los rendimientos de crecimiento y producción. Con esto, se presume que las condiciones de crecimiento ejercen una regulación sobre los genes de las proteínas secretadas. En otros estudios se reporta que los medios utilizados para la producción de proteínas heterólogas en cepas de *Streptomyces*, y también para otros microorganismos, son típicamente medios enriquecidos que

contienen cantidades suficientes de aminoácidos (Pozidis y col., 2001; Görgens y col., 2005).

2. ANTECEDENTES

Existen diversos reportes sobre la producción heteróloga de péptidos antimicrobianos con sistemas de expresión biológicos, por ejemplo, la producción de defensinas humanas en *E. coli* (Xu y col., 2005), la producción de Bacteriocina, Enterocina A y Bacteriocina E 50-52 en *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis* respectivamente (Jiménez y col. 2014). Sin embargo, la mayoría de estos sistemas tienen sus limitaciones, tales como los bajos rendimientos debidos a la autotoxicidad sobre la cepa productora o la proteólisis de la proteína de fusión que enmascaran sus propiedades tóxicas. Existen otros sistemas de la exitosa expresión de híbridos recombinantes, como es el caso del péptido Cecropina A(1-8)-Magainina 2(1-12) en *Pichia pastoris* (Fengliang y col. 2006), concatémicos como la Buforina II en *E. coli* y Enterocina P-Sakacina A (Jiménez y col. 2013), con estos sistemas se ha evitado la letalidad del hospedero al enmascarar la actividad antimicrobiana intrínseca del péptido bioactivo.

Actualmente, se ha logrado diseñar un sistema de producción de un AMP catiónico en *S. lividans*, basado en el uso de un péptido señal (*vs*) el cual, mostró ser eficaz para la secreción de grandes cantidades de CAMPs. El péptido de interés seleccionado no es tóxico para plantas y animales, tiene una actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos, es un péptido basado en un fragmento de Lactoferricin B (Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Glu-Ala) en la cual se ha sustituido un ácido Glutámico por Alanina en la posición 14 de la secuencia original. Para el *cassette* de expresión utilizaron los codones preferenciales para *S. lividans* TK24 con G y C en la tercera posición (figura 2). El vector de clonación utilizado es PIJ486 en donde fue insertado el péptido de interés unido al promotor (*vs*) y la secuencia señal (*vs*) del inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70. Este vector se deriva del plásmido pIJ101 que incluye una secuencia terminadora de la transcripción y un marcador de resistencia a thioestrepton. En cuanto a la cepa de producción (*S. lividans* TK24), no

posee un espacio periplásmico. Esto facilita que las proteínas producidas se secreten en el medio de crecimiento, lo que simplifica su plegado, purificación y actividad adecuada (Roldan y col., 2017).

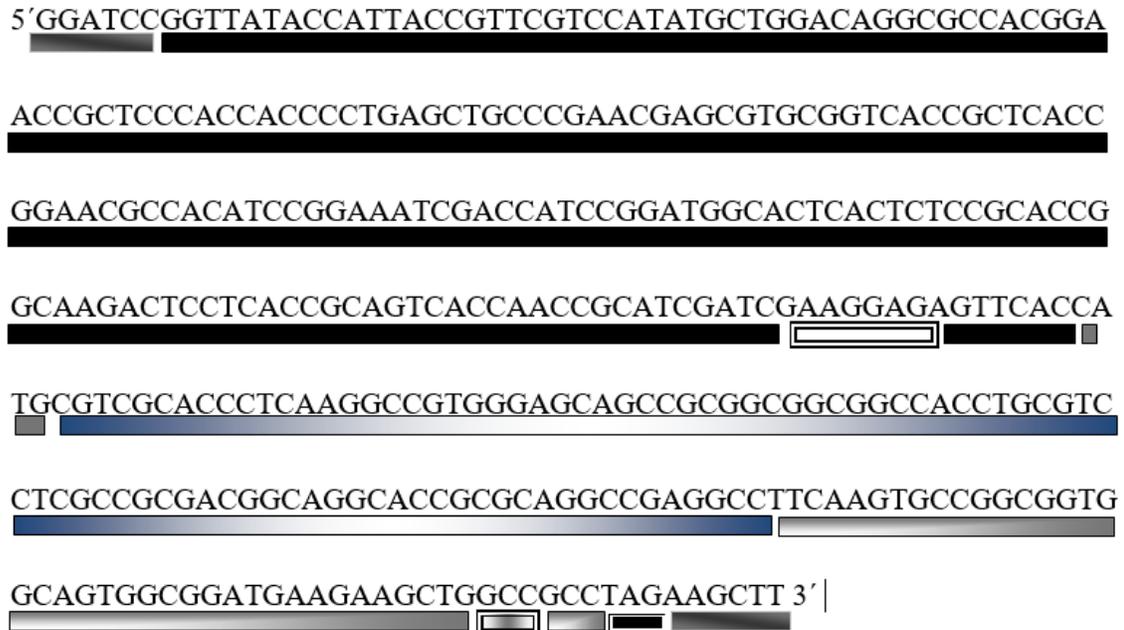


Figure 2. Cassette de expresión para *S. lividans* TK24. ■ Sitio de restricción, ■ Promotor, □ Secuencia de Shine-Dalgarno, ■ Codón de inicio, ■ Peptido señal, □ Péptido de interés, □ Aminoácido modificado, ■ Codón de paro. (Roldán y col., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de productos químicos como fungicidas y pesticidas en el control de enfermedades causadas en plantas genera efectos perjudiciales para el medio ambiente y los seres humanos, además, actualmente el uso excesivo de estos productos está generando la resistencia de patógenos.

Los péptidos antimicrobianos son componentes naturales de la respuesta inmune de los organismos y poseen un amplio rango de actividad contra microorganismos patógenos, a pesar de que combaten un amplio espectro de microorganismos, debido a su mecanismo de acción, no afectan a las células eucarióticas. Su aplicación bactericida resulta prometedora para la agricultura como alternativa a la creciente generación de resistencia a los antibióticos comunes.

Una estrategia para producir un péptido con actividad antimicrobiana se presenta sobre la base de la construcción de un *cassette* de expresión de *S. lividans* TK24. Con el uso de este sistema de expresión para la producción de AMPs, es posible implementarlo en la industria para controlar fitopatógenos en el sector agrícola a un bajo costo. En este trabajo, se pretende encontrar un medio de cultivo para la producción de PepB15 y evaluar sus componentes con la finalidad de eventualmente poderlos sustituir y pensar en un proceso más rentable.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Es posible producir un péptido heterólogo en *S. lividans* TK24 a escala semi-piloto, en un medio de cultivo con componentes grado industrial.

4.2. Objetivo general

Obtener un medio de cultivo tipo industrial para la producción heteróloga en *S. lividans* TK24 de un péptido con actividad antimicrobiana y evaluar el efecto sus componentes.

4.3. Objetivos particulares

1. Comprobar que la cepa transformante conserve el *cassette* de expresión que contiene al péptido de interés.
2. Determinar los componentes del medio de cultivo tipo industrial que más impactan la producción del péptido.
3. Evaluar el efecto de los componentes del medio de cultivo al sustituirlos por componentes de grado industrial.
4. Establecer las condiciones de operación tanto de cultivos semilla como de producción, las cuales incluyen calidad de inóculo, agitación, temperatura, edad.
5. Realizar pruebas piloto en biorreactor de 14 L.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos empleados

5.1.1. *Streptomyces lividans* TK24 (NCBI: 457428)

Esta cepa es un hospedero estándar para la expresión heteróloga de un gran número de proteínas y enzimas de síntesis de antibióticos (Rückert y col., 2015). En este estudio se usan 2 cepas: (i) *S. lividans* TK24, denominada cepa parental, (ii) *S. lividans* TK24-PepB15 denominada cepa transformante productora del péptido de interés (PepB15).

La cepa *S. lividans* TK24-PepB15 contiene el plásmido PIJ486 en el que PepB15 se expresa a través del promotor fuerte (*vsI*) y un péptido señal (*vsI*), ambos elementos del gen inhibidor de la subtilisina en *Streptomyces venezuelae* (Roldan y col., 2017).

El stock de ambas cepas se conservó de dos formas: liofilizados a temperatura ambiente y en suspensión de esporas (cepa parental) y suspensión de micelio (cepa transformante) en glicerol al 40 % v/v a -20 °C.

Las suspensiones de esporas y micelio respectivamente, se obtuvieron a partir de un cultivo en medio Phage durante 48 h a 30 °C y 150 rpm. Para la cepa transformante se utilizó thioestrepton a una concentración final de 50 µg/mL en el medio de cultivo para asegurar el mantenimiento del plásmido PIJ486.

5.1.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Es el microorganismo sensible utilizado para medir la actividad antimicrobiana del péptido de interés. Se conservó en suspensión de micelio con glicerol al 40 % v/v a congelación de -20 °C. El stock se obtuvo de un cultivo en medio LB a 30 °C con agitación de 220 rpm durante 16 h.

5.2. Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados se expresa en gramos por litro de agua destilada. Todos los medios se esterilizaron a 121°C durante 18 minutos.

5.2.1. Medio Phage

Medio utilizado para el crecimiento de *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24-PepB15: 0.5 g de MgSO₄.7H₂O, 0.74 g de CaCl₂.2H₂O, 10 g de Glucosa, 5 g de triptona, 5 g de Extracto de levadura, 5 g de Lab Lemco *powder*. Se ajustó el pH a 7.2.

5.2.2. Medio R₂

Medio utilizado para *S. lividans* TK24-PepB15 como control positivo en la etapa de producción de PepB15:

103 g de Sacarosa, 0.25 g de K₂SO₄, 10.12 g de MgCl₂.6H₂O, 10 g de Glucosa, 0.1 g de casaminoácidos, 1 g de Extracto de levadura, 5 g de Lab Lemco *powder*, 100 mL de TES (pH 7.7, 0.25 M), 10 mL de KH₂PO₄ (0.5 %), 200 µL de solución de elementos traza.

El medio se suplementa con CuSO₄.5H₂O (2 mM-1/100) y CaCl₂.2H₂O 36.8 % (1/100), antes de usarse.

5.2.2.1. Solución de elementos traza (1 L)

40 mg de ZnCl₂, 200 mg de FeCl₃.6H₂O, 10 mg CuCl₂.2H₂O, 10 mg de MnCl₂.4H₂O, 10 mg de Na₂B₄O₇.10H₂O, 10 mg de (NH₄)₆ MO₇O₂₄.4H₂O.

5.2.3. Medio UP (PGA)

Se empleó para *S. lividans* TK24-PepB15 como medio de producción de PepB15 y para *S. lividans* TK24 como control negativo sobre la producción de PepB15:

5 g de bacto triptona (BD), 10 g de glicerol. Se ajustó el pH a 7.0±0.2.

5.2.4. Medio Luria-Bertani (LB)

El medio LB se utilizó para cultivar a *B. subtilis*:

5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura. Se ajustó el pH a 7.0.

5.2.4.1. Medio LB suave

El medio LB suave fue empleado para realizar los bioensayos de actividad antimicrobiana por efecto del péptido de interés:

5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura. Se ajustó el pH a 7.0 y adicionar 10 g de agar bacteriológico.

5.2.5. Medio MS

Medio utilizado para la esporulación y formación de micelio en *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24-PepB15, respectivamente:

20 g de Manitol, 20 g de harina de soya, 20 g de agar bacteriológico, 1 L de H₂O destilada.

5.3. Re-activación de *S. lividans* TK24-PepB15 a partir de un liofilizado

La primera etapa de este proyecto fue dedicada a comprobar que la cepa transformante aun mantuviera el plásmido PIJ486 y a su vez el *cassete* de expresión que contiene al péptido de interés (PepB15).

Se partió de un liofilizado de *S. lividans* TK24-PepB15 que fue preparado con 0.5 mL de medio Phage durante 30 min en área estéril, una vez obtenida esa suspensión se inocularon 500 µL en 50 mL medio Phage líquido con thioestrepton (50 µg/mL) bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 200 rpm, 96 horas. Después de obtener el cultivo de *S. lividans* TK24-PepB15, se prepararon cajas de Petri con 30 mL de medio MS con thioestrepton (50 µg/mL) que fueron inoculadas con 50 µL del cultivo por el método de

estría para obtener colonias aisladas, fueron llevadas a incubación a 30 °C durante 12 días. Se seleccionaron todas las colonias que presentaron la morfología que caracteriza a *S. lividans* TK24 y cada una fue resembrada en medio MS con thioestrepton (50 µg/mL), ahora con la finalidad de obtener un césped homogéneo en toda la caja. Se mantuvieron en incubación a 30 °C, durante 12 días y fueron colectadas en *Tween* 80 (0.01 % v/v) y glicerol (80 % v/v), relación 1:1. Los stock de las colonias fueron conservados en congelación a -20 °C.

Para realizar los bioensayos por cobertera de cada una de las colonias seleccionadas, se prepararon cajas de Petri con medio R₂ agar, suplementadas con CuSO₄·5H₂O (2 mM-1/100) y CaCl₂·2H₂O 36.8 % (1/100) y se agregaron volúmenes de 20 µL, 40 µL, 50 µL del stock de cada colonia, se incubaron a 30 °C durante 12 días, hasta ver un crecimiento adecuado para agregar una cubierta de medio LB suave embebido con *Bacillus subtilis* (D.O.1), cultivo previo a 37 °C en medio LB líquido, 200 rpm, durante 16 h. Los bioensayos por cobertera fueron incubados a 30 °C por 16 h.

5.4. PCR por colonia

Para comprobar que el cassette de expresión se encontraba en la cepa modificada, se realizó un PCR de colonia. Las condiciones de esta técnica fueron estandarizadas (tabla 1), así como los componentes, las concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción (tabla 2). Se utilizó Di-metil sulfóxido (DMSO) en la preparación de la mezcla de reacción debido a que *S. lividans* posee una alta cantidad triples enlaces por tener un mayor porcentaje de G y C en su genoma.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 °C	15 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Anillamiento	64 °C	1 min	30
Elongación	72 °C	3 min	
Extensión	72 °C	5 min	1
Volumen total		25 µL	

Tabla 1. Condiciones estándar de la reacción para la amplificación del *cassete* de expresión.

Componentes	Volumen	Concentración Final
Master Mix	12.5 µL	1X
Primer FW	2.5 µL	10 µM
Primer RV	2.5µL	10 µM
DMSO	2.5 µL	Concentrado
ADN	1 colonia	---
Agua libre de nucleasas	5 µL	N.A.
Volumen total		25 µL

Tabla 2. Composición general de la mezcla de reacción para la amplificación del *cassete* de expresión.

5.5. Electroforesis en gel de agarosa

El resultado obtenido por PCR fue analizado con una electroforesis en gel de agarosa preparado con 30 mL de tampón TAE (1X) y agarosa al 1.7 % p/v, las muestras de ADN (4 µL) se mezclaron con 2 µL de tampón de carga y gel red. La electroforesis se desarrolló con un voltaje de 80 V, durante 90 min a 4 °C. Finalizada la electroforesis, las bandas de ADN de revelaron en un transiluminador.

5.6. Producción y secreción del péptido en el medio extracelular.

Con la finalidad de comprobar que el péptido producido por la cepa transformante era secretado de forma natural al medio extracelular en fermentaciones liquidas se realizó

el proceso de producción descrito por Roldán (2017), dividido en 3 etapas (tabla 3) y, enseguida se realizaron antibiogramas por el método de difusión en pozos para probar actividad inhibitoria.

Tabla 3. Etapas del proceso de producción de PepB15 reportado por Roldán (2017).

Etapa	Proceso	Medio de cultivo (líquido)
1	Pre-cultivo	Phage
2	Cultivo semilla	Phage
3	Producción	R ₂

5.6.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó empleando el método de difusión en pozos. Se prepararon cajas de Petri cuadradas con 250 mL de medio LB suave, embebido con una 25 µL de *B. subtilis* (DO1) previamente cultivado, una vez gelificado el medio LB, fue perforado con ayuda de un sacabocado estéril. En cada pozo se agregaron 200 µL del sobrenadante obtenido en los diferentes tiempos de muestreo, se tomó como control negativo un pozo con 200 µL de medio R₂ líquido. Las cajas preparadas fueron llevadas a refrigeración (4 °C) durante 30 minutos y luego se incubaron a 30 °C durante 16 h.

5.7. Edad del cultivo

El objetivo de este experimento fue obtener calidad y cantidad de inóculo adecuado para obtener una mayor producción del péptido de interés. Se consideraron los siguientes tiempos de incubación en esta etapa (1): 48, 72 y 96 h. Se agregaron 50 mL de medio Phage enriquecido con thioestrepton (50 µg/mL) y 30 µL del stock de la cepa transformante, en matraces bafleados de 250 mL bajo las siguientes condiciones: 150 rpm, 30 °C. Transcurridos los respectivos tiempos, se inoculó 1 g de biomasa de cada cultivo en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio Phage y thioestrepton

durante 48 h, 150 rpm, 30 °C. En la etapa 3 de producción se inocularon 5 mL del cultivo en 100 mL de medio R₂ suplementado con CuSO₄·5H₂O (2 mM-1/1000) y CaCl₂·2H₂O 36,8 % (1/100), esta etapa se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 150 rpm, 30 °C, 15 días. Se muestreó cada 24 h para hacer cinéticas de actividad y cuantificación de biomasa con el sobrenadante de la muestra tomada.

5.8. Fermentación con diferentes medios de producción

El medio de producción reportado para la producción del péptido de interés es un medio (complejo) de nivel laboratorio, sin embargo, en un proceso industrial, este medio sería de alto costo, por esta razón se procedió a realizar ensayos con un medio de producción nuevo que cumpliera con los requerimientos nutrimentales básicos para el desarrollo de *S. lividans* TK24. Se ha reportado que los medios para la producción de proteínas recombinantes en *Streptomyces* son típicamente formulados con aminoácidos y una fuente de carbono sencilla (D'Huys y col., 2011). El medio de producción que se eligió probar para la producción del péptido fue el medio UP compuesto por bacto triptona y glicerol.

Las fermentaciones se realizaron siguiendo la metodología reportada por Roldan (2017), con medio de producción R₂ como control y medio UP como nueva variable de respuesta.

Para el pre-inóculo se agregó una alícuota de 30 µL del stock de *S. lividans* TK24-PepB15 en 50 mL de medio Phage con thioestrepton (50 µg/mL) en matraces bafleados de 250 mL, bajo las siguientes condiciones: 150 rpm, 30 °C, 72 h. Posteriormente, se colectó 1 g de biomasa obtenida por centrifugación (16,684 x g, 10 min), se le realizaron dos lavados con agua destilada estéril y luego fue transferida en 50 mL de medio Phage fresco e incubada a 30 °C con agitación constante de 150 rpm durante 48 h. Para la etapa de producción se tomaron 5 mL del cultivo y se separó la biomasa del sobrenadante aplicando vacío, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril

para obtener sólo la biomasa, la cual fue inoculada en los respectivos medios de producción; las condiciones de esta etapa fueron 150 rpm, 30°C, 15 días. Este experimento se realizó por duplicado. Como control negativo se consideró el mismo procedimiento con *S. lividans* TK24. Se muestreo cada 24 h para hacer cinéticas de actividad con el sobrenadante y biomasa (peso seco) de las muestras tomadas. La actividad antimicrobiana se determinó empleando el método descrito en el apartado 5.6.1.

5.8.1. Fraccionamiento por tamaño molecular

Para comprobar que la actividad inhibitoria era debido al péptido de interés y no a algún metabolito y/o proteína con actividad antimicrobiana, se realizó un fraccionamiento molecular mediante ultrafiltración en tubos Amicon® de diferentes cortes de tamaño molecular (NMWL, *Nominal Molecular Weight Limit*): 30 KDa, 10 KDa y 3 KDa, en una centrifuga BECKMAN COULTER J6-MI, rotor JA-14.

El sobrenadante libre de biomasa de un cultivo de 48 h fue llevado a los tubos Amicon® de 30 KDa y centrifugado a $6,021 \times g$ durante 10 min, se colectó la fracción que no pasó por la membrana y la fracción que pasó por la membrana fue llevada al tubo Amicon® de 10 KDa y centrifugada a $6,021 \times g$ durante 12 min, nuevamente la fracción que no pasó por la membrana fue colectada en microtubos y la fracción de menor peso fue llevada al tubo de 3 KDa, centrifugando nuevamente a $6,021 \times g$ durante 10 min.

Estas fracciones se utilizaron para realizar ensayos de actividad inhibitoria por el método de difusión en pozos (5.6.1), se utilizaron 200 µL de cada fracción que fueron agregados en cada pozo, como microorganismo indicador se utilizó 25 µL de un cultivo de *B. subtilis* (DO1).

5.9. Fermentación con fuentes de carbono diferentes

Una vez realizados los bioensayos se procedió a probar el mismo medio de producción UP cambiando la fuente de carbono. Se probaron 2 fuentes de carbono nuevas: Sacarosa y glucosa (sólida). Como control positivo, la fuente original del medio UP: glicerol.

El proceso y las condiciones que se utilizaron con cada uno de los medios modificados fueron las mismas que se han utilizado en fermentaciones anteriores. Se muestreó cada 24 h para hacer cinéticas de actividad y cuantificación de biomasa por peso seco. La actividad antimicrobiana se determinó empleando el método descrito en el apartado 5.6.1.

5.10. Fermentación con fuentes de nitrógeno grado industrial.

El uso de bacto triptona (BD Difco) en un proceso a nivel industrial resulta poco rentable debido a que el costo de este componente es elevado, por ello, se procedió a probar algunas variantes grado industrial que cumplieran las características que contiene este componente.

La bacto triptona es un digerido de aminoácidos, actúa como fuente de nitrógeno en el medio de producción; los componentes que se probaron con la finalidad de sustituir la fuente de nitrógeno en el medio son:

1. Bio proteína
2. Suero de leche
3. Extracto de levadura
4. Glúten de maíz
5. Harina de soya

Estos componentes fueron otorgados por la empresa mexicana Química Agronómica de México, S. de R.L. de C.V. dedicada a la producción de productos que actúan contra enfermedades bacterianas y fúngicas en cultivos agrícolas. El proceso se realizó con

la misma metodología del proceso original, sólo cambiando al medio de producción UP la fuente de nitrógeno experimentada; se utilizó como control positivo el medio UP normal. Todos los medios modificados fueron ajustados a un pH de 7.2 al inicio de la producción y durante la etapa de producción fue monitoreado cada 24 h. Se realizó un muestreo cada 24 h durante 5 días para realizar ensayos de actividad.

5.11. Fermentación por cultivo semi-continuo

Para determinar si la disminución del rendimiento del péptido se debía a la escasez de nutrientes en el medio de producción, se realizó un cultivo semi-continuo a nivel matraz.

El sobrenadante (medio de cultivo UP) fue removido cada 24 h por filtración rápida, agregándole el mismo volumen de medio UP fresco:

1. Volumen de sobrenadante retirado: 20, 40, 60, 80 mL.
2. Volumen de medio UP fresco agregado: 20, 40, 60, 80 mL respectivamente.

5.12. Prueba de sensibilidad

Con la finalidad de encontrar el motivo por el cual los rendimientos de la actividad del péptido disminuían a través del tiempo se realizó una prueba de sensibilidad contra su propio hospedero *S. lividans* TK24.

En este ensayo de actividad se prepararon cajas de Petri con 30 mL de medio Phage agar (1 %), donde *S. lividans* TK24 (DO1) fue embebida a diferentes diluciones (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Luego, con un sacabocado estéril se hicieron pozos en el centro de cada caja donde fueron agregados 200 μ L de sobrenadante libre de biomasa (PepB15). Las cajas fueron llevadas a incubación a 30 °C durante 20 h.

5.13. Pruebas piloto en biorreactor

Se inoculó una alícuota de 30 μ L del stock de la cepa transformante en 50 mL de medio Phage con thiostrepton (50 μ g/mL) en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL y se incubaron por 72 h con agitación constante de 150 rpm a 30 °C. Posteriormente la biomasa obtenida por centrifugación (12,600 \times g, 15 °C, 30 min), fue lavada 2 veces con agua destilada estéril y transferida a un matraz bafleado de 500 mL que contenía 200 mL de medio Phage, se incubó por 48 h, a 150 rpm, 30 °C. Transcurrido el tiempo se colectaron 40 g de biomasa que nuevamente fue lavada y obtenida por centrifugación, la biomasa fue resuspendida en 50 mL de medio UP y transferida a una cubeta de reactor previamente preparada con 4.5 L de medio UP, todo bajo condiciones estériles. El biorreactor fue monitoreado durante 96 horas bajo las siguientes condiciones: T= 30 °C, agitación constante de 150 rpm, 1 vvm de aeración, el pH fue mantenido en 7 ± 0.2 utilizando NaOH (10 M). Dichas pruebas se realizaron en la empresa Química Agronómica de México, S. de R.L. de C.V. en la ciudad de Chihuahua, Chih., en un biorreactor marca BioFlo 310 de 14 L.

6. RESULTADOS

6.1. Re-activación de la cepa transformante y selección de colonias aisladas

Después de re-activar la cepa transformante partiendo de un liofilizado, se seleccionaron 30 colonias aisladas, que presentaron morfología característica de *S. lividans* TK24 en medio sólido, estas colonias fueron resembradas por separado en cajas de Petri con 30 mL de medio MS embebidas con thiostrepton (50 µg/mL) y fueron conservadas en glicerol al 80 % v/v y *tween* 80 al 0.1 % v/v.

De las 30 colonias obtenidas se realizaron bioensayos por cobertera como segundo criterio de selección de la conservación del *cassete* de expresión (expresión de PepB15) en la cepa transformante. Se obtuvo que, 7 de las 30 colonias presentaron actividad inhibitoria contra el microorganismo indicador embebido en la cobertera de medio LB suave.

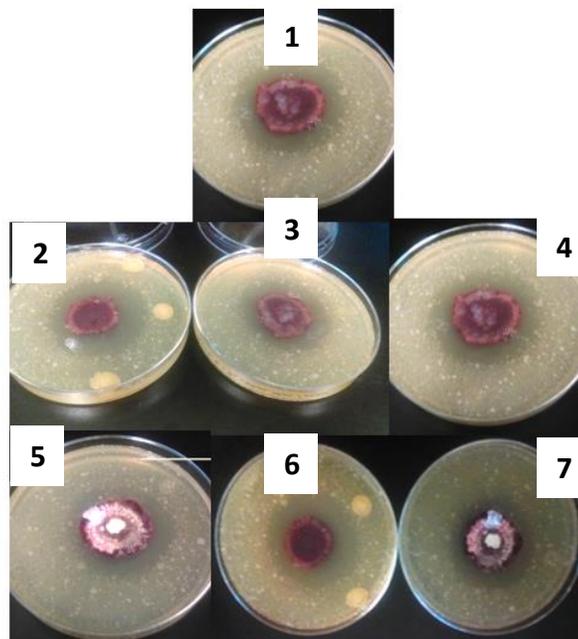


Figura 3 . Bioensayos por cobertera. Inhibición de crecimiento radial de *B. subtilis* (colonia 1: pep12A-5, colonia 2: pep12A-6, colonia 3: pep12A-9, colonia 4: pep12A-15, colonia 5: pep12B-6, colonia 6: pep12C-4, colonia 7: pep12C-5).

6.2. PCR por colonia y electroforesis

Una vez seleccionadas las colonias que presentaron la actividad antimicrobiana se procedió a realizar un PCR de colonia como otro método de selección para comprobar que el *cassete* de expresión estuviera insertado en la cepa transformante. Se utilizaron *primers* específicos reportados por Roldan y col. (2017), estos *primers* flanquean el sitio de clonación múltiple del vector PIJ486 donde fue insertado el *cassete* de expresión.

En la figura 4, se observa que en las dos colonias a las que se les realizó PCR seleccionadas al azar de las 7 que presentaron actividad, la región amplificada corresponde a un tamaño de banda localizada entre 500 y 750 pb, considerando que, el *cassete* de expresión es de 684 pb aseguramos que efectivamente las bandas corresponden al peso del inserto.

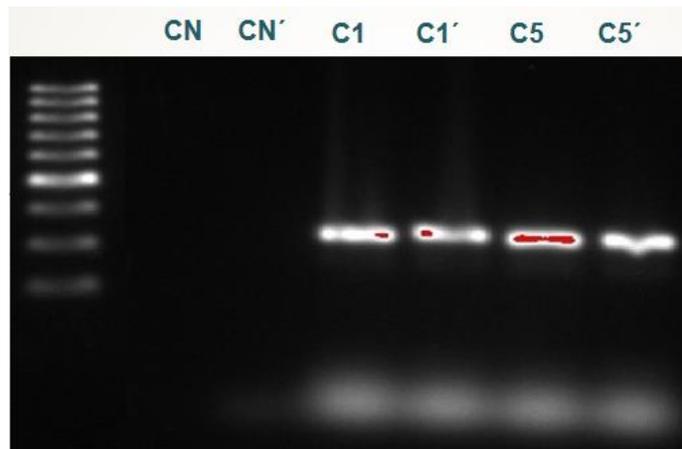
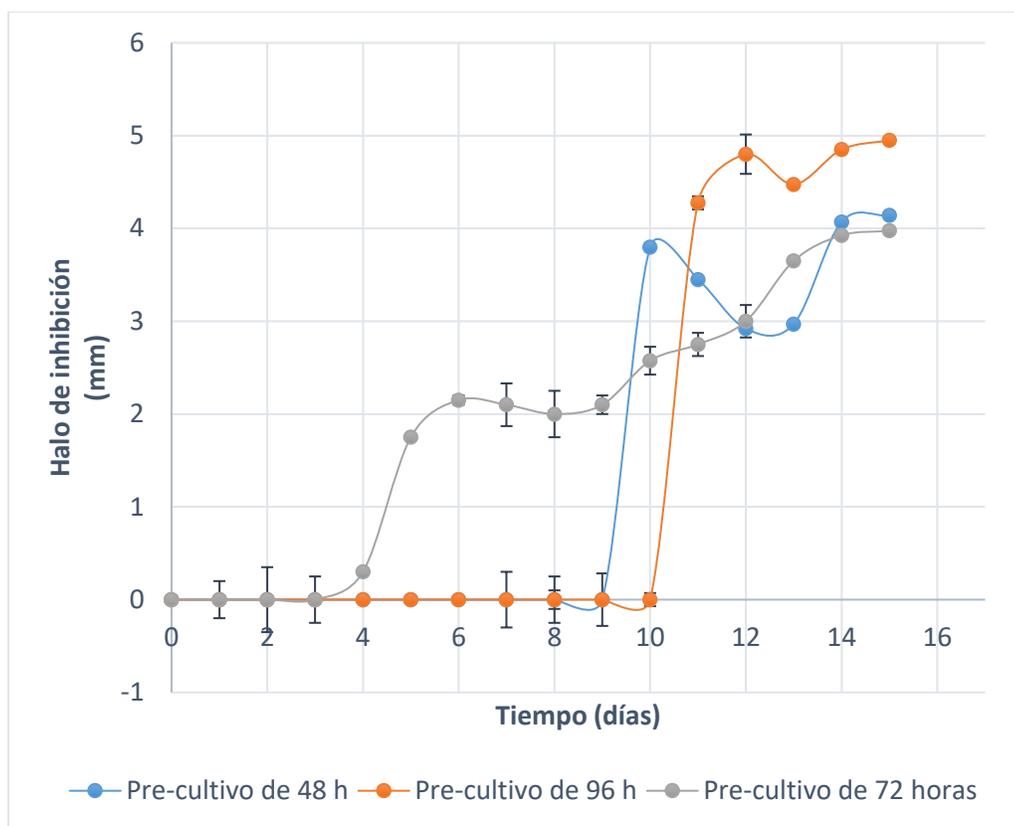


Figura 4. PCR de colonia realizado a muestras de las colonias **1: PepA-5** y **5: PepB-6**, se pueden apreciar las bandas correspondientes al tamaño del *cassete* de expresión (684 pb) y la muestra de cepa parental como control (CN).

6.3. Evaluación de la edad del cultivo

Se realizaron cinéticas de la actividad del péptido a través del tiempo de producción para determinar con qué edad de inóculo en el cultivo se obtenía una mayor actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la medición del diámetro del halo de inhibición que se llevó a cabo por el método de difusión en pozo del sobrenadante libre de biomasa (PepB15), obtenido en la etapa de producción del cultivo.



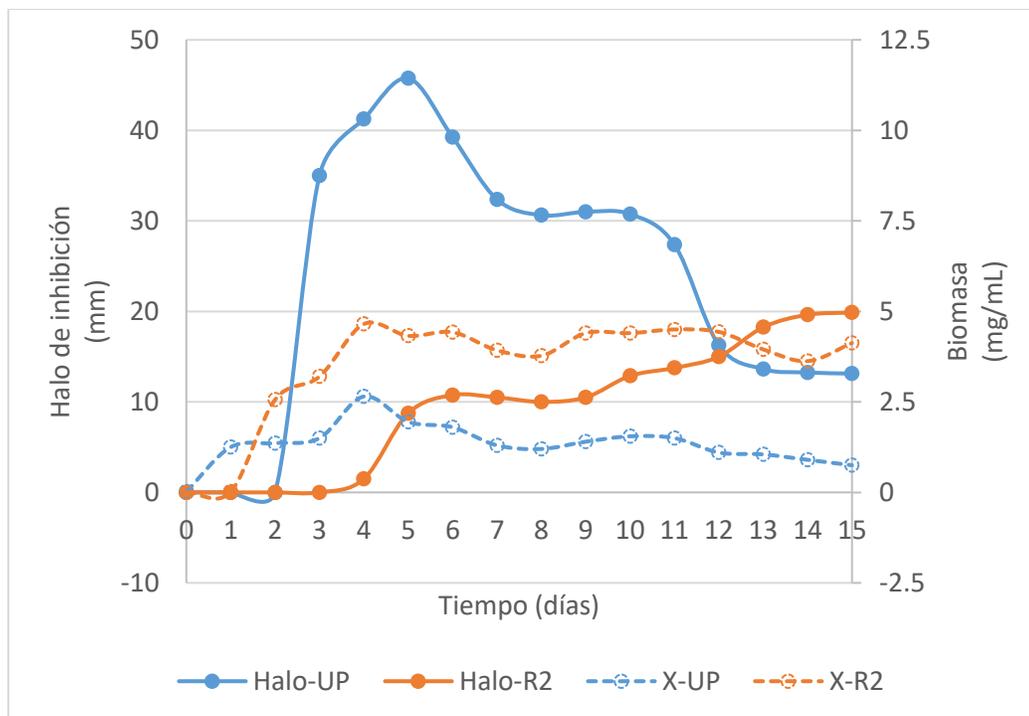
Gráfica 1. Cinéticas de actividad de PepB-15 a diferentes edades de cultivo (48, 72 y 96 h).

El pre-cultivo de 72 h presentó una producción temprana con respecto a los tiempos de crecimiento de 24 y 96 h, es decir, la actividad antimicrobiana del péptido con el pre-cultivo de 24 y 96 h se presentó hasta el día 9, mientras que con el pre-cultivo de 72 h presentó actividad desde el día 4 de fermentación.

6.4. Ensayos de producción en diferentes medios de cultivo

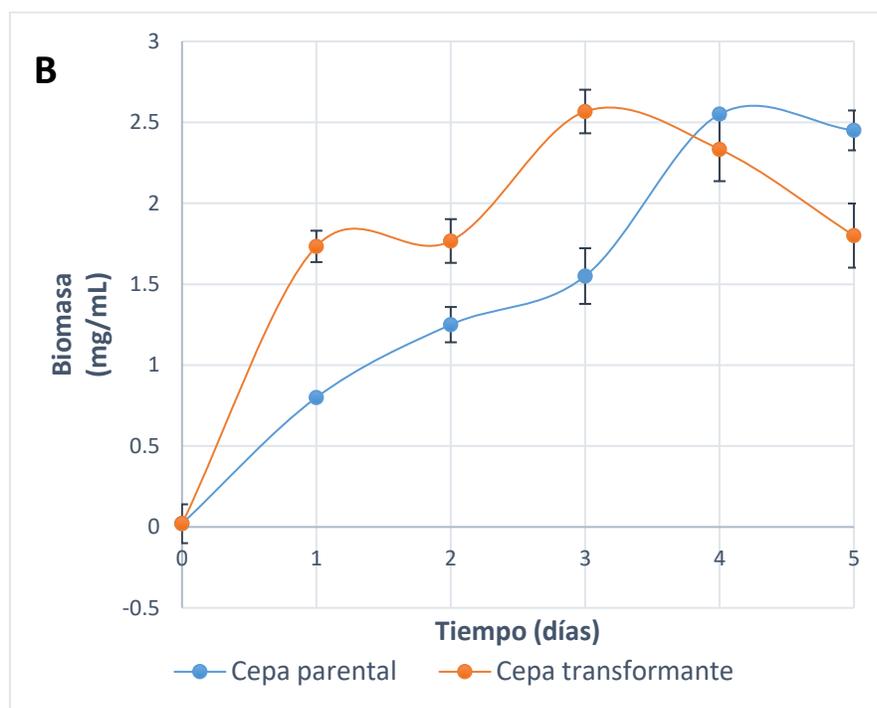
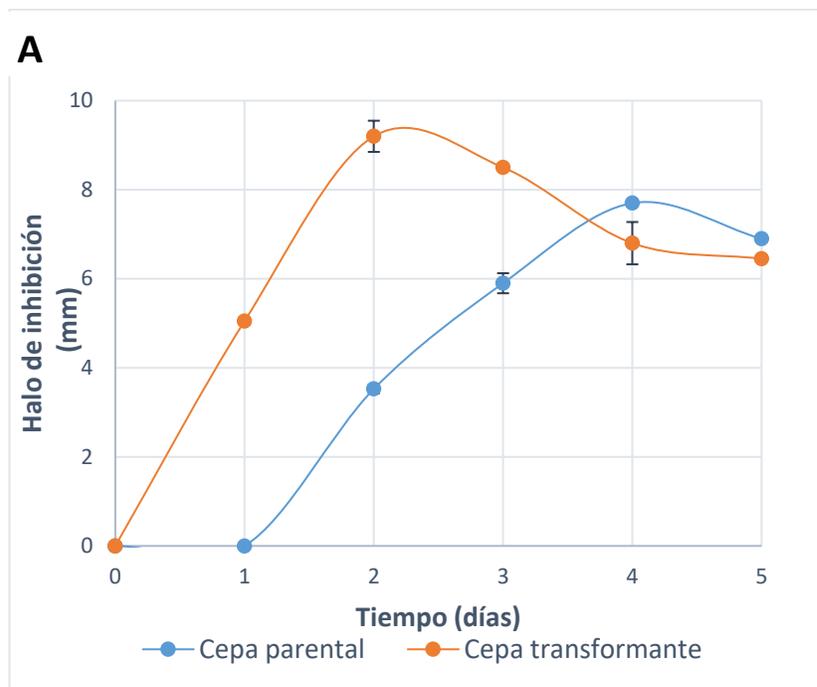
Las cinéticas de actividad obtenidas a partir de los bioensayos realizados con el sobrenadante de *S. lividans* TK24-PepB15, muestran que el medio UP es un buen candidato para la producción del péptido de interés, incluso con una mayor actividad

en comparación con la actividad obtenida utilizando el medio R₂, la producción de PepB15 con medio UP se presenta a partir de las 72 h y con el medio control R₂ inicia hasta las 96 h. En la gráfica 2, también se observa que los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con la fermentación en medio UP son más grandes en todos los tiempos de fermentación que los halos obtenidos con la producción en medio R₂.



Gráfica 2. Cinética de producción de PepB-15 y biomasa (mg/mL) utilizando dos medios de cultivo diferentes.

Además, los resultados indican que la mayor producción de péptido se presenta entre las 96 y las 120 h (día 4 y 5), a partir de las 120 h de fermentación la actividad del péptido comienza a disminuir. Por otro lado, lo esperado era que con el control negativo (sobrenadante libre de biomasa del cultivo de la cepa parental) no se observara halo de inhibición, sin embargo, con el medio UP como medio de producción, también presentó actividad antimicrobiana contra el microorganismo indicador (gráfica 3).



Gráfica 3. A) Cinética de halo inhibición del sobrenadante libre de biomasa de la *cepa parental* y la *transformante* en medio UP (etapa de producción: 3). **B)** Cinética de biomasa (mg/mL) de la *cepa parental* y la *transformante*.

6.5. Fraccionamiento por tamaño molecular.

Con el fin de verificar que la inhibición del crecimiento bacteriano que estaba presentando el sobrenadante de la cepa transformante con el medio UP era debido a la actividad del péptido y no a alguna otra molécula bioactiva, se realizó un fraccionamiento de la muestra libre de biomasa con unidades de ultrafiltración Amicon® de diferentes tamaños de membrana: 30 KDa, 10 KDa, 3 KDa. Se realizó el mismo fraccionamiento al sobrenadante obtenido de la fermentación de la cepa parental. Y finalmente se realizaron bioensayos de cada una de las fracciones obtenidas.

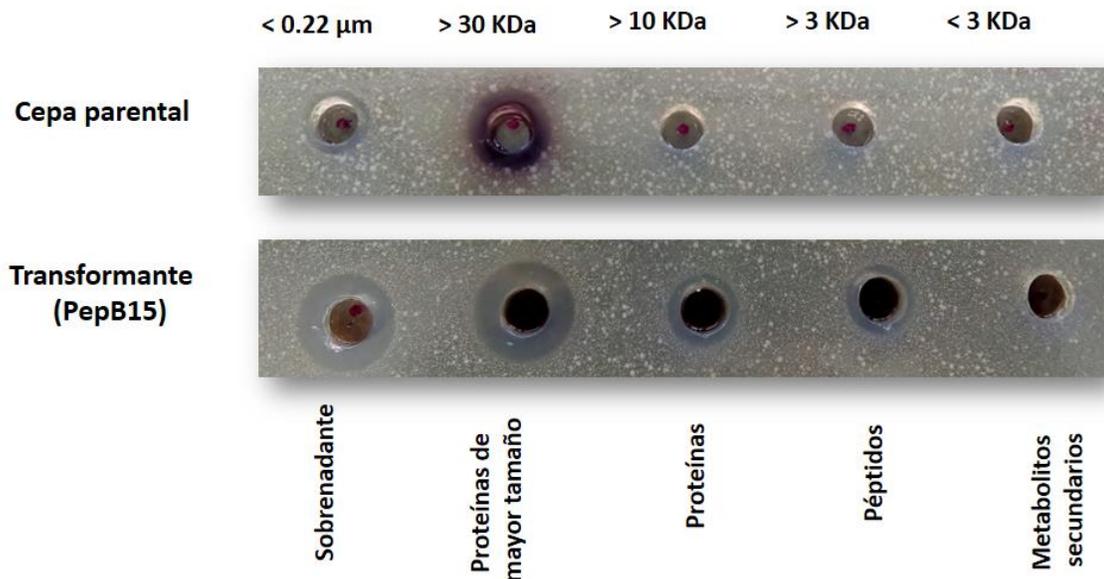


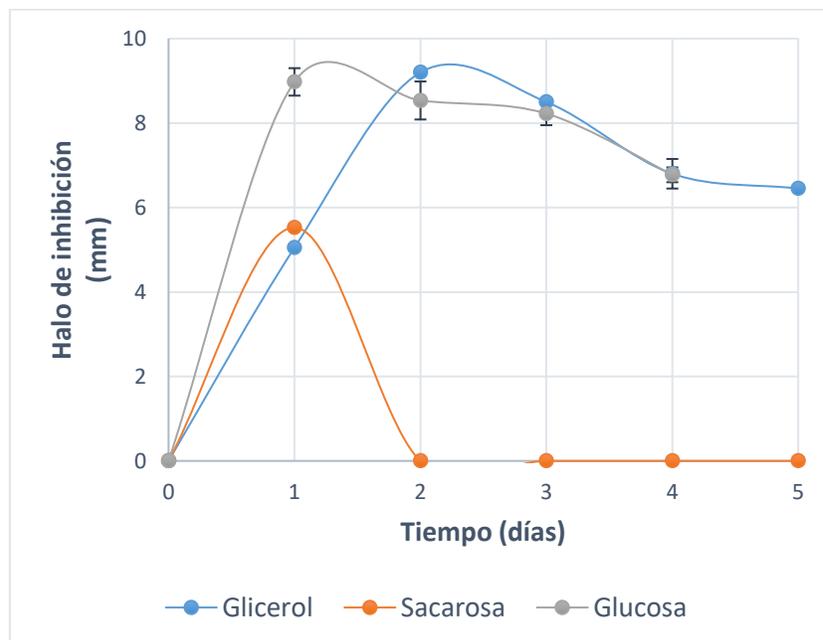
Figura 5. Bioensayos realizados con las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración de los sobrenadantes de una fermentación de 48 h con medio UP, de la cepa transformante y la cepa parental respectivamente.

El tamaño molecular del péptido de interés es de 3.51 KDa. Los resultados de los bioensayos realizados a cada una de las fracciones del sobrenadante de la cepa transformante presentan actividad en tres fracciones diferentes: >3KDa, >10KDa y >30KDa. En contraste, con los resultados de los bioensayos realizados con las fracciones obtenidas del sobrenadante de la cepa parental muestran inhibición bacteriana solo en la fracción >30 KDa.

6.6. Sustitución de la fuente de carbono en el medio de producción UP.

Se realizaron fermentaciones sustituyendo la fuente de carbono en el medio de producción UP, con la finalidad de encontrar una variante de menor costo o incluso de nivel industrial que pudiese sustituir al glicerol en la producción de PepB15.

La gráfica 4 muestra que al utilizar glicerol o glucosa como fuente de C en el medio UP, las cinéticas de actividad antimicrobiana del péptido se comportan de forma similar, sin embargo, al utilizar sacarosa no favorece la producción de éste.

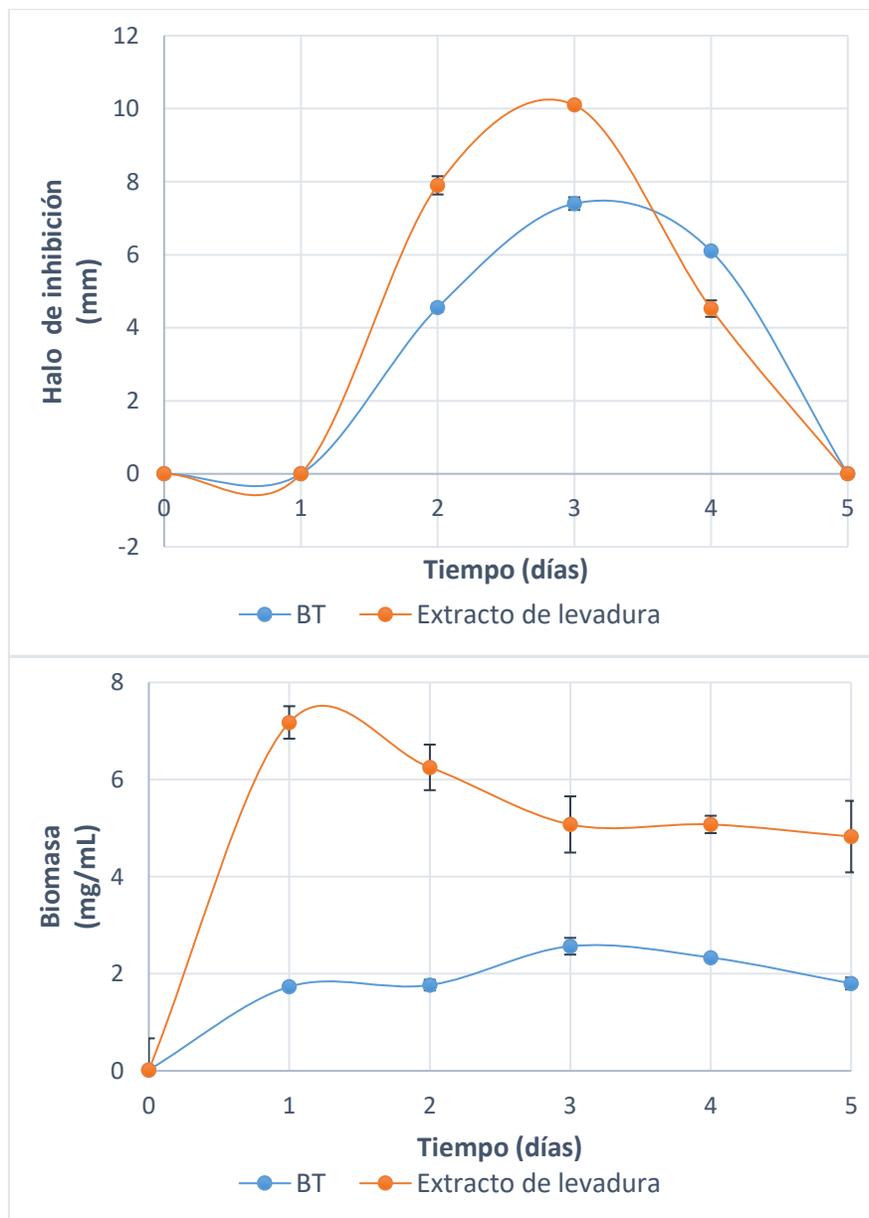


Gráfica 4. Cinética de actividad antimicrobiana de PepB-15 en la cepa transformante con diferentes fuentes de carbono (medio UP modificado).

6.7. Sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio de producción UP.

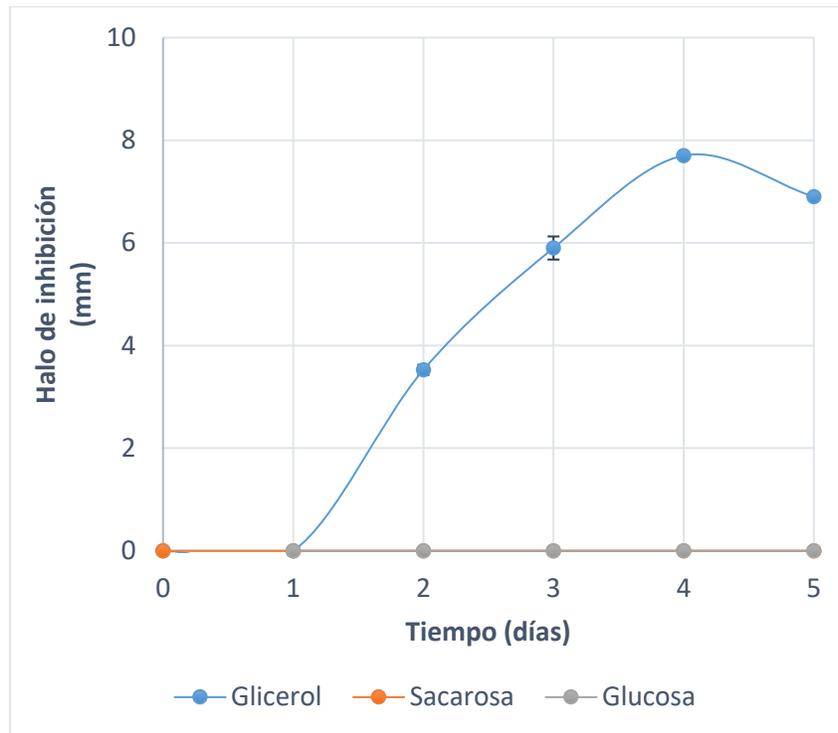
Se probaron 5 fuentes de nitrógeno de nivel industrial otorgadas por la empresa mexicana Química Agronómica de México que utilizan como nutriente complejo en medios de producción. Los resultados indican que el único componente que el microorganismo asimila de los 5 probados para la producción del péptido de interés, además de la bacto triptona (control positivo), es el extracto de levadura nivel industrial.

Este ingrediente es utilizado en una amplia variedad de medios de cultivo como una excelente fuente de nutrientes por ser extracto de un autolisado de células de levaduras seleccionadas, rico en vitaminas, especialmente del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento. En la gráfica 5 se muestra la actividad obtenida a diferentes tiempos de fermentación en medio UP normal y medio UP modificado.



Gráfica 5. A) Cinética de halo de inhibición de pepB-15 en la cepa transformante con diferentes fuentes de nitrógeno de grado industrial (medio UP modificado). B) Biomasa (mg/mL) cuantificada en la etapa de producción.

6.8. Efecto de la fuente de carbono sobre la molécula bioactiva

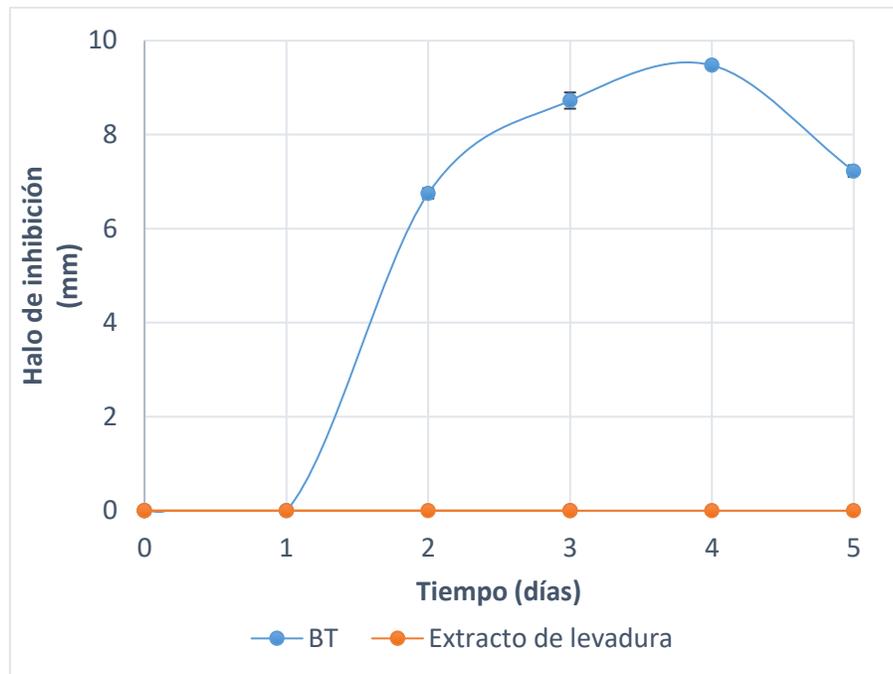


Gráfica 6. Cinética de producción de la molécula bioactiva en la cepa parental probando diferentes fuentes de carbono (medio UP).

En la gráfica 6 se observa que la cepa parental presenta actividad inhibitoria contra *B. subtilis* sólo con glicerol como fuente de carbono, ya que al cambiar la fuente de C del medio UP por glucosa o sacarosa no se observa actividad antagonista en ningún tiempo de fermentación.

6.9. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la molécula bioactiva

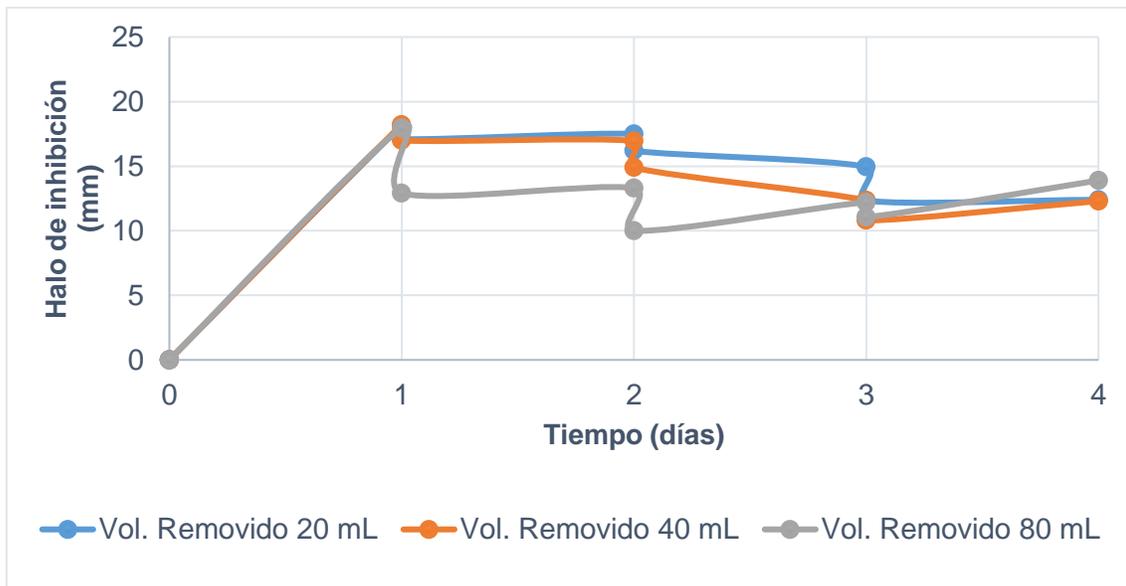
Los resultados de la cepa parental (gráfica 7) tampoco muestran actividad antagonista con ningún medio modificado por fuente de nitrógeno, las variantes que se utilizaron fueron: bioproteína, suero de leche, extracto de levadura y harina de soya, todas de nivel industrial. Sin embargo, se observa una actividad inhibitoria en el medio UP original, es decir, con bacto triptona (BD Difco) como fuente de nitrógeno.



Gráfica 7. Cinética de producción de la molécula con actividad antimicrobiana en la cepa parental probando diferentes fuentes de nitrógeno de grado industrial (medio UP modificado).

6.10. Pruebas de sensibilidad ante la misma cepa productora.

Se realizó una fermentación en cultivo semi-continuo a nivel matraz, los resultados muestran que, al ser removido el sobrenadante de la fermentación en curso no se observan incrementos de actividad al transcurrir periodos de 24 horas, esto ocurre en con los tres volúmenes de sobrenadante removido que fueron probados, se observa incluso, un comportamiento igual con los 3 volúmenes removidos, esto en procesos independientes.



Gráfica 8. Cinética de producción del péptido (PepB15) removiendo diferentes volúmenes de medio de cultivo (UP) cada 24 h.

También se realizó una prueba de actividad antagónica hacia la misma cepa productora (*S. lividans* TK24) para determinar si la actividad del péptido antimicrobiano también actuaba contra su mismo hospedero; en los resultados se observa que, en efecto, el péptido presenta actividad antimicrobiana contra *S. lividans* TK24.

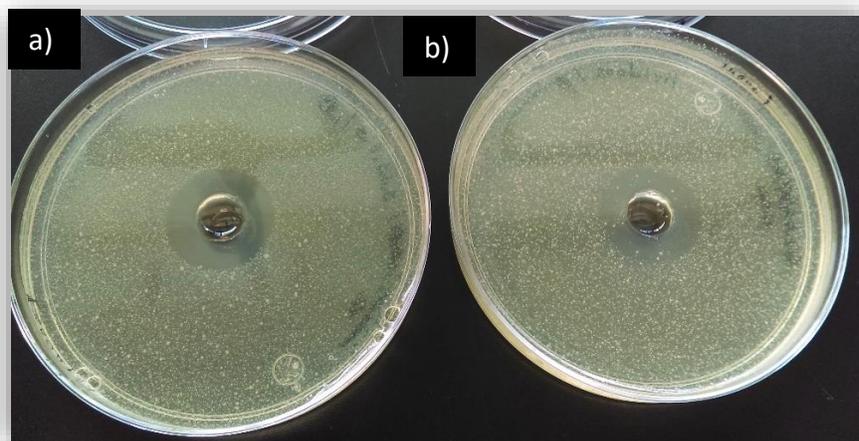
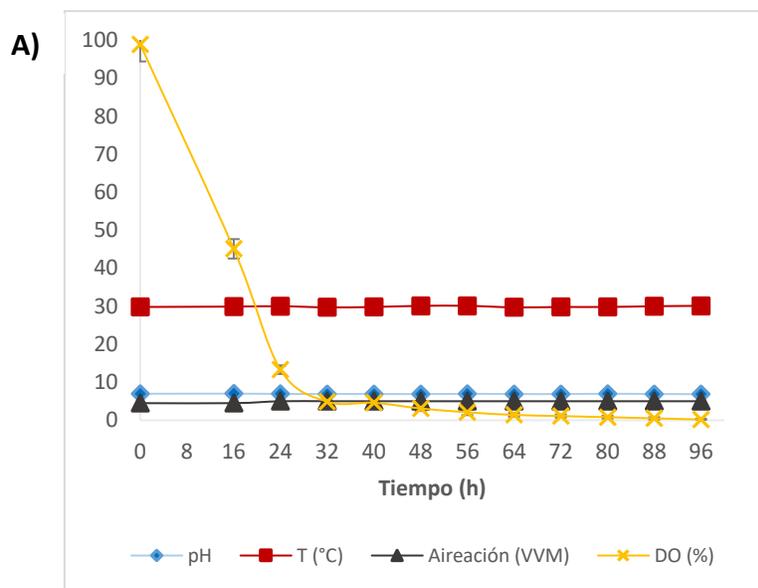


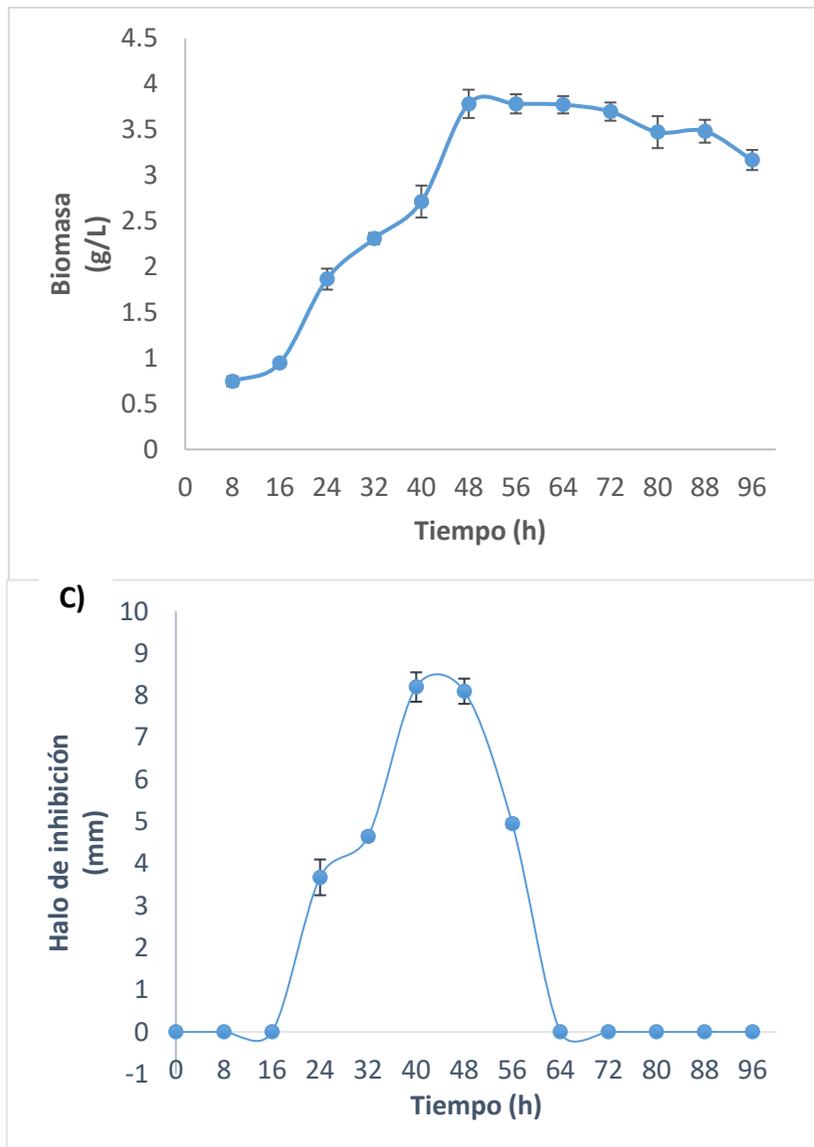
Figura 6. Prueba de sensibilidad: a) *B. subtilis* (microorganismo control), b) *S. lividans* TK24 (hospedero) contra el péptido producido por sí misma.

6.11. Pruebas piloto en biorreactor

En las pruebas piloto realizadas para la producción de PepB15 se utilizó medio UP como medio de producción, sin ninguna modificación. Se realizó por duplicado en tanques independientes bajo las siguientes condiciones: temperatura de 30 °C, agitación constante de 150 rpm, 1 turbina, 1 vvm de aireación, pH de 7.0 ± 0.2 (ajustado con NaOH (10M)). Fue monitoreado cada 8 h durante 4 días.

En las siguientes gráficas se presentan los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana (halo de inhibición), biomasa (g/L), y el monitoreo de las condiciones establecidas en el reactor (pH, temperatura, demanda de oxígeno).





Gráfica 9. A) Monitoreo de los parámetros establecidos para la producción de PepB15 en *S. lividans* TK24 durante el tiempo de fermentación, B) Cuantificación de biomasa (g/L) en la etapa 3 de producción a nivel reactor, C) Actividad antimicrobiana de PepB15 contra *B. subtilis* durante la etapa de producción.

7. DISCUSIÓN

La producción de péptidos con actividad antimicrobiana obtenidos de forma heteróloga en microorganismos es aún un tema en desarrollo, debido a la complejidad que presenta tanto el diseño del *cassete* como el modelo de expresión. Existen diversos reportes sobre la producción heteróloga de péptidos antimicrobianos con sistemas biológicos de expresión, por ejemplo, la producción de defensinas humanas en *E. coli* (Xu y col., 2005), la producción de Bacteriocina Enterocina A y Bacteriocina E 50-52 en *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis* respectivamente (Jiménez y col. 2014). Sin embargo, la mayoría de estos sistemas tienen sus limitaciones, tales como los bajos rendimientos debidos a la autotoxicidad sobre la cepa productora o la proteólisis de la proteína de fusión que enmascaran sus propiedades tóxicas. Existen otros sistemas para la expresión de híbridos recombinantes, como es el caso del péptido Cecropina A(1-8)-Magainina 2(1-12) en *Pichia pastoris* (Fengliang y col. 2006), concatémeros como la Buforina II en *E. coli* y Enterocina P-Sakacina A (Jiménez y col. 2013), con estos sistemas se ha evitado la letalidad del hospedero al enmascarar la actividad antimicrobiana intrínseca del péptido biactivo.

Roldan y col. (2017), forman parte del laboratorio de investigación de Ingeniería genética y Metabolismo secundario de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en este laboratorio se desarrolló el actual proyecto, este grupo de trabajo reporta un modelo de expresión heteróloga en *S. lividans* TK24 para la producción de un péptido catiónico con actividad antimicrobiana (PepB15), atractivo para implementarse contra microorganismos fitopatógenos. Los componentes principales de este sistema de expresión *S. lividans* TK24 son: promotor fuerte constitutivo (*vsI*) y un péptido señal (*vsI-ss*) del gen inhibidor de la subtilisina en *S. venezuelae* y, el vector de clonación utilizado fue PIJ486 que tiene como marcador de resistencia al thioestrepton.

A partir de esa construcción y su sistema de expresión, el presente trabajo fue dedicado primero a comprobar la presencia del vector clonado y *cassete* de expresión en la cepa transformante, comprobar el efecto de PepB15 (actividad antimicrobiana), y finalmente, encontrar un medio de cultivo con componentes grado industrial que cumpliera con los requerimientos básicos para la producción del péptido de interés (PepB15) en *S. lividans* TK24-PepB15.

Para la re-activación de la cepa transformante a partir de un liofilizado se consideraron varios criterios de selección: la cepa fue crecida en presencia de thioestrepton que es el marcador de resistencia del vector clonado, luego, se sembró en medio Phage agar embebido nuevamente con thioestrepton para obtener colonias y probar actividad antimicrobiana. Las colonias que presentaron actividad antimicrobiana fueron sometidas a una PCR de colonia para comprobar la presencia del *cassete* de expresión y asegurar que, el efecto inhibitorio fuese provocado por el péptido de interés (PepB15). Los resultados muestran que en efecto el fragmento obtenido por electroforesis en gel de agarosa corresponde al tamaño del *cassete* de expresión que se insertó en *S. lividans* TK24 (figura 2).

El proceso llevado a cabo para la biosíntesis y secreción simultánea de PepB15 al medio extracelular reportado por Roldan y col. (2017) está dividido en 3 etapas: pre-cultivo, cultivo semilla y producción, para el pre-cultivo y el cultivo semilla utilizaron medio phage, para la etapa de producción medio R₂. Sin embargo, este proceso aún no es el más adecuado, por lo que fue necesario encontrar la edad adecuada del cultivo que favoreciera la producción, y consecuente actividad inhibitoria de PepB15 ante microorganismos fitopatógenos. D`Huys y col., (2010) reportan un pre-cultivo en medio Phage de 48 horas para medir los perfiles de captación de aminoácidos de fermentaciones discontinuas de tipo natural y recombinante en *S. lividans* TK24, por otro lado, Bouvin y col. (2016) reportan un pre-cultivo en medio Phage de 72 horas para la producción de celulasa A producida de manera heteróloga por *S. lividans* TK24. Con base en estos reportes se consideró experimentar con tres tiempos

diferentes para el pre-cultivo de *S. lividans* TK24-PepB15: 48, 72 y 96 h, los procesos de fermentación se realizaron de forma independiente bajo las mismas condiciones, para que la única variable de respuesta para este experimento fuera el efecto de la actividad antimicrobiana con respecto al tiempo. Los resultados indican que con el pre-cultivo de 72 horas el halo de inhibición (actividad antimicrobiana) tiende a ir en aumento a partir del día 4, en la etapa de producción. Por otro lado, utilizando pre-cultivos de 48 y 96 horas la actividad del péptido se presenta hasta el día 9 y 10 respectivamente. Como control negativo, se utilizó a *S. lividans* TK24, la cual no presentó actividad inhibitoria durante la etapa de producción.

Por otro lado, encontrar un medio de cultivo que sustituyera al medio R₂ que tuvo resultados positivos en la producción de PepB15 (Roldan y col., 2017) fue uno de los retos más importantes en este proyecto, para ello, se realizó un estudio previo de los requerimientos nutricionales que necesitan los actinomicetos para crecer, en particular, *S. lividans* TK24 y, se seleccionaron compuestos agroindustriales que cumplieran con estos requisitos y además, con el propósito de reducir los costos del proceso.

En general para todos los microorganismos, es bien sabido que los principales componentes deben incluir fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio y algunos factores de crecimiento (Lara, 2011). Por otro lado, Pozidis y col. (2000), reportan que los medios para la producción de proteínas heterólogas en *Streptomyces* son ricos en aminoácidos como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, en efecto, el medio que utilizó Roldan y col. (2012), para probar la producción del péptido de interés, contiene extracto de levadura (fuente de vitaminas del complejo B, aminoácidos y factores de crecimiento), Lab lemco-powder (extracto de carne; vitaminas, compuestos nitrogenados y sales), dos fuentes de carbono (glucosa y sacarosa), entre otros. Para este proyecto, se probó un medio de producción compuesto por: bacto triptona que es un digerido pancreático de caseína (aminoácidos y sulfatos) como fuente de nitrógeno y, glicerol como fuente de carbono,

este medio se conoce como UP. Los resultados obtenidos (gráfica 2) fueron comparados contra un cultivo de la cepa transformante en medio R₂ que fue tomado como control positivo, y un cultivo de la cepa parental en medio UP como control negativo, cabe mencionar que los dos medios de cultivo utilizados y comparados en este experimento se clasifican como medios de cultivo complejos cuya composición química no está definida por ser extractos de origen natural (Hernández y col., 2003). Aunque el medio UP es un medio complejo al igual que el medio R₂, UP consta de sólo dos componentes, por su parte R₂ consta de más de 12 componentes, esto nos indica que el medio R₂ es un medio más completo en cuestiones nutricionales, sin embargo, ambos medios son utilizados para la etapa de producción donde el inóculo a transferir ya fue previamente crecido en medio Phage (Korn y col., 1978) en 2 etapas: pre-cultivo y cultivo semilla. Por lo general, el medio de cultivo utilizado para la preparación del inóculo es diferente al medio utilizado en la etapa de producción porque cumplen con funciones diferentes: cuando se prepara el inóculo se espera que el microorganismo salga de su etapa de latencia y se adapte a las condiciones de cultivo; mientras que en la etapa de producción la composición del medio cultivo ya no es tan exigente sino más bien depende tanto del microorganismo como del producto que se desea obtener (Hernández y col., 2003).

Los resultados en la etapa de producción con medio UP se presentan en la gráfica 2, por un lado, nos muestran que la producción de PepB15 inicia a partir del día 3, este es un resultado favorable, ya que representa una producción temprana con respecto a la producción del péptido con medio R₂, la cual inicia a partir del día 4, por otro lado, existe una diferencia significativa en la actividad que se presenta con cada medio, es decir, al comparar el punto máximo de actividad en medio UP (día 5) con la actividad presentada en medio R₂ en el mismo día, los resultados reflejan una actividad 5.4 veces mayor utilizando medio UP que al utilizar medio R₂. Además, a pesar de que la curva de actividad utilizando medio R₂ va en aumento, en el día 15 de producción la actividad sigue siendo menor a la máxima en medio UP a los 5 días.

Estos resultados sugieren que, bastaría darle al microorganismo una fuente de nitrógeno y carbono para poder producir el péptido de interés, y, comparado con los resultados en medio R₂ tomados como estándar o control positivo, se sugiere que posiblemente muchos de sus componentes tal vez no sean requeridos por el microorganismo para la biosíntesis del péptido, sin embargo, aunque los resultados muestran que hay mayor actividad antimicrobiana utilizando medio UP, se podría considerar para futuros experimentos enriquecer este medio con algunos de los componentes esenciales que un microorganismo requiere en la etapa de crecimiento, por ejemplo, sales que contengan fósforo, azufre, potasio, y/o magnesio (Lara, 2011) y evaluar si al enriquecer el medio UP, arroja algún efecto sobre la producción de PepB15.

La sustitución de la fuente de carbono en el medio UP se realizó para evaluar el efecto que ejerce sobre la biosíntesis del péptido de interés, así como encontrar una fuente de carbono que sustituya al glicerol que es un compuesto costoso en comparación con cualquier otra fuente de carbono como sacarosa, almidón o incluso glucosa; por otro lado, la sustitución de la fuente de nitrógeno en la cepa transformante se realizó con el objetivo de sustituir a la bacto triptona (grado laboratorio) por alguna variante de nivel industrial debido al elevado costo que tiene este componente.

Los resultados obtenidos de la cepa transformante (gráfica 4) presentan actividad antimicrobiana en función del tiempo con las fuentes de carbono probadas. Se sugiere sustituir el glicerol por la glucosa debido a que presentan resultados muy similares en la actividad antimicrobiana. Con respecto a la fuente de nitrógeno los resultados indican que, con extracto de levadura (procesos independientes) se produce el péptido de interés, incluso existe mayor producción con extracto de levadura (grado industrial) que con el componente original del medio (bacto triptona) entre las 48 y las 72 horas. Los medios para la producción de proteínas heterólogas en cepas de *Streptomyces* son medios que contienen cantidades suficientes de aminoácidos y factores de crecimiento (D´Huys, 2010), esto coincide con los resultados obtenidos, debido a que

el extracto de levadura es rico en vitaminas especialmente del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento.

La secreción de PepB15 hacia el medio extracelular es gracias al eficiente sistema de expresión mediado por el péptido señal (*vs1*), del inhibidor de la subtilisina en *S. lividans* TK24, la elección del promotor y el péptido señal (*vs1*) también influyen para una eficiente expresión del gen introducido, *vs1* es un promotor fuerte constitutivo con una capacidad de inicio de la transcripción 1.5 y 1.9 veces mayor que los promotores *aph* y *ermEp**, respectivamente (Pimienta, 2009). Con esta información, se esperaba observar una producción constante a lo largo del tiempo en la etapa de producción, sin embargo, los resultados recopilados de todos los ensayos realizados con diferentes procesos muestran que a determinado tiempo, la actividad del péptido disminuye. Para saber el motivo que ocasionaba este resultado, se realizaron dos experimentos, el primero consistió en realizar un cultivo en lote alimentado con el objetivo de remover medio de cultivo y agregar medio de cultivo fresco, presumiendo que el efecto de la disminución de la actividad antimicrobiana fuera debido a la escases de nutrientes a determinado tiempo del proceso, sin embargo, los resultados no presentaron incrementos de actividad antimicrobiana al adicionarle medio de cultivo fresco (gráfica 8).

El segundo experimento consistió en realizar bioensayos de difusión en pozo utilizando como microorganismo indicador la propia cepa hospedera *S. lividans* TK24. Los resultados que se presentan en la figura 6, muestran que el péptido presenta un efecto antagonista contra *S. lividans* TK24, por lo tanto, se presume que la disminución de la actividad antimicrobiana del péptido a través del tiempo es debido a que a determinada concentración de PepB15 en el cultivo, este provoca un efecto tóxico contra su propio hospedero; relacionando los resultados obtenidos en bioensayos anteriores, se sugiere que entre las 24 y 48 h de fermentación se alcanza una concentración tóxica que posiblemente provoca lisis celular en el cultivo.

Las pruebas piloto del proceso de producción de PepB15 se realizaron en un biorreactor de 14 L con medio UP como medio de producción, a un volumen total de 5 L. Se consideraron como condiciones base las condiciones trabajadas a nivel matraz y estas fueron monitoreadas cada 8 h. En la gráfica 8B, se observa el comportamiento del crecimiento celular durante el tiempo de fermentación, al tiempo 48 h se presenta el punto máximo y a partir de ahí un descenso constante a lo largo del tiempo, por otro lado, la actividad antimicrobiana máxima durante la fermentación se presenta entre las 40 y las 48 h de fermentación, después de las 48 h se presenta una disminución en la actividad, estos resultados coinciden con el comportamiento del cultivo a nivel matraz, lo que nos permite lograr un avance, sin embargo, a pesar de obtener resultados positivos sobre la biosíntesis y secreción simultánea de PepB15 en *S. lividans* TK14-PepB15 en estas pruebas piloto, estos sólo son experimentos iniciales que aportan resultados que serán tomados como base en futuros experimentos para la optimización del proceso y posterior escalamiento en biorreactor.

Por otro lado, la cepa parental *S. lividans* TK24 tomada como control negativo sobre la producción de PepB15, fue inoculada tanto en medio R₂ como en medio UP de forma independiente y bajo las mismas condiciones consideradas para *S. lividans* TK24-PepB15. Uno de los fines de utilizar *S. lividans* TK24 como microorganismo hospedero en diversos reportes de producción heteróloga de proteínas recombinantes es, porque este microorganismo hasta el momento, no tiene reportes de producción de proteínas bioactivas. Los resultados obtenidos con medio R₂, en efecto, no presentan actividad antimicrobiana al realizar los bioensayos correspondientes. Sin embargo, con medio UP obtuvimos resultados totalmente inesperados (gráfica 3), al realizar los respectivos bioensayos de actividad antimicrobiana, encontramos que las muestras obtenidas con la cepa parental presentaron halo de inhibición, esto nos causó una gran inquietud por lo mencionado anteriormente respecto a las referencias reportadas de este microorganismo. Nuestros resultados; que se discuten más adelante, sugieren que, la composición del medio UP está provocando la activación de algún gen o genes silenciosos que provocan la expresión de esta molécula no identificada hasta el

momento, además, se trata de una molécula bioactiva con la característica de que es secretada al medio extracelular. Estos resultados provocaron plantear ciertas hipótesis no sólo respecto a la cepa parental, sino también hacia los resultados obtenidos con la transformante, debido a que se puso en duda si la actividad antimicrobiana presentada con el cultivo de la cepa transformante se debía realmente a la producción del péptido o era por el mismo efecto aún no descrito que induce a la biosíntesis y secreción simultánea de la molécula bioactiva en la cepa parental.

El medio UP (DGA) es un medio de cultivo utilizado en *S. coelicolor* para la producción de pigmento rojo conocido como undecilprodigiosina con una estructura de tripirrol altamente hidrofóbica, este metabolito secundario es un antibiótico activo frente a bacterias Gram-positivas, el cual pertenece al grupo de las prodigiosinas que actualmente tienen gran atractivo por su efecto inmunosupresor y anticancerígeno (Williamson y col., 2006; Ho et al., 2007; Yepes, 2010). Esto nos hizo pensar en primera instancia que, probablemente la actividad antagónica presente en la cepa parental se debía a la expresión de un gen silencioso activado en *S. lividans* y presente en *S. coelicolor*.

Para comprobar que la actividad antimicrobiana observada de las muestras del cultivo de la cepa transformante fuese por efecto de la biosíntesis del péptido de interés, y no por alguna molécula bioactiva, se realizó un fraccionamiento por tamaño molecular del sobrenadante libre de biomasa obtenido a partir de fermentaciones en medio UP tanto de la cepa transformante como de la cepa parental. A cada una de las fracciones obtenidas se le realizaron pruebas de actividad antimicrobiana (bioensayos) contra el microorganismo indicador (*B. subtilis*).

Al evaluar las fracciones obtenidas del sobrenadante libre de biomasa del cultivo de la cepa transformante, se observa halo de inhibición en varias de ellas (figura 3), considerando que PepB15 tiene un tamaño de 3.51 KDa (Roldan y col. 2017) se comprueba que la cepa transformante sí produce el péptido de interés al obtener

actividad en la fracción [3 KDa<PepB15<10 KDa], sin embargo, también se presenta actividad en la fracción [10 KDa<Fracción<30 KDa], esto podría ser por efecto de la actividad del mismo péptido debido a que pudo retenerse en esa fracción cierta cantidad de péptidos al no hacer los lavados necesarios para que se filtraran por completo las moléculas menores a 10 KDa. La fracción >30 KDa también presenta actividad, esto sugiere que además del péptido de interés la cepa transformante está sintetizando una molécula bioactiva de mayor tamaño.

Por otro lado, el sobrenadante de la cepa parental presentó actividad antimicrobiana sólo en la fracción [>30kDa], por el tamaño molecular que indica el resultado (figura 3), se trata de una molécula bioactiva de gran tamaño que posee actividad antagonista contra *B. subtilis*, con esto concluimos que, es por efecto de la molécula bioactiva expresada también en la cepa transformante, incluso el diámetro del halo de inhibición de la fracción >30 KDa en la cepa transformante es más grande que el diámetro del halo de la cepa parental, esto podría deberse a que el efecto inhibitorio podría ser la suma del péptido y la molécula bioactiva. Se realizó una ardua búsqueda de posibles proteínas antimicrobianas o moléculas bioactivas en *S. lividans* secretadas de forma natural, sin embargo, no se encontraron reportes referentes a esto. Malik y col. (2008) reportan una proteína antimicrobiana extracelular (péptido de alto peso molecular de 63 kDa) inhibidora de *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, resistentes a meticilina y resistentes a *Staphylococcus aureus* en un cultivo fermentado de *Streptomyces fulvissimus*. Por su parte, Grewal y col. (2014) purificó y caracterizó una proteína antimicrobiana extracelular (~30 KDa por análisis SDS-PAGE) producida por *Pseudomonas aeruginosa* JU-Ch1 aislada de un suelo totémico de un santuario que tradicionalmente se usaba como ungüento para la piel. Esta proteína tiene una amplia actividad inhibidora frente a patógenos humanos, bacterianos y fúngicos seleccionados, Gram positivos/negativos. Esto sugiere que la molécula encontrada puede corresponder a una proteína bioactiva o a un péptido de alto peso molecular desconocido hasta el momento, con estos resultados se abre una nueva línea de

investigación para aislar y caracterizar a esta molécula bioactiva, saber el tipo e incluso evaluar su actividad antagonista contra diferentes microorganismos.

Con este hallazgo, se realizó también un experimento para evaluar el efecto que ejerce la fuente de carbono sobre la biosíntesis de la molécula bioactiva y determinar si la modificación del medio influye sobre la biosíntesis y secreción de la molécula bioactiva. Por otro lado, la sustitución de la fuente de nitrógeno se realizó con el mismo objetivo de evaluar el efecto que ejerce la fuente de nitrógeno sobre la biosíntesis de esta molécula.

En los resultados de la cepa parental (gráfica 5) no se presenta inhibición bacteriana utilizando una fuente de carbono diferente a la original del medio UP, esto sugiere que la expresión y secreción de la molécula bioactiva es inducida sólo por el glicerol como sustrato carbonado o bien reprimible por la fuente de carbono. Respecto a las variantes utilizadas como fuente de nitrógeno de nivel industrial tampoco se presenta actividad antimicrobiana con ninguna de las variantes probadas, la gráfica 7 muestra que la actividad antimicrobiana sólo se presenta con la fuente de nitrógeno original del medio UP, enlazando el resultado obtenido en el ensayo de la fuente de carbono se sugiere que la biosíntesis de la molécula bioactiva sólo se presenta con la combinación de componentes específicos tales como glicerol y bacto triptona.

8. CONCLUSIÓN

- Utilizar medio de cultivo UP presentó mayor producción de PepB15 que al utilizar el medio control R₂ en la cepa transformante.
- Sustituir la fuente de carbono (glicerol) por glucosa en el medio UP refleja iguales resultados de producción de PepB15.
- Sustituir la fuente de nitrógeno original (triptona) por extracto de levadura grado industrial en el medio UP aumenta en un 36% la producción de PepB15 en la cepa transformante.
- La disminución de la actividad antimicrobiana de PepB15 a través del tiempo de fermentación se debe a que *S. lividans* TK24 es sensible PepB15 cuando llega a su producción máxima en el medio.
- Las condiciones establecidas (temperatura de 30 °C, aireación de 1 vvm, agitación de 150 rpm, pH constante de 7 ± 0.2) para las pruebas piloto en biorreactores de 14 L, mostraron resultados similares a la producción a nivel matraz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 2002; 417:141-147.
2. Binnie C., Cossar J.D. and Stewart D.I.H. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol.* 1997; 15, 315.
3. Boman H.G. Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity: *Scand. J. Immunol.* 1996; 43: 475-482.
4. Boman H.G. Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Rev.* 2000; 173: 5-16.
5. Bouvin J., Daniels W., Anné J., Nicolai B., Bernaerts K. Metabolic fluxes in recombinant *Streptomyces lividans* analyzed with ¹³C-based metabolic flux analysis. *IFAC-PapersOnLine* 49-26. 2016; 336–343.
6. Chen F.Y, Lee M.T, Huang H.W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide induced pore formation. *Biophys J.* 2003; 84:3751-758.

7. Farfán D., Gutiérrez C. Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos. Tesis de Grado. 2009; 5-13.
8. Fengliang Jin, Xiaoxia Xu, Liexi Wang, Wenqing Zhang, Dexiang Gu. Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)–magainin2(1–12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization Protein Expression and Purification. 2006; 50 (2): 147–156.
9. Fornwald JA, Donovan MJ, Geber R, Keller J, Taylor DP, Arcuri EJ, Brawner ME: Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. Bio/Technology. 1993; 11:1031-1036.
10. Gilbert M. Morosoli R. Shareck F, Kluepfel D. Production and secretion of proteins in *streptomyces*. Crit. Rev. Biotechnol. 1995; 15, 13–39.
11. Grewal S., Bhagat M., Vakhlu J. Proteína antimicrobiana producida por *Pseudomonas aeruginosa* JU-Ch 1, con un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Biocatálisis y Biotecnología Agrícola. 2014; 3(4): 332-337.
12. Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E., Galán-Wong LJ., Viader-Salvadó JM. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la aplicación en acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 2004; 16-19.
13. Gutierrez P., Orduz S. Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. Actual Biol. 2003; 25 (78): 5-15.
14. Hancock R.E. Antibacterial peptides and the outer membranes of Gram-negative bacilli. J. Med Microbiol. 1997; 26:1-3.

15. Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. Microbiología industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia, 2003.
16. Ho, T.F., C.J. Ma, C.H. Lu, Y.T. Tsai, Y.H. Wei, J.S. Chang, J.K. Lai, P.J. Cheuh, C.T. Yeh, P.C. Tang, J. Tsai Chang, J.L. Ko, F.S. Liu, H.E. Yen and C.C. Chan. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 225:318-328.
17. Hopwood D.A. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet.* 2006; 40:1-23.
18. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000.
19. Konstantin B., Naoki N., Toshiomi Y. Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *E. coli* in fed-batch cultivation for phenylalanine production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1990;70(4):253-60.
20. Lara A. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2011; 10(2): 209-223.
21. Lammertyn E., Anné J: Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 160:1-10.
22. Malik H., Sur B, Singhal N, Bihari V. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2008; 46 (4): 254-257.
23. Matsuzaki, Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem.*

Cell Biol. 1990; 76: 235-246.

24. Mellaert LV, Dillen C, Proost P, Sablon E, DeLeys R, Van Broekhoven A, Heremans H, Van Damme J, Eyssen H, Anné J: Efficient secretion of bioactive mouse tumor necrosis factor α by *Streptomyces lividans*. *Gene* 1994; 150:153-158.
25. Pieter-Jan D’Huys, Ivan Lule, Sven Van Hove, Dominique Vercamme, Christine Wouters, Kristel Bernaerts, Jozef Anné, Jan F.M. Van Impe. Amino acid uptake profiling of wild type and recombinant *Streptomyces lividans* TK24 batch fermentations. *Journal of Biotechnology* 152. 2011; 132–143.
26. Pimienta E.T.R. Evaluación de *Streptomyces lividans* como hospedero para la expresión de interferón alfa 2b y estreptoquinasa. Tesis de doctorado. 2009.
27. Pimienta ETR. Evaluación de *Streptomyces lividans* como hospedero para la expresión de interferón alfa 2b y estreptoquinasa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2009; 40(3).
28. Pimienta ET, Vallín C. Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2005; 36 (2).
29. Pozidis C., Lammertyn, E., Politou, A.S., Anné, J., Tsiftsologou, A.S., Sianidis, G., Economou, A. Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 72(1): 611–619.

30. Roldán M., Anné, J., Reyes A., Carrasco U., Millán PC, Barrios GJ, Mejía A. *Streptomyces* as Overexpression System for Heterologous Production of an Antimicrobial Peptide. *Protein & Peptide Letters*. 2017; 24, 1-6.
31. Rozkov, A., Avignone-Rossa, C., Ertl, P., Jones, P., O'Kennedy, R., Smith, J., Dale, J. y Bushell, M. Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;88, 909-915.
32. Rückert C., Albersmeiera A., Buschea T., Jaenicke S, Winkler A., Friðjónsson OH., Hreggviðsson OG., Lambert C., Badcock D., Bernaertse K., Anef J, Economou A-, Kalinowski J. Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Biotechnology*. 2015; 199, 21–22.
33. Schaerlaekens K., Lammertyn, E., Geukens, N., De Keersmaeker, S., Anné, J., Van Mellaert, L. Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* 2004; 112, 279–288.
34. Tavares L.S, Santos M.O, Viccini L.F, Moreira J.S, Miller R.N.G, Franco O.L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 2008; 29:1842-1851.
35. Thomma B.P, Cammue BP, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*. 2002; 216:193-202.
36. Titus A., Pereira G.N. "The role of actinomycetes in coffee plantation ecology," 2005. <http://www.inneedcoffee.com/05/actinomycetes/>. Acceso 01 de Julio de 2017.

37. Wad JM., Janssen, GR., Kieser, T., Bibb, MJ., Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. MGG, Mol. Gen. Genet. 1986; 203, 468–478.
38. Williamson, N.R., P.C. Fineran, F.J. Leeper and G.P. Salmond. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nat Rev Microbiol. 2006; 4:887-99.
39. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. Barrel stave model or toroidal model; A case study on melittin pores. Biophys J. 2001; 81:1475-1485.