



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1

Diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa producida en *Escherichia coli* mediante el uso de programas bioinformáticos.

Paredes Sánchez, Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Trujillo Toledo, Luis Enrique Ph. D.

25 de marzo del 2021

Document Information

Analyzed document	R5 Tesis Alexandra Paredes urkund.docx (D98043088)
Submitted	3/12/2021 12:53:00 AM
Submitted by	Trujillo Toledo Luis Enrique
Submitter email	letrujillo3@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	letrujillo3.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Proyecto de Investigacion SEBASTIAN CHILE .docx Document Proyecto de Investigacion SEBASTIAN CHILE .docx (D79115612) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.orkund.com		2
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_orkund.docx Document TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_orkund.docx (D54106120) Submitted by: vmpaez1@espe.edu.ec Receiver: tiramos.espe@analysis.orkund.com		1
W	URL: http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI14029.pdf Fetched: 3/8/2021 2:31:23 AM		1
SA	BAVIERA_CLIMENT_DP06147_20190625_1102_c007.pdf Document BAVIERA_CLIMENT_DP06147_20190625_1102_c007.pdf (D54157863)		2
W	URL: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/24509/BarradasCruz_NaolliAnaid_TFM ... Fetched: 4/23/2020 12:07:31 PM		1
W	URL: https://core.ac.uk/download/pdf/328796157.pdf Fetched: 12/8/2020 8:17:22 PM		1
SA	Memoria Benjamín Arancibia y Macarena Huerta.docx Document Memoria Benjamín Arancibia y Macarena Huerta.docx (D78853395)		1
W	URL: https://www.researchgate.net/figure/Principios-basicos-de-la-cromatografia-de-excl ... Fetched: 3/12/2021 12:54:00 AM		1
W	URL: http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fcl791i/doc/fcl791i.pdf Fetched: 1/12/2021 4:17:30 AM		1



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ENRIQUE
 TRUJILLO
 TOLEDO**

Dr. Trujillo Toledo, Luis E.

C.I.: 1755850276



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa producida en *Escherichia coli* mediante el uso de programas bioinformáticos.**”, fue realizado por la señorita **Alexandra Paredes Sánchez**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar a la señorita para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 12 de marzo del 2021.



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ENRIQUE
TRUJILLO
TOLEDO**

Dr. Trujillo Toledo, Luis Enrique

C.I.: 1755850276



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Paredes Sánchez, Alexandra**, con cédula de ciudadanía n° 1722935887, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa producida en *Escherichia coli* mediante el uso de programas bioinformáticos.”**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 12 de marzo del 2021.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Alexandra Paredes Sánchez'.

Paredes Sánchez, Alexandra

C.I.: 1722935887



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Paredes Sánchez, Alexandra**, con cédula de ciudadanía n° 1722935887, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa producida en *Escherichia coli* mediante el uso de programas bioinformáticos.**”, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 12 de marzo del 2021.

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'A. Paredes', sobre una línea de puntos.

Paredes Sánchez, Alexandra

C.I.: 1722935887

Dedicatoria

A mi hija, mi pequeña Ariana que con sus dulces besos y sonrisas son y seguirán siendo el principal impulso para cumplir mis metas.

A mi madre y mi padre que han puesto su confianza en mí, con sus consejos han inculcado siempre valores en sus hijas, su apoyo incondicional me ha ayudado a cumplir una más de mis metas.

A mis queridas hermanas Mayra y Tania, que me acompañaron en cada paso ayudándome cuando lo he necesitado, gracias por brindarme su apoyo y cariño.

A mi sobrina Chen Yi, que me ha dado la dicha de ser tía.

Alexandra Paredes Sánchez

Agradecimiento

A mis padres que, con cariño y amor, has llevado a sus hijas a culminar sus estudios universitarios.

Un agradecimiento especial a mi tutor de tesis, Dr. Luis E. Trujillo, que me ha guiado académicamente en la dirección correcta, y brindado su asesoramiento en la presente investigación cada vez que lo he necesitado, su conocimiento ha contribuido en la estructuración de este proyecto.

A mis profesores universitarios, que compartieron sus conocimientos durante estos años.

A mis compañeros quienes hicieron amena mi estancia por las aulas de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Índice de Contenidos

Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoria.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de figuras	12
Índice de tablas	12
Resumen.....	15
Capítulo 1	17
Generalidades	17
Formulación del problema y antecedentes	17
Justificación.....	20
Objetivos	22
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos específicos</i>	22
Capítulo 2	23
Marco referencial	23
Función de la β -galactosidasa	23
Estructura de la β -galactosidasa	23
Gen BgaD	24

	9
Hospedador <i>Escherichia coli</i>	27
Diseño óptimo de los vectores de expresión.....	29
Condiciones para la producción de <i>Escherichia coli</i>	35
<i>Efecto de la temperatura</i>	35
<i>Oxígeno disuelto</i>	35
<i>pH</i>	36
<i>Agitación</i>	36
Suero de Leche	36
Programas Bioinformáticos.....	37
<i>Benchling</i>	37
<i>SuperPro Designer</i>	38
Diseño del Bioproceso.....	38
<i>Proceso Upstream</i>	39
<i>Proceso Downstream</i>	39
Capítulo 3	45
Metodología.....	45
Producción de Enzimas recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	45
<i>Benchling</i>	45
<i>Obtención de secuencias</i>	45
<i>PCR in silico</i>	46
Generación de una molécula híbrida.	46
Expresión.	46
Transformación bacteriana mediante	47

	10
Evaluación de bacterias que producen β -galactosidasa.....	47
Determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa.....	47
Evaluación técnico-económico de la producción de β -galactosidasa.....	48
Base del diseño.....	49
Microorganismo.....	50
Medio de Cultivo pre-inóculo.....	50
Medio de Cultivo inóculo.....	50
Medio de Fermentación.....	51
Hipótesis de investigación.....	56
Capítulo 4	57
Resultados	57
Molécula Híbrida	57
PCR <i>in silico</i>	58
Determinación de clones recombinantes.....	62
Análisis de Actividad enzimática.....	63
Establecimiento del Bioproceso.....	64
Condiciones del Bioproceso para la expresión de β -galactosidasa recombinante	64
Crecimiento Biomasa Medio de Cultivo inóculo.....	67
Fermentación Principal.....	70
Evaluación Económica	72
Análisis de Producción	73
Costo Fijo Directo.....	73
Costo Fijo Indirecto.....	73

	11
Inversión Total.....	73
Estimación de Costo de Operación	76
Costo de manufactura	76
Materias primas.....	76
Consumibles.....	77
Mano de obra	78
Evaluación de impacto ambiental	80
Ingresos	81
Rentabilidad del Proyecto.....	82
Ganancia Bruta al año.....	83
Ganancia Bruta al año.....	83
Flujo de efectivo neto en el año.....	83
Retorno de Inversión ROI.....	84
Periodo de recuperación PBP	84
Capítulo 5	85
Discusión.....	85
Capítulo 6	89
Conclusiones	89
Capítulo 7	90
Recomendaciones	90
Referencias	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

Tabla 1. <i>pET-28a(+)</i> sequence landmarks.....	34
Tabla 2. <i>Composición nutricional de lactosuero dulce y ácido</i>	37
Tabla 3. <i>Descripción de los ensayos reacción A, B y control para determinar la actividad enzimática βgalactosidasa</i>	48
Tabla 4. <i>Parámetros utilizados para el diseño del proceso de producción de enzimas recombinantes</i>	49
Tabla 5. <i>Medio de cultivo para la fermentación por lotes, y fermentador principal producción de βGalactosidasa</i>	52
Tabla 6. <i>Descripción del bioproceso para la producción de β-Galactosidasa</i> ..	52
Tabla 7. <i>Ecuaciones estequiométricas que indican el crecimiento celular en glucosa, galactosa y glicerol</i>	65
Tabla 8. <i>Parámetros cinéticos de las etapas de propagación de E. coli</i>	67
Tabla 9. <i>Concentración de sustrato para cada etapa de fermentación E. coli</i> ..	68
Tabla 10. <i>Crecimiento celular en matraz de 500 mL</i>	69
Tabla 11. <i>Producción de β-galactosidasa con respecto al sustrato (SuperPro Designer)</i>	73
Tabla 12. <i>Costos Fijos de Instalación</i>	74
Tabla 13. <i>Costos Total de Inversión en dólares</i>	76
Tabla 14. <i>Resumen del Costo de materias primas para la producción de β-galactosidasa recombinante</i>	77
Tabla 15. <i>Resumen del Costo de materias primas para la producción de β-galactosidasa recombinante</i>	78
Tabla 16. <i>Costo de mano de obra para la producción de β-galactosidasa recombinante</i>	78

Tabla 17. <i>Estimación de costos de operación utilizando suero de leche y para glicerol.....</i>	79
Tabla 18. <i>Principales compuestos de desecho emitidos en la producción de β-galactosidasa..</i>	80
Tabla 19. <i>Producción de β-galactosidasa producidas al año.....</i>	81
Tabla 20. <i>Tiempo estimado para la producción de β-galactosidasa por batch.</i>	81
Tabla 21. <i>Proyección de β-galactosidasa consumidas en los últimos 5 años...82</i>	
Tabla 22. <i>Producción de la demanda de β-galactosidasa... ..</i>	82

Índice de figuras

Figura 1. <i>Hidrólisis de lactosa por β-galactosidasa para producir beta-D-galactosa y beta-D-glucosa.....</i>	23
Figura 2. <i>Estructura tetramérica de β-galactosidasa.....</i>	24
Figura 3. <i>Componentes del vector pET-28a(+)</i>	30
Figura 4. <i>Diagrama de Flujo para la producción de β-Galactosidasa.....</i>	56
Figura 5. <i>Sitios de restricción asociado al gen β-galactosidasa (Lac4), cds completos de <i>Kluyveromyces lactis</i>. Los sitios NheI y BamHI son únicos en el vector ubicados en los extremos del polilinker.....</i>	57
Figura 6. <i>Sitios de restricción asociado al vector pET-28 a (+). Los sitios NheI y BamHI son únicos en el vector ubicados en la región del Polylinker 199-232 pb.58</i>	
Figura 7. <i>Electroforesis in silico de los productos obtenidos de la digestión con BamHI y NheI, fragmento de PCR: 1) Plásmido pET-28a(+)</i> 5.4 Kb y 2) Fragmento	

<i>de PCR de βgalactosidasa (Lac4) cds completos con sitios de restricción 3.1 kB.</i>	
<i>Ladder: 1 kb Plus.</i>	59
Figura 8. <i>Producto obtenido de la digestión con BamHI y NheI, Inserción del gen codificante de βgalactosidasa y dentro del Plásmido pET-28 a (+).....</i>	60
Figura 9. <i>Electroforesis in silico de los productos obtenidos de la digestión con BamHI y NheI, Fragmento de PCR : 1) fragmento del Plásmido pET-28 a (+) 5.3 kB, 2) fragmento de βgalactosidasa 3.1 kB 3) Fragmento de pET-28 a (+)- BgaL</i>	
<i>Fragmentos de 5.3 Kb y 3.1 KB, Ladder: 3 kb Plus.....</i>	61
Figura 10. <i>Prueba de gen de resistencia a Kanamicina, colonias amarillentas son característica de E. coli.</i>	62
Figura 11. <i>Cribado azul-blanco de colonias bacterianas utilizando IPTG y X-Gal.</i>	
<i>.....</i>	63
Figura 12. <i>Resultados de la hidrólisis de orto-nitrofenol-beta-D-galactopiranósido ONPG.....</i>	63
Figura 13. <i>Valores de la actividad de la β-galactosidasa ácida después de diferentes tiempos de incubación a 25 y 37 ° C.....</i>	64
Figura 14. <i>Diagrama de flujo del Bioproceso para la producción de β-glucosidasa recombinante</i>	66
Figura 15. <i>Cinética de crecimiento de Biomasa en cultivos por lote (propagación)</i>	70
Figura 16. <i>Cinética de crecimiento de biomasa en fermentador 2000 L (propagación).</i>	
<i>.....</i>	70
Figura 17. <i>Composición de costos para la producción de β-glucosidasa recombinante.</i>	79

Resumen

La producción de β -galactosidasa a partir de hospederos naturales resulta insuficiente para llevar a cabo una producción industrial importante que satisfaga los niveles necesarios según la demanda por lo que se necesita un sistema productivo a partir de un organismo recombinante.

La presente investigación tiene como objetivo el diseño de un Bioproceso, desde la fase de clonación del gen de interés hasta el diseño de la producción a escala industrial de β -galactosidasa, enzima de gran demanda, necesaria para la hidrólisis de la lactosa cuyos componentes son utilizados como suplemento digestivo y tratamiento a la intolerancia a la lactosa. Se planifica utilizar en este diseño suero de leche que es un subproducto industrial de desecho como sustrato en el medio de fermentación para el crecimiento de *Escherichia coli* BL21(DE3) recombinante que sobre expresó el gen codificante para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. El diseño conceptual y una evaluación tecno-económica de la producción de una enzima tipo β -galactosidasa a escala industrial con bajos costos productivos, se determinó mediante una versión libre del software bioinformático SuperPro Designer. El cuál es el primer paso en el diseño para la construcción de una planta de producción. La producción diseñada se llevó a cabo en un fermentador de 2000 L, los procesos de recuperación y purificación de la fase soluble e insoluble dieron como resultado una producción de 177.137 Kg de enzima/Batch con actividad catalítica de 0.4552 (U / mL) a 37°C. El análisis tecno-económico refleja que la planta tiene un retorno de inversión de 11 veces la inversión inicial con un periodo de recuperación de 8.6 años.

PALABRAS CLAVE:

- **β -GALACTOSIDASA**
- **BIOPROCESO**
- **FERMENTACIÓN**
- **SUPERPRO DESIGNER**

ABSTRACT

The production of β -galactosidase from natural hosts is insufficient to carry out an important industrial production that satisfies the necessary levels according to demand, Reason why a productive system is needed from a recombinant organism.

The present research aims to design a Bioprocess, from the cloning phase of the gene of interest to the design of industrial-scale production of β -galactosidase, an enzyme in great demand, necessary for the hydrolysis of lactose which components are used as a digestive supplement and treatment for lactose intolerance. It is planned to use in this design whey which is an industrial waste by-product as a substrate in the fermentation medium for the growth of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) that overexpressed the coding gene for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. The conceptual design and a techno-economic evaluation of the production of a β -galactosidase type enzyme on an industrial scale with low production costs was determined using a free version of the bioinformatics software SuperPro Designer. Which is the first step in the design for the construction of a production plant. The designed production was carried out in a 2000 L fermenter, the recovery and purification processes of the soluble and insoluble phase resulted in a production of 177.137 Kg of enzyme / Batch with catalytic activity of 0.4552 (U / mL) at 37 ° C. The techno-economic analysis reflects that the plant has a return on investment of 11 times the initial investment with a payback period of 8.6 years.

KEY WORDS:

- **β -GALACTOSIDASE**
- **BIOPROCESS**
- **FERMENTATION**
- **SUPERPRO DESIGNER**

Capítulo 1

Generalidades

Formulación del problema y antecedentes

Existe una creciente aplicación de enzimas en los sectores industriales, como son las manufacturas de alimentos, detergentes, textiles, fines terapéuticos y diagnóstico (Berini, Marinelli, & Binda, 2020). Ecuador no tiene mucho desarrollo en la producción de sus propias enzimas más bien se importan desde el extranjero, lo que encarece todo sistema productivo que se lleve a cabo.

La tecnología del ADN recombinante, permite la transferencia de genes de una especie en el genoma de otra, con el fin de utilizar la maquinaria metabólica para producir grandes cantidades, una proteína que naturalmente no se sintetiza en el hospedero (Alvarado, Chavarría, Leiva, & Mora, 2019). Según Vieira (2018), la producción de proteínas recombinantes biológicamente activas surge a principios de la década de 1980, con el propósito de superar la cantidad producida mediante la extracción de fuentes naturales.

Según Vandermies & Fickers (2019) la producción de proteínas recombinantes representa un mercado multimillonario. Por lo cual, la biotecnología industrial en conjunto con la ingeniería genética y las técnicas de recombinación de ADN facilitan la producción óptima de proteínas a gran escala en condiciones controladas de crecimiento que dependen de la proteína de interés (Taipa, Fernandes, & Carcalho, 2019).

La producción mundial de β -galactosidasa se estima en alrededor de 5,75 millones de toneladas métricas por año, el mercado de expresión de proteínas fue de 1645 millones en el 2017 y se espera llegar a 2850 millones de dólares para el 2022 (Vieira, Souza, Silva, Mendonça, & Parachin, 2018).

La β -galactosidasa (lactasa) es una enzima importante en el cuerpo y en la industria alimentaria, cataliza la hidrólisis de los galactósidos hasta llegar a monosacáridos, cada

galactósido contiene galactosa en su composición. La aplicación principal es la hidrólisis de lactosa en leche y derivados como el suero de leche (Yin *et al.*, 2018; Oliveira, Guimarães, & y Domingues, 2011).

Dentro de la farmacéutica las β -galactosidasas, son utilizadas como suplemento digestivo y tratamientos de trastornos como la intolerancia a la lactosa (Chanalia, Gandhi, Attri, & Dhanda, 2018). Es una enzima esencial para el metabolismo de la lactosa en los seres humanos ayudando en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa. La intolerancia a la lactosa es una disminución de la capacidad de digerir la lactosa, que afecta aproximadamente al 70% de la población adulta mundial, una estrategia para el manejo de intolerancia a la lactosa es utilizar productos con cantidad reducida de lactosa o complementar la dieta con β -galactosidasa exógena (Yin *et al.*, 2018).

Otra aplicación de la β -galactosidasa es la producción de prebióticos de la leche galacto-oligosacáridos (GOS) mediante transglicosilación, que han sugerido beneficios para la salud, como la prevención del cáncer colorrectal, evitando y tratando los síntomas de la enfermedad asmática, y mejora el microbiota, en la actualidad, la producción de GOS sigue siendo una industria emergente. La razón principal es la falta de enzimas industriales eficaces. Las mejores cepas productoras de GOS conocidas actualmente son *B. circulans*, *Kluyveromyces Lactis* y *A. oryzae* (Li, Zhu, & Xing, 2019).

Para el 2030 se estima que un tercio de las industrias se basen en procesos biotecnológicos, por lo tanto, la inversión en la biotecnología industrial es de suma importancia (Llerena, 2017). En el país cada vez se impulsa más la investigación un ejemplo es la planta Farmacéutica INDEUREC S.A. que se dedica a la fabricación de productos relacionados al cuidado de la salud, también se encarga de la producción de tabletas de lactasa 9000 FCC (INDEUCEC S.A., 2020).

El problema de estudio es el uso de β -galactosidasa en las industrias lácteas de Ecuador y el alto costo que representa esta enzima comercial, se propone el diseño de un bioproceso de producción de β - galactosidasa recombinante a escala industrial, desde la fase

de clonaje hasta la fase productiva, para proveer cantidades suficientes de enzima que pueda ser utilizada de manera específica en la industria láctea.

La β -galactosidasa puede obtenerse de diferentes fuentes naturales, que incluyen microorganismos, células vegetales y animales que representan un sistema de expresión de bajo rendimiento para la enzima (Oliviera, Guimaraes, & Domingues, 2012).

La producción de la enzima a escala industrial para aplicaciones en procesos alimenticios se realiza en microorganismos considerados seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA, y son las que provienen de *Kluyveromyces fragilis* y *lactis* y los hongos *Aspergillus niger* y *oryzae* (Morioka *et al.*, 2019). Los mismos que presentan rendimientos aceptables (Martarello *et al.*, 2019). Sin embargo, mediante el uso de las herramientas genéticas, se puede utilizar una cepa hospedera transformada con un vector de expresión más eficiente con el fin de aumentar los niveles de expresión de enzima y sean capaces de desarrollarse en un medio de cultivo con un mínimo de nutrientes (García *et al.*, 2013).

Para el diseño de un bioproceso a escala industrial es fundamental elegir correctamente el sistema de expresión, que está conformado por el organismo hospedero y un vector de expresión que contiene los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción del gen de interés en dicho organismo hospedero. *Escherichia coli* es un organismo huésped heterólogo considerado inofensivo en la producción de proteínas recombinantes, debido a su simplicidad, el crecimiento rápido y los procedimientos rentables de cultivo celular y extracción de proteínas (Smolskaya, Logashina, & Andreev, 2020). Segundo para la simulación de los pasos de los bioprocesos, se debe considerar la producción estimada, costos de implementación, escala de tiempo de producción, capacidad de ampliación para procesos posteriores, así como las propiedades y usos del producto (García *et al.*, 2019).

Justificación

En la actualidad el empleo de enzimas para la obtención de productos industriales, farmacéuticos, cosméticos y de uso cotidiano se ha incrementado, en Ecuador no existe información sobre la producción a escala industrial de enzimas tipo β -galactosidasas de forma natural o recombinante, debido a la escasa información local, de una propuesta tecnológica y metodológica apropiada a nivel de la zona de estudio (Tuquerres *et al.*, 2020). Las empresas más destacadas como Nestlé, Parmalat y Alpina tienen que importar β -galactosidasa de empresas extranjeras como Proenzimas S.A, para generar productos libres de lactosa (Rueda, 2019).

Las actividades industriales generan gran cantidad de residuos que pueden ser transformados en medios de cultivo para producción de nuevos productos contribuyendo así a una economía circular, y la reutilización de los mismos (Álvarez, Rico, Cerdán, Becerra, & González, 2018). Zikmanis, Kolesovs, & Semjonovs (2020) declaran que hay que enfocarnos en los recursos renovables, ampliar el uso de desechos agrícolas, incluido el suero de leche, que es una amenaza medioambiental, por lo tanto, su uso como materia prima, además de los beneficios para el ambiente, puede facilitar la producción industrial de muchos sub-productos.

El suero es un subproducto en la elaboración del queso, rico en lactosa, azúcar de la leche, contiene una alta cantidad de nutrientes consta de 93% de agua, 5% de lactosa, 0,7 a 0,9% de proteína y 0,3 a 0,5% de grasa (Chua & Liu, 2019).

En Ecuador las industrias lácteas presentes en las zonas de Imbabura, Carchi, Esmeraldas y Sucumbíos, se estima que cerca de un tercio de la producción lechera de la región se dedica a la producción de queso, generando grandes cantidades de suero (Chanfrau *et al.*, 2017). Las industrias lácteas enfrentan un gran problema de contaminación cerca de 1,6 billones de litros de suero ácido por año son producidos, los nutrientes presentes en el suero generan cerca de 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) la lactosa es el principal componente que contribuye a

la alta DBO y DQO por lo cual debe degradarse (Mieles, Yépez, & Ramírez, 2018). Los procesos de fermentación del suero podrían disminuir significativamente la carga orgánica (contenido de lactosa), mediante la hidrólisis de la lactosa y convertirla en productos útiles como etanol, GOS, ésteres de azúcar, enzimas y proteínas, reduciendo así el impacto ambiental (Alves, Morioka, & Suguimoto, 2019).

El suero contiene un 15-20% de proteínas que es demasiado grande para ser eliminado y se puede reutilizar, afortunadamente hoy en día se reconoce el potencial del suero como materia prima (Patel, 2015). Los procesos para convertir el suero en productos valiosos mediante el uso de microorganismos emergen como una ruta potencial para el desarrollo de biorrefinerías (Lappa, Terpou, Koulouglitotis, Eriotou, & Kopsahelis, 2019).

Las muchas propiedades funcionales (nutricionales y terapéuticas) de cada componente presente en el suero de leche aún están inexplorados (Kaur, Sharma, Jaimni, Kehinde, & Kaur, 2020). Además, la falta de enzimas que se necesitan para los procesos de fermentación del suero y obtener productos de interés, limita la exploración y componentes del suero de leche.

El suero puede ser fraccionado directamente empleando múltiples técnicas de separación de proteínas, como filtración, cromatografía, precipitación, y secado por pulverización que permite la formulación de productos, como suero dulce en polvo, suero aislado de proteína, suero ácido en polvo, suero concentrado de proteínas, polvos reducidos en lactosa (Kaur, Sharma, Jaimni, Kehinde, & Kaur, 2020). Por último, el suero se puede utilizar como materia prima de bajo valor para la elaboración de productos de alto valor añadido, como la producción de enzimas como α -amilasa, cutinasa, enzima convertidora de angiotensina-I y β -galactosidasa enzimas (De Freitas, Hortêncio, De Albuquerque, Rocha, & Gonçalves, 2020).

Teniendo en cuenta la premisa del uso requerido de β -galactosidasa en las industrias ecuatorianas y el hecho que la producción de enzimas en el país es mínima, es necesario

considerar la producción a gran escala, para satisfacer las necesidades internas y a futuro externas de la enzima, ofreciendo además un campo laboral para los ingenieros biotecnólogos (Berini, Marinelli, & Binda, 2020).

El presente trabajo tiene como objetivo obtener mediante el uso de softwares bioinformáticos un análisis técnico-económico de la implementación de un bioproceso para la expresión de β -galactosidasa utilizando como hospedero *Escherichia coli*.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa producida en *Escherichia coli* mediante el uso de programas bioinformáticos.

Objetivos específicos

Mediante el uso softwares bioinformáticos diseñar, realizar y comprobar *in silico*, las operaciones moleculares e ingenieriles necesarias para la obtención y producción de β -galactosidasa a partir de un clon de *Escherichia coli* BL21(DE3) recombinante.

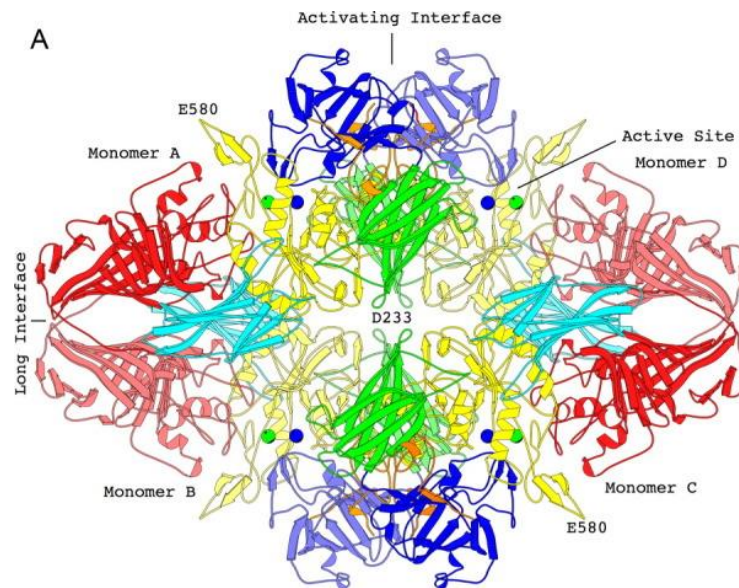
Simular utilizando la versión libre del software SuperPro Designer, un bioproceso para la producción industrial de la enzima recombinante.

Realizar el análisis ambiental y económico de la implementación de este bioproceso utilizando el software bioinformático SuperPro Designer y datos de la literatura.

terminal del barril. En el tetrámero, los 4 monómeros se agrupan, la interfaz "larga", formada por el eje horizontal de dos pliegues de la (Figura 2), relaciona los monómeros A y B. También relaciona C con D, el área de superficie involucrada en esta interfaz es de aproximadamente 4000 \AA^2 (Rueda, 2019) con un peso de 117 KDa.

Figura 2

Estructura tetramérica de β -galactosidasa (Rueda, 2019).



Gen BgaD

Las β -galactosidasas provenientes de levaduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*, tienen un pH óptimo 7, son utilizadas para la hidrólisis de la lactosa de la leche y del suero dulce (Acosta & Beltran, 2012).

La secuencia codificante para el gen de β -galactosidasa se obtuvo de la base de datos del NCBI: *Kluyveromyces lactis* cepa VKM Y-1339 gen β -galactosidasa (*Lac4*), cds completos (Número de accesoión: MT469915.1) cada triplete transcribe un aminoácido. Presentando la secuencia de la proteína.

Codón de Inicio

```

atc AtC ctt gct att cct gga gaa ttt aag gaa ccc caa aaa ggt tca cga aaa tag att gcc tac tag ggc tta cta cta tga tca gga tat ttt cga a
M I L A I P G E F K E P Q K G S R K * I A Y * G L L L * S G Y F R I
      10      20      30      40      50      60      70      80      90

tc tct caa tgg gcc ttg ggc ttt tgc gtt gtt tga tgc acc tct tga cgc tcc gga tgc taa gaa ttt aga ctg gga aac ggc aaa gaa atg gag cac ca
S Q W A L G F C V V * C T S * R S G C * E F R L G N G K E M E H H
      110     120     130     140     150     160     170     180     190

t ttc tgt gcc atc cca ttg gga act tca gga aga ctg gaa gta cgg taa acc aat tta cac gaa cgt aca gta ccc tat ccc aat cga cat ccc aaa tcc
F C A I P L G T S G R L E V R * T N L H E R T V P Y P N R H P K S
      210     220     230     240     250     260     270     280     290

tcc cac tgt aaa tcc tac tgg tgt tta tgc tag aac ttt tga att aga ttc gaa atc gat tga gtc gtt cga gca cag att gag att tga ggg tgt gga c
S H C K S Y W C L C * N F * I R F E I D * V V R A Q I E I * G C G Q
      310     320     330     340     350     360     370     380     390

aa ttg tta cga gct tta tgt taa tgg tca ata tgt ggg ttt caa taa ggg gtc cgg taa cgg ggc tga att tga tat cca aaa gta cgt ttc tga ggg cg
L L R A L C * W S I C G F Q * G V P * R G * I * Y P K V R F * G R
      410     420     430     440     450     460     470     480     490

a aaa ctt agt ggt cgt caa ggt ttt caa gtg gtc cga ttc cac tta tat cga gga cca aga tca atg gtg gct ctc tgg tat tta cag aga cgt ttc ttt
K L S G R Q G F Q V V R F H L Y R G P R S M V A L W Y L Q R R F F
      510     520     530     540     550     560     570     580     590

act aaa att gcc taa gaa ggc cca tat tga aga cgt tag ggt cac tac aac ttt tgt gga ctc tca gta tca gga tgc aga gct ttc tgt gaa agt tga t
T K I A * E G P Y * R R * G H Y N F C G L S V S G C R A F C E S * C
      610     620     630     640     650     660     670     680     690

gt cca ggg ttc ttc tta tga tca cat caa ttt cac act tta cga acc tga aga tgg atc taa agt tta cga tgc aag ctc ttt gtt gaa cga gga gaa tg
P G F F L * S H Q F H T L R T * R W I * S L R C K L F V E R G E W
      710     720     730     740     750     760     770     780     790

g gaa cac gac ttt ttc aac taa aga att tat ttc ctt ctc cac caa aaa gaa cga aga aac agc ttt caa gat caa cgt caa ggc ccc aga aca ttg gac
E H D F F N * R I Y F L L H Q K E R R N S F Q D Q R Q G P R T L D
      810     820     830     840     850     860     870     880     890

cgc aga aaa tcc tac ttt gta caa gta cca gtt gga ttt aat tgg atc tga tgg cag tgt gat tca atc tat taa gca cca tgt tgg ttt cag aca agt g
R R K S Y F V Q V P V G F N W I * W Q C D S I Y * A P C W F Q T S G
      910     920     930     940     950     960     970     980     990

ga gtt gaa gga cgg taa cat tac tgt taa tgg caa aga cat tct ctt tag agg tgt caa cag aca tga tca cca tcc aag gtt cgg tag agc tgt gcc at
V E G R * H Y C * W Q R H S L * R C Q Q T * S P S K V R * S C A I
      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090

t aga ttt tgt tgt tag gga ctt gat tct aat gaa gaa gtt taa cat caa tgc tgt tgg taa ctc gca tta tcc aaa cca tcc taa ggt gta tga cct ctt
R F C C * G L D S N E E V * H Q C C S * L A L S K P S * G V * P L
      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190

```

cga taa gct ggg ctt ctg ggt cat tga cga ggc aga tct tga aac tca tgg tgt tca aga gcc att taa tgc tca tac gaa ctt gga ggc tga ata tcc a
R * A G L L G H * R G R S * N S W C S R A I * S S Y E L G G * I S R
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

ga tac taa aaa taa act cta cga tgt taa tgc cca tta ctt atc aga taa tcc aga gta cga ggt cgc gta ctt aga cag agc ttc cca act tgt cct aa
Y * K * T L R C * C P L L I R * S R V R G R V L R Q S F P T C P K
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

g aga tgt caa tca tcc ttc gat tat tat ctg gtc ctt ggg taa cga agc ttg tta tgg cag aaa cca caa agc cat gta caa gtt aat taa aca att aga
R C Q S S F D Y Y L V L G * R S L L W Q K P Q S H V Q V N * T I R
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

tcc tac cag act tgt gca tta tga ggg tga ctt gaa cgc ttt gag tgc aga tat ctt tag ttt cat gta ccc aac att tga aat tat gga aag gtg gag g
S Y Q T C A L * G * L E R F E C R Y L * F H V P N I * N Y G K V E E
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

aa gaa cca cac tga tga aaa tgg taa gtt tga aaa gcc ttt gat ctt gtg tga gta tgg cca tgc aat ggg taa cgg tcc tgg ctc ttt gaa aga ata tc
E P H * * K W * V * K A F D L V * V W P C N G * R S W L F E R I S
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690

a aga gtt gtt cta caa gga gaa gtt tta cca agg tgg ctt tat ctg gga atg ggc aaa tca cgg tat tga att cga aga tgt tag tac tgc aga tgg taa
R V V L Q G E V L P R W L Y L G M G K S R Y * I R R C * Y C R W *
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790

ggt gca taa agc tta tgc tta tgg tgg tga ctt taa gga aga ggt tca tga cgg agt gtt cat cat gga tgg ttt gtg taa cag tga gca taa tcc tac t
V A * S L C L W W * L * G R G S * R S V H H G W F V * Q * A * S Y S
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890

cc ggg cct tgt aga gta taa gaa ggt tat tga acc cgt tca tat taa aat tgc gca cgg atc tgt aac aat cac aaa taa gca cga ctt cat tac gac ag
G P C R V * E G Y * T R S Y * N C A R I C N N H K * A R L H Y D R
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990

a cca ctt att gtt tat cga caa gga cac ggg aaa gac aat cga cgt tcc atc ttt aaa gcc aga aga atc tgt tac tat tcc ttc tga tac aac tta tgt
P L I V Y R Q G H G K D N R R S I F K A R R I C Y Y S F * Y N L C
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090

tgt tgc cgt gtt gaa aga tga tgc tgg tgt tct aaa ggc agg tca tga aat tgc ctg ggg cca agc tga act tcc att gaa ggt acc cga ttt tgt tac a
C C R V E R * C W C S K G R S * N C L G P S * T S I E G T R F C Y R
2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190

ga gac agc aga aaa agc tgc gaa gat caa cga cgg taa acg tta tgt ctc agt tga atc cag tgg att gca ttt tat ctt gga caa att gtt ggg taa aa
D S R K S C E D Q R R * T L C L S * I Q W I A F Y L G Q I V G * N
2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290

t tga aag cct aaa ggt caa ggg taa gga aat ttc cag caa gtt tga ggg ttc ttc aat cac ttt ctg gag acc tcc aac gaa taa tga tga acc tag gga
* K P K G Q G * G N F Q Q V * G F F N H F L E T S N E * * * T * G
2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

```

ctt taa gaa ctg gaa gaa gta caa tat tga ttt aat gaa gca aaa cat cca tgg agt gag tgt cga aaa agg ttc taa tgg ttc tct agc tgt agt cac g
L * E L E E V Q Y * F N E A K H P W S E C R K R F * W F S S C S H G
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490

```

```

gt taa ctc tcg tat atc ccc agt tgc att tta cta tgg gtt tga gac tgt tca gaa gta cac gat ctt tgc taa caa aat aaa ctt gaa cac ttc tat ga
* L S Y I P S C I L L W V * D C S E V H D L C * Q N K L E H F Y E
2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590

```

```

a gct tac tgg cga ata tca gcc tcc tga ttt ccc aag agt tgg gta cga att ctg gct agg aga tag tta tga atc att tga atg gtt agg tcg cgg gcc
A Y W R I S A S * F P K S W V R I L A R R * L * I I * M V R S R A
2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690

```

```

cgg cga atc ata tcc gga taa gaa gga atc tca aag att cgg tct tta cga ttc caa aga tgt aga gga att cgt ata tga cta tcc tca aga aaa tgg a
R R I I S G * E G I S K I R S L R F Q R C R G I R I * L S S R R K W K
2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790

```

```

aa tca tac aga tac cca ctt ttt gaa cat caa att tga agg tgc agg aaa act atc gat ctt cca aaa gga gaa gcc att taa ctt caa gat ttc aga cg
S Y R Y P L F E H Q I * R C R K T I D L P K G E A I * L Q D F R R
2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890

```

```

a ata cgg ggt tga tga agc tgc cca cgc ttg tga cgt taa aag ata cgg cag aca cta tct aag gtt gga cca tgc aat cca tgg tgt tgg tag cga agc
I R G * * S C P R L * R * K I R Q T L S K V G P C N P W C W * R S
2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

```

```

atg cgg acc ttg tgt tct gga cca gta cag att gaa agc tca aga ttt caa ctt tga gtt tga tct cgc tAg Caa taa < 3078
M R T L C S G P V Q I E S S R F Q L * V * S R * Q *
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070

```

Codón de Parada

Hospedador *Escherichia coli*

Escherichia coli es uno de los hospedantes de producción más utilizados debido a la extensa información de sus procesos fisiológicos y genéticos, facilidad de cultivo, bajo costo de su crecimiento y logro de fermentaciones de alta densidad celular (Sadeghian, Ebrahimi, Moazzen, Yousefian, & Jahanian, 2019).

La secuencia codificante de la proteína de interés se puede insertar en un vector de expresión apropiado y transformarse en un huésped procarionta, como la bacteria *Escherichia coli* la cual se puede utilizar como fábrica de células microbianas para producir proteínas recombinantes reduce los costos de producción y mejora el rendimiento. La sobreexpresión de proteínas conduce a la formación de agregados insolubles o cuerpos de inclusión, los cuales han llamado la atención por la consideración biotecnológica que requiere que sean

procesados por métodos, que proporcionen proteínas solubles con las propiedades de sus homólogos nativos (Gardner, Hassan, Hafeez, Arif, & Akhtar, 2019).

La cepa BL21 (DE3)

La línea B de *Escherichia coli* surgió como la ganadora dadas sus características destacadas. Un derivado, BL21 (DE3), se ha convertido en el huésped preferido para la producción de proteínas recombinantes. La secuenciación del genoma de las cepas de la línea B ha ayudado a comprender la base molecular de fenotipos útiles para la síntesis de proteínas heterólogas (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

Cuerpos de Inclusión

La formación de cuerpos de inclusión durante la sobre expresión de las proteínas recombinantes puede ser resultado de la acumulación de altas concentraciones de intermediarios de plegamiento o debido a un ineficiente procesamiento por las chaperonas celulares. (González & Fillat, 2018). La agregación probablemente sea causada por la alta concentración local de polipéptidos nacientes que emergen de los ribosomas, inicialmente se creía que los cuerpos de inclusión eran productos de desecho de las bacterias, pero se ha descubierto que se forman como una reacción de estrés de las células dando como resultado una proteína precipitada supuestamente biológicamente inactiva (Slouka, Kopp, Spadiut, & Herwig, 2019).

Los cuerpos de inclusión son objeto de estudio debido a los elementos estructurales del polipéptido presentes en la unidad monomérica y para describir las interacciones intermoleculares que mantienen estos monómeros en una estructura agregada (Gardner, Hassan, Hafeez, Arif, & Akhtar, 2019).

El procesamiento posterior, como la homogeneización de células, la centrifugación o la solubilización de los cuerpos de inclusión, es propenso a un rendimiento de proceso variable y resultados rendimientos de extracción bajos (Slouka, Kopp, Spadiut, & Herwig, 2019).

De acuerdo a Flores *et al.*, (2019), los cuerpos de inclusión son una red de proteínas parcialmente plegadas con un amiloide, la recuperación de proteínas bioactivas solubles presentes en los cuerpos de inclusión se ha logrado típicamente mediante el tratamiento con agentes caotrópicos o tratamientos ácidos, seguido de dilución o diálisis en tampones de replegamiento optimizados. En la mayoría de los casos, el proceso involucra el despliegue de proteínas.

Diseño óptimo de los vectores de expresión

Los elementos que conforman el vector de expresión incidirán directamente en la eficiencia de la expresión del gen clonado. Estrategia de expresión será constituido en vector de expresión pET (Maksum, Nabel, Ishmayana, & Soedjannatmadja, 2020). (Figura 3) Otros elementos necesarios para su replicación en el hospedero y para la transcripción y traducción del gen son, el origen de replicación, el promotor, la secuencia codificadora, terminadores de la transcripción, sitio de unión al ribosoma y el uso de marcadores de resistencia a antibióticos que ayudan con selección de los recombinantes y garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo (González & Fillat, 2018).

Promotores

La expresión génica está fuertemente regulada a nivel transcripcional por lo que la síntesis del ARN mensajero (ARNm) pudiera considerarse el determinante primario del rendimiento final de la proteína de interés (González & Fillat, 2018).

Un promotor eficaz en la expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli* tiene cuatro características importantes: primero, el promotor debe ser lo suficientemente fuerte para permitir la acumulación de proteína recombinante en un 10-30% del total de proteínas celulares; segundo, exhibe una actividad transcripcional basal mínima y, por tanto, se evita la transcripción no deseada antes de la inducción; tercero, el promotor permite una inducción sencilla y económica; y cuarto, la actividad promotora se puede ajustar con precisión (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

Secuencia del vector pET-28 a (+)

1 atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gacccgttta gaggcccaa
61 ggggttatgc tagttattgc tcagcggtag cagcagccaa ctacagcttcc tttcgggctt
121 tgtttagcagc cggatctcag tgggtggtag ggtggtagctc gagtgcggcc gcaagcttgt
181 cgacggagct cgaattcggg tccgcgaccc atttgctgtc caccagtcac gctagccata
241 tggctgcccgc gcggcaccag gccgctgtcg tgatgatgat gatgatggct gctgcccag
301 gtatatctcc ttcttaaagt taaacaaaat tatttctaga ggggaattgt tatccgctca
361 caattcccct atagtgagtc gtattaatth cgcgggatcg agatctcgat cctctacgcc
421 ggacgcacgc tggccggcat caccggcgc acaggtgcgg ttgctggcgc ctatatcgcc
481 gacatcacgc atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc
541 gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactggttg gcgccatctc cttgcatgca
601 ccattccttg cggcggcggg gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaagt
661 caggagtcgc ataagggaga gcgctcgagat cccggacacc atcgaatggc gcaaacctt
721 tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc aggtggtga atgtgaaacc
781 agtaacgta tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctc tatcagaccg tttcccgcg
841 ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc
901 ggagctgaat tacattcca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct
961 gattggcgtt gccacctcca gtctggccct gcacgcgccc tcgcaaattg tcgcgccgat
1021 taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag cgtggtagtg tcgatgtag aacgaagcgg
1081 cgtcgaagcc tgtaaagcgg cggtagcaca tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat
1141 cattaactat ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gactaatgt
1201 tccggcgta tttcttgatg tctctgacca gacaccatc aacagtatta ttttctcca
1261 tgaagacggc acgcgactgg gcgtggagca tctggtagca ttgggtcacc agcaaatcgc
1321 gctgtagcgc ggcccattaa gttctgtctc ggcgctctg cgtctggctg gctggcataa
1381 atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtccat
1441 gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttcca ctgcatgct
1501 ggttgccaac gatcagatgg cgtggcgc aatgcgcgcc attaccagt ccgggctgcg
1561 cgttggtgag gatctctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat
1621 cccggcgta accaccatca aacaggatth tcgcctgctg gggcaacca gcgtggaccg
1681 cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcggg gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact
1741 ggtgaaaaga aaaaccacc tggcgcccaa tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc
1801 cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt tccccgactg gaaagcggc agtgagcgc

1861 acgcaattaa tgtaagttag ctcaactcatt aggcaccggg atctcgaccg atgcccttga
1921 gagccttcaa cccagtcagc tccttccggt gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac
1981 ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca
2041 ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat
2101 tcggaatctt gcacgcctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg
2161 gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccccacg ggtgcgcatg atcgtgctcc
2221 tgtcgttgag gacccggcta ggctggcggg gttgccttac tggttagcag aatgaatcac
2281 cgatacgcga gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaac gtctgcgacc tgagcaacaa
2341 catgaatggt cttcggtttc cgtgtttcgt aaagtctgga aacgcggaag tcagcgcctt
2401 gcaccattat gttccggatc tgcacgcag gatgctgctg gctaccctgt ggaacaccta
2461 catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgcgcga
2521 tccataccgc cagttgttta ccctcacaac gttccagtaa ccgggcatgt tcatcatcag
2581 taaccoctat cgtgagcadc ctctctcgtt tcatcgggat cattaccccc atgaacagaa
2641 atccccctta cacggaggca tcagtgacca aacaggaaaa aaccgcccctt aacatggccc
2701 gctttatcag aagccagaca ttaacgcttc tggagaaact caacgagctg gacgcggatg
2761 aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgctga tgagctttac cgcagctgcc
2821 tcgcgcgttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca
2881 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg
2941 ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc agtcacgtag cgatagcggg gtgtatactg
3001 gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatat gcggtgtgaa
3061 ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc gctcttccgc ttctctgctc
3121 actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg
3181 gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc
3241 cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcggtgctgg cgtttttcca taggctccgc
3301 ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga
3361 ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc
3421 ctgocgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat
3481 agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg
3541 cacgaacccc ccgctcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc
3601 aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga
3661 gcgaggatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact
3721 agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt
3781 ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag
3841 cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg

3901 tctgacgctc agtggAACGA aaactCACGT taagggattt tggTcatgaa caataaaaact
3961 gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgTtatgagc catattcaac gggaaacgTc
4021 ttgctctagg ccgCGattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc
4081 tcgCGataat gTcgggcaat caggtgCGac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc
4141 gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat
4201 ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg
4261 tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc gggaaaacag cattccaggt
4321 attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgTtctgCG
4381 ccggttgcat togattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcCG tatttCGtct
4441 cgctcaggCG caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga
4501 gcgtaatggc tggcctgTtg aacaagtctg gaaagaaatg cataaaacttt tgccattctc
4561 accggattca gTcgtcactc atggTgattt ctcaactgat aaccttattt ttgacgaggg
4621 gaaattaata ggtTgtattg atgtTggacg agTcggaatc gcagaccgat accaggatct
4681 tgccatccta tggaaactgcc tcggtgagTt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca
4741 aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctCGatga
4801 gtttttctaa gaattaattc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac
4861 aaataggggt tccgCGcaca tttccccgaa aagtGCCacc tGaaattgta aacgttaata
4921 ttttgTtaaa attCGcgtta aatttttGtt aaatcagctc attttttaac caataggccg
4981 aaatCGGcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggTtg agTgtTgttc
5041 cagTttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggCGaaaaa
5101 ccgtctatca gggCGatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt
5161 cgaggTgCCg taaagcacta aatCGgaacc ctaaagggag cccCGattt agagcttgac
5221 ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agCGaaagga gcgggCGcta
5281 gggCGctggc aagtgtagCG gTcacgctgc gcgtaaccac cacaccCGcc gcgcttaatg
5341 cgccgctaca gggCGcgtcc cattCGcca

Tabla 1

pET-28a(+) sequence landmarks (Genome Compiler, 2020).

Secuencia	Ubicación
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

Codones 5'UTR y N-terminal

A pesar de que el código genético es universal, tanto hospederos eucariotas como procariontes utilizarán preferencialmente el uso de determinados codones sinónimos, lo cual está determinado por la abundancia relativa de los ARN de transferencia (ARNt) complementarios a cada codón (González & Fillat, 2018). Tanto el codón de iniciación 5'UTR como la región codificante 5' de la transcripción de un gen están estrechamente relacionadas con el inicio de la traducción y la expresión de proteínas. La optimización de las secuencias de nucleótidos con la unión entre el vector pET y la secuencia codificante puede mejorar la producción de proteínas. Además, el uso de codones raros en lugar de codones comunes en la región codificante 5' aumenta la expresión de proteínas en *Escherichia coli* en aproximadamente 14 veces (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019)

Etiquetas de Fusión

Una etiqueta de fusión se adiciona en el extremo N o C, permite una fácil detección de la expresión de proteínas. La etiqueta His6 o etiqueta hexahistidina, generalmente consta de seis residuos de histidina que pueden unirse a varios tipos de iones inmovilizados, es una de las etiquetas de purificación más utilizadas, y se puede obtener proteína de alta pureza con un 80% en una sola etapa cromatográfica (Baolei & Che, 2016).

Marcadores de resistencia

La implementación de marcadores de resistencia a antibióticos, ayudan a la selección de los recombinantes y garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo (González & Fillat, 2018). Por lo general, los plásmidos contienen genes que confieren resistencia a los antibióticos. a mayor escala, el uso de antibióticos se dificulta debido a sus costos asociados, la contaminación ambiental y las restricciones regulatorias. Los marcadores de resistencia a la ampicilina, el cloranfenicol y kanamicina, tienden a degradarse (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

Condiciones para la producción de β -galactosidasa en *Escherichia coli*.

Cambiar las condiciones del cultivo es la forma más fácil de alterar el crecimiento de *Escherichia coli* que tiene un impacto directo en la producción de proteína recombinante, las variaciones de los parámetros conducen a cantidades de producción más altas (Sandomenico, Sivaccumar, & Ruvo, 2020). Los principales parámetros a tomar en cuenta son:

Efecto de la temperatura

La temperatura de crecimiento óptima para *Escherichia coli* es de 37 °C. Se ha reportado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* a 37 °C induce la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019). También es posible evitar la formación de cuerpos de inclusión optimizando las condiciones de cultivo celular. La expresión de proteínas en *Escherichia coli* a 15-25 °C ayuda para aumentar la solubilidad de proteínas recombinantes (Slouka, Kopp, Spadiut, & Herwig, 2019).

Oxígeno disuelto

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) común en la producción de interferones recombinantes se mantiene sobre 20 – 30 % de oxígeno disuelto (Carvajal & Rodríguez,

2017). El oxígeno es factor de fermentación fundamental para los microorganismos aerobios. El microorganismo requiere cierta cantidad de oxígeno para llevar a cabo su metabolismo, y así poder crecer a una velocidad óptima (Sandomenico, Sivaccumar, & Ruvo, 2020).

pH

El pH puede controlarse con hidróxido de amonio al 25-30%, la producción de interferón recombinante por *Escherichia coli* el pH se mantiene cercano a 7,2 (Carvajal & Rodríguez, 2017).

Agitación

El parámetro de agitación para maximizar la concentración de oxígeno en el medio varía entre los valores 500 – 1500 rpm (Carvajal & Rodríguez, 2017). La agitación permite mantener un proceso de mezcla homogéneo del medio de cultivo, permitiendo una disponibilidad efectiva de los nutrientes en todo el equipo de fermentación. También juega un papel importante en la transferencia de calor desde o hacia el medio de cultivo (Sandomenico, Sivaccumar, & Ruvo, 2020).

Producción de suero de leche en Ecuador

El suero de leche es uno de los principales subproductos de la industria láctea que contiene el 55% de los nutrientes de la leche y puede usarse como una fuente alternativa de compuestos de valor agregado (Sampaio, Faria, Da Silva, De Souza, & Converti, 2019). El suero de leche está compuesto de 93% de agua, 5% de lactosa, 0,7 a 0,9% de proteína y 0,3 a 0,5% de grasa (Alves, Morioka, & Suguimoto, 2019). Los datos registrados por la Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente del Ecuador (AGSO), en 2017 se registró un promedio de 5,4 millones de litros de leche diarios a nivel nacional (Chanfrau *et al.*, 2017). La producción de quesos en Ecuador, ha incrementado en los últimos años, de los 5.4 millones de litros de leche diarios más de un tercio es utilizado en la fabricación de quesos emitiendo una gran cantidad de suero de leche (Ayala, 2017). Mientras que el 50% de la leche cruda se estima a la fabricación de quesos sin pasteurizar en queserías de carácter informal. Se produce de

cada 100 ml de leche cruda, se obtiene 85 ml de lacto suero resultante (Guevara & León, 2019), lo cual genera un aumento en la cantidad de materia orgánica DBO generando un impacto ambiental.

El suero de leche posee una riqueza en lactosa, que puede utilizarse como fuente de carbono para diversos bioprocesos, reduciendo los graves problemas ambientales relacionados con su eliminación. Por tanto, la rentable recuperación es un tema emergente de investigación, debido a la enorme cantidad que se produce en todo el mundo (Sampaio, Faria, Da Silva, De Souza, & Converti, 2019).

Tabla 2

Composición nutricional de lactosuero dulce y ácido (Guevara & León, 2019).

Contenido	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Proteínas	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfatos	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Lactatos	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Programas Bioinformáticos

Existe un gran número de páginas web con bases de datos de genes. Una de las más utilizada es la del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta base de datos almacena la información de las secuencias genómicas en el Banco de Genes (GenBank). Además, contiene un índice de artículos científicos y una recopilación de enfermedades genéticas humanas (Guevara, Jiménez, & Sotelo, 2020).

Benchling

Es una plataforma utilizada en el campo de la ingeniería genética, la biología molecular y la biología sintética. Es un software gratuito para usuarios académicos y está disponible en línea (<https://www.benchling.com/>).

El software es compatible con Windows. Además, el software admite formatos de archivo comunes como: FASTA, Vector NTI, SnapGene, Geneious, Clone Manager, Serial Cloner, Plasma DNA, ApE, DNASTar. EL programa permite diseñar experimentos de clonación, realizar alineaciones de secuencia y anotaciones de secuencia, diseñar cebadores, predecir la expresión de proteínas. También puede visualizar genomas completos, realizar un proceso de hibridación y simular los resultados de la electroforesis en gel (Benchling, 2020).

SuperPro Designer

El software SuperPro Designer posee una versión gratuita de gran utilidad que permite la simulación y análisis de bioprocesos (<https://www.intelligen.com>). Permite acercar al investigador a la respuesta esperada en los procesos industriales en función de las modificaciones planteadas en el mismo. Además, la plataforma presenta una herramienta de análisis de costes y emisiones lo que la hace muy versátil en su uso en diferentes áreas relacionadas con los procesos fermentativos, ambientales, de energías renovables y de producción química (Cara, Gómez, Martínez, Rosas, & Fernández, 2015).

Dentro del software hay una opción que se especializa en cálculos tecno económicos en la ingeniería de procesos, el programa puede proporcionar al usuario los costos, estimación que tiene en cuenta los costos de capital, los costos operativos, los costos de materiales, así como los costos administrativos y costos auxiliares (Bergman, 2019).

Diseño del Bioproceso

La ingeniería de bioprocesos industriales es una agregación tanto de la química, la biología, las matemáticas y el diseño industrial que se ocupa en varios procesos biotecnológicos con fines de producción a gran escala de varios procesos cercanos a la naturaleza, lo que permitirá a los fabricantes analizar la inversión y explotar los resultados y productos antes de emprender la construcción de la planta y ejecución del bioproceso en físico (Kulkarni, 2019).

Un bioproceso involucra la transformación de un sustrato en determinado producto mediante el uso de microorganismos, es la combinación de múltiples secciones de proceso, generalmente para procesamiento upstream y downstream.

Proceso Upstream

Los Bioprocesos involucrados corriente Arriba incluyen todas las unidades de operación que son requeridas antes de comenzar con la etapa de la biorreacción. Las operaciones típicas Upstream son: preparación de medios, importancia de la elección de los componentes, esterilización de materias primas, esterilización de biorreactores, y preparación de inóculos (González, 2018).

1. Producción

La modalidad por lote alimentado o sistema Batch es la más utilizada para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Se utilizará un biorreactor en tanque agitado, el biorreactor es donde ocurre la conversión de las materias primas en productos (González, 2018). El tanque agitado ofrece la opción de aplicar una amplia gama de tecnología analítica de procesos y estrategias de control de proceso, la importancia es mantener controlada la mezcla a una velocidad constante manteniendo el cultivo homogéneo. Las células, nutrientes y gases disueltos se distribuyen de manera uniforme, lo que minimiza las limitaciones locales de cualquier componente y permite el monitoreo en línea del cultivo, los biorreactores permiten tomar muestras de pequeños volúmenes para análisis fuera de línea sin alterar el cultivo (Kießlich & Kamen, 2020).

Proceso Downstream

El procesamiento downstream es dependiente de las etapas de biorreacción y del procesamiento aguas arriba (upstream). Es el procesamiento de la bioproducción, o bioseparaciones que comprenden los procesos biotecnológicos, como la separación y purificación (Hu, 2020).

El número de pasos de tratamiento aguas abajo debe mantenerse en un valor reducido que permita satisfacer la pureza y la robustez del proceso. Para seleccionar la alternativa más apropiada, hay que considerar muchas características tales como pureza / selectividad, rendimiento, costos de operación, costo de la inversión necesaria, posible desnaturalización de producto, robustez del proceso, condiciones de separación, y concentración de producto después de la etapa (González, 2018). Dentro de los principales procesos Downstream tenemos:

1. Recuperación de Enzima Recombinante

La enzima se produce en *Escherichia coli* como producto intracelular, en forma soluble e insoluble agregada como cuerpo de inclusión, por lo que el primer paso para la obtención de la proteína es separar la biomasa celular y los compuestos insolubles del caldo de fermentación, removiendo el líquido extracelular.

La centrifugación y la filtración por membrana son alternativas válidas para la separación de células del medio. Estas técnicas son las más usadas para la recuperación de células a gran escala (Carvajal & Rodríguez, 2017).

a) La centrifugación las centrífugas de discos con tambor auto limpiante son indispensables para la separación mecánica de suspensiones sólido-líquido. Se usa principalmente para eliminar el medio gastado y reponer con medio fresco (Hu, 2020). Las centrífugas de disco son comúnmente utilizadas para la separación de partículas muy finas. Las condiciones iniciales en la centrífuga serán las finales provenientes de la fermentación de cultivo por lote alimentado. En esta etapa se asume que la centrífuga tiene un porcentaje de recuperación del 99.5% (Carvajal & Rodríguez, 2017).

2. Ruptura Celular

La disrupción de células *Escherichia coli* utilizando el proceso de homogeneización ideal para la producción a escala industrial de proteínas terapéuticas recombinantes.

Luego las células se rompen por el paso de un disruptor de flujo continuo a 1200 bar de presión (Carvajal & Rodríguez, 2017).

En el homogeneizador de alta presión, está adaptado del dispositivo diseñado para crear emulsiones, la suspensión microbiana se presuriza primero usando una bomba de desplazamiento positivo. La presión se libera rápidamente al pasar a través de un orificio fino. A partir de entonces, la suspensión celular típicamente impacta una superficie sólida para mejorar aún más la rotura celular. El homogeneizador de alta presión utilizan presiones operativas en el rango de 20-120 MPa (Murray, 2019).

3. Purificación

a) Cromatografía de Intercambio iónico

Con el uso de la cromatografía de intercambio iónico, se separan las moléculas basándose en sus propiedades de carga eléctrica. Durante la separación se produce una competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente o una matriz de intercambio iónico (Deloisa, Martínez, & Palomares, 2013).

Se purificará las proteínas por medio de una Cromatografía de intercambio iónico. Para lo cual se utilizaron columnas DEAE celulosa, equilibrada con Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.1M, mismas que contienen una fase móvil y una estacionaria. En la fase móvil se tiene una carga neta positiva producida por las proteínas del presente estudio y en la fase estacionaria hay una carga neta negativa (Cuestas & Sánchez, 2018).

b) Cromatografía de Exclusión Molecular

El uso de la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, es requerida en los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño, una solución fluye a través de una cama empacada de medio poroso que ayuda a la elución diferencial de los solutos en función del tamaño molecular (Chávez, 2020). Se utilizó una columna

Sephadex S-200 que permite fraccionar proteínas en un rango de 5-250 KDa, utiliza buffer fosfato.

c) Filtración

La filtración, se utiliza para separar la materia sólida de fluidos, en la filtración un fluido líquido o gaseoso que contiene la proteína de interés pasa a través de un filtro con poros finos, las células quedan retenidas en el filtro en el mercado se encuentran disponibles diferentes tipos de medios filtrantes con diferente tamaño de poro (Show, Ooi, & & Ling, 2019).

d) Ultrafiltración

La ultrafiltración utiliza la presión hidrostática para forzar el agua a través de una membrana semipermeable, es una operación ampliamente utilizada para la concentración de proteínas, que consiste en un sistema de filtración por membranas. La presión de operación típica varía entre 0,2 y 0,5 Mpa y el flujo promedio varía entre 20 y 50 L/m² ·h. Se va a utilizar un sistema de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa De con respecto al tamaño de la proteína de interés (Carvajal & Rodríguez, 2017).

e) Diafiltración

La diafiltración es un caso específico de filtración mediante el uso de filtros permeables de micromoléculas para obtener una solución pura, en dónde el concentrado es diluido en agua y recirculado, reduciendo la concentración de los componentes solubles e incrementando el retenido (Rincón, Sepúlveda, & Ciro, 2020). La diafiltración se realizó diluyendo el concentrado proveniente de la cromatografía en 5 volúmenes de H₂O con grado 1 de pureza y volviéndola a reducir al volumen original, eliminando los componentes diferentes a β -galactosidasa.

4) Liofilización

La liofilización es una opción conservación, este proceso se basa en la sublimación, donde el agua pasa de sólido a vapor sin pasar por el estado líquido este proceso nos brinda beneficios de alto rendimiento, larga vida útil, con la liofilización se puede extraer más del 95% del agua contenida (Villegas & Lievano, 2020). El mantener el producto en un estado sólido retrasa las reacciones de degradación de las proteínas, debido a la disminución en el contenido de agua. No obstante, el someter a la proteína a procesos de liofilización puede desnaturalizarla, por ende, se necesita de excipientes encargados de otorgar una mayor estabilidad (Carvajal & Rodríguez, 2017).

5) Obtención de cuerpos de inclusión

Estudios recientes han demostrado que los cuerpos de inclusión contienen una cantidad importante de proteína activa. Los cuerpos de inclusión de β -galactosidasa recombinantes presentaron actividad enzimática. Las estructuras contienen una proporción importante de proteínas activas (Flores, Nolan, Perillo, & Sánchez, 2018). La recuperación de los cuerpos de inclusión se ha logrado típicamente mediante el tratamiento con agentes caotrópicos o tratamientos ácidos, seguido de dilución o diálisis en tampones de replegamiento optimizados (Flores *et al.*, 2019).

Para la obtención de proteínas puras y activas a partir de cuerpos de inclusión involucra tres pasos:

- **Recuperación de Cuerpos de Inclusión**

Posterior a la centrifugación, el pellet obtenido del lisado bacteriano, se resuspendió en una solución de tampón fosfato (0.05 M, pH=6.8, con NaCl 500 mM) las células fueron lisadas en un homogenizador de alta presión.

Se adicionó la solución de lavado 1 (0.5% Triton-X100, Tris-HCl, 100 mM NaCl), Pasa a un segundo proceso de centrifugación a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, El pellet se resuspendió en solución de lavado 2 (Buffer fosfato 0.05mM, 0.05 M y pH=6.8) con DNAsas durante 20 minutos la muestra a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°Cy enzima liberada de los cuerpos de inclusión se encuentra presente en el sobrenadante (Bianco, 2016).

- **Solubilización y Replegamiento**

Los cuerpos de inclusión se mezclan en una proporción en peso 1:50 con tampón de solubilización (0.1 M sulfato de sodio, urea 8 M, ditiotreit (DDT) 10mM, Tis 50mM, pH=9), se deja a temperatura ambiente durante 2 horas, los cuerpos de inclusión se replegarán con una dilución 10:1 de tampón de replegamiento (Urea 3M, glicerol al 15%, NaCl 300mM, Tris 50mM, glicina 20mM, fosfato de sodio 75mM, cisteína 4mM, glutatión 5mM, ph=8,2) la reacción de replegamiento dura 24 horas, el replegamiento se realizó en un tanque de acero inoxidable de 250 L (Xi *et al.*, 2019).

- **Purificación**

Los cuerpos de inclusión se purifican en una cromatografía en las mismas cromatografías de la fase soluble, pasan las proteínas por medio de una cromatografía de intercambio iónico. Para lo cual se utilizaron columnas DEAE celulosa, equilibrada con Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.1M (Cuestas & Sánchez, 2018). El recuperado pasa a una cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, se utilizó una columna Sephadex S-200 que permite fraccionar proteínas en un rango de 5-250 KDa, utiliza buffer fosfato (Chávez, 2020) .

Capítulo 3

Metodología

La información recolectada fue concerniente a los procesos de hidrólisis de β -galactosidasa. El presente estudio se realizó, con la finalidad de producir β -galactosidasa recombinante, a partir de residuos industriales con la finalidad de aprovecharlos reduciendo los costos de producción.

La metodología consta principalmente de dos fases: la primera es la obtención de β -galactosidasa, mediante un sistema de expresión *Escherichia coli* BL21(DE3) recombinante ayudándonos con el uso del Software bioinformático Benchling, en segundo lugar, se estableció las condiciones óptimas de cultivo para *Escherichia coli* transformada mediante datos bibliográficos, para el diseño de un Bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa el diseño de la planta del bioproceso se realizó utilizando el software SuperPro Designer que es un simulador utilizado para determinar parámetros de diseño, para la creación de nuevos productos.

Producción de enzimas recombinantes de *Escherichia coli*.

Para la realización del primer objetivo, la simulación del clonaje del sistema de expresión de β -galactosidasa recombinantes en bacterias de *Escherichia coli* BL21(DE3) y el uso del vector pET-28 a (+) que contiene el gen de interés, se realizó utilizando el software Benchling para su posterior producción a gran escala.

Benchling

Se utilizó el software Benchling de bioinformática, que permite analizar las secuencias de proteínas, se puede realizar búsquedas BLAST, diseñar cebadores para experimentos PCR, clonación secuenciación o hibridación, editar datos de cromatograma, ensamblar contigs (Thermo Fisher, 2020).

Obtención de secuencias

La secuencia codificante para el gen de β -galactosidasa se obtuvo de la base de datos

del NCBI: *Kluyveromyces lactis* cepa VKM Y-1339 gen β -galactosidasa (*Lac4*), cds completos (Número de acceso: MT469915.1).

La secuencia del vector pET-28 a (+) se obtuvo de la base de datos preexistente en el software Genome Compiler.

PCR *in silico*

Se procedió a realizar una simulación de PCR *in silico* tanto para el gen de β -galactosidasa y el vector de clonación con las enzimas de restricción únicos en los extremos 5' y 3' que permita clonar la banda única en el vector. Las enzimas escogidas son: "*BamHI* y *NheI*", enzimas de alta fidelidad y corte pegajoso.

BamHI

G ▼ GATC C

C CTAG ▲ G

NheI

G ▼ CTAG C

C GATC ▲ G

Los primers se diseñaron introduciendo los sitios de restricción de las enzimas seleccionadas en el programa Benchling.

F: 5' ATGGATCCGTCTTGCCTTATTCCTGAG 3'

R: 5' TTCAAGCTAGCAAGCGAGATCAAAGCTCAAAG 3'

Generación de una molécula híbrida.

Los fragmentos obtenidos de la digestión del vector y β -galactosidasa con las enzimas *BamHI* y *NheI* se ensamblaron utilizando el programa Benchling obteniéndose así una molécula híbrida.

Expresión.

Para verificar que la molécula se encuentre correctamente empalmado se analizó el construct que se encuentra en la misma dirección que el promotor T7.

Mediante una digestión con las enzimas encontradas se realizará una electroforesis en gel de agarosa 0.8% *in silico* utilizando el software Benchling con oligos internos del gen y externos del vector.

Transformación bacteriana mediante choque térmico

Para la transformación bacteriana el protocolo a usar fue el sugerido por NEB. Se procede a descongelar células de la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) en hielo una alícuota de 50 μ L, se adicionaron 0.1 μ g de plásmido pET-28 a(+) a la mezcla de células, moviendo el tubo sin agitar, se incubó en hielo por 30 minutos, la mezcla fue sometida a choque de calor en un baño maría a 42°C por exactamente 30 segundos, se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos, se agregó 950 μ L de medio LB (Luria-Bertani) a temperatura ambiente, la mezcla fue incubada por 60 minutos a 250 rpm y 37 °C, extender 100 μ L de cada dilución en platos previamente calentados a 37°C enriquecido con kanamicina a una concentración de 100 μ g/mL, los platos fueron cultivados por una noche a 37°C (NEB, 2020).

Evaluación de bacterias que producen β -galactosidasa.

La selección de las bacterias que recibieron el vector se verificó mediante el gen de resistencia a antibiótico en este caso para kanamicina ya que el vector pET posee el gen de resistencia a este antibiótico. En un medio LB con kanamicina sobrevivirán únicamente las bacterias que incorporaron el vector (Ferreira, Rodrigues, & Freitas, 2018). Posteriormente se realizará un análisis de restricción PCR comprobatorio de la inserción de la banda correctamente.

Determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa.

Una vez seleccionadas las colonias que contienen el plásmido se cultivaron en tubos de 500 mL con agitación, se inoculará una alícuota de 100 mL de medio Luria-Bertani y 100 μ g / mL de Kanamicina. Se propone un test de actividad enzimática para determinar actividad β -galactosidasa.

El precipitado se colocará en 2 tubo de 50 mL se colocó buffer de lisis (Stock 5 mL de NaOH 0.2N, SDS 25 mL, agua destilada 220 mL) más lisozima (1 mg/mL), se agitó en vortex y se dejó en hielo durante 10 min, se agitará durante una hora a 37°C, las células se recuperaron por centrifugación a 12000 rpm a 4°C, el sobrenadante se mantiene a 4 °C (Castro, Díaz, Pulido, Acosta, & Guerrero, 2020). Se transfirió 1 mL de la suspensión en un tubo de 1.5 mL y centrifugar durante 1 min a 10000 rpm para sedimentar las partículas sólidas, se transfirió 500 μ L del sobrenadante en un tubo nuevo (Extracto de lactasa).

Tabla 3

Descripción de los ensayos reacción A, B y control para determinar la actividad enzimática β -galactosidasa.

Reacción A	Reacción B	Control
390 μ L de PBS 100 mM	390 μ L de PBS 100 mM	400 μ L de PBS 100 mM
100 μ L de ONPG 5 mM orto-nitrofenol-beta-D-Galactopiranosido	100 μ L de ONPG 5 mM	100 μ L de ONPG 5 mM
10 μ L de extracto de lactasa	10 μ L de extracto de lactasa	

Los componentes se mezclaron en un vórtex y se dejó 1 min para que la reaccione, en el tubo A se observará un cambio de coloración al cabo de 5 min a temperatura ambiente, el tubo B se incubó a 37 °C agregue 500 μ L de carbonato de sodio 1 M a ambos tubos A y B para inhibir la enzima lactasa, terminando la reacción, transferir 500 μ L a cubetas de espectrofotómetro limpias y medir la absorbancia a 420 nm utilizando un espectrofotómetro con intervalos de 2,5,10,30 minutos (Leksmono *et al.*, 2018)

Evaluación técnico-económico de la producción de β -galactosidasa.

Para la implementación del Bioproceso para la producción de proteínas recombinantes se estableció en dos fases, el proceso upstream donde se establece las condiciones del inóculo, en el proceso downstream se basa la recuperación y purificación de la proteína recombinante, por último, se caracterizó el producto mediante ensayos de

estabilidad y calidad estableciendo los costos de producción mediante el uso del software SuperPro Designer.

La producción láctea en Ecuador es de 5,8 millones de litros de leche/día, un tercio de esta se destina a la fabricación de quesos, cifra que representa aproximadamente 1,9 millones de litros de leche/día, obteniéndose un aproximado de 1,71 millones de suero de leche (Guevara & León, 2019). La empresa Ecuallac, registra una producción de 30 a 40 mil litros de leche diarios (Alvarado, 2017).

Base del diseño.

La escala de producción se basó en el supuesto de que la fabricación de enzimas se integraría con una planta, utilizando un biorreactor de 2000 L con respecto a las especificaciones del producto, la enzima se estabilizó en un tampón de citrato de pH 5,8. Los principales parámetros utilizados para el diseño se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Parámetros utilizados para el diseño del proceso de producción de enzimas recombinantes.

Parámetro	Suposición
Enzima después de la recuperación y concentración	15 g / L
Tiempo de funcionamiento anual de la unidad de producción de enzimas	7200 h (300 días)
Volumen nominal del biorreactor principal	20 m ³
Volumen máximo de trabajo del fermentador	80%
Temperatura	26 ° C
Presión demasiada	125 kPa
Material fermentador	Acero inoxidable: grado 316 (SS316)
μ	0,23 h ⁻¹
pH	7.2
Concentración de glucosa (durante la fase de alimentación por lotes)	1,5 g / L
pO ₂	20%

Nota. Recuperado de Ferreira, R., Rodrigues, A., & Freitas, S. (2018). *Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: the case of recombinant β -glucosidase.*

Microorganismo

Para la producción de β -galactosidasa se utilizará como sistema de expresión *Escherichia coli* BL21(DE3) Novagen (WI-USA) que contiene un plásmido pET28-a(+) que está bajo el control del operador lac y el promotor T7 que controlan la traducción de la enzima β -galactosidasa. El plásmido también contiene el gen de resistencia a kanamicina kanR (Ferreira, Rodrigues, & Freitas, 2018).

Medio de Cultivo pre-inóculo.

Las cepas de *Escherichia coli* modificadas se cultivaron en tubos de 50 mL con agitación, se inoculará una alícuota de 10 mL de medio Luria-Bertani, con 100 μ g / mL de Kanamicina con glicerol, se incubará durante 8 horas a 37°C (Su, Qi, Yu, & Wu, 2017).

Medio de Cultivo inóculo.

En matraces de 500 mL se cultivaron en matraces con agitación, se inoculará 100 mL del pre-inóculo se inoculará a 200 rpm, 37 °C se utilizarán para inocular 14 L de medio de cultivo (Su, Qi, Yu, & Wu, 2017).

Tabla 5

Medio de cultivo para la fermentación por lotes, y fermentador principal producción de β -Galactosidasa.

Componente	Medio de Cultivo 2000L(mg/L)	Solución de alimentación (mg/L)	Solución de alimentación (mg/L)
Glucosa/Lactosa (Glicerol)	200×10^4 (60×10^4)		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	12×10^4		
K ₂ HPO ₄	60×10^4		
Ácido cítrico	10×10^4		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	80×10^4	227×10^3	
(NH ₄)H ₂ PO ₄		169.5×10^3	
Fe(III) citrato	1.2×10^4		5×10^3
H ₃ BO ₃	6000		250
MnCl ₂ × 4H ₂ O	3000		125
EDTA × 2H ₂ O	1680		700
CuCl ₂ × 2H ₂ O	300		125
Na ₂ MO ₄ × 2H ₂ O	500		213
CoCl ₂ × 6H ₂ O	500		213
Zn(CH ₃ COO) ₂ × 2H ₂ O	1600		668
Sulfato de Kanamicina	30 mg/L*		
IPTG	1 mmol/L*		

Nota. Recuperado de Ferreira, R., Rodrigues, A., & Freitas, S. (2018). *Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: the case of recombinant β -glucosidase.*

Medio de Fermentación.

El proceso de fermentación se realizará utilizando un sistema tipo batch, que emplea como medio el suero de leche proveniente de empresas lácteas Ecuatorianas, "Ecuilac", el mismo que será microfiltrado, como medio de cultivo para fermentación con una porosidad

de 1.4 μm , el pH se ajustó a 5 con la adición de HCl 0.1 M luego se pasteuriza a 65°C durante 30 min, se adicionará un 10% del inóculo (Bosso *et al.*, 2019). Como fuente de carbono lactosa, y amoníaco como fuente de nitrógeno, el proceso de fermentación se lleva a cabo a 26 ° C en un recipiente de acero inoxidable presurizado de 150 kPa (Ferreira, Rodrigues, & Freitas, 2018).

Tabla 6

Descripción del bioproceso para la producción de β -Galactosidasa.

Proceso	Unidad operacional	Código	Descripción	Condiciones
<i>UPSTREAM</i>				
Establecimiento del Pre-inóculo	Tubo de precultivo (50 ml)	*	Una colonia se transfiere a un tubo de 50 mL con 300 mL de medio LB	V= 50 mL pH= 7 T=37°C
Establecimiento del Inóculo		*	Del Pre-inóculo anterior a un Erlenmeyer de 500mL con 300 mL de medio LB fresco suplementado con kanamicina y un 10% de glicerol.	V= 500 mL pH= 7 T=37°C 200 rpm con agitación
Preparación del medio	Tanque de acero inoxidable		Estanques para agua purificada, glicerol, medio de cultivo	Medio de cultivo pH=5
Preparación del medio de fermentación	Tanque de acero inoxidable	V-101	Se emplea un medio definido que contiene glucosa/galactosa/glicerol como principal fuente de carbono y amoníaco como principal fuente de nitrógeno.	T= 26°C P= 125 kPa V1= 2000 L
Esterilización	Esterilizador continuo	ST-101	Esterilización de los sustratos se realizarán en la estufa. Utiliza inyección directa de vapor.	T= 121°C t= 1 hora Q= 1 VVM
	Autoclave	*	Los medios se esterilizan en autoclave.	T= 121°C t= 20 min
Inyección de aire estéril	Compresor	G.101	Mantener la cantidad de oxígeno suficiente para el crecimiento de los microorganismos.	O ₂ = 20%

Filtro de aire absoluto AF-101 Utilizado para la salida de gas del fermentador.

DOWNSTREAM

Producción

Fermentación	Fermentador de producción	Fr-101	Los componentes esterilizados se colocan en contacto con los microorganismos que son inoculados en el reactor y se permite el crecimiento celular.	T=37°C Formación de cuerpos de inclusión
Evacuación de gases	Filtro de gases	Efluente de gas	El proceso de fermentación comúnmente produce gases derivados del metabolismo (principalmente CO ₂) que deben ser evacuados para evitar el incremento de la presión y permitir la disponibilidad de O ₂ .	
Tanque de almacenamiento	Acero inoxidable	V-102	Acero inoxidable, permite almacenar temporalmente el medio de cultivo.	
Disrupción celular	Homogeneizador de alta presión	HG-101	Se debe hacer la disrupción celular para la liberación de β-galactosidasa ya que es un producto intracelular.	P= 1000 kPa n=2 disrupción celular =100% denaturalización enzima= 5%
Centrifugación	Centrífuga de disco	DS-101	Permite eliminar la mayoría de las partículas de desechos celulares que permanecen como escombros de la disrupción.	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiencia de sedimentación 30% • Eliminación de desechos celulares 70% • n=2 • 10000 rpm
Ultrafiltración	Ultrafiltro	UF-101	La solución de β-Galactosidasa es concentrada por un proceso de filtración.	Eliminación de desechos 100%
Purificación	- Columna de cromatografía de intercambio iónico	Inx-101	Siguiendo el proceso de purificación, se realizará una cromatografía de intercambio iónico como primera etapa de purificación,	

	- Filtración en gel	C-101	después por un proceso de filtración en gel.	
Diafiltración	Unidad de diafiltración	DF-101	Permite el intercambio del buffer del proceso de filtración en gel.	Recirculación de agua
Liofilización	Liofilizador	SDR-101	Debido a que la presentación de β -Galactosidasa es liofilizada se requiere someterla a este procedimiento. Mantener el producto en un estado sólido	T= -105 °C.
Envasado	Envasador	FL-101	El envasado de este tipo de productos generalmente se realiza mediante equipos dosificadores altamente automatizados. Envasado en ampollas de vidrio correctamente esterilizadas	Potencia: 350W Voltaje: 110V

CUERPOS DE INCLUSIÓN

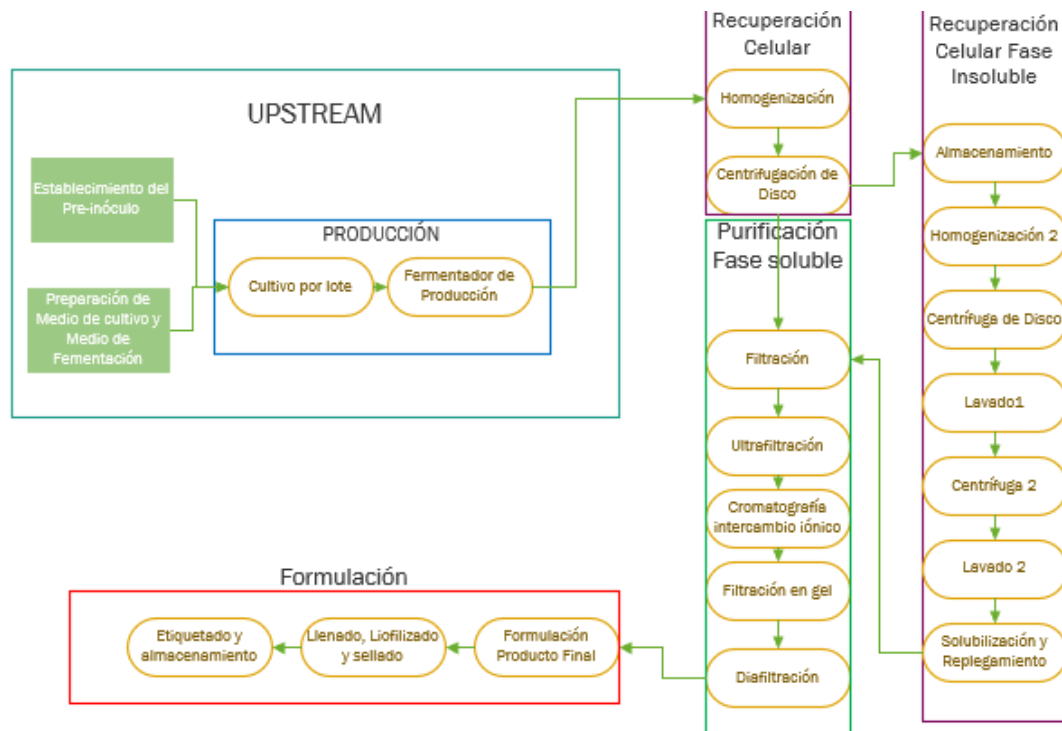
Proceso	Unidad operacional	Código	Descripción	Condiciones
Tanque de almacenamiento	Acero inoxidable	V-103	Acero inoxidable, permite almacenar los cuerpos de inclusión	pH=6.8 Tampón fosfato
Disrupción celular	Homogeneizador de alta presión	HG-101	Se debe hacer la disrupción celular para la liberación de β -galactosidasa de los cuerpos de inclusión.	P= 1000 kPa n=2 disrupción celular =100% denaturalización enzima= 5%
Centrifugación	Centrífuga de disco	DS-101	Permite eliminar la mayoría de las partículas de desechos celulares que permanecen como escombros de la disrupción.	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación desechos celulares 70% • n=2 • t= 10 min • T=4°C • 12000 rpm

Proceso de Lavado 1	Acero inoxidable	WSH-101	El pellet se resuspende en solución de lavado 1 Tritón con DNAsas	<ul style="list-style-type: none"> • t= 20 min • T=4°C • Buffer Tritón-X100
Centrifugación	Centrífuga de disco	DS-101	Permite eliminar la mayoría de las partículas de desechos celulares.	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación desechos celulares 70% • t= 10 min • T=4°C • 12000 rpm
Proceso de Lavado 2	Acero inoxidable	WSH-102	El pellet se resuspende en solución de lavado 2 y DNAsas, enzima recuperada se encuentra en el sobrenadante	<ul style="list-style-type: none"> • t= 20 min • T=4°C • Buffer Tritón-X100
Solubilización	Acero inoxidable	V-103	Los cuerpos de inclusión se mezclan con tampón de solubilización	<ul style="list-style-type: none"> t= 2 h pH=9 T 25°C V= 250 L
Replegamiento	Acero inoxidable	V-103	Los cuerpos de inclusión se replegarán con tampón de replegamiento	<ul style="list-style-type: none"> t=24h V= 250 L
Purificación	- Columna de cromatografía de intercambio iónico -Filtración en gel C101	Inx-101	Se realizará una cromatografía de intercambio iónico como primera etapa de purificación, seguido de una filtración en gel.	

Nota: Resumen de los procesos upstream y downstream para la producción de β -Galactosidasa, Carvajal & Rodríguez (2017). Ferreira, Rodrigues, & Freitas (2018). * no mostrada en el Bioproceso.

Figura 4

Diagrama de Flujo para la producción de β -Galactosidasa



Esquema de producción de la producción de β -Galactosidasa recombinante en *Escherichia coli* (Visio, 2020).

Análisis de resultados

Interpretación

Hipótesis de investigación

H_0 : Los softwares aplicados no permiten obtener el diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa recombinante producida en *Escherichia coli*.

H_1 : Los softwares aplicados permiten obtener el diseño de un bioproceso encaminado a la producción industrial de β -galactosidasa recombinante producida en *Escherichia coli*.

Capítulo 4

Resultados

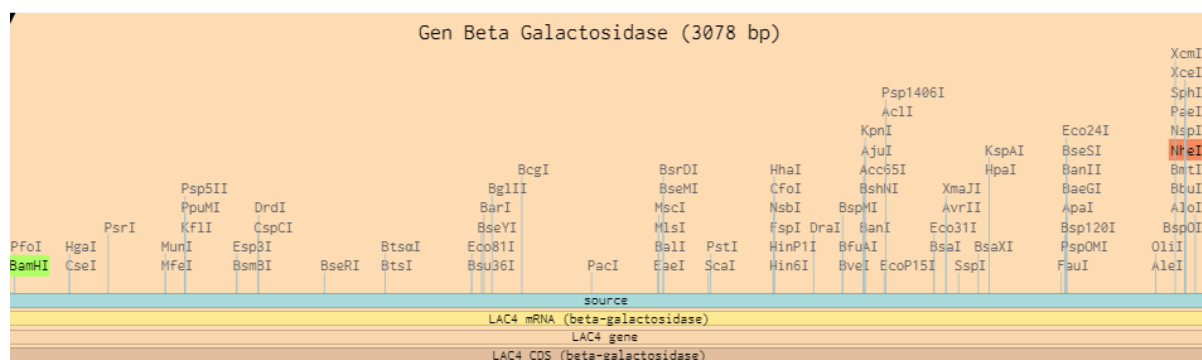
La producción de β -galactosidasa a partir de hospederos naturales resulta en bajo niveles productivos por lo que se necesita la expresión recombinante de esta enzima por eso en esta primera etapa del trabajo se hace un diseño *in silico* de la posible estrategia de clonaje del gen codificante para esta enzima.

Molécula Híbrida

La secuencia codificante para el gen de β -galactosidasa (*Lac4*), cds completos de *Kluyveromyces lactis* cepa VKM Y-1339, se subió al programa Benchling en formato Fasta, en el cual se determinaron los sitios de restricción que presenta el gen, como se puede identificar en la **Figura 5**. Adicionalmente se muestra la secuencia del vector de expresión pET-28 a(+) **Figura 6**.

Figura 5

*Sitios de restricción asociado al gen β -galactosidasa (*Lac4*), cds completos de *Kluyveromyces lactis*. Los sitios *NheI* y *BamHI* son únicos en el vector ubicados en los extremos del polilinker.*



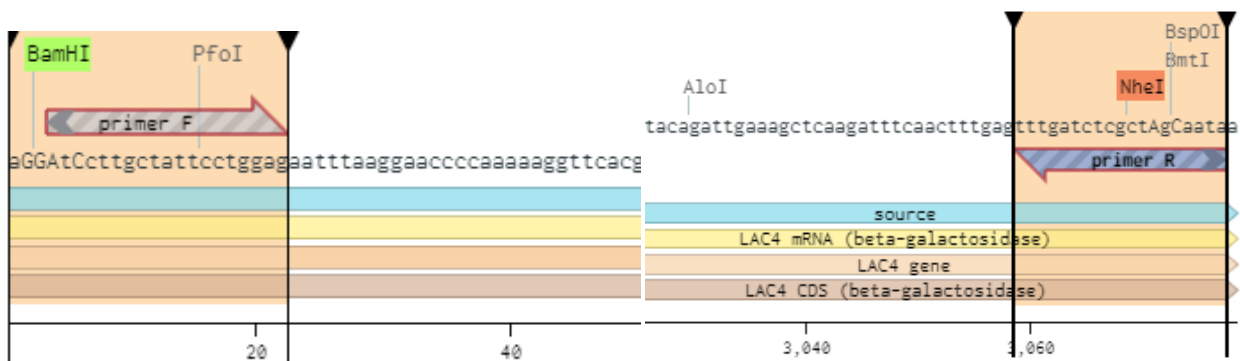
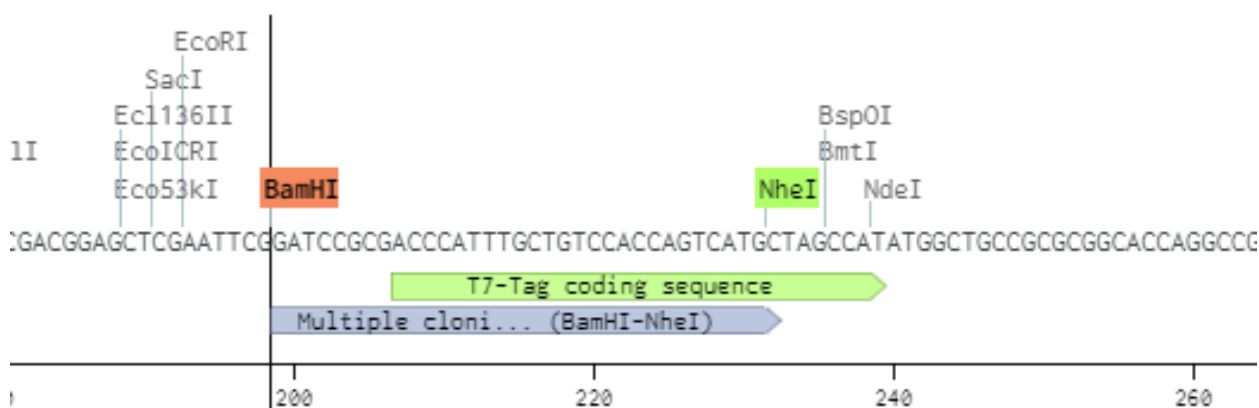
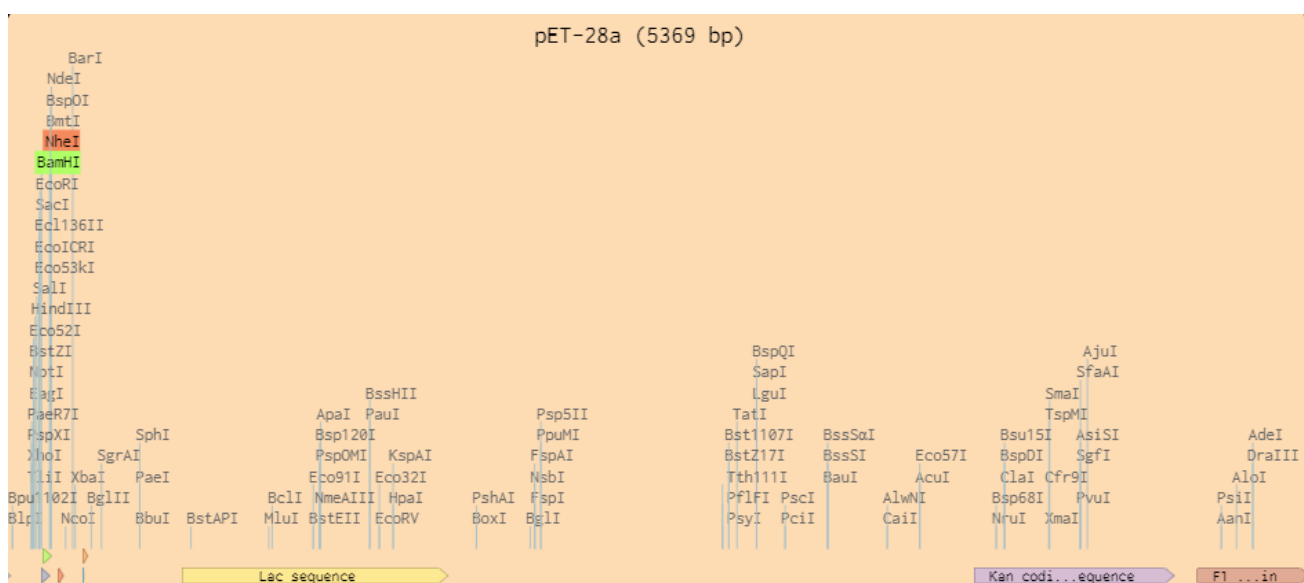


Figura 6

Sitios de restricción asociado al vector pET-28 a (+). Los sitios *NheI* y *BamHI* son únicos en el vector ubicados en la región del Polylinker (199-232 pb).



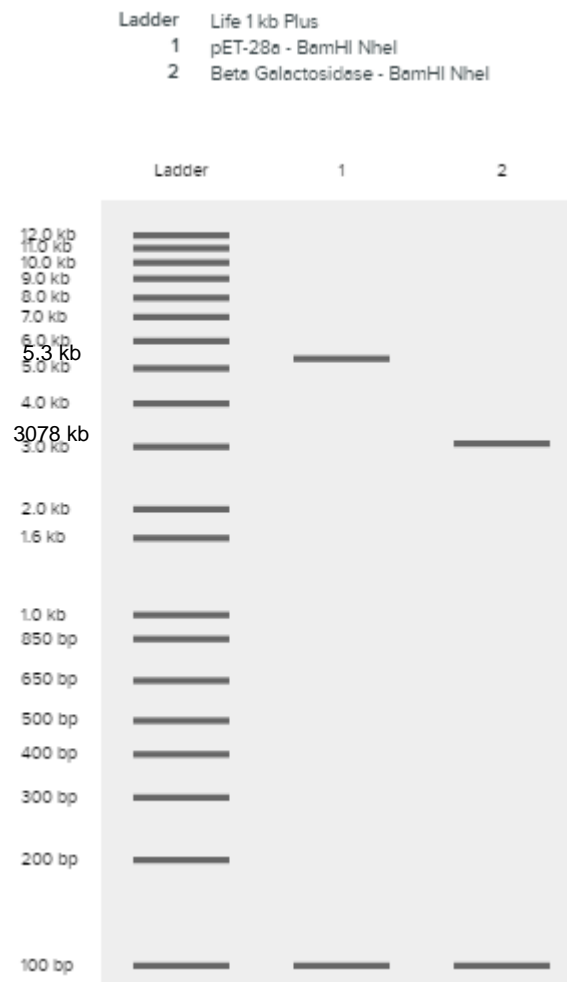
PCR in silico.

Para el diseño de primers se introdujo a los extremos los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *NheI*. Para comprobar que las enzimas de restricción corten en sitios únicos

en el vector y en el gen de β -galactosidasa (*Lac4*) cds completos, se procedió a digerir ambas secuencias con *Bam*HI y *Nhe*I; los fragmentos obtenidos se corrieron en una electroforesis *in silico* (**Figura 7**) y obtuvieron dos bandas para cada secuencia, respectivamente. De esta manera se comprobó que las enzimas cortan en sitios únicos y ambos fragmentos pueden ensamblarse. Obteniéndose un fragmento de 3.1 Kb para el gen de β -galactosidasa y un fragmento de 5.3 Kb para el vector pET-28a (+).

Figura 7

*Electroforesis in silico de los productos obtenidos de la digestión con BamHI y NheI, fragmento de PCR: 1) Plásmido pET-28a(+) 5.4 Kb y 2) Fragmento de PCR de β -galactosidasa (*Lac4*) cds completos con sitios de restricción 3.1 kb. Ladder: 1 kb Plus.*

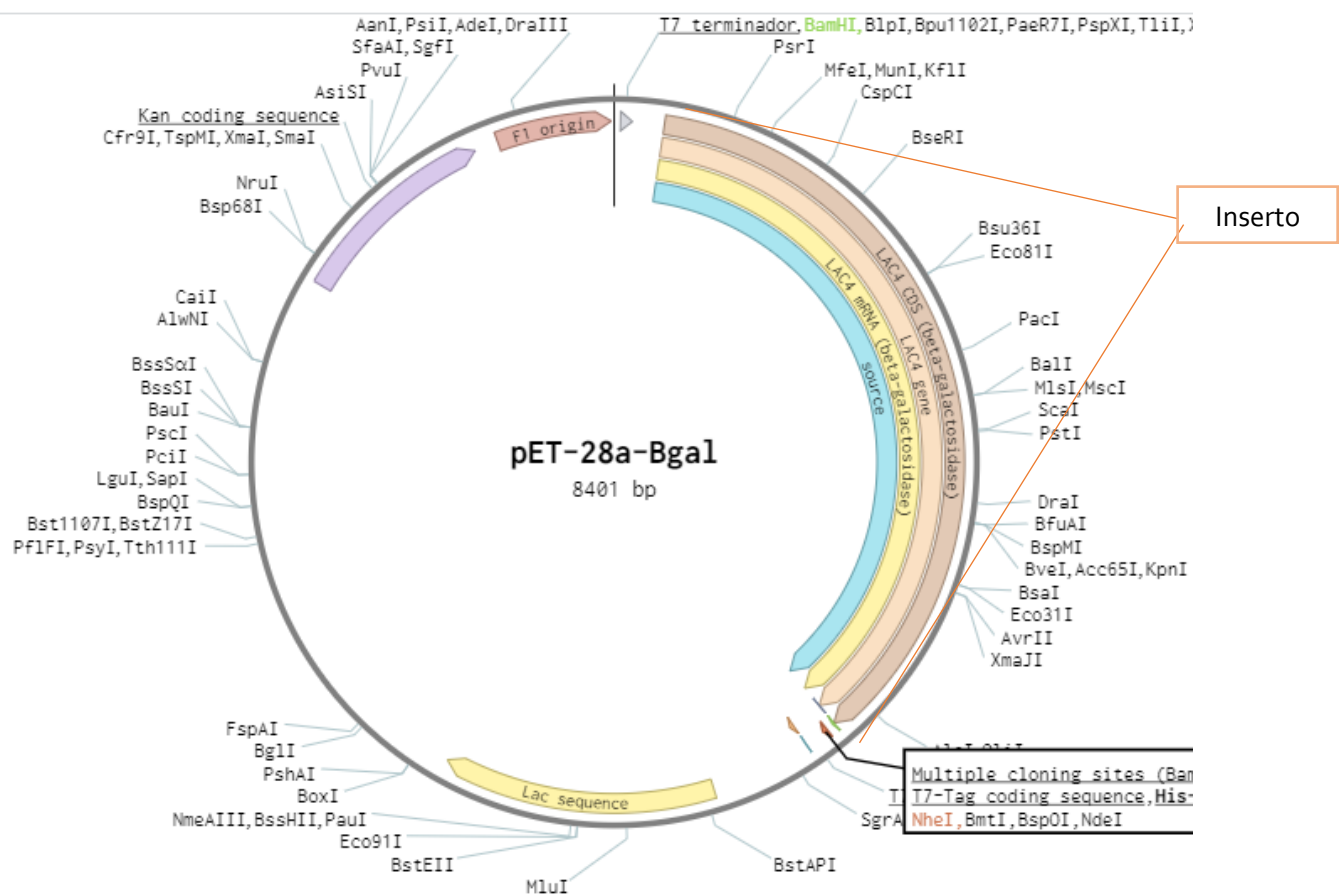


Los fragmentos obtenidos de la digestión del vector y del gen de β -galactosidasa (*Lac4*) cds completos, utilizando las enzimas *Bam*HI y *Nhe*I se ensamblaron en Benchling y se obtuvo una molécula híbrida.

El uso del software bioinformático Benchling proporciona el ensamblaje *in silico* de una molécula híbrida con las enzimas de restricción. En la (**Figura 8**) se puede destacar que los cds completos del gen codificante para β -galactosidasa (*Lac4*) cds completos, color rosa fue introducida en el plásmido pET-28a (+) entre los sitios de reconocimiento de *Bam*HI (verde) y *Nhe*I (rojo). Al analizar el construct destaca que el inserto se empalmó en la misma dirección del promotor T7.

Figura 8

Producto obtenido de la digestión con BamHI y NheI, Inserción del gen codificante de β -galactosidasa y dentro del Plásmido pET-28 a (+).

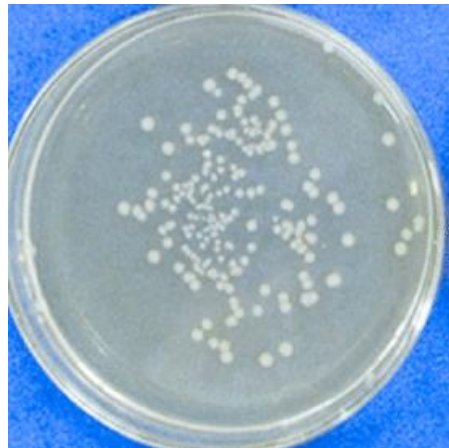


Determinación de clones recombinantes

Para determinar los clones recombinantes, se realizó la selección de las bacterias que contienen el plásmido con el gen de resistencia a kanamicina, se las cultivó en un medio Luria-Bertani agar suministrado 100 µg/mL de Kanamicina. Solo las bacterias que recibieron el vector con el gen de resistencia a este antibiótico, sobrevivieron (Figura 10), las bacterias amarillas.

Figura 10

Prueba de gen de resistencia a Kanamicina, colonias amarillentas son característica Escherichia coli (Freile, 2012).



Otra prueba para la selección de los clones recombinantes que se encuentran correctamente ensamblados, es decir se encuentran entre en promotor T7 y el terminador, se realiza mediante el operón lac, donde el medio suplementado con X-gal e IPTG produce colonias azules o blancas. Donde las colonias azules contienen bacterias con β -galactosidasa funcional, lo que indica que el plásmido absorbido durante la transformación no contenía el ADN de interés. Mientras que las colonias blancas indican los clones recombinantes y no contienen β -galactosidasa activa (Xu et al., 2016) Figura 11.

Figura 11

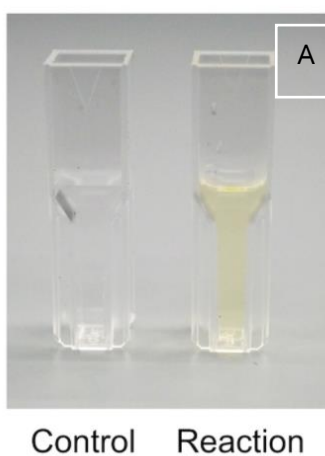
Cribado azul-blanco de colonias bacterianas utilizando IPTG y X-Gal (Xu *et al.*, 2016).

**Análisis de Actividad enzimática**

En la Figura 12 la reacción de control, en ausencia de la enzima lactasa, permanece transparente mientras que la solución de reacción A, que contiene extracto de β -galactosidasa, se vuelve amarilla a medida que el ONPG (orto-nitrofenol-beta-D-galactopiranosido) se hidroliza liberando orto-nitrofenol y beta D-galactosa.

Figura 12

Resultados de la hidrólisis de orto-nitrofenol-beta-D-galactopiranosido ONPG (Leksmono *et al.*, 2018).



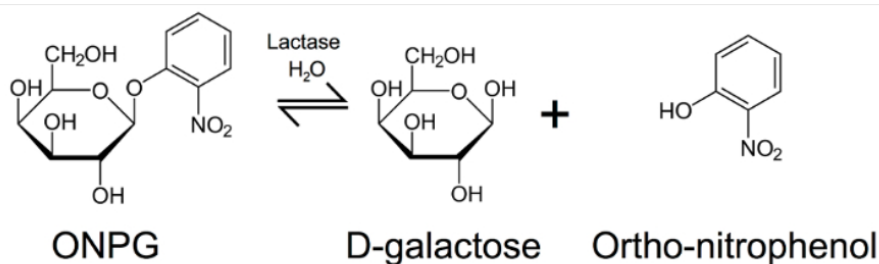
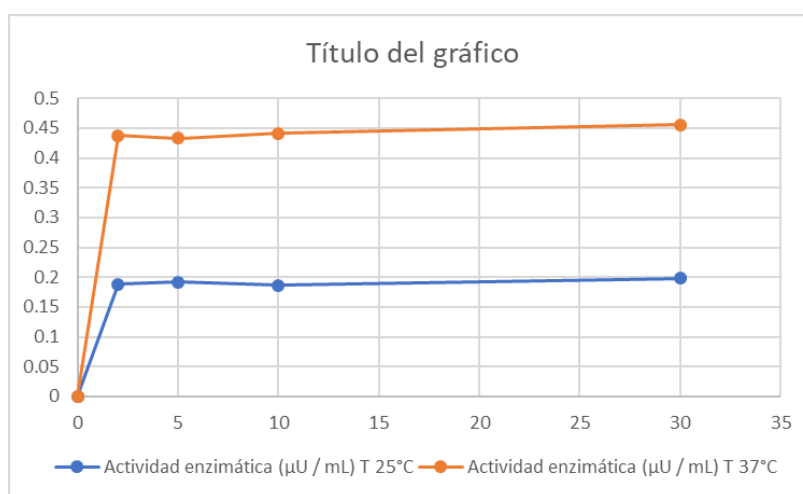


Figura 13

Valores de la actividad de la β -galactosidasa ácida después de diferentes tiempos de incubación a 25 y 37 ° C.



Los valores de la actividad de la β -galactosidasa en la Figura 13 a diferentes tiempos de incubación a 25°C y 37°C. Se determinó una actividad de β -galactosidasa al cabo de 30 de β -galactosidasa a 25 ° C de 0.1984 (U / mL) donde U es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 micromol de sustrato en 1 min, mientras que a 37 ° C 0.4552 (U / mL) (Kwapiszewski, Szczudlowska, Kwapiszewska, Chudy, & Brzozka, 2015) .

Establecimiento del Bioproceso

Condiciones del Bioproceso para la expresión de β -galactosidasa recombinante

La producción de las enzimas recombinantes nos permite optimizar los procesos y garantizar reproducibilidad y calidad del producto. Considerando los parámetros de cultivo, estabilidad del plásmido, procesos de aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión.

El crecimiento celular se modeló mediante ecuaciones estequiométricas basadas en el equilibrio atómico de C, H, O N, se asumieron valores de 0.50 de rendimiento de biomasa para glucosa y glicerol respectivamente en los fermentadores inicial y 0.50 de rendimiento de biomasa para galactosa para el fermentador principal. Se asume que la principal fuente de carbono es la glucosa y galactosa, y el producto es la biomasa de *Escherichia coli* con una fórmula empírica de $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$, obteniéndose como resultado la ecuación de crecimiento celular para glucosa-galactosa y glicerol Tabla 7. La estequiometría de la reacción proporciona información respecto a los coeficientes de rendimiento en el proceso, que relacionan la cantidad de masa microbiana formada por unidad de sustrato consumido por las células.

Tabla 7

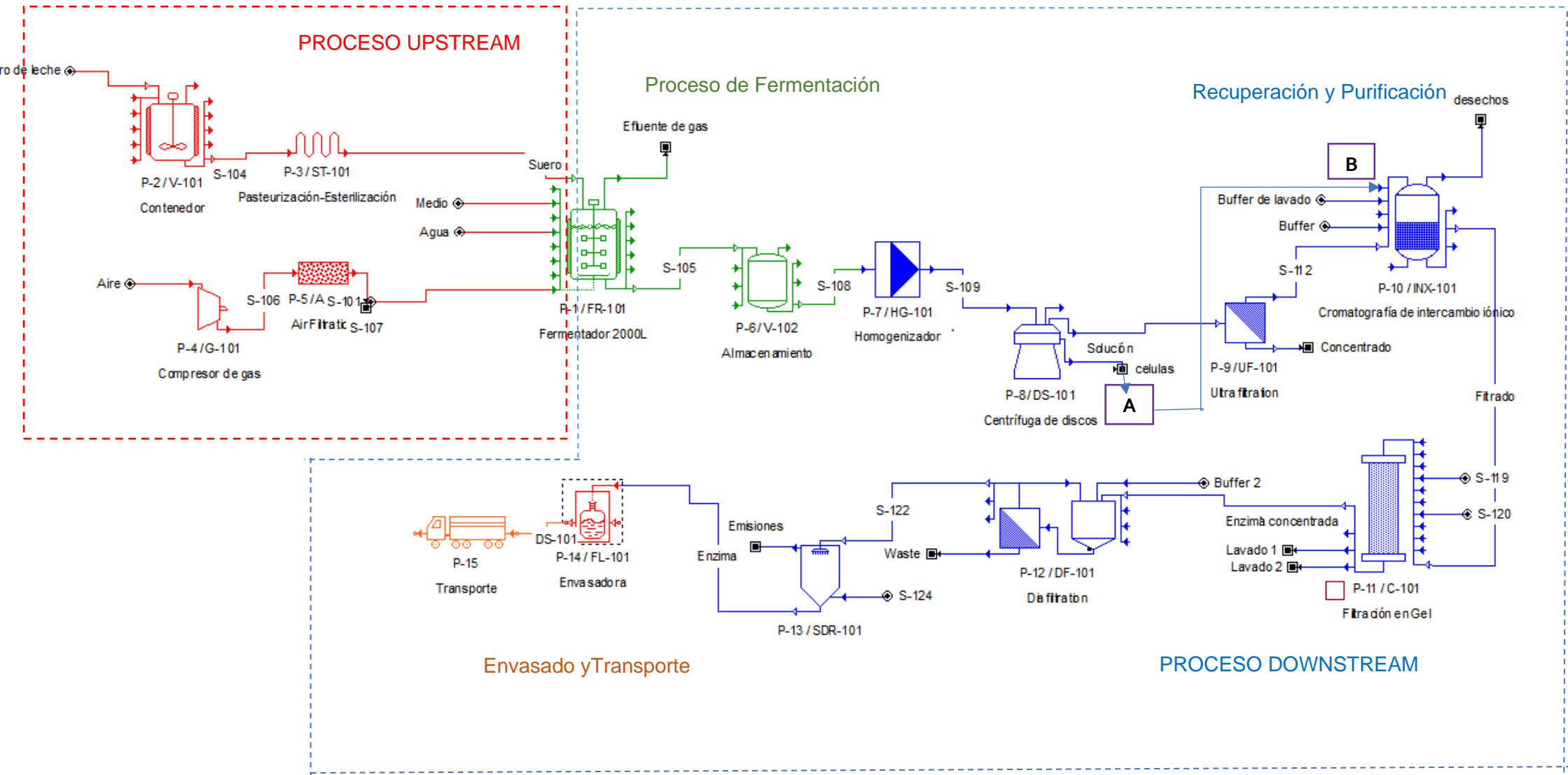
Ecuaciones estequiométricas que indican el crecimiento celular en glucosa. galactosa y glicerol.

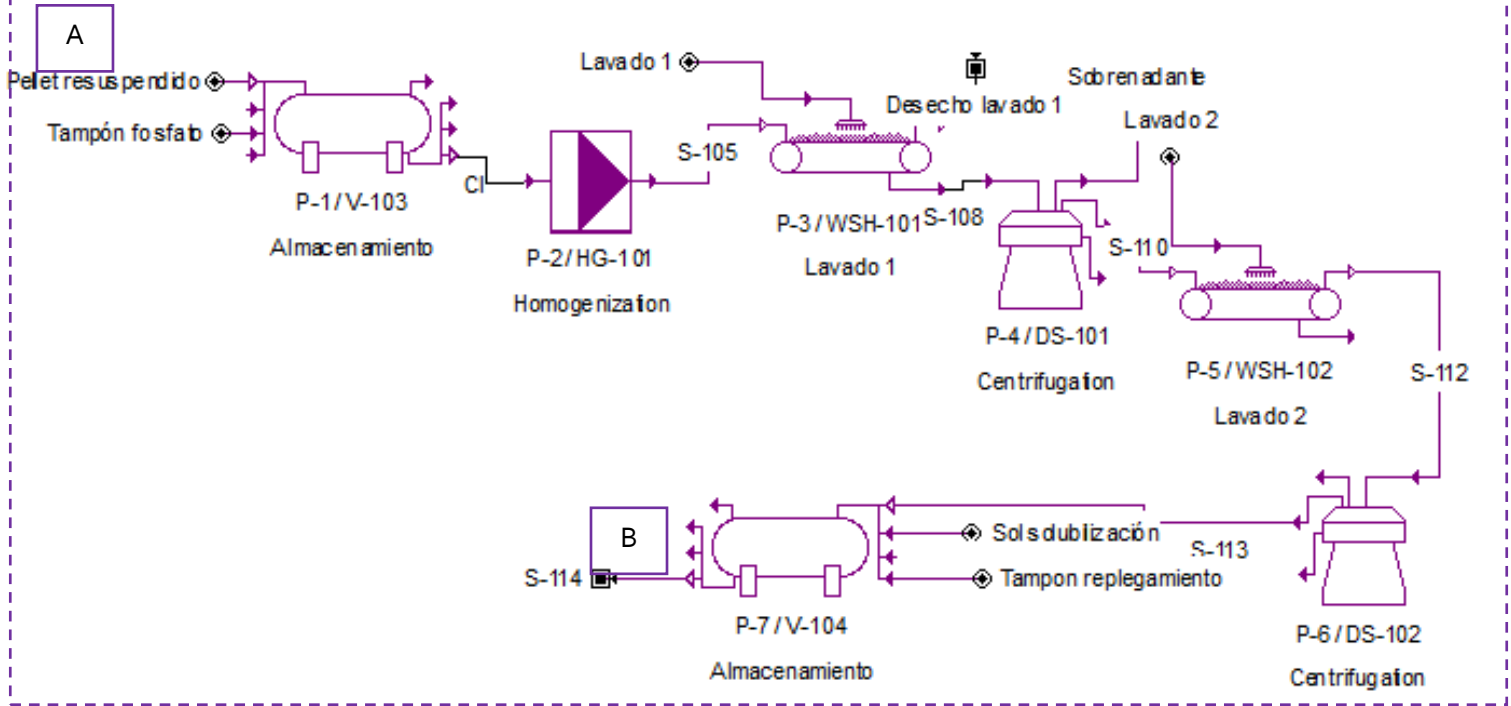
Fermentadores
Glucosa-galactosa: $180.16 C_6H_{12}O_6 + 69.10 O_2 + 12.46 NH_3 \rightarrow 90.08 CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 103.08 CO_2 + 68.55 H_2O$
Glicerol: $92.09 C_3H_8O_3 + 55.45 O_2 + 5.73 NH_3 \rightarrow 41.44 CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 57.96 CO_2 + 53.87 H_2O$
Fermentador principal
Galactosa-galactosa: $180.16 C_6H_{12}O_6 + 93.67 O_2 + 9.97 NH_3 \rightarrow 72.06 CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 135.27 CO_2 + 76.46 H_2O$
Glicerol: $92.09 C_3H_8O_3 + 66.76 O_2 + 4.59 NH_3 \rightarrow 33.15 CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 72.78 CO_2 + 57.51 H_2O$

Los procesos upstream y downstream, además de la recuperación de los cuerpos de inclusión se ven reflejados en la Figura 14.

Figura 14

Diagrama de flujo del Bioproceso para la producción de β -galactosidasa recombinante.





Crecimiento Biomasa Medio de Cultivo inóculo.

El bioproceso inicia con propagación del pre-inóculo en matraces de 500 mL se cultivaron en matraces con agitación, con medio LB a 200 rpm, 37 °C, se utilizarán 100 mL del pre-inóculo para inocular 14 L de medio de cultivo (Su, Qi, Yu, & Wu, 2017).

Tabla 8

Parámetros cinéticos de las etapas de propagación de *Escherichia coli*.

Parámetros	Matraz 500 mL	F 2000 L
$\mu_{max} [h^{-1}]$	0.46	0.46
$T [^{\circ}C]$	37	37
$X_o [g/L]$	0.2	20
$t [h]$	6	6
$X_f [g/L]$	2	30
$V [L]$	0.5	2000
K_s	0.6	0.6

En todas las etapas de propagación se utilizó el medio de cultivo descrito en la Tabla

4. La concentración de sustrato para cada fermentación se calcula utilizando la Ecuación 1.

$$S_o = S_f + \frac{(X_f - X_o)}{Y_{x/s}}$$

De donde:

$S_o =$ concentración inicial de sustrato g/L

$S_f =$ concentración final de sustrato g/L

$X_o =$ concentración inicial de biomasa g/L

$X_f =$ concentración final de biomasa g/L

$\frac{Y_x}{S} =$ rendimiento de en biomasa g/L

Tabla 9

Concentración de sustrato para cada etapa de fermentación *Escherichia coli*.

Concentración de Sustrato inicial	Matraz 500 mL	F 2000 L
S_o	3.6 g/L	100 g/L

El crecimiento de biomasa se calculó, utilizando las ecuaciones de Monod Ecuación 2 y Aborthey- Williamson Ecuación 3, mismas utilizadas en el software bioinformático SuperPro Designer.

Ecuación 2.

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{[K_S + S]}$$

De donde:

$\mu_{max} =$ tasa de crecimiento máxima de *E. coli*

$\mu =$ tasa de crecimiento específica de *E. coli*

$[S] =$ concentración de sustrato limitante para el crecimiento

$K_S =$ constante de media de velocidad el valor de S cuando $\mu/\mu_{max} = 0.5$

Ecuación 3.

$$q_o = m_s + \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

De donde:

q_o = velocidad específica de consumo de sustrato

m_s = coeficiente de mantenimiento del sustrato

μ = tasa de crecimiento específica de *E. coli*

$Y_{x/s}$ = rendimiento de en biomasa g/L

De acuerdo a nuestro modelo el crecimiento de la biomasa mostró un periodo de latencia de 2 horas, en el que la bacteria necesita para adaptarse al medio de cultivo, la fase exponencial comenzó cerca de 3 horas y duró aproximadamente 6 horas (Tabla 10, Figura 15), a partir de ese tiempo la cantidad de sustrato empieza a ser un factor limitante.

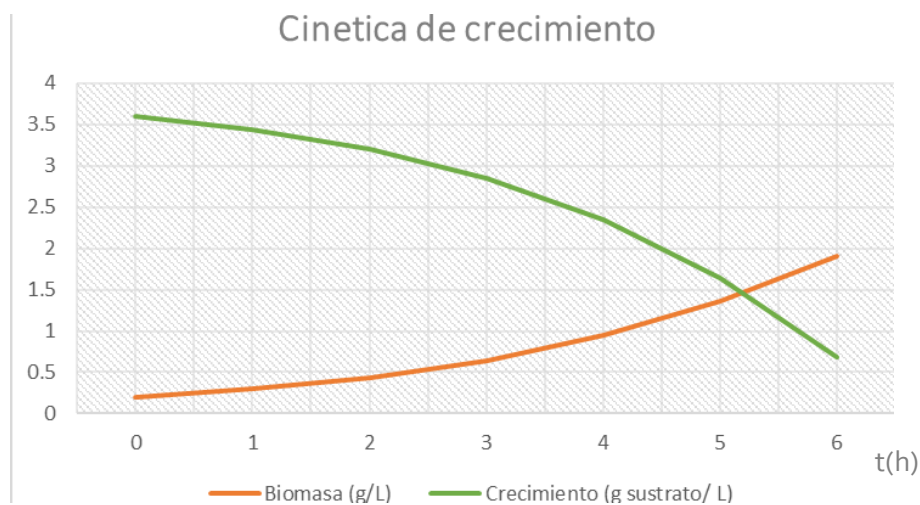
Tabla 10

Crecimiento celular en matraz de 500 mL.

Tiempo	Biomasa (g/L)	Crecimiento (g sustrato/ L)
0	0.2	3.6
1	0.29666486	3.43828571
2	0.4388937	3.19997236
3	0.64653358	2.85116783
4	0.94544169	2.34683663
5	1.36374853	1.63522112
6	1.90934349	0.69008261

Figura 15

Cinética de crecimiento de Biomasa en cultivos por lote (propagación).



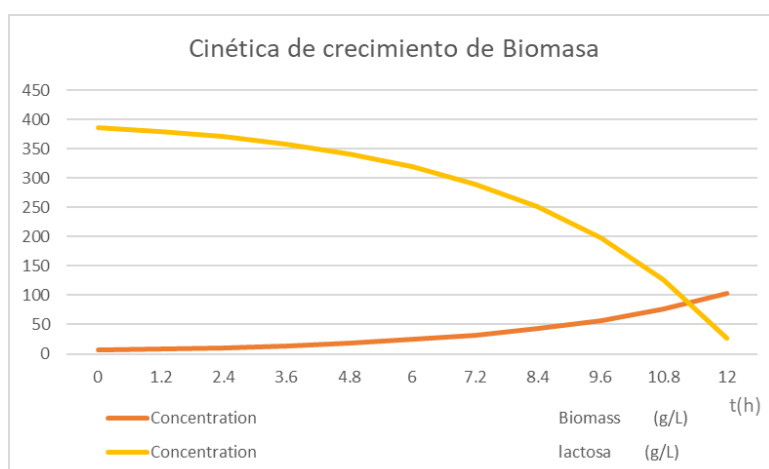
En la figura 15 se muestra las corrientes involucradas en la fermentación de matraz de 500 mL alcanzando un máximo crecimiento celular de 2 g/L al cabo de 6 horas.

Fermentación Principal.

La máxima concentración celular alcanzada según el programa utilizado fue de 100 g de biomasa/ L en el fermentador de 2000 L, alcanzando la máxima concentración celular al cabo de 11 horas (Figura 16).

Figura 16

Cinética de crecimiento de Biomasa en fermentador principal Fermentador 2000 L.



En todos los procesos de fermentación, se alimenta con el medio de cultivo descrito en la Tabla 5, haciendo una comparación del producto obtenido entre el suero de leche y glicerol, se suministra oxígeno mediante un compresor de gas que administra una concentración de oxígeno del 20% en relación al volumen del fermentador, el caldo proveniente del fermentador principal se recoge en un tanque de almacenamiento y luego se lisa en un homogeneizador a presión (caudal de 500 L/h). La producción a gran escala da como resultado la formación de cuerpos de inclusión. Se recomienda mantener una temperatura de 37°C hasta la fase de crecimiento exponencial, y se redujo a 25 °C para evitar la formación de cuerpos de inclusión (Singh, Upadhyay, Singh, & Panda, 2020).

La homogenización se produce a altas presiones, de manera discontinua para lograr la disrupción de las células, liberándose así la enzima al medio mediante 4 pasos se logra liberar el 97%, el homogeneizador presenta un rendimiento del 75%, el gasto energético es de 1.5 kW en cada proceso de homogenización.

Mediante la centrifugación de pila de discos a 10000 rpm y elimina el 70% de los desechos a razón (36 L/min), se asume que la centrífuga tiene un porcentaje de recuperación de 80 % de la enzima recombinante, ocupa un consumo de 7.5 kW en cada proceso (Carvajal & Rodríguez, 2017). Fraccionando así la enzima en su fase soluble e insoluble.

La concentración de células que se elimina en la primera centrifugación contiene la fase insoluble que contiene la enzima en forma de inclusión con actividad enzimática activa, se resuspendió en una solución de tampón fosfato, las células fueron lisadas en un homogeneizador de alta presión. Se lavó con una solución de lavado 1, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, El pellet se resuspendió en solución de lavado 2 (Buffer fosfato 0.05mM, 0.05 M y pH=6.8) con DNAsas durante 20 minutos la muestra a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C, la enzima liberada de los cuerpos de inclusión se encuentra presente en el sobrenadante

Los cuerpos de inclusión se mezclan en tampón de solubilización durante 2 horas, los cuerpos de inclusión se replegarán con una dilución 10:1 de tampón de replegamiento cuya reacción de replegamiento dura 24 horas, finalmente para la purificación sigue los mismos protocolos que la enzima soluble recuperándose 1/3 de la producción 40 Kg enzima/Batch.

Para el proceso de purificación de la enzima en su fase soluble e insoluble, se someten al paso por una membrana de filtración de 0.50 μm y ultrafiltración con una membrana de 0.22 μm . Con un porcentaje de rendimiento del 90%, con un factor de concentración del 5%, la filtración y ultrafiltración tiene como función concentrar el medio aumentando la concentración de enzima y facilitar el proceso de purificación.

El clarificado es diluido en Tris-HCl 50 mM, 2% en volumen, para pasar por la cromatografía de intercambio iónico con columna DEAE-celulosa en la cual separa las moléculas en cuanto a su carga iónica, las proteínas no absorbidas son lavadas de la celulosa con NaCl, la enzima recuperada es procesada por filtración en gel Sephacryl S200 diluida en Tris-HCl 0.1 M, cuyos poros separan a las proteínas en cuanto a su tamaño y para la eliminación de contaminantes. La solución de enzima se estabiliza en una solución tampón de citrato usando un sistema de diafiltración (Ferreira, Rodrigues, & Freitas, 2018) que es utilizado para acrecentar la filtración de solutos permeables. El producto filtrado es secado utilizando un liofilizador con una capacidad de secado 2000 kg de producto en 3 horas.

Evaluación Económica

La evaluación económica se realizó con el software SuperPro-Designer, se utilizó el costo internacional del equipo proporcionado por el software, los datos de las fuentes correspondientes se presentan en las Tablas 12,13,14,15,16,17. Proporcionando así el costo de operación del Bioproceso.

Análisis de Producción

Tabla 11

Producción de β -galactosidasa con respecto al sustrato (SuperPro Designer).

Medio de Fermentación	Producción Kg/Batch
Suero de leche	177.137
Glicerol	350.15
Suero de leche y Glicerol	198

La producción a gran escala de β -galactosidasa se la realizó en el programa SuperPro-Designer con tres fermentaciones utilizando diferentes tipos de fuente de carbono, al utilizar suero de leche mostró un rendimiento de producción de 177.137 Kg de enzima/Batch, se observó un mejor rendimiento cuando se utiliza glicerol como sustrato alcanzando una producción de 350.15 Kg/Batch, al combinar suero de leche con glicerol la producción de β -galactosidasa de 198 Kg/Batch.

Costo Fijo Directo

Se considera al costo del equipo adquirido, sistema eléctrico, costo de mano de obra, cimiento, construcción, soporte.

Costo Fijo Indirecto

El capital fijo indirecto implica costo de planificación, impuestos, contratistas, soporte, y gastos legales, para los cuales se estima un aproximado de 2% del costo de los equipos, para el pago de contratistas se tomará un promedio de 4%, para gastos imprevistos o contingencia como desastres naturales, se tomará un promedio del 10%, para ingeniería y supervisión se utilizará un 30% del costo de los equipos (Carvajal & Rodríguez, 2017).

Inversión Total

La inversión total es la sumatoria de los costos fijos directo e indirecto, incluyendo el costo del terreno, 382093 dólares expuesto en la Tabla 13

Tabla 12

Costos Fijos de Instalación.

Operación		Especificaciones	Consumo energético	cantidad	Precio unitario	Precio total
Proceso Upstream	Matraz Erlenmeyer	500 mL	-	20	11	220
	Tanque de preparación de medio	Acero inoxidable	-	3	650	1950
		Potencia 3000 L/h Voltaje: 110V/60Hz Dimensiones: 140 x 80 x 100 mm	60 kW	1	39.90	39.90
	Esterilizador continuo	Acero inoxidable Capacidad 70 L	65 kW	1	3065	3065
	Autoclave	Acero inoxidable Capacidad 240 L	36 kW	1	4000	4000
	Inyección de aire estéril	Compresor de aire 100 L Caudal 159 L/min	30kW	3	310	930
	Filtro del aire absoluto	Filtro HEPA 0.5um	-	3	20	20
Fermentación	Fermentadores	Acero inoxidable 200L Acero inoxidable 2000L Con válvula de desagüe	38 kW	1	4200	4200
	Filtro de emisión de Gases	Volumen de aire 10800 m3/h	5 kW	3	80	240

Recuperación Celular	Centrífuga de discos	Capacidad 200 L/h 245 Kg peso	7.5 kW en cada proceso	1	30000	30000
	Homogenizador	Peso 650 kg	60 kW	1	4000	4000
	Tanque de lavado	Acero inoxidable	-	2	551.5	1103
Purificación	Filtro	0.5 μ m	-	10	50	500
	Ultrafiltro	0.22 μ m	-	10	60	600
	Cromatografía de intercambio iónico	Capacidad 6000L/h Aplicación filtración	-	3	4000	12000
	Filtración en gel	Protein purification resin	-	1	4000	4000
	Unidad de diafiltración	Capacidad 2000L/h	-	1	1900	1900
Envasado	Liofilizador	Capacidad 730 Kg	50 Kw	1	32783	32783
	Envasador	35-140 bolsas/min	3.8 kW	1	6500	6500
TOTAL						78451

Tabla 13

Costos Total de Inversión en dólares.

Costo directo de Planta	
Costo de compra de los equipos	78451.0
Instalación	12870
Tubería del proceso	21458
Instrumentación	31380
Aislamiento	2354
Electricidad	7845
Construcción	35303
Mejoras	11768
Instalaciones auxiliares	31380
Total	238808
Costo Indirecto total de la planta	
Ingeniería	59702
Construcción	83583
Total	143285
Costo Total de la Planta (Costo directo+ Costo Indirecto)	382093
Contratista y Contingencia	
Honorario de Contratista	19105
Contingencia	38209
Total	57314
Costo directo de capital fijo	678215

Estimación de Costo de Operación

Es la estimación de los costos de operación de la planta y recuperación de la inversión, es la cantidad anual de dinero necesaria para producir el producto y devolver la inversión. Contempla el costo de las materias primas, mano de obra y otros gastos generales (Casteblanco, 2009).

Costo de manufactura

Es el costo de las materias primas y la mano de obra.

Materias primas

Se considera materia prima al costo del medio de cultivo, medio de alimentación, los reactivos necesarios para equilibrar, lavar, eluir las resinas en etapas cromatográficas (Carvajal & Rodríguez, 2017).

Consumibles

Se considera a los materiales y piezas de equipo que se debe reemplazar.

Tabla 14

Resumen del Costo de materias primas para la producción de β -galactosidasa recombinante.

Componente	Costo kg	Kg/año	Total
Glucosa/Lactosa	20	963.32	19266.49
Glicerol	10	365.4	3654
MgSO ₄ × 7H ₂ O	18	59.778	1076.004
K ₂ HPO ₄	86	401.04	34489.44
Ácido cítrico	37	49.815	1843.155
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6	500.67	3004.02
(NH ₄)H ₂ PO ₄	80	76.275	6102
Fe(III) citrato	80	76.275	6102
H ₃ BO ₃	25	8.2278	205.695
MnCl ₂ × 4H ₂ O	21	3.1014	65.1294
EDTA × 2H ₂ O	96	1.5507	148.8672
CuCl ₂ × 2H ₂ O	182	1.151892	209.644344
Na ₂ MO ₄ × 2H ₂ O	209	0.115695	24.180255
CoCl ₂ × 6H ₂ O	324	0.344925	111.7557
Zn(CH ₃ COO) ₂ × 2H ₂ O	230	0.344925	79.33275
Tris-HCl	186	0.477	88.722
NaCl	90	6.885	619.65
EDTA	96	0.06885	6.6096
Sacarosa	24	11.775	282.6
Sulfato de Kanamicina	100	29.889	2988.9
IPTG	6000	0.9963	5977.8
		TOTAL	86345.99

Tabla 15

Resumen del Costo de materias primas para la producción de β -galactosidasa recombinante.

Materia Prima	Costo Anual
Solución de Alimentación	86345
Sulfato de amônio	196
<i>E. coli</i>	0
Agua	30000
Aire	0
TrisHCl	20000
Tris Base	10000
Buffer Citrato	355
Tritón X	3220
Buffer Fosfato	5612
Sol Lavado 1	3604
Sol Lavado 2	2230
Total	161562

Mano de obra

Es el costo de la mano de obra hace referencia a la cantidad de operarios y personal que se requiere para el funcionamiento de la planta, manteniendo un sueldo con base a los datos del Gobierno de Ecuador.

Tabla 16

Costo de mano de obra para la producción de β -galactosidasa recombinante.

Cargo	Perfil	N° personas	Sueldo Neto	
Jefe de planta	Ingeniero Biotecnología, bioquímico o afines	1	1200	1200
Operario de planta	Ingeniero Biotecnología, bioquímico o afines	4	700	2800
Supervisor de Calidad	Ingeniero Biotecnología, bioquímicos o afines	1	700	700
Personal de aseo	Sujeto a evaluación	1	400	400
Asistente comercial	Ingeniero comercial	1	500	500
Técnico de mantenimiento	Ingeniero mecánico o industrial	1	900	900
TOTAL				6500

Tabla 17

Estimación de costos de operación utilizando suero de leche y para glicerol.

Item	Costo anual	
	Suero de leche	Glicerol
Implementación	678215	678215
Materia Prima	161562	181562
Mano de obra	6500	6500
Consumibles	391021	391021
TOTAL	1237298	1257298

Al utilizar el suero de leche como fuente de sustrato el costo de operación de β -galactosidasa recombinante es de \$ 1237298 dólares, mientras que con la utilización de glicerol el costo de operación es de \$ 1257298 Presentándose un ahorro de \$ 20000 que corresponde aproximadamente el 5% del costo de operación.

Figura 17

Composición de costos para la producción de β -galactosidasa recombinante.



En la Figura 17 se observa que los consumibles (materias primas, filtros, membranas) representan un 69% de los gastos anuales de operación, seguido de las facilidades de

dependencia que incluye los costos de mantenimiento de la planta con un 15% y las materias primas con un 15%.

Evaluación de impacto ambiental

El software SuperPro Designer permite estimar las consecuencias que la producción de β -galactosidasa causa al medio ambiente evaluando las emisiones al aire, agua o suelo y permite al ingeniero analizar los riesgos y posibles alternativas.

Tabla 18

Principales compuestos de desecho emitidos en la producción de β -galactosidasa.

Emisión de Gases			
Componente	ppm/Batch	ppm/Year	%
Dióxido de Carbono	2328.49	572808	70.42
Nitrógeno	559.609	137664	16.92
Oxígeno	418.433	102935	12.65
Fosfato diamónico	0.046	11	0
Fósforo	0.037	9	0
Desecho de lavado			
Acido Cítrico	-	12001	2.84
Lactosa	-	317132	75.14
Fosfato diamónico	-	19082	4.52
Fósforo	-	15544	3
Tris-Base	-	19393	4.60
Tris-HCl	-	38.853	9.20
Triton X-100	-	2873.47	0.68

Con base a los datos presentados en el programa Super-Pro Designer se estimó los índices de impacto ambiental, además de la cantidad de los compuestos de desecho producidos al año, se observa una emisión de CO_2 de 572808 ppm al año, correspondiente al 70% de los gases producido por las bacterias, principalmente en la etapa de fermentación. En cuanto a los compuestos eliminados en los lavados persiste residuos de lactosa que corresponde al 75 %. Por otro lado, aunque no presenta un riesgo elevado para la salud, los desechos del Tris-Base y Tris-HCl corresponden al 4.6% y 9.2 % respectivamente.

Ingresos

Se considera a las ventas anuales realizadas de la enzima, se considera el costo comercial de la enzima, en Ecuador se estima un aproximado de 100 dólares por kilogramo (Agroalimentar).

Tabla 19

Tiempo estimado para la producción de β -galactosidasa por batch.

Procedimiento	Duración (h)	Tiempo de inicio (h)	Tiempo de Finalización (h)
Fase Soluble	32.07	0	32.07
Fase Insoluble	32	32.07	64.07

Se estima un tiempo de 64 horas que corresponden a los procesos upstream y downstream, para la producción de β -galactosidasa de la fase soluble e insoluble por lo cual se considera 2 procesos a la semana por un año.

Tabla 20

Producción de β -galactosidasa producidas al año.

Medio de Fermentación	Producción Kg/Batch	Producción anual
Suero de leche	177.137	17005.152
Glicerol	350.15	36415.6
Suero de leche y Glicerol	198	20592

En la Tabla 20, se puede observar que el mejor sustrato es el glicerol, sin embargo, el costo del glicerol incrementa un 5 % al costo de operación. Para el análisis de rentabilidad en la producción de β -galactosidasa, se consideró la cantidad de enzima obtenida con el uso del suero de leche como fuente de carbono ya que es una fuente de desecho reutilizable de procesos de producción de queso.

Rentabilidad del Proyecto

Para el análisis de la oferta y demanda se considera que la oferta es 3 puntos menor que la demanda y crece anualmente en un 3.8%, en los últimos 5 años. Para la producción de productos deslactosados se estima un consumo de 14586.075 Kg de β -galactosidasa consumidas en el año 2020 (Alarcón & Puga, 2019).

Para un análisis económico para la producción de β -galactosidasa en *Escherichia coli*, se estimó que para una planta que produce 17005.152 kg de β -Gal por año se muestra una proyección de los últimos 5 años del consumo de la enzima en la Tabla 21. Este análisis asume que se construirá una nueva instalación para este proceso y la vida útil del proyecto es de 15 años, con 5 años de depreciación Tabla 22.

Tabla 21

Proyección de β -galactosidasa consumidas en los últimos 5 años.

Año	Consumo en Kilogramo
2016	12000
2017	12600
2018	13230
2019	13891.5
2020	14586.075

Tabla 22

Proyección de la demanda de β -galactosidasa.

Año	Consumo
2021	15200.61
2022	15846.975
2023	16493.34
2024	17139.705
2025	17786.07

$$r_j = m_j * p_j$$

De donde:

$m_j = \text{cantidad de producto vendido al año}$

$p_j = \text{precio realizado en ese año}$

$$r_j = 15200.61 * 100$$

$$r_j = 1520000$$

Ganancia Bruta al año

$$G_j = r_j - C_j$$

De donde:

$r_j = \text{ingreso anual}$

$c_j = \text{costo total anual del producto}$

$$G_j = 1458607.5 - 1237298$$

$$G_j = 221309$$

Beneficio neto al año

Es igual al beneficio bruto menos impuestos a la renta (corresponde a un 35%)

$$N_j = (r_j - C_j) * (1 - \emptyset) = G_j * (1 - \emptyset)$$

$$N_j = (221309) * (1 - 0.35) = 143850.85$$

Flujo de efectivo neto en el año

Es igual al beneficio neto y depreciación, de ese año, corresponde al dinero que regresa al capital con el cual se paga nuevas inversiones, reembolso de préstamos.

d_j corresponde al 10% del valor de inversión, $d_j = 67821.5$

$$A_j = (N_j - d_j)$$

$$A_j = (183756.3 - 67821.5) = 76029.35$$

Retorno de Inversión ROI

Es la relación entre beneficio e inversión, mide la efectividad de la empresa para generar beneficios con el capital invertido.

$$ROI = \frac{N_j}{TCI} * 100$$

$$ROI = \frac{143850.85}{1237298} * 100$$

$$ROI = 11.62$$

De Donde

TCI= Inversión del capital total

El retorno sobre la inversión (ROI), sirve para calcular cuanto ganó la empresa, en este caso el retorno fue 11 veces la inversión inicial.

Periodo de recuperación PBP

Es el tiempo necesario para pagar la conversión de capital utilizando el flujo efectivo neto anual que retorna al depósito de capital. En este caso nos tomará 8.60 años para recuperar el capital de inversión.

$$PBP = \frac{100}{ROI} = \frac{100}{11.62} = 8.60$$

Capítulo 5

Discusión

La β -galactosidasa es utilizada para hidrolizar la lactosa en glucosa y galactosa para la producción de diversos productos destinados a las personas con intolerancia a la lactosa (Martarello *et al.*, 2019). Las β -galactosidasas se utilizan como biocatalizadores para producir galacto-oligosacáridos (GOS) que son derivados prebióticos de la leche, que han sugerido beneficios para la salud, tanto para la prevención del cáncer colorrectal, evitar y tratar síntomas de la enfermedad asmática, y mejora el microbiota (Li, Zhu, & Xing, 2019).

Los avances y conocimiento de Biología Molecular permiten la producción a gran escala de proteínas recombinantes en diversos sistemas de expresión. En este estudio la β -galactosidasa se produjo mediante la inserción del gen *Lac4* de *Kluyveromyces lactis* en el vector pET-28 a(+) Figura 8. La transformación bacteriana se realizó en *Escherichia coli* BL21(DE3) que es un sistema de expresión de alto nivel para proteínas recombinantes heterólogas (Shilling, Mirzadeh, Cumming, Widesheim, & Kock, 2020) el diseño de primers se realizó en el software Benchling para los sitios de restricción *BamHI* y *NheI* con sitios de corte únicos tanto para el vector como para el gen.

Para la selección de clones recombinantes, en la Figura 11, las características de las colonias concuerdan con los resultados reportados por Green & Sambrook, (2019), las bacterias, cuyo plásmido no contenía el gen de β -galactosidasa se muestran en colonias azules. Por otro lado, las colonias blancas indican la presencia de clones recombinantes, ya que al insertarse el vector provoca disrupción del operon lac, por lo cual en presencia de X-gal e IPTG no pueden producir β -galactosidasa y no pueden metabolizar el X-gal, permaneciendo de color blanco (Xu *et al.*, 2016).

En la Figura 13, la actividad enzimática de β -galactosidasa se midió a diferentes temperaturas, se demostró una actividad enzimática 3 veces mayor en una temperatura de

37°C (0.455 U / mL) sobre una temperatura ambiente de 25°C (0.1198 U /mL) al cabo de 30 min de incubación, siendo estos valores similares a los reportados por Plasencia (2019) cuyo estudio indica una actividad enzimática de β -galactosidasa usando como sustrato ONPG a las mismas condiciones de temperatura y un periodo de incubación de 30 min presenta una actividad enzimática de 0.461 (U /mL) a 37°C y a 0.1 (U /mL) a 25°. En la Figura 12 se observó un cambio en la reacción enzimática, la β -galactosidasa escinde el ONPG a galactosa y o-nitrofenol mismo que presenta un color amarillo, lo que demuestra la actividad de la enzima (Becerra, 2021). Esta propiedad podría ser utilizada en Bioprocesos industriales para determinar si la β -galactosidasa se encuentra activa, siendo un método cualitativo permite una identificación rápida (Murphy, Ryan, & Walsh, 2020).

La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre ONPG y lactosuero es considerada mesófilo, ya que presenta una actividad máxima a una temperatura de 37°C. Otros parámetros que se pueden evaluar la actividad enzimática es la concentración de proteínas, efecto de pH, temperatura, sustrato y tiempo de incubación, los mismos que son de vital importancia a la hora de diseñar un bioproceso para la producción de enzimas (Zhou, Hua, Huang, & Xu, 2019).

En el diseño de un bioproceso para la producción a gran escala de β -galactosidasa se considera también las etapas en las fases de pre-inóculo e inóculo antes de ingresar al fermentador, no mostradas en la Figura 14 (Tripathi y Shrivastava, 2019), conocer el comportamiento del crecimiento celular en estas etapas, permite la selección de inóculos viables en las fases del fermentador principal (Zhou, Hua, Huang, & Xu, 2019).

Los resultados de la cinética de crecimiento del pre-inóculo, señala un periodo de latencia de 2 horas, tiempo necesario que la bacteria usa para adaptarse al medio de cultivo, la fase exponencial comenzó al cabo de 3 horas y terminó a la hora 6 con una producción máxima de biomasa de 2 g/L. Figura 15, que comparado con lo descrito por, Baev, Jancso, & Campbell (2006) el crecimiento de *Escherichia coli* en medio LB presenta una fase de

estabilización de 1.5 horas, la fase exponencial comenzó al cabo de 3 horas y el proceso de fermentación es de 7 horas que son valores casi idénticos a los obtenidos en este trabajo. Conocer la curva de crecimiento permite escalar la reproducibilidad de las fermentaciones (Carvajal & Rodríguez, 2017). Las curvas de crecimiento son similares para la fermentación a 2000 L alcanzando un máximo crecimiento celular de 100 g/L al cabo de 11 horas Figura 16. Se usó IPTG que es un inductor en la expresión de enzima recombinante. Sin embargo, Duan (2017) sugiere que la lactosa puede reemplazar al IPTG debido a su doble función, como inductor, sustrato su bajo costo y falta de toxicidad la hacen rentable para la producción a gran escala reduciendo los costos de operación.

La producción de β -galactosidasa es intracelular lo que conduce a la formación de agregados de proteína (Slouka *et al.*, 2019). Estos cuerpos de inclusión contienen una cantidad razonable de enzima activa dentro de su estructura (Flores, Nolan, Perillo, & Sánchez, 2019). Para la solubilización se utilizó agentes denaturantes de sulfato de sodio, urea 8M combinada con DDT reduciendo los puentes disulfuros, manteniendo la enzima en estado reducido (Brito, *et al.*, 2016), seguido de una diálisis en tampones de replegamiento con urea y glicerol, necesario para evitar la pérdida de la enzima de interés (Villavicencio, 2020). Por último, sigue el mismo proceso de purificación de la fase soluble, que según Slouka *et al.*, (2019) permite recupera así 1/3 de la enzima 40 kg de enzima/Batch Figura 14. Las enzimas en *Aspergillus niger* de β -galactosidasa se secretan al medio extracelular, por lo cual el diseño de un Bioproceso podría eliminar los pasos en el replegamiento de cuerpos de inclusión (Martarello *et al.*, 2019).

La composición del medio de cultivo es importante en la expresión de proteínas recombinantes, luego de los pasos de recuperación y purificación a los que la enzima fue sometida Figura 14, se obtuvo una producción de 177.137 Kg de enzima/Batch cuando se usa el suero de leche como fuente principal de carbono semejante a lo descrito por Carvajal & Rodríguez (2017) cuyo trabajo presentó una producción de 150 Kg/Batch cuando utiliza lactosa como fuente de carbono. Se observa un mayor rendimiento cuando se utiliza glicerol

como fuente de carbono 350.15 Kg de enzima/Batch y de 198 Kg de enzima /Batch al combinar los sustratos (Tabla 19). Estos resultados se debieron principalmente a que la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* no puede metabolizar la galactosa, resultante de la lactosa escindida (Duan, Hu, Qi, Gu, & Wu, 2017). Sin embargo, el uso de lactosa como fuente de carbono reduce los costos de producción en un 5% Tabla 17. Se espera una hidrólisis de lactosa mayor al 35% presente en el suero de leche (Chanfrau *et al.*, 2017).

En cuanto a los costos dependientes de las instalaciones se observa en la Figura 19 que los consumibles (materias primas, filtros, membranas) representaron un 73% de los gastos, esto se debe al costo elevado de las membranas de ultrafiltración, diafiltración, y el costo de los Buffer utilizados para el lavado de las columnas de cromatografía tiene un gran impacto económico directo e indirecto en el coste (Ferreira, Rodrigues & Freitas, 2018).

Los procesos de purificación representan el mayor porcentaje de inversión, el uso de operaciones unitarias más baratas para la purificación de enzimas, así como el filtro de tambor de vacío, el reemplazo de la filtración por otro medio de purificación reduciría en un 15% el costo de instalación reduciendo así el costo de producción (SuperPro Designer).

Con respecto al impacto ambiental, el software SuperPro Designer calcula las emisiones al aire de CO_2 , de 2328.49 ppm que representa el 70.42% de las emisiones producidas en el proceso de fermentación. Concentraciones superiores a 30000 ppm puede causar dolores de cabeza, mareos y problemas respiratorios por lo cual los valores emitidos no son considerados peligrosos para la salud (Espín & Ballesteros, 2021). Las emisiones al agua son de 75.14% correspondiente aún a residuos de lactosa, seguido de Tris-Base y Tris-HCl con 4.6% y 9.2% respectivamente, Tris-Base y Tris-HCl poseen concentraciones de nitrógeno que, en conjunto con las cantidades de buffer desechado, pueden generar problemas ambientales de eutrofización (Ngatia *et al.*, 2019). Tritón X-100 es un surfactante considerado biodegradable, por lo cuál es un excelente biosurfactante para la recuperación

de la enzima presente en los cuerpos de inclusión, sin causar un daño ambiental (Hernández, 2019).

Según los resultados mostrados se puede estimar que el bioproceso tiene una duración de 64 horas (Tabla 19), partiendo de una producción de 177.137 Kg de enzima/Batch considerándose 2 procesos semanales por un año se obtuvo un retorno de inversión (ROI) de 11 veces la inversión inicial siendo económicamente rentable. Al comparar con otro bioproceso de producción a gran escala de interferón bovino que obtuvo un ROI del 69, nuestro valor es relativamente menor, esto se puede atribuir a que el precio de venta del interferón es elevado en comparación con la β -galactosidasa (Carvajal & Rodríguez, 2017).

Se estima un periodo de recuperación de 8.60 años necesarios para recuperar la inversión inicial. El programa SuperPro Designer permite realizar un análisis integral de los costos y factores que influyen en la producción rentable de β -galactosidasa a gran escala.

Capítulo 6

Conclusiones

A partir de un clon de *Escherichia coli* BL21(DE3) recombinante que posee el gen codificante para β -galactosidasa, se logra expresar la enzima *in silico*, utilizando el software bioinformático Benchling y primers diseñados para las enzimas de restricción *BamHI* y *NheI* para la inserción del gen de β -galactosidasa (*Lac4*), cds completos de *Kluyveromyces lactis* cepa VKM Y-1339 de 3.7 kb dentro del vector.

Para la producción industrial de β -galactosidasa recombinante, se diseñó un bioproceso con operaciones upstream y downstream mediante el uso del software bioinformático SuperPro Designer obteniéndose una producción de 177.17 Kg de enzima/Batch utilizando suero de leche como fuente de carbono.

El análisis ambiental y económico de la implementación de este bioproceso se considera con bajo impacto en las emisiones de gases, mientras que el nitrógeno eliminado

en conjunto con por los buffers de lavado de las columnas de cromatografía pueden ocasionar problemas ambientales de eutrofización.

La producción de β -galactosidasa utilizando residuos agroindustriales como el suero de leche es un proceso viable para la obtención de enzima, debido a su bajo costo, además, trae consigo beneficios económicos al reemplazar IPTG como inductor que es un reactivo costoso y tóxico para las células con la lactosa presente en el suero de leche siendo también la principal fuente de carbono.

Este tipo de bioprocesos en países en vías de desarrollo es considerado de gran valor económico debido a los bajos costos de materia prima con respecto al costo de importación, además de la generación de nuevas fuentes de trabajo.

Capítulo 7

Recomendaciones

Se recomienda realizar el análisis técnico-económico de la implementación de una planta de tratamiento de agua residuales interna que permita reducir las cantidades de DBO y DQO presentes en la producción de β -galactosidasa proveniente del suero de leche y del desecho de los buffers antes de ser desechados al medio ambiente.

Reemplazar el inductor IPTG con la lactosa del suero de leche que puede ser tóxico para las bacterias, el suero de leche induce una expresión de enzimas recombinantes más lenta y menos estresante para las células.

Un reemplazo de los procesos downstream que permitan un mayor rendimiento en la producción de β -galactosidasa, incorporando un proceso de recuperación más eficiente, y reduciendo los costos de purificación de la enzima.

Referencias

- Acosta, A., & Beltran, L. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Hechos Microbiol*, 3(2), 25-35.
- Alarcón, D., & Puga, B. (2019). *Determinación de Zearalenona en leche cruda de vaca y sus factores de riesgo en la provincia de Manabí - Ecuador, en época lluviosa y seca*. Quito: Universidad Central.
- Alvarado, M., Chavarría, T., & Mora, J. (2019). Recombinant protein production from transgenic animals: Systems and Applications. *Tecnología en Marcha*, 32(3), 133-144.
- Alvarado, R. (2017). *Estudio de Mercado "Sector de la leche en el Ecuador"*. Portoviejo: Superintendencia de Control del Poder de Mercado.
- Álvarez, M., Rico, A., Cerdán, M., Becerra, M., & González, M. (2018). Valuation of agro-industrial wastes as substrates for heterologous production of α -galactosidase. *Microb Cell Fact*, 3(17).
- Alves, E., Morioka, L., & Sugimoto, H. (2019). Comparison of bioethanol and beta-galactosidase production by *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* strains grown in cheese whey. *International Journal of Dairy Technology*, 72(3), 409-417.
- Ayala, M. (2017). *Diseño de un método de manejo de suero de leche adaptado a dos empresas queseras como alternativa para su posterior industrialización*. Quito.
- Baev, M., Baev, D., Jancso, A., & Campbell, J. (2006). Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays. 71, 310-316.
- Baolei, J., & Che, O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. 6(8).

- Barradas, N. (2019). *Purificación y caracterización bioquímica de una β -galactosidasa térmofila*. Universidad de Coruña.
- Becerra, M. (03 de 06 de 2021). *Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis**. Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14196/RodriguezOlivenza_David_TFM_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Beltrán, L., & Acosta, A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Hechos microbiológicos*, 25-35.
- Berg, S., Brobst, G., Edmons, McGuire, A., Menard, & Tracu, N. (2020). *SuperPro Designer User Manual*. Obtenido de <https://projects.ncsu.edu/project/actionagenda/coprotein/media/UsersManual.pdf>
- Bergman, E. (2019). *Evaluation of the software SuperPro Designer through simulation of a biohydrogen production process*. Lund University.
- Berini, F., Marinelli, F., & Binda, E. (2020). Streptomycetes: Attractive Hosts for Recombinant Protein Production. *Frontiers in Microbiology*, 1-16. doi:10.3389/fmicb.2020.01958
- Bianco, M. (2016). *Caracterización de β -galactosidasa estructurada en cuerpos de inclusión*. Córdoba.
- BioLabs. (9 de 8 de 2016). *Don't Clone Alone: A Comparison Between SnapGene and Genome Compiler*. Obtenido de <https://bitesizebio.com/26510/dont-clone-alone-a-comparison-between-snapgene-and-genome-compiler/>
- Bosso, A., Igleciasa, A., Bosso, A., Guemra, S., Ito, L., & Hiroshi, H. (2019). Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 1-5.

- Brito, S., Morejón, A., Acevedo, D., Beltran, J., Serrano, G., Pimienta, E., & Marrero, D. (2016). Estudio preliminar de diferentes métodos de solubilización de la proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 16 obtenida en *Escherichia coli*. *Ciencias Biológicas*, 349-352,.
- Carvajal, T., & Rodríguez, N. (2017). *Evaluación de la factibilidad Técnico-Económica de una planta de producción alfa hbovino recombinante (rBoIFN- α)*. Pontificia Universidad Católica Valparaíso.
- Castebianco, E. (2009). *Cómo definir los costos de tu empresa*. Bogotá: Kimpres.
- Castro, R., Díaz, J., Pulido, D., Acosta, O., & Guerrero, C. (2020). PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSC70 RECOMBINANTE EN *Escherichia Coli* BL21(DE3) PARA GENERAR ANTICUERPOS POLICLONALES. *Investigación original*, 1-14.
- Centeno, C. (2018). *Producción de un crudo enzimático (Celulasa, Xilanas) por Aspergillus niger van Tieghem (ATCC® 6275™), utilizando residuos agroindustriales*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Cevallos, A. (2019). *Producción de alfa-amilasa recombinante de Bacillus licheniformis ATCC 14580 en Escherichia coli BL21 (DE3)*. Quito: Universidad de las Américas.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., & Dhanda, S. (2018). Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorganic Chemistr*, 176-189.
- Chanfrau, J., Pérez, J., Fiallos, M., Rivera, L., Abri, I., Guaran, M., & Trujillo, L. (2017). Milk Whey- From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology. *Prensa Med Argent*, 103(4).

- Chávez, A. (2020). *Estructura Y Función De Las Biomoléculas*. Obtenido de http://ri.utn.edu.mx/bitstream/handle/123456789/553/Unidad%202_final%20BIOQUIMICA.pdf?sequence=1
- Chua, J.-Y., & Liu, S.-Q. (2019). Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. *Trends in Food Science & Technology*, 24-32. doi:10.1016/j.tifs.2019.06.016
- De Andrade, B., Migliavacca, V., Okano, F., Grafulin, V., Lunardi, J., Roth, G., & Volpato, G. (2018). Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed-batch culture using DO-stat and linear control. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1-7.
- De Freitas, M., Hortêncio, L., De Albuquerque, T., Rocha, M., & Gonçalves, L. (2020). Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Deloisa, K., Martínez, L., & Palomares, M. (2013). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 415-429.
- Díaz, A., Álvarez, M., Escuder, J., González, M., Cerdán, M., & Becerra, M. (2017). Rational mutagenesis by engineering disulphide bonds improves *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for hightemperature industrial applications temperature industrial applications. *Scientific Reports*, 2-11.
- Duan, X., Hu, S., Qi, X., Gu, Z., & Wu, J. (2017). Title: Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Process Biochemistry*, 53, 17-24.

- Espín, E., & Ballesteros, F. (06 de 03 de 2021). *Plan Nacional de la Calidad de aire*. Obtenido de <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/libro-calidad-aire-1-final.pdf>
- Ferreira, R., Rodrigues, A., & Freitas, S. (2018). Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *. Biotechnology for Biofuels*.
- Flores, H., Pérez, G., Gioia, L., & Medina, J. (2018). Metodología de optimización de procesos industriales relacionando las inversiones con los costos operativos. *Portal De La Ciencia*, 87-95.
- Flores, S. S., Nolan, V., Perillo, M. A., & Sánchez, J. M. (2019). Superactive β -Galactosidase inclusion bodies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.049
- Freile, A. (2012). *Método de marcación genética de plásmidos de Escherichia coli*. Quito: Universidad de San Francisco.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., Gonzales, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia*. *VacciMonito*, 22(2), 30-39.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, M.-S. J., & Valero, F. (2019). Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol. *New Biotechnology*, 53, 24-34. doi:10.1016/j.nbt.2019.06.002
- Gardner, Q., Hassan, N., Hafeez, S., Arif, M., & Akhtar, M. (2019). Exploring the nature of inclusion bodies by MALDI mass spectrometry using recombinant proinsulin as a model protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, , 647-653.

- Genome Compiler. (26 de 09 de 2020). Obtenido de http://www.genomecompiler.com/?utm_source=refferal_website&utm_medium=referral&utm_term=resources_software&utm_content=website&utm_campaign=sgd_wiki
- GOLDBIO. (22 de 04 de 2018). *Blue-White Screening of Bacterial Colonies* . Obtenido de <https://www.goldbio.com/documents/1031/Blue%20White%20Screening%20of%20Bacterial%20Colonies%20using%20X-Gal%20and%20IPTG%20Plates.pdf>
- González, A., & Fillat, M. (2018). Aspectos Metodológicos De La Expesión De Proteínas Recombinantes EnEscherichia coli. *Revista de Educación Bioquímica*, 14-27.
- Green, M., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 790-795.
- Guevara, E., Jiménez, L., & Sotelo, R. (2020). *Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial*. Obtenido de <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/152>
- Guevara, L., & León, R. (2019). *Aprovechamiento del lactosuero dulce en la elaboración de un alimento enriquecido con Hordeum vulgare y Passiflora edulis*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Hernández, A. (26 de 09 de 2020). *Practical Bioinformatics a course for the life sciences*. Obtenido de <https://digital.library.txstate.edu/handle/10877/5620>
- Hernández, W. (2019). *Efecto de la variación de la concentración del surfactante TritonX-100 en la remediación de una muestra de suelo contaminada con hidrocarburos a escala de laboratorio utilizando la técnica de remediación lavado de suelo*.
- Hu, W. (2020). *Cell Culture Bioprocess Engineering* (2 ed ed.). CRC Press.
- INDEUCEC S.A. (09 de 27 de 2020). Obtenido de <http://www.farmayala.com/nuestra-planta/resena.html>

Intelligen. (26 de 09 de 2020). *SuperPro Designer Product Features*. Obtenido de <https://www.intelligen.com/products/superpro-designer/superpro-designer-product-features/>

Jia, B., & Jeon, C. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*, 6(8).

Karimi Alavijeh, M., Meyer, A. S., Gras, S., & Kentish, S. (2019). Simulation and economic assessment of large-scale enzymatic N-acetyllactosamine manufacture. *Biochemical Engineering Journal*. doi:10.1016/j.bej.2019.107459

Kaur, N., Sharma, P., Jaimni, S., Kehinde, B. A., & Kaur, S. (2020). Recent developments in purification techniques and industrial applications for whey valorization: A review. *Chemical Engineering Communications*, 1-16.

Khan. (03 de 01 de 2021). *Transformación y selección bacteriana*. Obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-selection>

Kiesslich, S., & Kamen, A. (2020). Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology Advances*, 11-35.

Kittibunchakul, S., Pham, M., Tran, A., & Nguyen, H. (2019). β -Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: Biochemical Characterization and Recombinant Expression for Applications in Dairy Industry . *nt J Mol Sci*, 20(44).

Kwapiszewski, R., Szczudlowska, J., Kwapiszewska, K., Chudy, M., & Brzozka, Z. (2015). Determination of Acid β -Galactosidase Activity: Methodology and Perspectives. *Indian J Clin Biochem.*, 57-62.

Lappa, I. K., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications, 8(8), 347. *Foods*, 8(8).

- Leksmono, C., Manzoni, C., Tomkins, J. E., Lucchesi, W., Cottrell, G., & Lewis, P. (2018). Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. *Journal of Visualized Experiments*.
- Li, S., Zhu, X., & Xing, M. A. (2019). New β -Galactosidase from the Antarctic Bacterium *Alteromonas* sp. ANT48 and Its Potential in Formation of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides. *Mar Drugs*, 17(11), 1-4.
- Llerena, E. (2017). *Diseño de un proceso industrial para la obtención de jarabe de suero a partir de residuos lácteos*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Lu, G., & Moriyama, E. (26 de 09 de 2020). *Vector NTI a balanced all-in-one sequence analysis suite*. Obtenido de <https://academic.oup.com/bib/article-lookup/doi/10.1093/bib/5.4.378>
- Maksum, I., Nabel, A., Ishmayana, S., & Soedjannatmadja, U. (2020). Safety Aspect of Recombinant Protein Produced by *Escherichia coli*: Toxin Evaluation with Strain and Genomic Approach. *InterchOpen*.
- Martarello, R; Cunha, L; Cardoso, S; al., et. (2019). Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. *AMB Expr*(81).
- Mejía, C., & López, Y. (2020). *Producción de la enzima recombinante Xyn30D de Paenibacillus barcinonensis para la degradación de residuos agroindustriales*. Ambato.: Universidad Técnica de Ambato.
- Montero, H. (28 de 09 de 2020). *Métodos de centrifugación*. Obtenido de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>
- Morioka, L., Santos, C., Pádua, E., Gonzales, F., Massaro, A., & Sayuri, A. S. (2019). Concentrated beta-galactosidase and cell permeabilization from *Saccharomyces*

fragilis IZ 275 for beta-galactosidase activity in the hydrolysis of lactose. *Food Science and Technology*, 39(3).

Murphy, J., & Walsh, G. (2019). Purification and characterization of a novel thermophilic β -galactosidase from *Picrophilus torridus* of potential industrial application. *Extremophiles*, 783-792.

Murphy, J., Ryan, M., & Walsh, G. (2020). Purification and Characterization of a Novel β -Galactosidase From the Thermoacidophile *Alicyclobacillus vulcanalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* volume, 1190–1206.

Murray, M.-Y. (2019). *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.

NEB. (25 de 12 de 2020). *Protocolo de transformación de E. coli competente para subclonación (C2988)*. Obtenido de <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/subcloning-competent-ecoli-transformation-protocol>

Ngatia, L., Iii, J., Moriasi, D., & Taylor, R. (2019). Nitrogen and Phosphorus Eutrophication in Marine Ecosystems. In *Monitoring of Marine Pollution*. . doi:10.5772/intechopen.81869

NOVAGEN. (2020). Obtenido de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/pET-28a+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69864?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

Oliviera, C., Guimaraes, P., & Domingues, L. (2012). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. 29(6), 600–609.

Ortega, D. (2020). Enfoque de la Biotecnología Industrial en Ecuador y la Provincia de Esmeraldas. 5(8), 1228-1239.

- Packiam, K. A., Ramanan, R. N., Ooi, C. W., Krishnaswamy, L., & Tey, B. T. (2020). Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. . *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Parada, M., Tapia, Z., LLerena, E., Carreras, F., & Manobanda, P. (2019). HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON β -galactosidasa DE *Kluyveromyces lactis*. *Perfiles*, 1(22), 44-53.
- Patel, S. (2015). Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. . *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 6847–6858.
- Plasencia, O. (2019). *Caracterización de la actividad enzimática de la beta-galactosidasa aislada de un cultivo líquido de Pleurotus ostreatus a base de suero de leche*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
- Priyank, S., Ankit, S., Sudeepa, S., & Amulya, K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. . *Trends in Biotechnology*.
- Rincón, D., Sepúlveda, J., & Ciro, H. (2020). Evaluation of diafiltration process for concentration of the protein in the sweet whey from cheese factory. *DYNA*, 87(214), 239-247.
- Rosano, G., Morales, E., & Ceccarelli, E. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422.
- Rueda, M. (2019). *Optimización de las condiciones de cultivo de Lactobacillus casei ATCC 393 empleando suero de leche como fuente de carbono para la producción de lactasa*. Quito: Universidad de las Americas.
- Sadeghian-Rizi, T., Ebrahimi, A., Moazzen, F., Yousefian, H., & Jahanian-Najafabadi, A. (2019). Improvement of solubility and yield of recombinant protein expression in *E. coli* using a two-step system. . *Research in Pharmaceutical Sciences*, 14(5).

- Sampaio, F., Faria, J., Da Silva, M., De Souza, R., & Converti, A. (2019). Cheese Whey Permeate Fermentation by *Kluyveromyces lactis* : a Combined Approach to wastewater treatment and Bioethanol Production. *Environmental Technology*, 1-26.
- Sandomenico, S., Sivaccumar, J., & Ruvo, M. (2020). Evolution of *Escherichia coli* Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17). doi:10.3390/ijms21176324
- Serial Cloner. (25 de 09 de 2020). Obtenido de http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner-Download.html
- Shaima, S., Attiya, Sobia, A., & Raazia, T. (2017). Sources of b-galactosidase and its applications in food industry. *Biotech*, 7(1).
- Shilling, P., Mirzadeh, K., Cumming, A., Widesheim, M., & Kock, O. (s.f.). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. . *Communications Biology*, 1-8.
- Show, P. L., Ooi, C. W., & Ling, T. C. (2019). *Bioprocess Engineering: Downstream Processing*. CRC Press.
- Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A., & Panda, A. (2020). Structure-Function Relationship of Inclusion Bodies of a Multimeric Protein. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-10.
- Slouka, C., & al., e. (2019). Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Appl Microbiol Biotechnol*, 103, 1143–1153.
- Smolskaya, S., Logashina, Y., & Andreev, Y. (2020). *Escherichia coli* Extract-Based Cell-Free Expression System as an Alternative for Difficult-to-Obtain Protein Biosynthesis. *International Journal Of Molecular Science*, 21(3).

Su, L., Qi, J., Yu, L., & Wu, J. (2017). Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C. *C. Microb Cell Fact*, 24.

SuperPro Designer . (26 de 09 de 2020). Obtenido de <https://encrack.com/superpro-designer-10-build-7/>

Taipa, M., Fernandes, P., & Carcalho, C. (2019). Production and Purification of Therapeutic Enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

Terán, D., & Peñafiel, A. (2019). *Producción de la enzima recombinante Cel6D de Paenibacillus barcinonensis para la degradación de residuos agroindustriales*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Thermo Fisher. (2020). Obtenido de https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Cloning/Images/TFS_Vector-NTI-Software_FAQ.pdf,

Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* . *Frontiers Media* .

Trujillo, L. (2020). Sostenibilidad de los bioprocesos., (pág. 46).

Tuquerres, H., Cerda, G., Tenemasa, V., Diéguez, K., Carrera, K., & Pérez, A. (s.f.). Diseño del proceso para la obtención de ácido cítrico a partir del bagazo de caña disponible en Pastaza Ecuador. *47(2)*, 86-96.

Vandermies, M., & Fickers, P. (2019). Bioreactor-Scale Strategies for the Production of Recombinant Protein in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*, 7(2). doi:10.3390 / microorganismos7020040

- Vieira, A., Souza, T., Silva, M. F., & Parachin, N. (2018). Comparison of Yeast as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6(2), 1-23.
- Villavicencio, C. (2020). *Obtención de la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en Escherichia coli, como alternativa al tratamiento de infecciones virales.* . Sangolquí.
- Villegas, I., & Lievano, S. (2020). *EVALUACIÓN FINANCIERA Y TÉCNICA DE LA LIOFILIZACIÓN DEL AGUACATE*. Medellín:: Universidad EAFIT.
- Wu, W. D., & Gao, X. (2020). *Estados Unidos Patente nº 16 / 935,321* .
- Xi, G., Esfandaria, R., Bittencourt, C., Jouihan, H., Sharma, A., & Linke, T. (2019). Refolding and purification of cGMP-grade recombinant human neurturin from Escherichia coli inclusion bodies. *Pre-proof*, 1-45.
- Xu, H., Wang, Y., Lu, J., Zhang, B., Zhang, Z., Si, L., . . . Zgou, D. (2016). Re-exploration of the Codon Context Effect on Amber Incorporation of Noncanonical Amino Acids in Escherichia coli by the Blue–White Screening Assay. *ChemBio*, 17(13).
- Yin, H., Pijning, T., Meng, X., Dijkhuizen, L., & Leeuwen, S. (2017). Engineering of the Bacillus circulans β -Galactosidase Product Specificity. *Biochemistry*, 56(5), 704–711.
- Yin, S. Z., Shen, M., Li, G., Lu, S., Zhao, Y., & Wang, J. (2018). Surface Display of Heterologous β -Galactosidase in Food-Grade Recombinant Lactococcus lactis. *Current Microbiology*.
- Zapata, L. (2017). *Escalamiento y optimización de la producción de enzimas alginato liasa recombinante*. Chile: Universidad de Chile.
- Zhou, X., Hua, X., Huang, L., & Xu, Y. (2019). Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess. *Bioresour Technol*, 272, 70-76.

Zikmanis, P., Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020). Production of biodegradable microbial polymers from whey. . *Bioprocess*, 7(36). doi:10.1186/s40643-020-00326-6