



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Presentada para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Por:

Rosa María Paulín Guzmán

Ingeniero Biotecnólogo

Producción de biomasa de *Salmonella typhi* para la obtención de porinas

Dirigida por:

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

México, D. F. Mayo de 2008



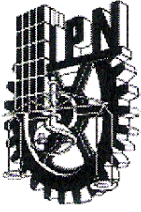
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 10 del mes Julio del año 2008, el (la) que suscribe Rosa María Paulín Guzmán alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A060428, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas y cede los derechos del trabajo intitulado "Producción de Biomasa de *Salmonella typhi* para la obtención de porinas", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: rosapaulin04@yahoo.com y j.s.ab@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:00 horas del día 19 del mes de junio del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

"Producción de biomasa de *Salmonella typhi* para la obtención de porinas "

presentada por la alumna:

 Paulín
Apellido paterno

 Guzmán
materno

 Rosa María
nombre

Con registro:


A	0	6	0	4	2	8
---	---	---	---	---	---	---

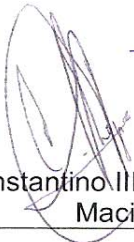
Aspirante al grado de: Maestra en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISION REVISORA

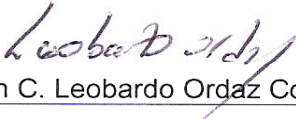
Director de tesis


 Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas


 Dr. Constantino III Roberto López Macías


 Dr. Edgar Salgado Manjarrez


 Dra. Marina Olivia Franco Hernández

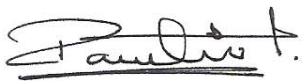

 M. en C. Leobardo Ordaz Contreras

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


 Dr. Edgar Salgado Manjarrez

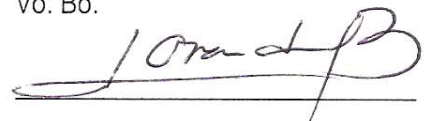
DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Rosa María Paulín Guzmán

Vo. Bo.



Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas
Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mis padres
Margarita Guzmán

A mis hermanos
Gude, Elena, Isabel, Luís y Jorge

Por ser la inspiración para llevar a cabo todos mis proyectos, por su inagotable amor y apoyo: "familia, MIL GRACIAS".

A mis amigos

Rosalía Aduna, Rubén Medina, Nora Ríos, Dr. Ramírez, Itzmel Saldivar y muy en especial a César González por su incuestionable paciencia.

Por el tiempo, opiniones y desavenencias compartidos.

A mi Comité revisor:

Dr. Edgar Salgado

M. en C. Leobardo Contreras

Dr. Constantino López

Dr. Olivia Franco

Dr. Juan Aranda

Por las valiosas aportaciones a este trabajo

Al Dr. Armando Isibasi, por la oportunidad brindada para formar parte del equipo que dirige y por sus acertadas observaciones a este trabajo.

Al Dr. Constantino López, por su confianza y por sus consejos que me ayudaron a tomar siempre las mejores decisiones.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Lugar donde se desarrolló este proyecto.

*Por su guía, tiempo, dedicación y compromiso en el desarrollo de este proyecto, SIEMPRE GRACIAS
Dr. Juan Aranda.*

CONTENIDO

RESUMEN	01
ABSTRACT	02
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	03
INTRODUCCIÓN GENERAL	05
Fiebre tifoidea	05
Vacuna parenteral de antígeno polisacárido Vi	05
Vacuna oral Ty21a	06
Vacuna tentativa	06
Proceso de producción de biomasa	08
BIBLIOGRAFIA	10
1. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO SINTÉTICO PARA <i>Salmonella typhi</i>	12
INTRODUCCIÓN	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Cepa de <i>Salmonella typhi</i>	14
Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio complejo	14
Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio sintético	14
Técnicas analíticas	15
Correlación densidad óptica-peso seco	15
Viabilidad de <i>Salmonella typhi</i>	15
Determinación de sustrato residual	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Formulación de medio de cultivo sintético para el cultivo de <i>Salmonella typhi</i>	16
Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio complejo	19
Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio sintético	20
Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio sintético y complejo	24
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	28
2. PRODUCCIÓN DE <i>Salmonella typhi</i> EN BIORREACTOR	30
INTRODUCCIÓN	30

MATERIALES Y MÉTODOS	31
Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico ($k_L a$)	31
Cultivo de <i>Salmonella</i> Typhi en biorreactor en diferentes medios	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico	32
Cultivo de <i>Salmonella typhi</i> en biorreactor en diferentes medios	34
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37
3. RUPTURA CELULAR DE <i>Salmonella typhi</i> PARA LA RECUPERACIÓN DE PORINAS	38
INTRODUCCIÓN	38
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Proceso experimental general	41
Producción de biomasa	41
Ruptura celular en homogenizador	41
Viabilidad y complejidad celulares	41
Cuantificación de proteínas liberadas al medio	42
Extracción de proteínas de membrana externa	42
Cuantificación e identificación de proteínas de membrana	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Producción de biomasa	44
Ruptura celular en homogenizador	45
Viabilidad celular	45
Complejidad celular	48
Cuantificación de proteínas liberadas al medio	51
Cuantificación de proteínas de membrana	52
Identificación de proteínas de membrana	52
SDS-PAGE	52
ELISA	53
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56
CONCLUSIONES GENERALES	59

RESUMEN

Las porinas, proteínas de la membrana externa de *Salmonella typhi* son usadas como base de una vacuna tentativa contra fiebre tifoidea, tres etapas del proceso de producción de estas proteínas se abordaron: 1) La formulación de un medio de cultivo sintético, 2) La producción de la biomasa en biorreactor (4 l) bajo condiciones controladas (37°C, 200 rpm, 0.5 vvm y pH 7) con el medio sintético diseñado, y 3) La implementación del homogenizador para la ruptura celular del microorganismo fueron las etapas mejoradas del proceso de producción.

Se logró equivalencia del desarrollo cinético entre los medios sintético y complejo para el cultivo del microorganismo ($\mu_{\text{sintético}} = 0.060 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{\text{complejo}} = 0.059 \text{ h}^{-1}$), en biorreactor se determinó que la transferencia de oxígeno no es una limitante del crecimiento y se obtuvo una cantidad de biomasa semejante a la del cultivo en matraz (10 l) en medio complejo. Finalmente la caída de la viabilidad celular, el incremento en la concentración de proteína liberada y la granularidad como medida equivalente de complejidad celular evidenciaron que con dos pases de la suspensión bacteriana por el homogenizador se obtuvo el grado más conveniente de ruptura celular.

ABSTRACT

Porins are outer membrane proteins of *Salmonella typhi* that are isolated in order to include them in a candidate vaccine formulation against typhoid fever. Porins production involves three stages: 1) The preparation of synthetic culture media, 2) The biomass production in bioreactor (4 l) under controlled conditions (37°C, 200 rpm, 0.5 vvm. and pH 7) with chemically defined culture media, and 3) The implementation of an homogenizer to achieve cell disruption. The improvement of certain aspects in the production process was the aim of this work.

Kinetic development, considered as microbial growth and substrate consumption, was evaluated for *Salmonella typhi* growing on synthetic and complex culture media. The kinetic parameters resulted practically identical in both experiments. An estimation of volumetric oxygen transfer coefficient allows us to affirm that that oxygen would not be a growth limiting factor. Finally, the fall of cell viability, the increase of protein released and the granularity as equivalent measure of cellular complexity showed that two passes of the cell suspension through the homogenizer are a virtually optimal condition for cell disruption.

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Composición de la membrana externa de bacterias gram negativas	7
Figura 2. Proceso de producción	9

1. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO SINTÉTICO PARA *Salmonella typhi*

Figura 1.1. Correlación peso seco-densidad óptica de <i>Salmonella typhi</i>	15
Figura 1.2. Cinética de crecimiento en medio complejo de <i>Salmonella typhi</i>	19
Figura 1.3. Cinética de crecimiento en medio sintético de <i>Salmonella typhi</i>	20
Figura 1.4. Cinéticas de crecimiento en medio sintético de <i>Salmonella typhi</i> usando distintos tratamientos de inoculación	21
Figura 1.5. Cinéticas de crecimiento con diferentes concentraciones de FeSO ₄ y control de pH	22
Figura 1.6. Esquema de adición de FeSO ₄ a cultivo de <i>Salmonella typhi</i> en medio sintético	23
Figura 1.7. Cinética de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en medio sintético	23
Figura 1.8. Cinéticas de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en diferentes medios	24
Figura 1.9. Velocidad específica de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i>	25
Figura 1.10. Velocidades volumétricas de producción de biomasa	26
Figura 1.11. Rendimientos globales en diferentes medios	27
Cuadro 1.1. Composición elemental de <i>E. coli</i>	16
Cuadro 1.2. Cantidad de elementos requeridos por <i>Salmonella typhi</i>	17
Cuadro 1.3. Aporte de compuestos por elemento	17
Cuadro 1.4. Formulación de la solución de vitaminas	18
Cuadro 1.5. Diferencias en la formulación de los medios sintético y complejo	19
Cuadro 1.6. Velocidades específicas de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i>	25
Cuadro 1.7. Valores de rendimiento global en medios diferentes de <i>Salmonella typhi</i>	27

2. PRODUCCIÓN DE *Salmonella typhi* EN BIORREACTOR

Figura 2.1. Esquema de los componentes del biorreactor	30
Figura 2.2. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno en función del tiempo	33
Figura 2.3. Cinéticas de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en diferentes medios	34
Figura 2.4. Crecimiento y consumo de sustrato de <i>Salmonella typhi</i> en diferentes medios	35

Cuadro 2.1. Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhi</i> en cultivo en biorreactor	36
---	----

3. RUPTURA CELULAR DE *Salmonella typhi* PARA LA RECUPERACIÓN DE PORINAS

Figura 3.1. Pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	38
Figura 3.2. Métodos de ruptura celular	39
Figura 3.3. (A) Válvula de homogenización, (B) Válvula de asiento, (C) Anillo de impacto, (D) Espacio de ruptura, (F) Muestra procesada y (E) Muestra sin procesar	40
Figura 3.4. Cinética de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en biorreactor	44
Figura 3.5. Pérdida de la viabilidad en función del número de pases	46
Figura 3.6. Logaritmo natural de la viabilidad en función del número de pases	47
Figura 3.7. Citograma de dispersión de la muestra sin procesar por el homogenizador	49
Figura 3.8. Citograma de dispersión de la suspensión celular	51
Figura 3.9. Proteínas totales en la suspensión celular después de cada pase por el homogenizador	50
Figura 3.10. SDS-PAGE de proteínas de membrana	53
Figura 3.11. Absorbancia de muestras en función de la concentración de antígeno y controles (+ y -)	54
Cuadro 3.1. Porcentaje de la viabilidad celular de cada muestra	45
Cuadro 3.2. Constantes empíricas de la ruptura celular de <i>Salmonella typhi</i>	47
Cuadro 3.3. Distribución y porcentaje de los eventos en la Citometría de flujo	50
Cuadro 3.4. Lecturas de absorbancia de muestras y controles (+ y -)	54

INTRODUCCIÓN GENERAL

Salmonella typhi (*Salmonella enterica* serovar Typhi) no se trata estrictamente de una especie sino de un serotipo dentro de una subespecie (Brenner *et al.*, 2000). Es una enterobacteria gram-negativa, móvil, aerobia facultativa y es un patógeno intracelular causante de la fiebre tifoidea, bioquímicamente, produce H₂S, es lactosa negativa, ureasa positiva y es indol negativa (Koneman *et al.*, 1999). La infección se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria, no existen reservorios animales y la principal fuente de infección son los portadores asintomáticos.

Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea (salmonelosis) causada por *Salmonella typhi* afecta a 21.6 millones de personas mundialmente cada año, con aproximadamente 220,000 casos de muerte (Crump *et al.*, 2004; Bhan *et al.*, 2005). La enfermedad se caracteriza por la aparición súbita de fiebre, dolor de cabeza, náusea, pérdida del apetito, malestar abdominal, estreñimiento o diarrea, la fiebre alcanza 40 a 41°C y permanece hasta por dos semanas (Girard *et al.*, 2006). La fiebre tifoidea es frecuente en los países subdesarrollados y tiene características endémico-epidémicas, este fenómeno se encuentra relacionado directamente con deficiencias en el saneamiento ambiental, la disponibilidad de agua potable y alcantarillado. Mientras que en países desarrollados la mayoría de los casos son importados de países subdesarrollados

El control de la fiebre tifoidea, incluye entre otras posibilidades la prevención por vacunación, recomendado para personas que viajan a lugares endémicos y personal de laboratorio. Las vacunas parenterales compuestas de bacterias completas muertas, fueron poco efectivas pero producen fuertes efectos adversos debido a la presencia del lipopolisacárido (LPS).

Dos vacunas seguras y efectivas están disponibles y con licencia. Una se basa en una subunidad de antígenos definidos (Polisacárido-Vi) y la otra en un conjunto de bacterias vivas atenuadas (Ty21a), (WHO, 2003). Aunque no todas las cepas virulentas presentan el antígeno Vi.

Vacuna parenteral de antígeno polisacárido Vi. El polisacárido Vi es un homo-polímero lineal del ácido α -1, 4-2-desoxi-2-N-acetilglucosamina que cubre la bacteria como un antígeno capsular y es un factor de

virulencia conocido. La vacuna consiste en una sola dosis, aprobada para personas mayores de dos años de edad, es recomendada una revacunación cada tres años. Esta vacuna tiene licencia en Australia y en más de 92 países en África, las Américas, Asia y Europa, es usada por personas que visitan áreas de alto riesgo de contraer la fiebre tifoidea debido a la presencia de cepas multi-drogo resistentes. Su presentación comercial es Typhim Vi® por Aventis Pasteur MSD.

Vacuna oral Ty21a. Contiene una cepa de *Salmonella typhi* Ty21a atenuada, con deficiencia de la enzima uridin difosfato (UDP-galactosa 4-epimerasa), y carente del antígeno Vi. Debe ser tomada en tres dosis. Está aprobada para uso en niños con por lo menos cinco años de edad, para personas que viajan la revacunación debe ser anual. Esta vacuna tiene licencia en 56 países de África, Asia, Europa, América del sur y EUA. Vivotif® por Berna Biotech Ltd.

Vacuna tentativa. Constituida por 10 µg de porinas principales de *Salmonella typhi* (OmpC y OmpF), (Salazar *et al.*, 2004). En una sola aplicación subcutánea de 0.5 ml de la formulación. Isipor (no comercial).

La vacuna tentativa, se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y fue aprobada para estudios de Fase I por el comité de ética del mismo hospital.

Las porinas son proteínas de la membrana externa de todas las bacterias gram negativas, son de peso molecular de 31 a 48 kDa y reciben el nombre de porinas porque se ordenan en forma regular en la membrana externa formando trímeros (Figura 1). *Salmonella typhi* presenta dos porinas mayoritarias OmpC y OmpF.

Las porinas forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas, iones y nutrientes de aproximadamente 600 Da al interior de la bacteria y de desechos hacia el exterior. (Jap y Walian, 1996; Nikaido, 1994). Estas proteínas transmembranales se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril.

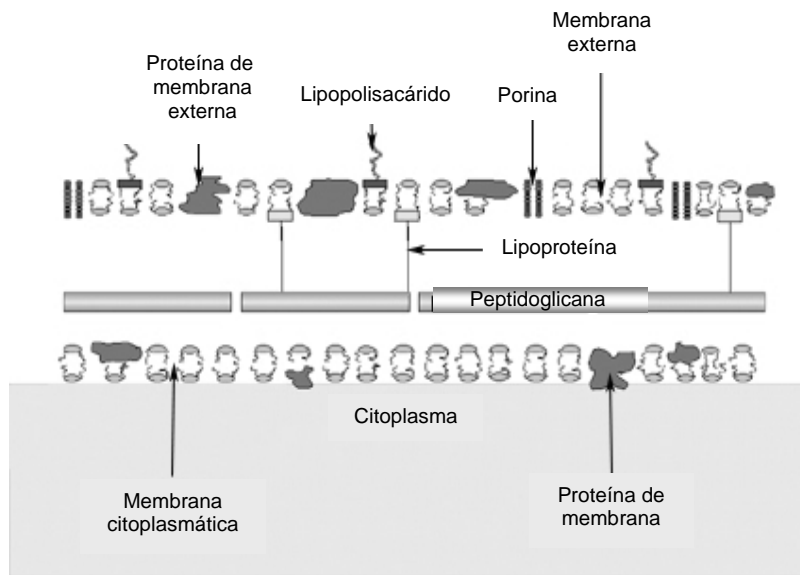


Figura 1. Composición de la membrana externa de bacterias gram negativas (Todar, 2008; Hunt, 2008).

Inicialmente un preparado de PME de *Salmonella typhi* presentó una inmunidad activa contra *Salmonella typhi* (Isibasi *et al.*, 1988) por otro lado en humanos, se ha demostrado la presencia de anti-cuerpos contra PME en pacientes con fiebre tifoidea (Calderon *et al.*, 1986) y otros resultados mostraron que la porinas son inmunogénicas en el humano, ya que se encontraron anticuerpos de las clases IgM e IgG específicos; los de clase IgG dirigidos principalmente contra éstas (Ortiz *et al.*, 1989). Así, las porinas se consideran inmunógenos que generan respuesta inmune humoral protectora (Isibasi *et al.*, 1992) y por otro lado despiertan la respuesta inmune celular (González *et al.*, 1993; González *et al.*, 1995).

Recientemente, estudios con porinas de *Salmonella typhi*, demostraron que pueden inducir anticuerpos de larga duración con capacidad bactericidas (Secundino *et al.*, 2005), lo que apoya el uso de porinas como modelo de memoria inmunológica y el desarrollo de vacunas constituidas de subunidades con la capacidad de conferir inmunidad de larga duración y la combinación de porinas de *Salmonella typhi* con el adyuvante PapMV que potencializa la respuesta inmune contra *Salmonella typhi* (Acosta *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó, las porinas son base fundamental para llevar a cabo la producción de una vacuna tentativa contra la fiebre tifoidea. Por lo que establecer un proceso de producción de porinas a partir de la

biomasa de *Salmonella typhi* para proveer la cantidad de proteína (porinas) necesaria para la formulación de la vacuna tentativa, es prioritario.

La producción de biomasa de *Salmonella typhi* para la obtención de porina se lleva a cabo tradicionalmente en matraz, este sistema de producción no proporciona al microorganismo las condiciones apropiadas para su óptimo crecimiento, entre las que destacan: adecuada transferencia de masa y de calor, control del pH del medio y como consecuencia se tienen bajos rendimientos en función de los nutrientes, volumen de operación y además de la falta de uniformidad entre lotes producidos, etc.

Por lo que, para lograr un incremento en la producción de la biomasa se requiere de la introducción de modos diferentes de cultivo. Por un lado el uso del biorreactor el cual por sus características generales ofrece sistemas de control de las diversas variables de proceso, y de sus formas de operación (lote, lote alimentado y continuo), logran en conjunto un proceso controlado que proporciona las mejores condiciones para el crecimiento del microorganismo y en consecuencia una mejora en la producción de biomasa.

Este trabajo se suma al interés en el área, es decir, la producción de antígenos de *Salmonella typhi* mediante la producción en biorreactor (H. Jang *et al.*, 2008).

Proceso de producción de biomasa

La producción de un metabolito de origen microbiano, porinas de *Salmonella typhi* se presenta en la Figura 2; en la cual en recuadros punteados se separan las tres principales etapas del proceso, 1) Preparación de medios, esterilización y preparación del fermentador, 2) Fermentación en biorreactor y finalmente, 3) Recuperación y purificación.

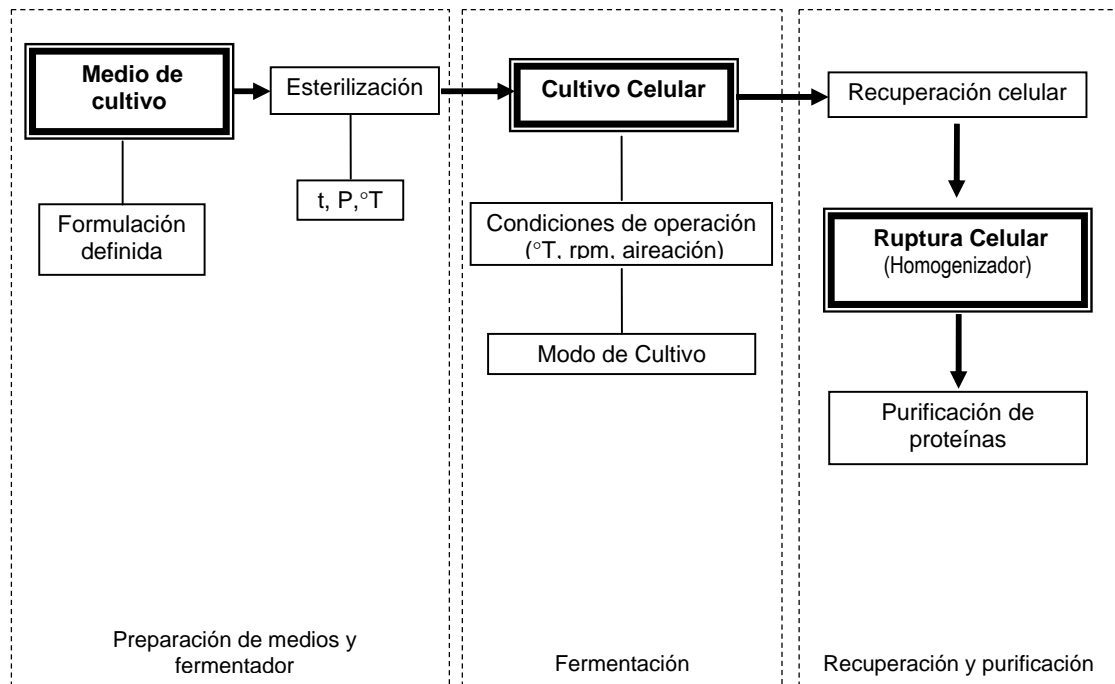


Figura 2. Proceso de producción.

Este trabajo se concentró en las etapas que en el diagrama del proceso de producción están en los cuadros remarcados (Figura 2); con respecto al medio de cultivo se diseñó un medio sintético para sustituir el uso del medio complejo, con la finalidad de evitar el remanente de proteínas contenidas en el extracto de levadura y evitando contaminantes de este origen en los procedimientos de purificación, y el empleo de una única fuente de carbono, la siguiente etapa fue llevar a cabo el cultivo en biorreactor en condiciones controladas para el crecimiento de *Salmonella typhi* con el objetivo incrementar la producción de biomasa en comparación con la producción tradicional y finalmente, la ruptura celular que es la primer etapa del proceso de recuperación de la porina, que consistió en la sustitución del uso del sonicador por un homogenizador, permitiendo mayor volumen de trabajo, disminución del tiempo de proceso entre otros aspectos, mejorando así el proceso de recuperación.

Abordar los aspectos antes mencionados fueron los objetivos de este trabajo, particularmente: 1) Diseñar un medio de cultivo sintético para el crecimiento de *Salmonella typhi*, 2) Cultivo celular en lote en biorreactor y 3) Establecer las condiciones óptimas de ruptura celular en homogenizador para la liberación de las porina.

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, R. E., Pérez, F. R., Majeau, N., Pastelin, P. R., Gil, C. C., Ramírez, S. M., Manjares, O. N., Cervantes, B. L., Santos, A. L., Flores, R. L., Becker, I., Isibasi, A., Leclerc, D., López, M. C. (2008). Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology*. 124 (2), 186-197.
2. Bhan, M.K., Bahl, R., Bhatnagar, S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever. August 25. India Institute of Medical Sciences. New Deli, India.
3. Brenner, F. W., Villar, R.G., Angulo, F. J., Tauxe, R. y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (7), 2465-2467.
4. Calderón, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodríguez, L. H., y Mora, G. (1986). Antibodies to porin antigens to *Salmonella typhi* induced typhoid infection in humans. *Infectology Immunity*. 52, 209-212.
5. Crump, J.A., Luby, S.P. y Mintz, E.D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull. W. H. O.* 82, 346-353.
6. Girard, M.P., Steele, D., Chaignat, C-L., Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*. 24, 2732-2750.
7. González, C. R., Isibasi, A., Ortiz, N. V., Paniagua, J., García, J.A., Blanco F., y Kumate, J. (1993). Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiology Immunology*. 37, 793-799.
8. González, C. R., Mejía, M.V., Paniagua, J., Ortiz, N.V., Ramírez G. e Isibasi, A. (1995). Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch. Med. Res.* 29 Spec No: S99-103.
9. Hunt, R. http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell_envelope.htm (pub. abril, 2008).

10. Hyun Jang, Yeon Kyung Yoon, Jeong Ah Kim, Hyo Seung Kim, So Jung An, Jin Ho Seo, Changfa Cui, Rodney Carbis. (2008). Optimization of Vi capsular polysaccharide production during growth of *Salmonella enterica* serotype Typhi Ty2 in a bioreactor. *Journal of Biotechnology*. 135, 71-77.
11. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González C., Moreno, J., Kumate, J. (1988), Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*, 9, 12, d, Vi. *Infection and Immunity*. 56, 2953-2959.
12. Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C. R., García, J. A. y Kumate, J. (1992). Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine*. 10, 811-813.
13. Jap, B. K. y Walian, P. T., (1996). Structure and functional mechanism of porins. *Physiology Review*. 76, 1073-1088.
14. Koneman, A., *et al.* (1999). *Diagnostico microbiológico*, 5a ed. Médica panamericana. 1432 pp.
15. Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269 (6), 3905-3908.
16. Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia, E., y Kumate, J. (1989), Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever., *Journal of Clinical Microbiology*. 27, 1640-1645.
17. Salazar, G. R. M., Maldonado, B.C., Ramírez, C. N. E., Rios, S. N., Beltrán, N. J., Castañón, G. J., Castillo, T. N., Palma, A. J. A., Carrera, C. M., López, M. C., Isibasi, A. (2004). Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica serovar typhi* bactericide antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology letters*. 93, 115-122.
18. Secundino, I., López, M. C., Cervantes, B. L., Gil, C. C., Ríos, S. N., Pastelin, P. R., Villasis, K. M. A., Becker, I., Puente, J. L., Calva, E., Isibasi, A. (2005). *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology*. 117, 59-70.

19. Todar, K. <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/structure.html>. (feb, 2008).
20. World Health Organization. (2003). Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. Geneva: World Health Organization (WHO/V&B/03.07).

1. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO SINTÉTICO PARA *Salmonella typhi*

INTRODUCCIÓN

El diseño de medios de cultivo sintético ha ganado interés debido a las ventajas que presenta: su uso a nivel comercial donde el rendimiento se mantiene y el valor agregado del producto justifica su empleo, perfiles de fermentación reproducibles, mejor monitoreo y control del proceso de fermentación, disminución en los problemas de escalamiento dado que el medio sintético es menos sensible al proceso de esterilización, y la solubilidad es mayor proporcionando composiciones reproducibles del medio de cultivo a diferentes escalas (Zhang y Gresham, 1999). Algunos otros aspectos incluyen: control sobre la concentración de nutrientes, la cual elimina problemas de regulación y limitación del crecimiento, y por otro lado la reglamentación para la producción de metabolitos de uso terapéutico (proteínas, enzimas) hace muy atractivo el uso de un medio de cultivo sintético porque se conoce con exactitud su composición y se cumple con los requisitos GRAS (generally recognized as safe, siglas en Inglés) debido a que no contiene ningún elemento de origen complejo o animal, generando así un producto biológicamente seguro (Nowruzi *et al.*, 2008).

El interés del crecimiento de *Salmonella typhi* en medio sintético responde a que en la membrana externa de este microorganismo encontramos embebidas proteínas llamadas porinas, las cuales presentan características inmunogénicas (Isibasi *et al.*, 1988; Ortiz *et al.*, 1989) y se han utilizado como base de una vacuna contra fiebre tifoidea para estudios de fase I (Salazar *et al.*, 2004). Así, es conveniente realizar el crecimiento en un medio sintético para evitar la presencia de proteínas endógenas en el medio, lo que podría facilitar la recuperación y aislamiento de las proteínas de membrana externa, del proceso de producción de la vacuna (Phan-Thanh y Gormon, 1997) y por otro lado lograr un mejor control del proceso de fermentación y perfiles reproducibles.

Existen diversas metodologías para el diseño de medio de cultivo, entre éstas se encuentran: diseño estadístico, redes neuronales, lógica difusa, algoritmos genéticos para la optimización de medios de fermentación y simulación del crecimiento usando herramientas analíticas, entre otras (Kennedy y Krouse, 1999). En este trabajo se consideró la composición celular como método para proponer la formulación del medio sintético.

De esta manera, se sabe que el microorganismo para su crecimiento, reproducción y mantenimiento requiere de fuentes de materia y energía, la fuente de materia deberá estar constituida por los elementos de la masa celular en proporción a la composición elemental del organismo en cuestión, entre los que destacan: C, N, O, S, P, K y micro-elementos necesarios para el metabolismo del microorganismo: Fe, Mn, Zn, Mg, entre otros. El propósito de este trabajo fue diseñar el medio de cultivo sintético y conocer las condiciones necesarias para el crecimiento de *Salmonella typhi* en el medio diseñado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de *Salmonella typhi*

Se usó la cepa *Salmonella typhi* STYF302 (Δ OmpF, KanR), (Dr. Edmundo Calva, IBT-UNAM). Lote de referencia L-1238 y conservado a -70°C (REVCO™) en medio de crio-preservación; Luria Bertani (Peptona 10 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹ y 5 g l⁻¹ de extracto de levadura) y 20 % de glicerol.

Crecimiento de *Salmonella typhi* en medio complejo

Salmonella typhi se cultivó en matraz (1 l) con un volumen de 0.4 l en agitador mecánico (4300-INNOVA™), (6 h, 37°C, 250 rpm), en medio líquido, el cual tuvo la siguiente composición: NaC₆H₅O₇·2H₂O 0.5 g l⁻¹, K₂HPO₄ 7 g l⁻¹, KH₂PO₄ 3.1 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1 g l⁻¹, 0.1 g l⁻¹ Extracto de levadura, 1 g l⁻¹ MgSO₄ y 5 g l⁻¹ Dextrosa. La cinética se siguió por densitometría a 540 nm (Auto UV-Vis, LaboMed™) con medio de cultivo estéril como blanco.

Crecimiento de de *Salmonella typhi* en medio sintético

Salmonella typhi también se hizo crecer en matraz con 0.4 l de medio de cultivo sintético con la siguiente composición: K₂HPO₄ 0.41 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0.32 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 3.22 g l⁻¹, MgSO₄ 0.12 g l⁻¹, Dextrosa 6.09 g l⁻¹, Pantotenato de calcio 0.29 g l⁻¹, FeSO₄ 0.048 g l⁻¹, NaCl 0.123 g l⁻¹, y se incubó a 37°C y 200 rpm. El seguimiento del crecimiento se hizo por densitometría a 540 nm (Auto UV-Vis, LaboMed™), con medio de cultivo estéril como blanco.

Técnicas analíticas

Correlación densidad óptica-peso seco

La cepa se cultivó en matraz en medio complejo. La cinética se siguió por densitometría a 540 nm (Auto UV-Vis, LaboMed™) con medio de cultivo estéril como blanco, 5 ml de cada muestra se filtraron en porta-filtro con membrana (Millipore, 25 µm Ø de poro), las membranas se deshidrataron en calor seco (Plus Oven, GALLENKAMP™), (100°C, 1 h) y se almacenaron en desecador hasta peso constante. La correlación entre la densidad óptica y el peso seco que se obtuvo se presenta en la Figura 1.1.

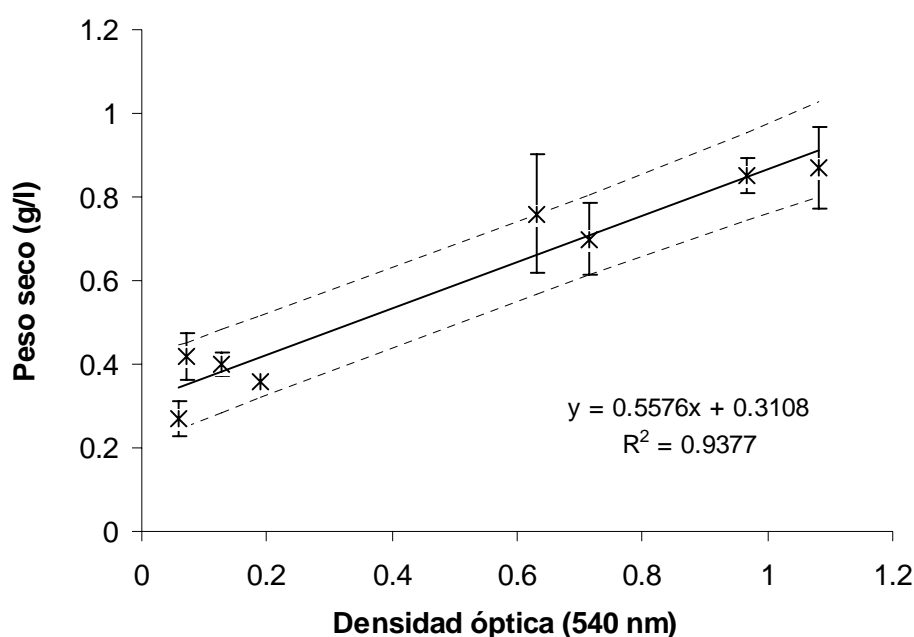


Figura 1.1 Correlación peso seco- densidad óptica de *Salmonella typhi*.

Viabilidad de *Salmonella typhi*

La viabilidad se evaluó cada seis horas del tiempo de incubación, se usó el método de vaciado en placa en medio TSA (BD Bioxon®), las muestras se trataron por triplicado y se incubaron (SHEL-LAB™), (37°C, 18-24 h), se consideraron aquellas placas de entre 30 y 300 UFC para hacer los cálculos correspondientes.

Determinación de sustrato residual

La cuantificación de azúcares reductores (mg ml⁻¹) se hizo por el método del 3,5-ácido dinitrosalisílico (DNS), (Miller, 1954). Se usó una curva tipo de 0.0-0.1 mg ml⁻¹ de glucosa (Difco®). Se tomó 1 ml de cada

muestra y se diluyó 1:10, posteriormente se adicionaron 3 ml del reactivo DNS (ácido 3,5-DNS 7.48 g l⁻¹, NaOH 13.98 g l⁻¹, C₄H₄KNaO₆ 216.1 g l⁻¹, fenol fundido 5.36 ml l⁻¹ y Na₂O₅S₂ 5.86 g l⁻¹), se incubaron a ebullición durante 5 min. Las muestras se dejaron enfriar y se leyeron a 550 nm (Auto UV-Vis, LabMed™) usando el tubo de 0.0 mg ml⁻¹ como blanco. Para eliminar las bacterias presentes en la muestra, 3 ml de la muestra se filtraron en porta-filtro con membrana (Millipore, 25 µm Ø de poro). La determinación se hizo por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación de medio de cultivo sintético para el cultivo de *Salmonella typhi*

Se usó a *E. coli* como referencia para la composición elemental de la biomasa, la cual se presenta en el Cuadro 1.1, debido a la similitud genética de hasta un 80 % que guarda con *Salmonella typhi* (Parkhill et al., 2001).

Cuadro 1.1. Composición elemental de *E. coli* (Bailey, 1986)

Elemento	% Peso seco
Carbono	50
Oxígeno	20
Nitrógeno	14
Hidrógeno	8
Fósforo	3
Azufre	1
Potasio	1
Sodio	1
Calcio	0.5
Magnesio	0.5
Cloro	0.5
Fierro	0.2
Otros	~0.3

Se formuló un medio de cultivo para producir 30 g de biomasa húmeda, en fermentador BioFlo IIc (4 l de volumen de operación). Este peso húmedo corresponde a 19.5 g de biomasa seca. De acuerdo con el Cuadro 1.1, la demanda de cada elemento se presenta en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Cantidad de elementos requeridos por *Salmonella typhi*.

Elemento	Gramos
Carbono	9.75
Oxígeno	3.9
Nitrógeno	2.73
Hidrógeno	1.56
Fósforo	0.585
Azufre	0.195
Potasio	0.195
Sodio	0.195
Calcio	0.0975
Magnesio	0.0975
Cloro	0.0975
Fierro	0.039

En el Cuadro 1.3 se presenta un resumen, en el que se aprecia la cantidad requerida de cada elemento por el microorganismo para la cantidad de biomasa seca que se proyecta producir (19.5 g), así como los gramos de cada compuesto que cubren esta demanda y su respectiva concentración (g l⁻¹).

Cuadro 1.3. Aporte de compuestos por elemento.

Compuesto	g _{compuesto}	Elemento	g elemento (19.5 g-X _{seca})	g l ⁻¹ _{compuesto}
Dextrosa	24.37	Carbono	9.75	6.09
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.88	Nitrógeno	2.73	3.22
		Azufre	3.11	
MgSO ₄	0.48	Azufre	0.19	0.12
		Magnesio	0.09	
K ₂ HPO ₄	1.64	Fósforo	0.29	0.41
		Potasio	0.73	
KH ₂ PO ₄	1.28	Fósforo	0.29	0.32
		Potasio	0.36	
NaCl	0.49	Sodio	0.195	0.12
		Cloro	0.29	
FeSO ₄ ·7H ₂ O*	0.04	Fierro	0.194	0.048
Pantotenato de Calcio	1.16	Calcio	0.039	0.29

* El esquema de adición de este compuesto se especifica en la Figura 1.6

La solución de vitaminas, donde éstas tienen la función de sustituir los cofactores que aporta el extracto de levadura al medio de cultivo, tiene la formulación que se presenta en el Cuadro 1.4†.

Cuadro 1.4. Formulación de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	(500 ml)
Biotina	1.5 mg
Piridoxal fosfato	20 mg
Inositol	125 mg
Piridoxina-HCl	25 mg
Tiamina- HCl	50 mg

El pantotenato de calcio cumple una doble función en el medio de cultivo: (1) como fuente de calcio (Cuadro 1.3) y (2) como cofactor de las enzimas que participan en las rutas metabólicas del microorganismo.

El medio de cultivo sintético se preparó en diferentes etapas: 1) El sulfato de magnesio y la dextrosa, se hidrataron y esterilizaron por separado, 2) El sulfato de hierro se esterilizó por filtración al igual que el pantotenato de calcio, ambos por separado y 3) Solución de vitaminas se esterilizó por filtración.

El pH del agua (embotellada) para el grueso del medio debió estar por encima de 7.5, lo mismo para disolver el MgSO₄, la dextrosa y el pantotenato de calcio. Por otro lado, para disolver el FeSO₄ se usa agua con un pH no mayor a 6, lo anterior para evitar la reducción del hierro que podría llevar a la formación de un precipitado, para obtener un pH final del medio sintético de aproximadamente 7, el cual es el pH adecuado para el crecimiento de *Salmonella typhi*. Finalmente, se presenta un cuadro comparativo (Cuadro 1.5), del aporte del medio complejo actualmente utilizado y el medio sintético formulado.

† Las enzimas y cofactores que participan en el metabolismo de *Salmonella typhi* se revisaron en <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html> y (Minoru Kenehisa y Susumu Goto, 2000)

Cuadro 1.5. Diferencias en la formulación de los medios sintético y complejo.

Nombre	Compuesto	g l ⁻¹	
		Medio sintético	Medio complejo
Dextrosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	6.09	5
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.22	1.0
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	0.12	1.0
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	0.41	7.0
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	0.32	3.1
Cloruro de sodio	NaCl	0.12	---
Pantotenato de calcio		0.29	---
Sulfato de hierro	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.048	---
Solución de vitaminas	Enz y cofac	25 ml	---
Citrato de sodio	NaC ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	---	0.5
Extracto de levadura	---	---	1.0

Crecimiento de *Salmonella typhi* en medio complejo

El crecimiento en medio complejo se presenta en la Figura 1.2 en la cual, se aprecia el incremento de la densidad óptica (540 nm) con respecto al periodo de incubación, y se muestra la cantidad de sustrato residual en el medio de cultivo. La densidad óptica alcanzada con el medio complejo fue de ~1.1, en matraz (0.4 l, 200 rpm, 37°C).

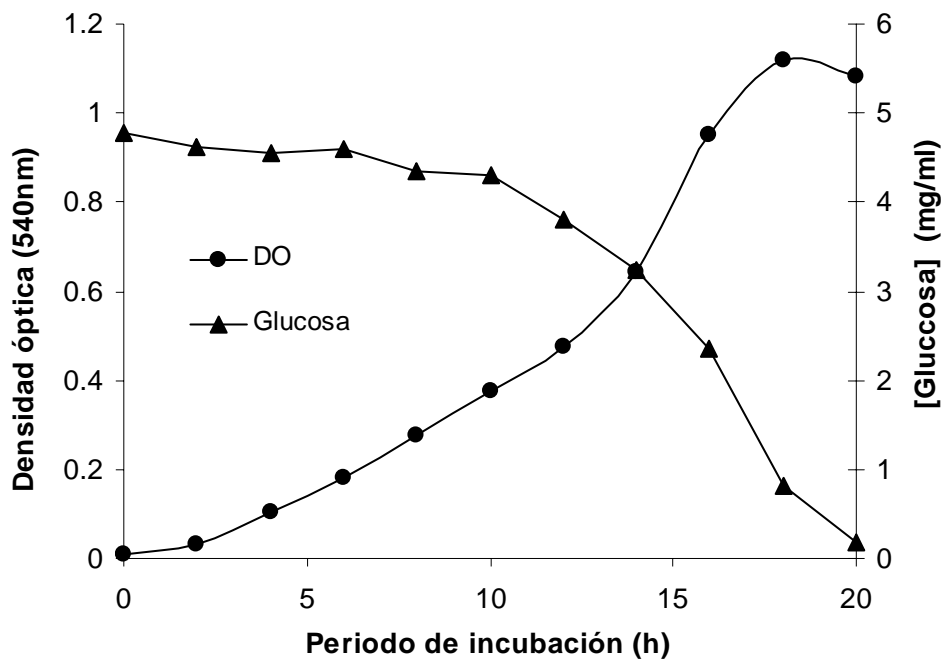


Figura 1.2. Cinética de crecimiento en medio complejo de *Salmonella typhi*.

Crecimiento de de *Salmonella typhi* en medio sintético

Las cinéticas de crecimiento con medio sintético, donde la glucosa fue la única fuente de carbono, se discuten en esta sección. Los primeros resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.3, donde se uso la cepa proveniente del lote de referencia y se utilizo la cantidad de FeSO_4 que se indica.

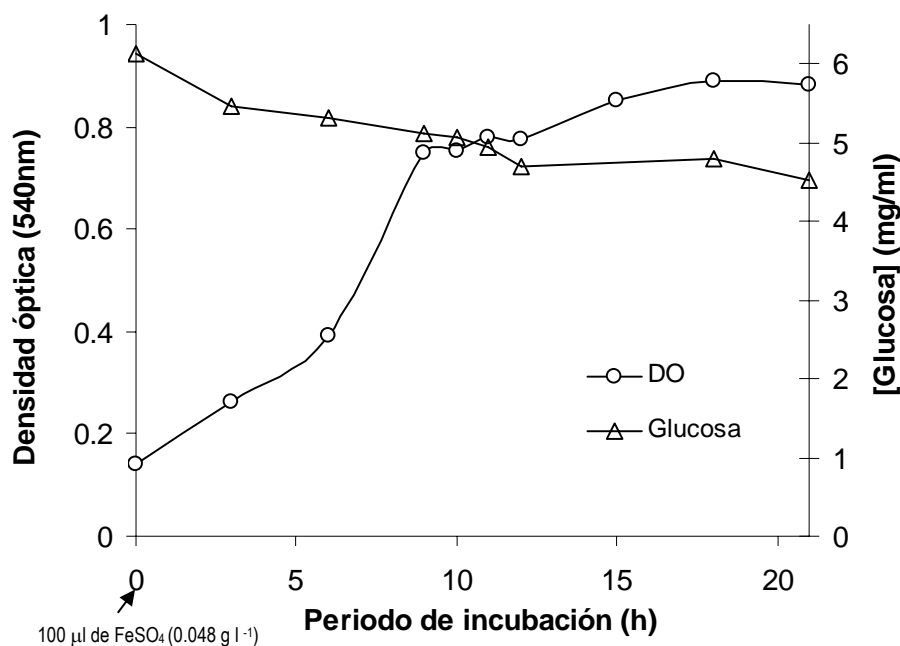


Figura 1.3. Cinética de crecimiento en medio sintético de *Salmonella typhi*.

Se aprecia que existe un incremento en la densidad óptica en el medio, mas no así un consumo de glucosa, la formación de un precipitado visible fue la causa probable de este incremento. Por otro lado, estos resultados sugieren que el microorganismo pudo crecer usando otra fuente de carbono diferente a la glucosa, proveniente del medio de crio-preservación.

Para lograr que *Salmonella typhi* fuera capaz de crecer en medio sintético fue necesario eliminar los sustratos provenientes del medio de crio-preservación. El procedimiento se realizo de la siguiente manera: 500 μL de la suspensión bacteriana se centrifugaron (12000 rpm, 4°C, 10 min.) y se desechó el sobrenadante. El botón obtenido se resuspendió con 1000 μL de solución PBS, pH 7.2 (Phosphate Buffer Solution, por sus siglas en inglés, NaCl 8 g l^{-1} , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.16 g l^{-1} , KH_2PO_4 0.2 g l^{-1} , KCl 0.8 g l^{-1}) y se centrifugó otra vez. Finalmente el paquete celular se resuspendió con 500 μL de la misma solución y este volumen fue inoculado al matraz con medio de cultivo. Los resultados pueden observarse en la Figura 1.4.

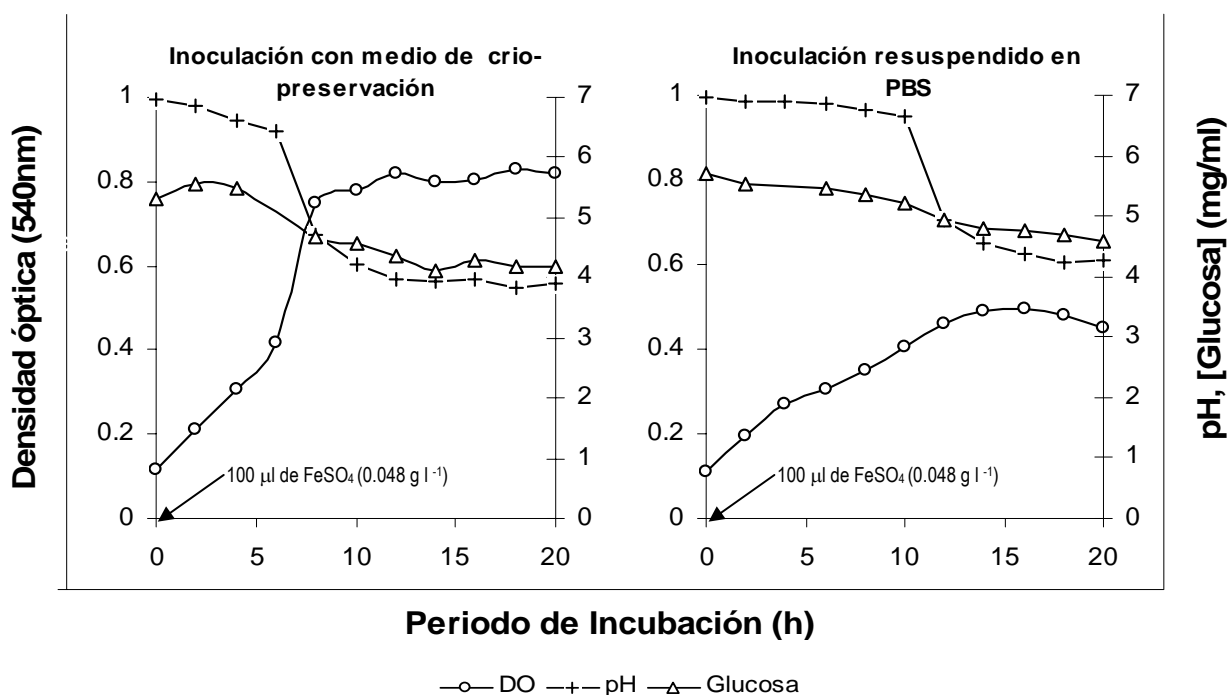


Figura 1.4. Cinéticas de crecimiento en medio sintético de *Salmonella typhi* usando distintos tratamientos de inoculación.

Al comparar las cinéticas de crecimiento donde se usaron cepas de *Salmonella typhi* resuspendidas en diferentes soluciones (Figura 1.4), se observa que la densidad óptica alcanzada por la cepa contenida en el medio de crio-preservación fue superior a la cepa resuspendida en PBS. La diferencia en el crecimiento celular se atribuye al aporte de nutrientes del medio de crio-preservación, dado que el consumo de glucosa en ambos medios estuvo alrededor de 1 g l^{-1} en el mismo periodo de incubación.

Después de haber establecido que el vial debía ser lavado para evitar en el efecto del medio de crio-preservación en las cinéticas de crecimiento, se realizaron cinéticas variando la concentración de sulfato de hierro en combinación con el control de pH, dado que en otros experimentos (no reportados) se encontró que la disminución del pH del medio pudo detener el crecimiento. Los resultados cinéticos se presentan en la Figura 1.5.

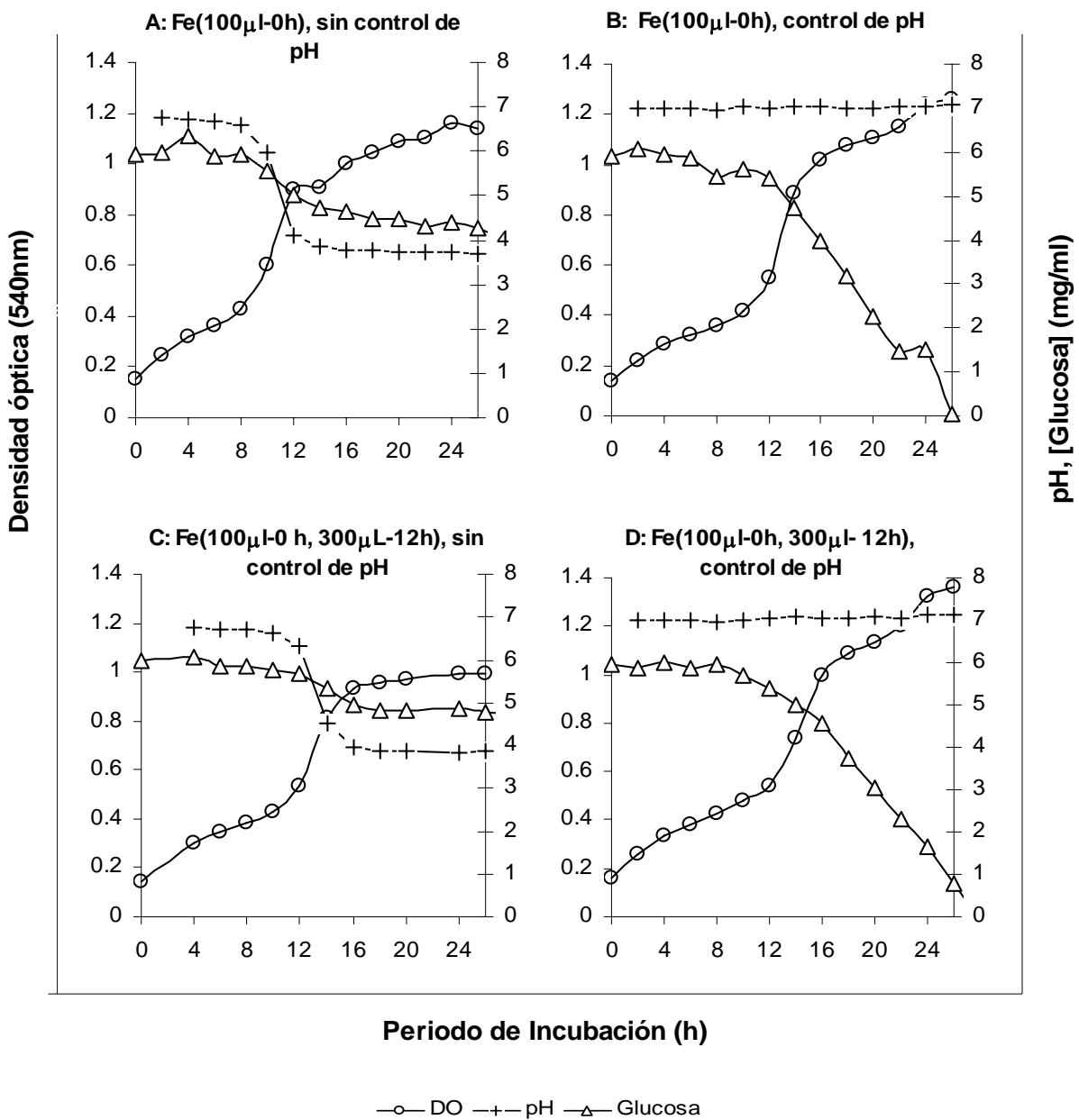


Figura 1.5. Cinéticas de crecimiento con diferentes concentraciones de FeSO_4 y control de pH.

De acuerdo con los resultados de la Figura 1.5, se encontró que la concentración de sulfato de hierro que no promovía la formación de un precipitado visible en medio de fermentación fue aquella en la que se aplica la siguiente estrategia de adición de este mineral (Gráfico D de la Figura 1.5).

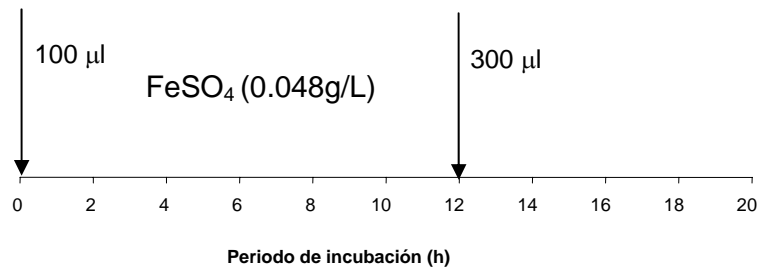


Figura 1.6. Esquema de adición de FeSO₄ a cultivo de *Salmonella typhi* en medio sintético.

Por otro lado en la Figura 1.5, se aprecia el efecto del control de pH igual a 7 sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en medio sintético, donde el mejor resultado se obtuvo controlando el pH en el valor óptimo de crecimiento del microorganismo en medio sintético. Además, en la cinética D (Figura 1.5), el consumo de glucosa ocurre de manera sostenida y se correlaciona adecuadamente con el incremento de la densidad óptica, que es un parámetro de crecimiento celular.

El control de pH (7) y el suministro de FeSO₄ al medio de cultivo sintético permiten afirmar que el incremento en la densidad óptica corresponde al crecimiento celular, y no debido a la formación de un precipitado del ion hierro, (Figura 1.7).

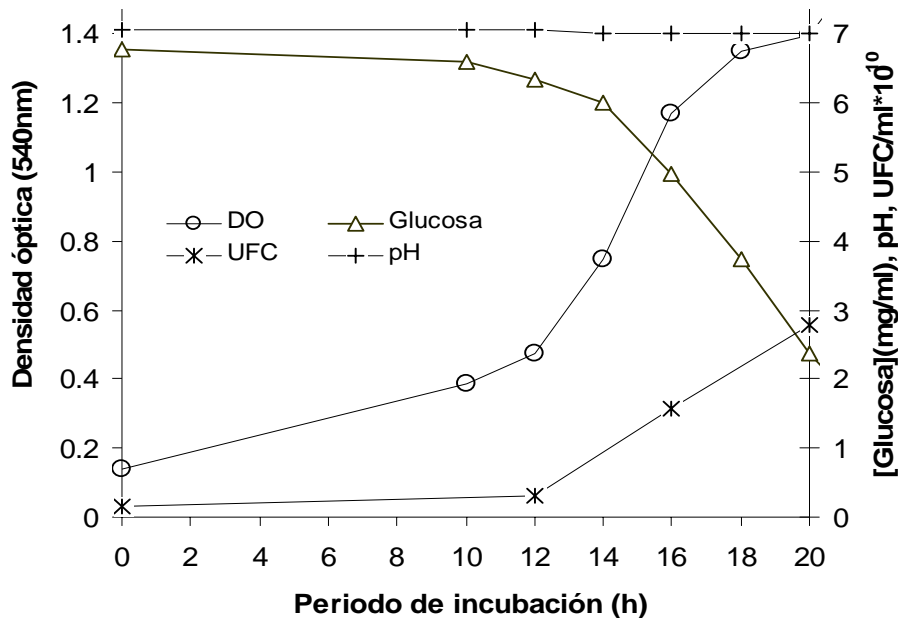


Figura 1.7. Cinética de crecimiento en densidad óptica y viabilidad celular de *Salmonella typhi* en medio sintético.

En la Figura 1.7, se aprecia que el incremento de la densidad óptica corresponde al incremento en la viabilidad celular, y al consumo de glucosa, misma que fue la única fuente de carbono en el medio de cultivo sintético diseñado.

Crecimiento de de *Salmonella typhi* en medio sintético y complejo

Se presentan las cinéticas de crecimiento en los medios complejo y sintético, a manera apreciar los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa en ambos medios.

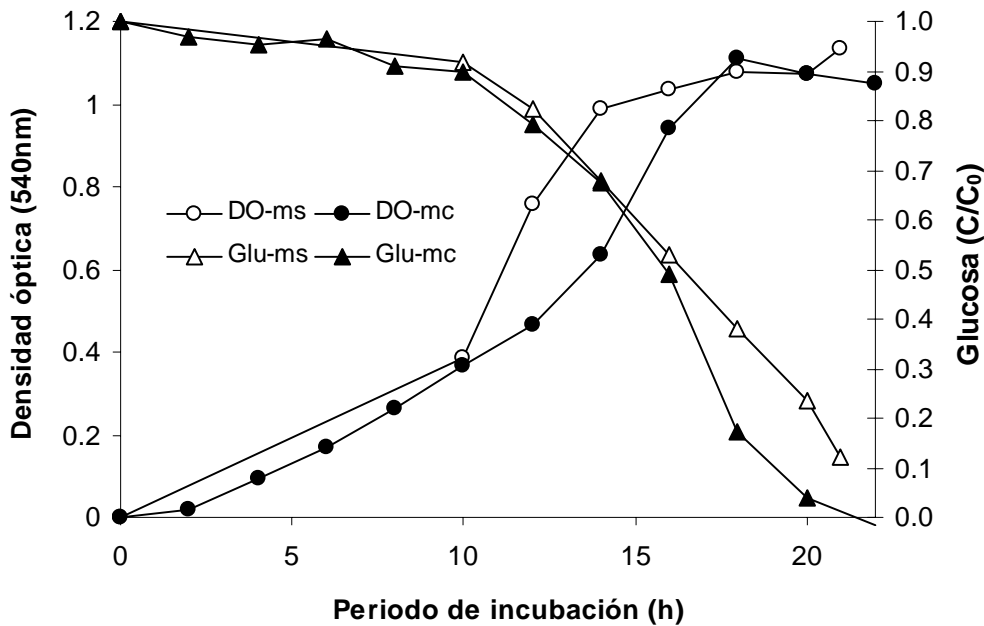


Figura 1.8. Cinéticas de crecimiento de *Salmonella typhi* en diferentes medios.

Es posible destacar en la Figura 1.8, que la densidad óptica alcanzada en el medio sintético es igual a la del medio complejo y el perfil en el consumo de glucosa fue similar en ambos medios.

Fue necesario primero establecer una correlación densidad óptica-peso seco (véase sección de Metodología), y utilizar esta relación para la determinación de parámetros cinéticos como la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) y el rendimiento global $Y_{x/s}$ en ambos medios. A partir de esos datos es posible una comparación cinética y estequiométrica del crecimiento celular en los dos medios, aspecto que se abordará en esta sección.

La velocidad específica de crecimiento se determinó mediante una regresión lineal en la parte exponencial de la curva de crecimiento, de acuerdo con la ecuación de Malthus (Ecuación 1.1).

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \dots\dots\dots (1.1)$$

la pendiente, corresponde a la velocidad específica de crecimiento del microorganismo creciendo en los medios sintético y complejo, Figura 1.9. Los valores obtenidos de la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) para ambos medios se presentan en el Cuadro 1.6.

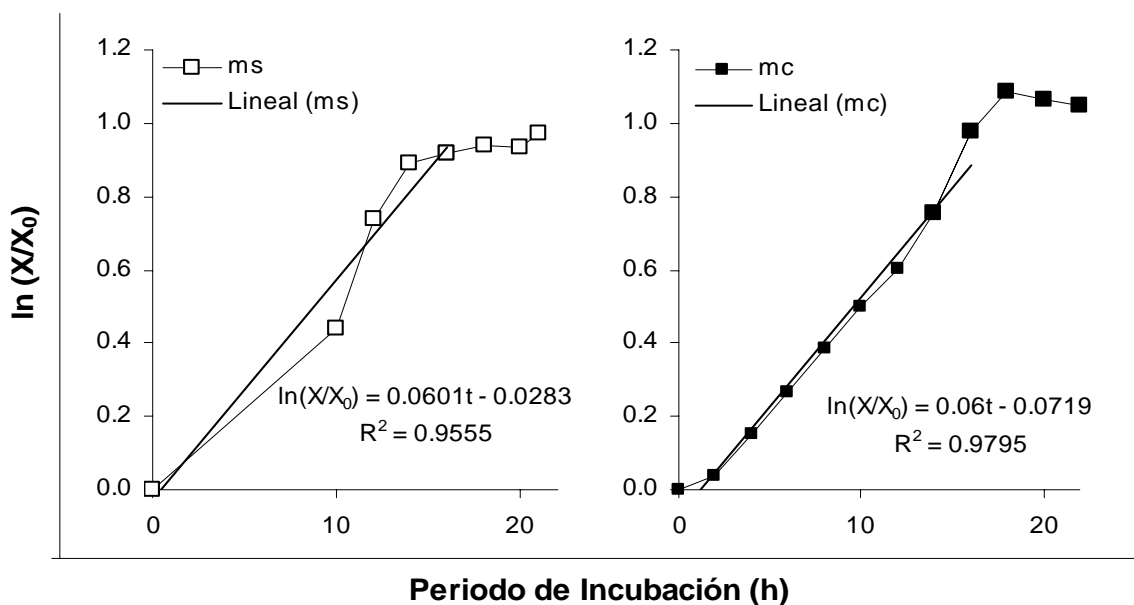


Figura 1.9. Velocidad específica de crecimiento de *Salmonella typhi* en medio sintético (ms) y medio complejo (mc).

Cuadro 1.6. Velocidades específicas de crecimiento de *Salmonella typhi*.

Medio	μ (h^{-1})
Sintético	0.0601 ± 0.007
Complejo	0.0599 ± 0.003

Del Cuadro 1.6, se muestran los valores de μ que indican que el microorganismo crece tanto en medio sintético como complejo, además se puede concluir que los componentes del medio sintético aportan al microorganismo todos los elementos necesarios para su crecimiento también como el medio complejo.

En la Figura 1.10, se observa la velocidad volumétrica instantánea de producción de biomasa (r_x) para el medio sintético (ms) y complejo (mc).

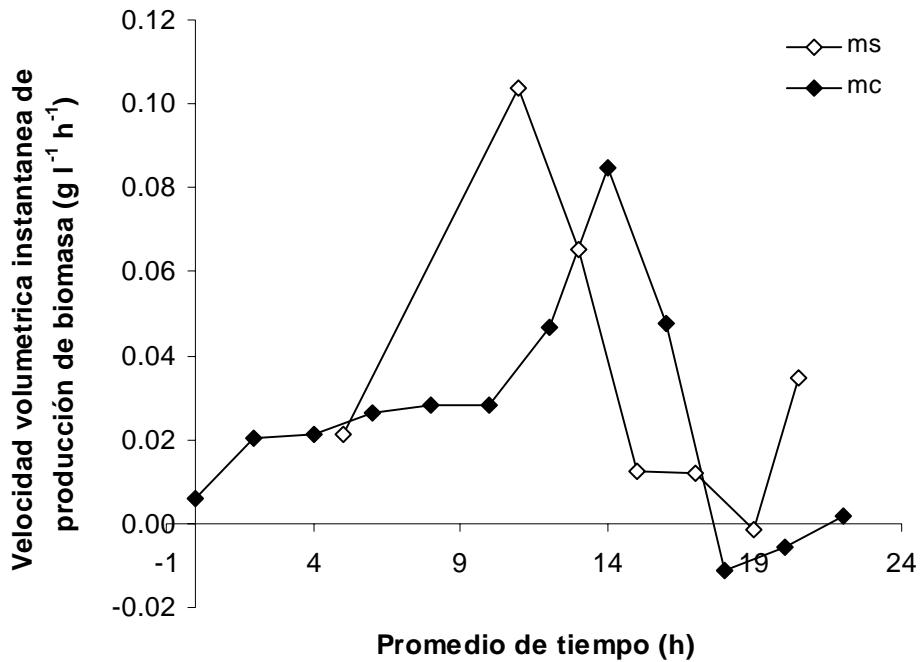


Figura 1.10. Velocidades volumétricas de producción de biomasa para los medios complejo (mc) y sintético (ms).

El valor más alto de r_x se obtiene en el medio sintético y en un promedio de tiempo menor, con respecto a la velocidad que alcanza el microorganismo en medio complejo, reafirmando así las aseveraciones anteriores.

El rendimiento global de producción de biomasa en base al consumo de sustrato (Monod, 1949) se determinó como:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \dots\dots\dots (1.2)$$

Al realizar un gráfico de los valores de la ecuación (1.2), se obtienen dos rendimientos globales; el primero, en la parte exponencial y el segundo en la parte estacionaria del rendimiento como se indica en la Figura 1.11.

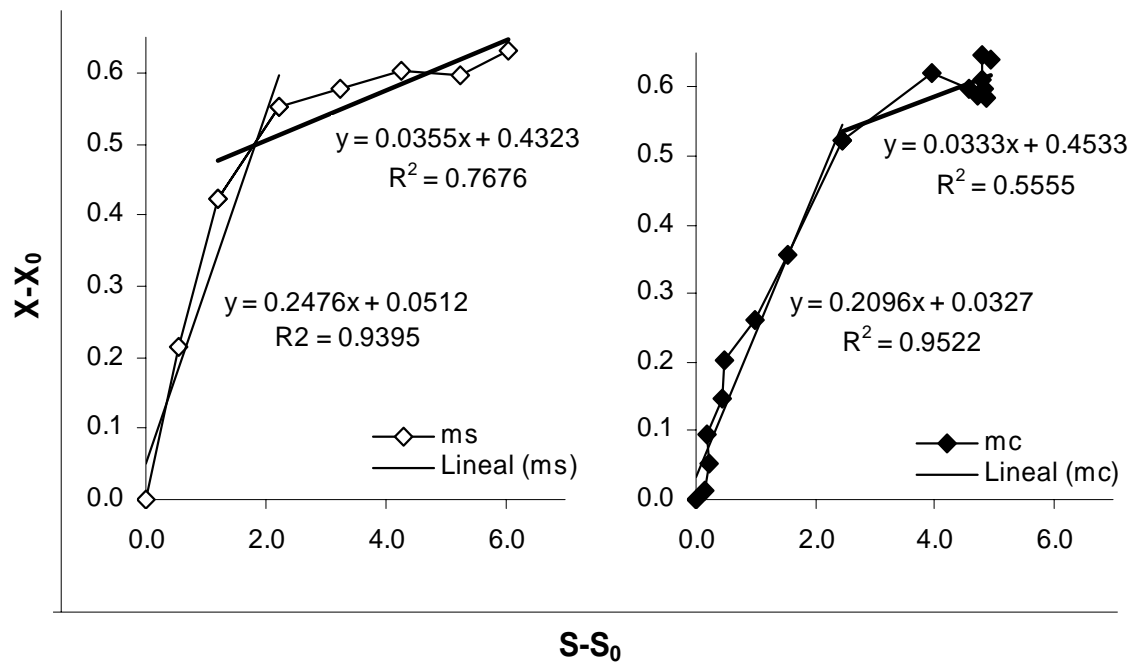


Figura 1.11. Rendimientos globales en diferentes medios.

Finalmente los valores obtenidos del rendimiento global del crecimiento de *Salmonella typhi* creciendo en medios diferentes se encuentran enlistados en el Cuadro 1.7.

Cuadro 1.7. Valores de rendimiento global en medios diferentes de *Salmonella typhi*.

Medio	$Y_{x/s}$ (1)	$Y_{x/s}$ (2)
Sintético	0.2476 ± 0.044	0.0355 ± 0.003
Complejo	0.2095 ± 0.017	0.0333 ± 0.011

CONCLUSIONES

El crecimiento de *Salmonella typhi* en el medio diseñado se logró después de establecer la adecuada concentración de FeSO₄ en un esquema de adiciones a las 0 y 12 h del tiempo de incubación evitando de esta manera la precipitación de elementos del medio de cultivo y así, mantener de manera disponible estos elementos para el microorganismo.

Por otro lado, se identificó que el control de pH en un valor de 7 influye directamente en el crecimiento de *Salmonella typhi* en el medio de cultivo sintético diseñado, por una parte manteniendo a los elementos que constituyen el medio en forma soluble y disponible al microorganismo, y por otra, representa el valor de pH óptimo para el adecuado crecimiento del microorganismo.

Al determinar los parámetros cinéticos (μ y $Y_{x/s}$) para ambos medios, se encontró que los valores son muy cercanos entre sí con una desviación estándar (σ) de 1×10^{-4} y 2×10^{-2} para μ y $Y_{x/s}$ respectivamente, lo que permite afirmar que existe equivalencia cinética del crecimiento microbiano en el medio complejo (con extracto de levadura) y el medio sintético diseñado.

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey, J. E. y Ollis, D. F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2a ed. McGrawHill. New York. 984p.
2. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González C., Moreno, J. y Kumate, J. (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice alter immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. Infection in Immunity. 56 (11), 2953-2959.
3. Kennedy, M. y Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 23 (6), 456-475.
4. Minoru Kenehisa y Susumu Goto. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Research. 28 (1), 27-30.

5. Miller G. L. (1954). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
6. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual. Review of Microbiology*. 3, 371-394
7. Nowruzi, K., Elkamel, A., Sharer, J. M., Cossar, D., Moo-Young, M. (2008). Development of a minimal defined medium for recombinant human interleukin-3 production by *Streptomyces lividans* 66. *Biotechnology and Bioengineering*. 99 (1), 214-222.
8. Ortiz, V., Isibasi, A., García, E. y Kumate, J. (1989). Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrana proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 27 (7), 1640-1645.
9. Parkhill J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., *et al.* (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413 (6858), 848-852.
10. Phan-Thanh, L. y Gormon, T. (1997). A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology*. 35, 91-95.
11. Salazar, G. R. M., Maldonado, B.C., Ramírez, C. N. E., Rios, S. N., Beltrán, N. J., Castañón, G. J., Castillo, T. N., Palma, A. J. A., Carrera, C. M., López, M. C., Isibasi, A. (2004). Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica serovar typhi* bactericide antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology letters*. 93, 115-122.
12. Zhang, J. y Gresham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51, 407-421.

2. PRODUCCIÓN DE *Salmonella typhi* EN BIORREACTOR

INTRODUCCIÓN

En los procesos biotecnológicos se busca la producción de altas concentraciones de biomasa/producto de gran valor agregado entre los que se encuentran: enzimas, antibióticos, proteínas, precursores enzimáticos, vitaminas, etc. El biorreactor es ampliamente usado para llevar a cabo el cultivo del microorganismo que produzca metabolitos de interés. La temperatura, el pH del medio, la agitación y la aireación son algunas de las variables de operación que se pueden controlar en el biorreactor (Shuler y Kargi, 2001). Debido a las características de control que ofrece el sistema, éste es capaz de proporcionar las condiciones ya mencionadas que serán óptimas para el crecimiento del microorganismo productor. En la Figura 2.1, se esquematizan los componentes principales de un biorreactor.

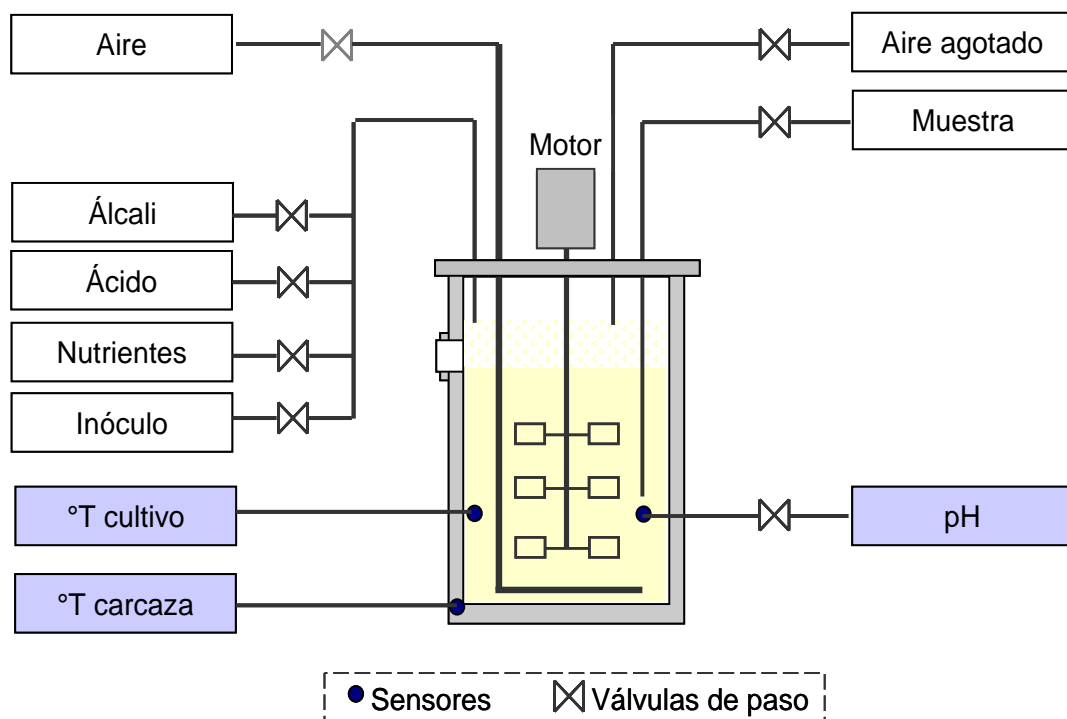


Figura 2.1. Esquema de los componentes del biorreactor.

Como puede observarse el sistema cuenta con puertos de adición de nutrientes, ácido/base, alimentación de y salida de aire agotado, los sistemas de control incluyen: control de pH, velocidad de agitación, temperatura del cultivo, y flujo de aire alimentado.

Las formas comunes de cultivo en biorreactor son: cultivo lote (CL), cultivo continuo (CC) y cultivo en lote alimentado (CLA). En este trabajo se propuso el CL, el cual tiene como característica principal al inicio una sola entrada de nutrientes y una sola salida al final del proceso de fermentación.

En procesos aerobios es necesario suministrar oxígeno de manera continua al medio de cultivo debido a la baja concentración de ese elemento en el agua (0.0084 g l^{-1} , 25°C) (Asenjo y Merchuk, 1994), de forma que el crecimiento del microorganismo no se limite por este nutriente (oxígeno) y por otro lado evitar la posibilidad del cambio en el metabolismo celular, de la producción de biomasa en condiciones aerobias a la síntesis de gases en condiciones anaerobias, condición que podría presentarse en la producción de biomasa dada la naturaleza anaerobia de *Salmonella typhi*, ya que la velocidad y naturaleza de la formación del producto (biomasa, gases, ácidos, etc.) es afectada por la disponibilidad de oxígeno.

La producción de biomasa de *Salmonella typhi* en cultivo lote en biorreactor, con medio sintético con glucosa como la única fuente de carbono y la determinación de la transferencia de oxígeno fueron los propósitos de esta sección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico (k_{La})

El método dinámico fue empleado para la determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico (Cabaret *et al.*, 2008; Fadavi, 2005). Las mediciones se hicieron empleando agua destilada a 37°C a una velocidad de agitación 200 rpm. El oxígeno fue desplazado del fluido mediante burbujeo de nitrógeno hasta alcanzar una concentración menor a 5 %, para después reestablecer el flujo de aire hasta la saturación al 100% a un flujo de alimentación de aire de 0.5 vvm proporcionado por un anillo difusor con cuatro orificios. Para cada ensayo, se usó un electrodo de oxígeno (Mettler-Toledo™), el sistema de agitación está constituido por dos impulsores tipo Rushton de seis paletas cada una ($D_{\text{impulsor}} = 6 \text{ cm}$, $H_{\text{paleta}} = 1.5 \text{ cm}$, ancho de paleta = 1.8 cm, espesor de paleta = 1 mm, distancia entre impulsores 14.4 cm).

Cultivo de *Salmonella typhi* en biorreactor en diferentes medios

Se utilizó la cepa *Salmonella typhi* STY302, la cual se hizo crecer en biorreactor (Bioflo Ilc. New Brunswick Scientific Co™, 4.4 l, 200 rpm, 0.5 vvm, 37°C, 6 h, control de pH=7 con NaOH 0.5 N) con 4 l de medio de cultivo sintético: 0.41 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.32 g l⁻¹ KH₂PO₄, 3.22 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.12 g l⁻¹ MgSO₄, 6.09 g l⁻¹ Dextrosa, 0.6 mM Pantotenato de calcio, 0.048 g l⁻¹ FeSO₄, 0.123 g l⁻¹ NaCl y en medio complejo: 0.5 g l⁻¹ Citrato de sodio, 7 g l⁻¹ K₂HPO₄, 3.1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 g l⁻¹ Extracto de levadura, 1 g l⁻¹ MgSO₄ y 5 g l⁻¹ Dextrosa, el cual se esterilizó (121°C, 20 min). El seguimiento del crecimiento se hizo por densitometría a 540 nm (Auto UV-Vis, LaboMed™) y como blanco se usó el medio correspondiente sin inocular. El inóculo se cultivó en matraz (1000 ml) con un volumen de 400 ml del medio correspondiente, y se incubó en agitador mecánico (4300-INNOVA™, 6 h, 37°C, 250 rpm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno es uno de los parámetros más importantes en los procesos fermentativos aerobios, este coeficiente depende de la velocidad de agitación, el flujo de aire inyectado, las propiedades reológicas del medio de cultivo, la temperatura, la presión, la geometría del biorreactor y el modo de cultivo (Galaction *et al.*, 2004; Puthli *et al.*, 2005). Y debido a que la transferencia de oxígeno en el biorreactor es frecuentemente un factor limitante del crecimiento dada la baja solubilidad de oxígeno en el medio, la correcta determinación del $k_L a$ es un paso crucial para prevenir posibles problemas de limitación del crecimiento.

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en el medio esta determinado por la ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) = VTO \dots\dots\dots (2.1)$$

al integrar la ecuación 2.1:

$$\ln(C_{O_2}^* - C_{O_2}) = -K_L a * t \dots\dots\dots (2.2)$$

Así, k_1a puede ser obtenido de la pendiente del $\ln(C_{O_2}^* - C_{O_2})$ vs tiempo. En la Figura 2.2 se presenta la estimación del k_1a (seg^{-1}) para 0.5 vvm y 200 rpm.

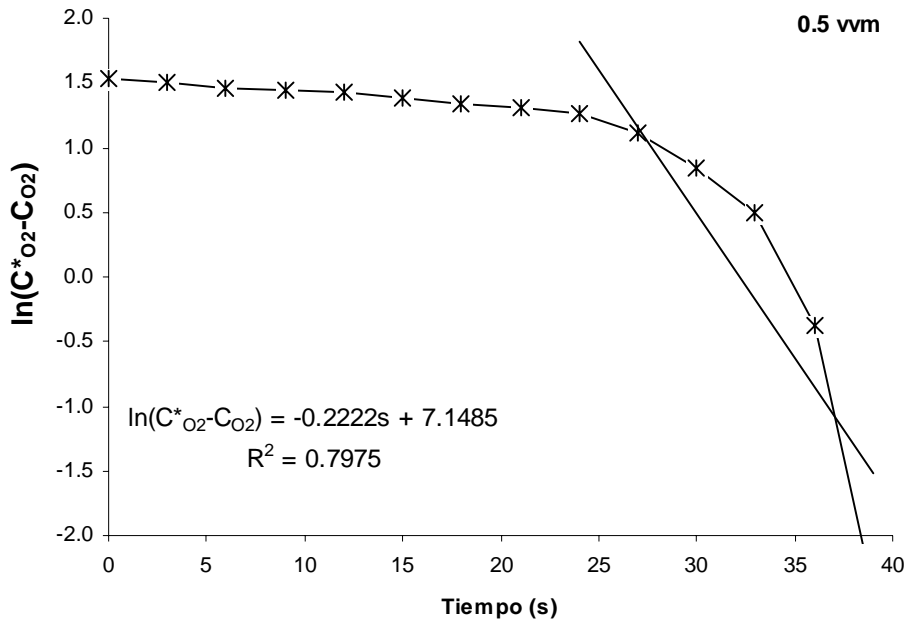


Figura 2.2. Determinación de del coeficiente de transferencia de oxígeno en función del tiempo.

El valor obtenido fue $k_1a = 799 \text{ h}^{-1}$, para 0.5vvm y 200 rpm con este valor y la Ecuación 2.3 se calcula la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{max}) que ofrece el sistema:

$$VTO_{max} = k_1a(C_{O_2}^*) \dots\dots\dots (2.3)$$

Donde: $C_{O_2}^* = 0.1703 \text{ mmolO}_2$ es la concentración de saturación de oxígeno disuelto en el medio, así la $VTO_{max} = 136.07 \text{ mmolO}_2 / \text{lh}$ y la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), Ecuación 2.4:

$$VCO = q_{O_2} X \dots\dots\dots (2.4)$$

$q_{O_2} = 11 \text{ mmolO}_2 / \text{g}_{X_{\text{seca}}} \text{h}$ es la velocidad específica de consumo de oxígeno de *E. coli* (Shuler y Kargi, 2001), por cada gramo de biomasa seca producida. X es la cantidad de biomasa seca que se desea producir ($19.5 \text{ g}_{X_{\text{seca}}}$ en 4 l), obteniéndose $VCO = 53.625 \text{ mmolO}_2 / \text{lh}$.

Al comparar la velocidad de transferencia oxígeno (VTO) se aprecia que es superior a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), asegurando que el oxígeno no es factor limitante del crecimiento.

Cultivo de *Salmonella typhi* en biorreactor en diferentes medios

El cultivo de *Salmonella typhi* en biorreactor se llevó a cabo en el medio sintético diseñado y, en el medio complejo. En la Figura 2.3, se exponen las cinéticas de crecimiento correspondientes.

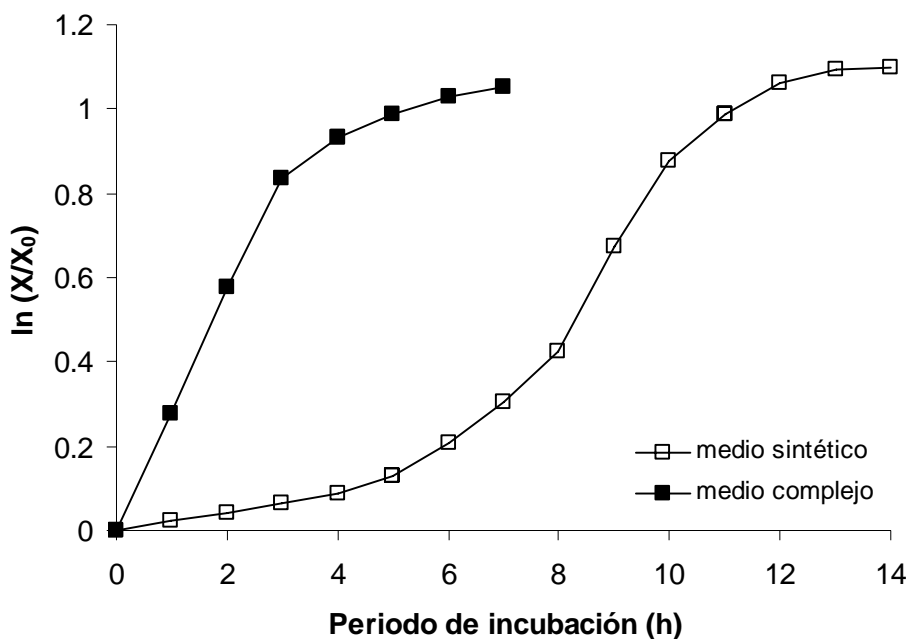


Figura 2.3. Cinéticas de crecimiento de *Salmonella typhi* en diferentes medios.

En la Figura 2.3 se puede observar los dos perfiles de crecimiento, aunque existe fase de adaptación (fase lag) en medio sintético (5 h), la concentración celular que alcanza el microorganismo (1.28 g l^{-1}) es ligeramente superior con respecto a la alcanzada en medio complejo (1.15 g l^{-1}). Se puede afirmar que el medio diseñado está constituido con los elementos y concentraciones adecuadas para el crecimiento de *Salmonella typhi*.

Por otra parte en la Figura 2.4, se encuentran las cinéticas de crecimiento con la densidad óptica alcanzada y su perfil correspondiente de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo.

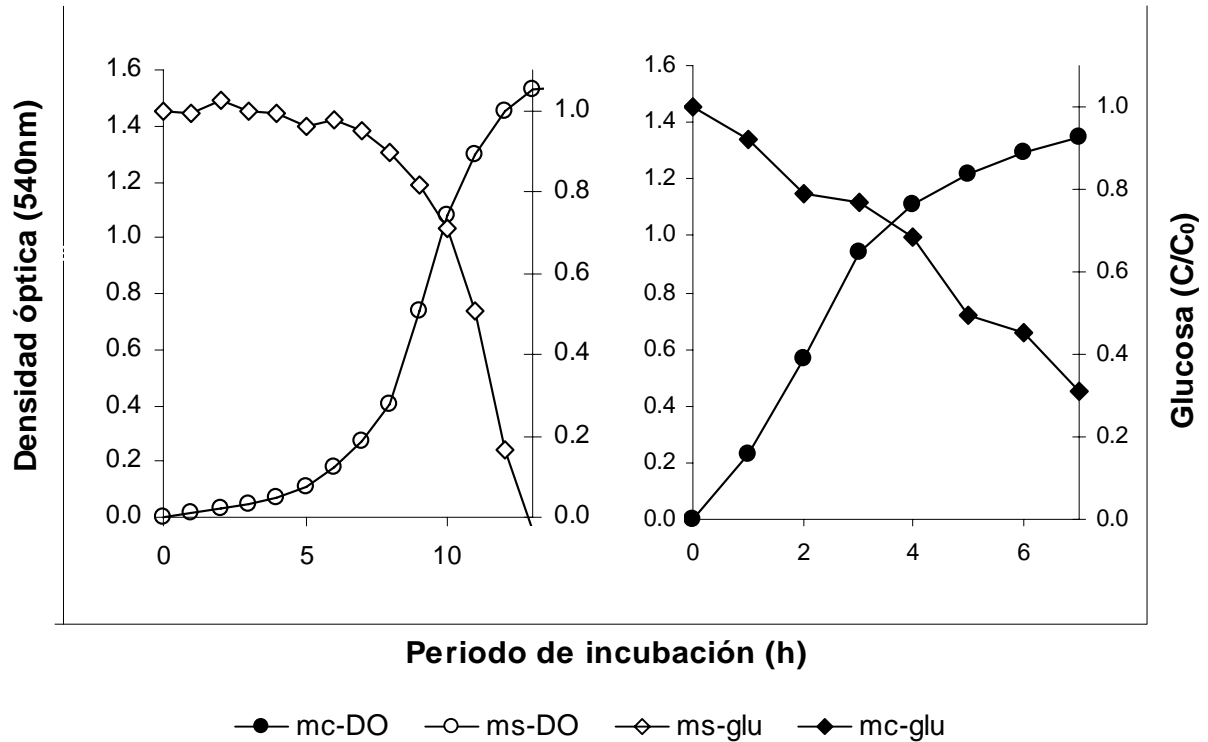


Figura 2.4. Crecimiento y consumo de sustrato de *Salmonella typhi* en diferentes medios.

En la Figura 2.4 se observa, la densidad óptica (DO) alcanzada del cultivo en biorreactor en medio complejo (mc, 1.34) es inferior a la alcanzada en el medio sintético (ms, 1.53), y por otro lado la glucosa (C/C_0) en el medio complejo disminuye de 1 a 0.31, y en medio sintético de 1 a 0.03. Se puede aseverar que el microorganismo es capaz de crecer en medio sintético con glucosa como única fuente de carbono, alcanzando una densidad óptica mayor a la lograda en el medio complejo, en cultivo lote en biorreactor.

Se obtuvieron las variables cinética del crecimiento de *Salmonella typhi* en biorreactor en un análisis similar al que se hizo en el Capítulo 1, los valores obtenidos de la velocidad específica de crecimiento (μ) y el rendimiento global ($Y_{X/S}$) de ambos medios se presentan en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Parámetros cinéticos de *Salmonella typhi* en cultivo en biorreactor

Medio	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (1)	$Y_{x/s}$ (2)
Sintético	0.1532 ± 0.012	0.3357 ± 0.016	0.0530 ± 0.006
Complejo	0.2424 ± 0.022	0.4147 ± 0.059	0.0751 ± 0.011

Del Cuadro 2.1, existe una diferencia en la velocidad específica de crecimiento de *Salmonella typhi* entre los medios sintético y complejo, de manera similar ocurre entre los valores del rendimiento global del crecimiento.

CONCLUSIONES

El valor determinado de la velocidad de transferencia de oxígeno dada por el coeficiente de transferencia, quedo establecido que la combinación de la velocidad de agitación y aireación genera un valor de transferencia de oxígeno fue superior a la velocidad de consumo de oxígeno estimada, de esta manera el oxígeno no es una variable limitante del crecimiento en lote en biorreactor de *Salmonella typhi*.

En el cultivo en biorreactor, se proporcionaron las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo: 37°C, pH = 7, velocidad de agitación 200 rpm y 0.5 vvm, al observarse perfiles de crecimiento con las fases lag, log y estacionaria bien definidas sin algún cambio drástico en el perfil que pudiera sugerir algún tipo de inhibición.

El crecimiento en medio sintético alcanzó mayor densidad óptica comparada con la que se alcanzó en medio complejo, demostrándose por una parte que la formulación del medio diseñado proporcionó los elementos necesarios para el crecimiento del microorganismo de manera equivalente a lo que sucede en el medio complejo.

Los parámetros cinéticos (μ y $Y_{x/s}$) del cultivo en biorreactor en medio complejo y sintético, presentaron una diferencia con una desviación estándar (σ) de 6×10^{-2} y 5×10^{-2} para μ y $Y_{x/s}$ respectivamente, lo que permite confirmar la equivalencia cinética en el biorreactor entre crecimiento en el medio complejo (con extracto de levadura) y el medio sintético diseñado.

BIBLIOGRAFIA

1. Asenjo, J. A. y Merchuk J. C. (1994). Bioreactor system design. Marcel Dekker, New York, 648 pp.
2. Cabaret, F., Fradette, L. y Tanguy, P.A. (2008). Gas-liquid mass transfer in unbaffled dual-impeller mixers. *Chemical Engineering Science*. 63, 1636-1647.
3. Fadavi, A. y Chisti, Y. (2005). Gas-liquid mass transfer in a novel forced circulation loop reactor. *Chemical Engineering Journal*. 112, 73-80.
4. Galaction, A. I., Cascaval, D., Oniscu, C. y Turnea, M. (2004). Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*. 20, 85-94.
5. Puthli, M. S., Rathod, V. K. y Pandit, A. B. (2005). Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 23, 25-30.
6. Shuler, M. L. y Kargi, F. (2001). *Bioprocess Engineering: Basic concepts*. 2° ed. Prentice Hall. New Jersey, 576 pp.

3. RUPTURA CELULAR DE *Salmonella typhi* PARA LA RECUPERACIÓN DE PORINAS

INTRODUCCIÓN

Diversos productos de origen bacteriano tienen importancia económica, por ejemplo: antibióticos y sus derivados, proteínas, nucleótidos y enzimas, entre otros. Algunos de ellos se encuentran dentro de la célula o embebidos en otros organelos, por lo que la ruptura celular es necesaria para llevar a cabo la liberación de estos productos (Balasundaram y Harison, 2005). Así, la ruptura celular se convierte en el primer paso del proceso de recuperación de productos intracelulares (Harrison, 1991).

El proceso de ruptura está relacionado al tipo de estructura celular, particularmente en bacterias Gram (+) y Gram (-) debido a que se ha demostrado que la estructura mecánica de la pared celular es uno de los principales factores que influyen para lograr la ruptura (Harrison *et al.*, 1991). A este respecto, algunas mediciones indican que la fuerza media compresiva necesaria para romper la pared celular de *S. epidermis* (Gram-positiva) está en el orden de 13.8 μN , mientras que para *E. coli* (Gram-negativa) es de 3.8 μN (Shiu *et al.*, 2002) y para levaduras se encuentra entre 40 μN para células en crecimiento exponencial y 90 μN para células en fase estacionaria del crecimiento (Roberts *et al.*, 1994). En la Figura 3.1 se esquematiza la diferencia entre las estructuras Gram (+) y Gram (-), y la presencia de la membrana externa.

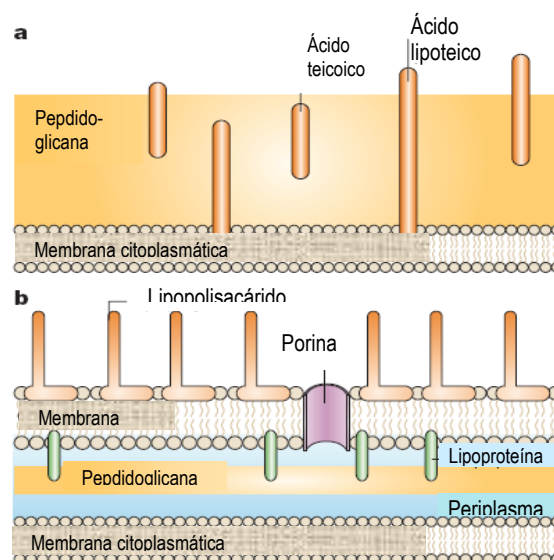


Figura 3.1. Pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Cabeen y Jacobs-Warner, 2005).

La pared celular de las bacterias Gram (+) está compuesta de una multicapa de peptidoglicana (20-80 nm de espesor) colocada por fuera de la membrana citoplasmática, ambas estructuras tienen embebidos polisacáridos aniónicos los cuales son esenciales para viabilidad y contribuyen a estabilizar la morfología celular. Por otro lado, la pared de las bacterias Gram (-) incluye una membrana externa que rodea una delgada capa de peptidoglicano con un espacio periplásmico entre las membranas externa e interna.

La membrana externa es una bicapa (lipidos-proteínas). Posee proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y separa el ambiente externo del periplasma. Debido a que las bacterias dependen de la difusión para su nutrición y para excretar metabolitos, la membrana externa debe ser permeable a ciertas sustancias y ser capaz de transportar otras (Beveridge, 1999). Un importante grupo de proteínas de membrana externa son las porinas, las cuales median de manera no específica la difusión de moléculas polares pequeñas, menores a 600 Da, (Gowtham y van den Berg, 2006).

Los métodos usados para llevar a cabo la ruptura celular se esquematizan de la siguiente manera:

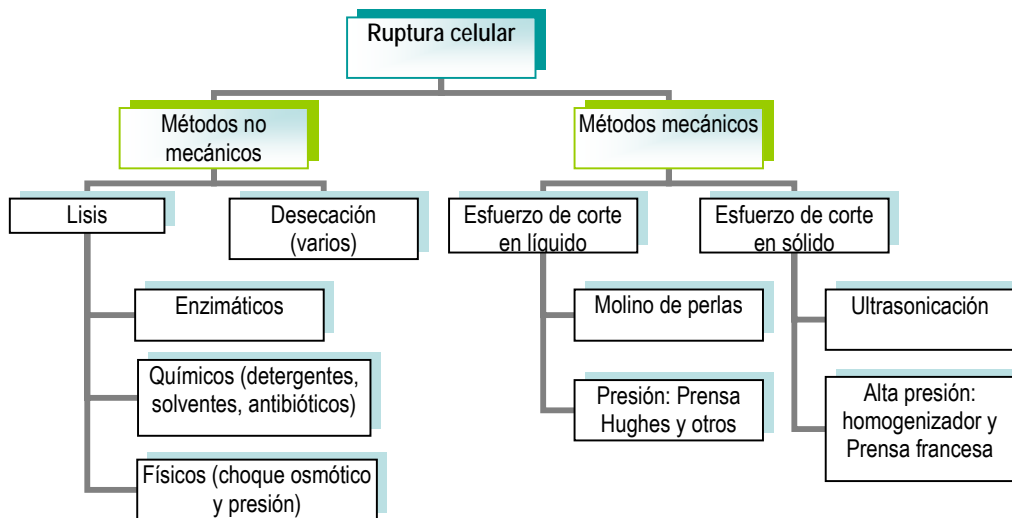


Figura 3.2. Métodos de ruptura celular (Chisti y Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995).

En la industria de alimentos, farmacéutica, química y cosmética el uso del homogenizador es muy amplio, otra bien conocida aplicación es la ruptura celular de levaduras y bacterias para liberar productos intracelulares (Diels y Michiels, 2006). A nivel laboratorio el sonicador y el molino de perlas son ampliamente utilizados para lograr la ruptura celular (Bury *et al.*, 2000; Fonseca y Cabral, 2002); aunque éstos presentan algunas desventajas, entre las que destacan: la necesidad de un enfriamiento eficiente

para prevenir el excesivo calentamiento del producto, el tiempo de proceso, el volumen de muestra y el daño que estos factores puede ocasionar a la molécula de interés. La implementación del homogenizador en la etapa de ruptura de *Salmonella typhi* como parte del proceso para la recuperación de las porinas representa ventajas, debido a que el incremento de la temperatura en la muestra es menos importante y el proceso de recuperación es mucho más rápido y a mayor volumen con respecto al uso del sonicador.

El homogenizador consiste de un pistón de desplazamiento positivo con dos válvulas (Figura 3.3), la muestra entra por la válvula de asiento (B) a alta presión y baja velocidad. Debido a que el producto fluye a través del espacio generado entre la válvula principal (A) y la válvula de asiento (B), hay un rápido incremento en la velocidad con un correspondiente decremento en la presión. Este intenso cambio de energía ocurre en microsegundos, produciendo capas turbulentas tridimensionales que rompen las partículas (células) a la salida del espacio (D). La muestra procesada (F), incide en el anillo de impacto (C) y existe la presión suficiente para su desplazamiento hacia la siguiente etapa del proceso (Ayazi *et al.*, 1995).

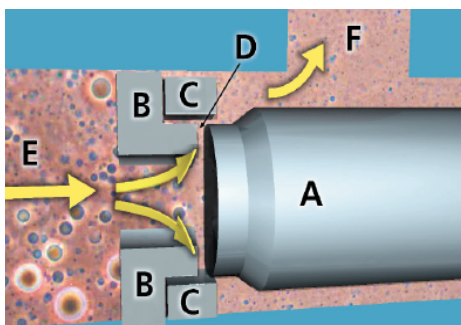


Figura 3.3. (A) Válvula de homogenización, (B) Válvula de asiento, (C) Anillo de impacto, (D) Espacio de ruptura, (F) Muestra procesada y (E) Muestra sin procesar.

Las características tales como presión o número de pases varían de acuerdo a la resistencia de la cepa microbiana, la edad y la temperatura del cultivo celular (Geciova *et al.*, 2001; Barnadas y Sabés, 2001). Determinar las condiciones de ruptura de *Salmonella typhi* en el homogenizador APV-2000 para la recuperación subsiguiente de las porinas fue el propósito central de esta sección del trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proceso experimental general

Las etapas que constituyen el proceso de ruptura celular son: 1) Desarrollo de inóculo en matraz (4300-INNOVA™, 0.4 l, 7 h, 200 rpm, 37°C), 2) Producción de biomasa en lote en fermentador (Bioflo Ilc. New Brunswick Scientific Co™, 4.4 l, 200 rpm, 37°C, 6 h, control de pH=7 con NaOH 0.5 N), 3) Recuperación de la biomasa por centrifugación del volumen total de cultivo (R6C, Sorvall™, 7000 rpm, 4°C, 15 min.), 4) Lavado del paquete celular (resuspensión del botón con 0.15 l de Tris-HCl: 50 mM, pH 7.7), 5) Centrifugación (R6C, Sorvall™, 7000 rpm, 4°C, 15 min.), 6) Conservación de la biomasa (12 h, -70°C), 7) Resuspensión del paquete celular (0.15 l de Tris-HCl) y 8) Ruptura celular de la suspensión en homogenizador (APV 2000, Invensys™) con la respectiva evaluación del proceso de ruptura. Algunas de las etapas más importantes del proceso se explican con mayor detalle en esta sección.

Producción de biomasa

Se usó la cepa *Salmonella typhi* STYF302 (Δ OmpF, Kan^R) (Dr. Edmundo Calva, IBT-UNAM). Se cultivó en biorreactor (Bioflo Ilc. New Brunswick Scientific Co™) con un volumen de operación de 4.5 l (6 h, 37°C, 250 rpm y 0.5 vvm), en medio de cultivo complejo. El medio tuvo la siguiente composición: 0.5 g l⁻¹ Na-Citrato, 7.0 g l⁻¹ K₂HPO₄, 3.1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1.0 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1.0 g l⁻¹ Extracto de levadura, 1.0 g l⁻¹ MgSO₄ y 5.0 g l⁻¹ Dextrosa. El seguimiento del crecimiento celular se hizo por densitometría a 540 nm (Auto UV-Vis, LabMed™).

Ruptura celular en homogenizador

La biomasa congelada fue resuspendida con 0.15 L de Tris-HCl (50mM, pH 7.7). El homogenizador (APV 2000, Invensys™) se calibró con 0.15 l de Tris-HCl a 1300 bar. La suspensión celular se pasó a través del homogenizador a 1300-1340 bar, 5 veces. Entre cada pase, el homogenizador se lavó por triplicado con una solución de etanol-agua al 5 % y agua destilada estéril y se calibró a la presión de trabajo. La muestra procesada se retuvo en baño de hielo para contrarrestar el incremento de temperatura de la muestra.

Viabilidad y complejidad celulares

La viabilidad se evaluó después de cada pase de la muestra por el homogenizador, se usó el método de vaciado en placa, en medio TSA (BD Bioxon®), las muestras se trataron por triplicado y se consideraron aquellas placas de entre 30 y 300 UFC para hacer los cálculos correspondientes.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multi-paramétrico capaz de identificar una célula por medio de sus características antigénicas o por sus características morfológicas de tamaño y complejidad. Esta última capacidad se usó para determinar el grado de ruptura celular: un incremento de partículas en la población significaría una mayor ruptura celular, al tiempo que también aumentaría la complejidad de la misma muestra. Para asegurar que se pudieran procesar al menos 10,000 eventos por cada muestra, después de evaluar la viabilidad celular se prepararon soluciones de 2×10^5 y 2×10^6 UFC, siendo la dilución 2×10^5 UFC la que mejores resultados presentó para el análisis de complejidad y tamaño de la muestra en el citómetro (FACS-Aria™).

Cuantificación de proteínas liberadas al medio

La cuantificación de proteínas liberadas y de membrana (mg ml^{-1}) se hizo por el método de Lowry, (Lowry *et al.*, 1951). Se usó una curva tipo de 0.0 - 0.7 mg ml^{-1} de BSA (A-7906, Sigma™). Se tomaron 10 y 15 μl de cada muestra, a los cuales se adicionó 20 μl de TCA 72 % y se centrifugaron (EBA 12R, Hettich™), (2000 rpm, 4°C, 30 min). Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 μl NaOH 0.5 N, los cuales se incubaron a ebullición durante 10 min. Luego se adicionó 1 ml de mezcla de reacción (Na_2CO_3 2 %, CuSO_4 1 %, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ 2 %) y 100 μl del reactivo Follin-Ciocalteau 1 N. Se agitó e incubó (45 min, °T amb, en oscuridad). Las muestras se leyeron a 750 nm usando NaOH como blanco. Para el caso de las proteínas liberadas, se tomó una muestra de la suspensión celular y se centrifugó para eliminar las células intactas (MIKRO 22R, Hettich™), (1000 rpm, 4°C, 15 min).

Extracción de proteínas de membrana externa

Después de que la suspensión celular fue procesada en el homogenizador, se centrifugó (R6C, Sorvall™), (7000 rpm, 4°C, 15 min) para remover las células intactas. El sobrenadante se ultra-centrifugó (ULTRA-Pro80, Sorvall™), (45 000 rpm, 4°C, 45 min), el paquete celular obtenido se resuspendió (Homogenizador vidrio-vidrio PYREX®, 40 ml) con solución amortiguadora (TRIS 50 mM, SDS 2%, pH 7.7) y se incubó en agitador mecánico (4300-INNOVA™, 120 rpm, 32°C, 30 min). La suspensión se centrifugó (40 000 rpm, 20°C, 30 min), el paquete celular obtenido fue resuspendido, incubado y centrifugado nuevamente como se mencionó antes. El paquete celular recuperado después de la segunda centrifugación se resuspendió con solución amortiguadora de Nikaido (TRIS 50 mM, SDS 1 %, NaCl 23.4 g L⁻¹, EDTA g L⁻¹, β -mercaptoetanol 0.05 %, pH 7.7) y se incubó en agitador mecánico (4300-INNOVA™), (120 rpm, 37°C, 120 min) para

después ser centrifugada (40 000 rpm, 20°C, 45 min). El sobrenadante que contiene las proteínas de membrana externa se almacenó en tubos Falcon® de 50 ml a temperatura ambiente.

Cuantificación e identificación de proteínas de membrana

Las proteínas se identificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Se usó una unidad electroforética para geles verticales en placa (BIO-RAD™), a través de un gel de separación (acrilamida 11.2 %, bis-acrilamida 2.5 %, SDS 0.19 %, Tris-HCl 0.35 M, pH 8.8), un gel introductor (acrilamida 0.5 %, bis-acrilamida 0.13 %, SDS 0.1 %, Tris-HCl 0.2 M, pH 6.8) y solución reguladora de corrimiento (Tris-HCl 0.025 M, 0.192 glicina pH 8.3 y SDS 0.1 %). El corrimiento (30 mA, 120 min) se realizó tanto en condiciones no desnaturizantes como desnaturizantes (5 min a ebullición) y se detectó la presencia de proteínas por tinción de Coomassie. Se usó un marcador de pesos moleculares con un intervalo de 10 a 225 kDa (V849A, Promega™).

En el análisis de inmunoabsorción, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, siglas en inglés) el antígeno (porinas de *Salmonella typhi*) se fijó a la placa 10 µg ml⁻¹ y las muestras de 10, 5 y 2.5 µg ml⁻¹, 1 h, 37°C, en buffer de carbonatos (NaHCO₃ 7g l⁻¹, NaCO₃ 2.8 g l⁻¹, pH 9.5) y se incubó (12 h, 4°C), se eliminó el exceso de antígeno lavando la misma con PBS-Tween 20 (NaCl 8 g l⁻¹, Na₂HPO₄.H₂O 1.16 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0.2 g l⁻¹, KCl 0.8 g l⁻¹, Tween 20 0.1%, 6 veces) y se incubó en solución de bloqueo (PBS-leche; NaCl 8 g l⁻¹, Na₂HPO₄.H₂O 1.16 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0.2 g l⁻¹, KCl 0.8 g l⁻¹, leche descremada 5%, 1 h, 37°C). Se lavó (6 veces) y se adicionó el primer anticuerpo específico a una dilución 1:100 para todas las muestras (anti-porinas, 100 µl, 1 h, 37°C), lavando la placa (6 veces). El segundo anticuerpo (anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa, dil. 1:2000) en una dilución en solución de bloqueo, (100 µl, 1.5 hr, 37°C), seguido de lavado (8 veces), para adicionar el sustrato (6 µg de O-fenilendiamina + 10 µl de H₂O₂ al 30 % en buffer de citratos pH 5.6), se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min, se detuvo la reacción (10 µl de H₂SO₄, 2.5 N) y se leyó a una longitud de onda de 490 nm en el lector de ELISA (6200, Napco™). Tanto las muestras como los controles se trataron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa

Las cinéticas de crecimiento de *Salmonella typhi* tanto del inóculo (5 h, $DO_{540nm}=1.093$), como del crecimiento en biorreactor (6 h, $DO_{540nm}=1.642$) se presentan en la Figura 3.4. Después de la recuperación de la biomasa se obtuvo 24 g de biomasa húmeda.

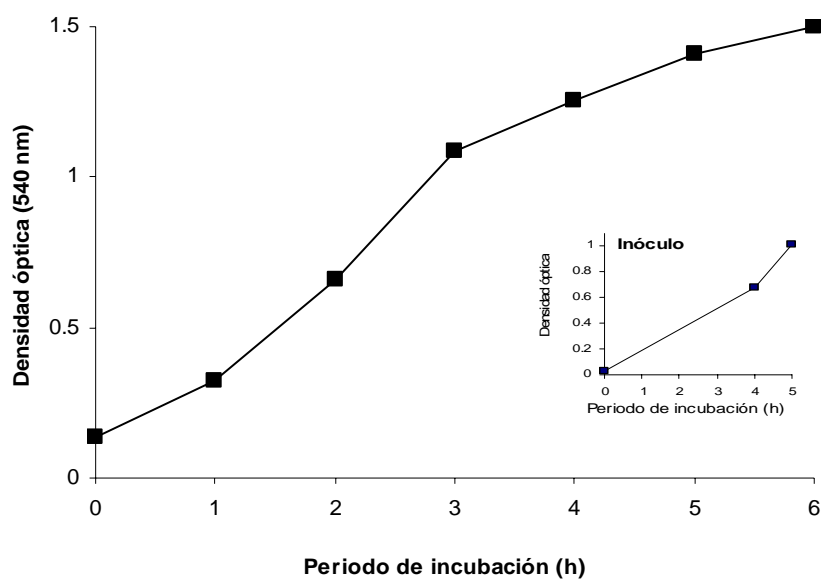


Figura 3.4. Cinética de crecimiento de *Salmonella typhi* en biorreactor.

Se aprecia una cinética de crecimiento típica de un microorganismo que no presentó limitación del crecimiento por ningún factor (oxígeno disuelto, pH, temperatura o nutrientes), durante el periodo de incubación. La anterior permite afirmar que el control de las variables de operación antes mencionadas se lleva a cabo adecuadamente en el biorreactor y que las condiciones de aireación (0.5 vvm), temperatura (37°C), agitación (250 rpm), y control de pH (7.0) son las mejores condiciones para el crecimiento de *Salmonella typhi* en biorreactor.

Ruptura celular en homogenizador

Viabilidad celular

Al evaluar la viabilidad celular, se obtuvieron los datos presentados en el Cuadro 3.1, en el cual se encuentra el resultado para: el cultivo celular en biorreactor, la suspensión bacteriana después de la recuperación de la biomasa por centrifugación, la suspensión celular después de congelar (-70°C, 12 h, misma que se usó como referencia del 100 % de la viabilidad celular) y finalmente la suspensión después de cada uno de los pases (1-5) por el homogenizador a 1300 bar.

Cuadro 3.1. Porcentaje de la viabilidad celular de cada muestra.

Resumen		UFC (N)	ln(N ₀ /N)
Cultivo celular en biorreactor		2.18 x10 ¹³	
Suspensión celular antes de congelar		2.54 x10 ¹³	
Suspensión celular después de congelar	0	3.19 x10 ¹³	0.000
	1	3.1 x10 ¹²	2.316
	2	4.72 x10 ¹¹	4.214
	3	3.22 x10 ¹¹	4.595
	4	3.16 x10 ¹⁰	6.918
Número de pases	5	5.10 x10 ⁹	8.743

Al trazar un gráfico de la pérdida de la viabilidad en función del número de pases se aprecia la caída de la viabilidad con cada uno de los pases, esta caída se presenta en mayor magnitud en el primer pase, lo cual se observa en la Figura 3.5.

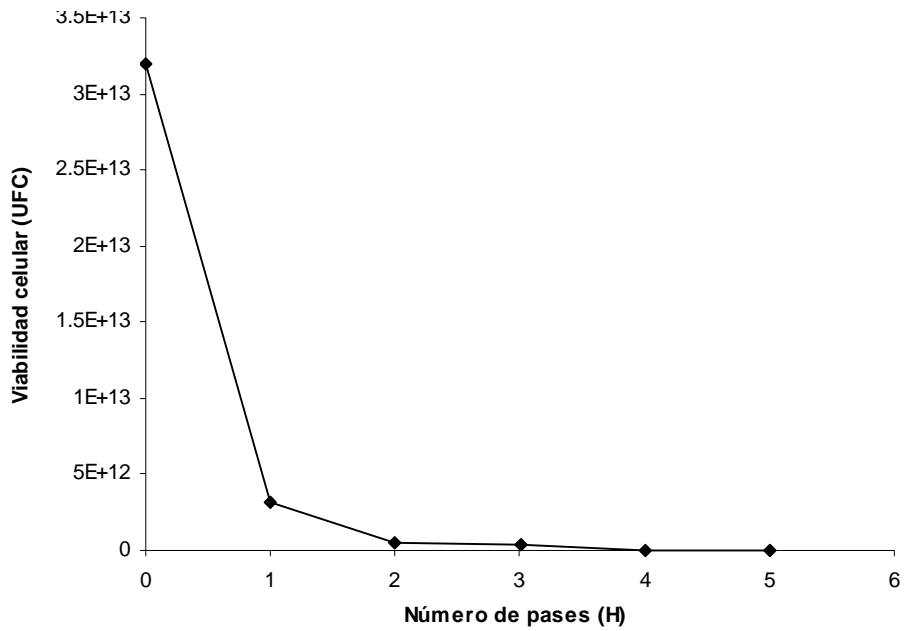


Figura 3.5. Pérdida de la viabilidad celular en función del número de pases.

Al usar el término de sobrevivencia celular $\ln(N_0 / N) = \nabla$, donde N son los organismos presentes (UFC) presentes al pase H y N_0 son los organismos presentes en la suspensión celular después de congelar (antes de ser procesada en el homogenizador). En un gráfico de sobrevivencia celular en función del número de pases (H) (Figura 3.6), se basa un modelo empírico parametrizado en la presión de trabajo. Esta ecuación es:

$$\frac{N_0}{N} = re^{-kH} \dots\dots\dots (3.1)$$

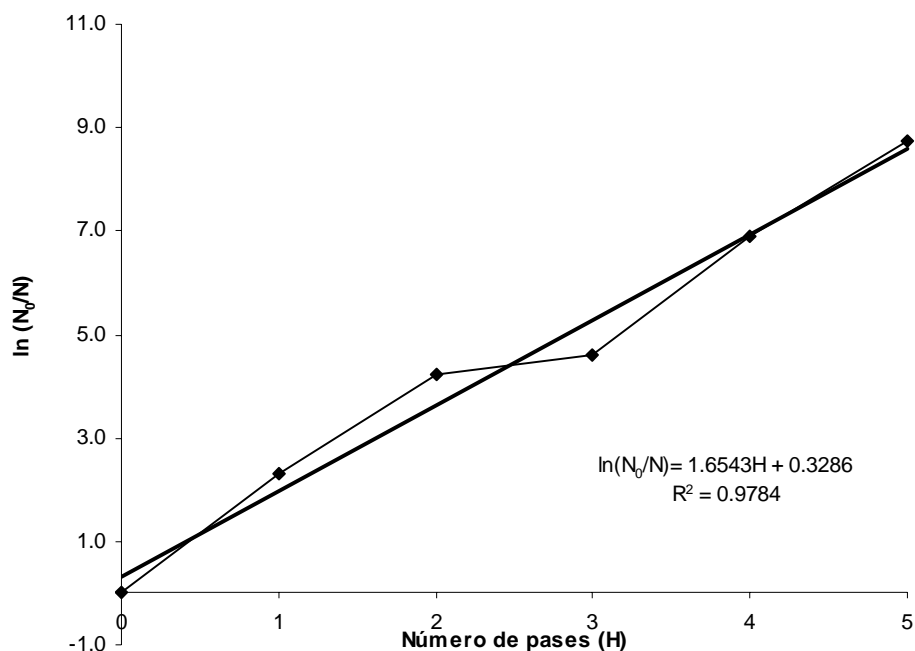


Figura 3.6. Logaritmo natural de la viabilidad en función del número de pases.

El carácter exponencial de este modelo empírico obedece a la caída también exponencial de la pérdida de viabilidad celular de la suspensión bacteriana con relación al número de pases en el homogenizador. El parámetro r es la constante que define la muerte celular intrínseca a la suspensión bacteriana, no debida al proceso, H corresponde al número de veces (pases) que la suspensión fue procesada por el homogenizador y k es la relación entre la disminución del logaritmo de la sobrevivencia y el número de pases. Los valores numéricos de estas constantes se presentan en el Cuadro 3.2.

La relación empírica obtenida (Ecuación 3.1) se suma a la serie de modelos matemáticos que han desarrollado otros autores, en los que se relacionan el tamaño de los restos celulares (Wong *et al.*, 1997), o liberación de proteínas con la presión ejercida a la muestra (Engler y Robinson, 1981), en métodos mecánicos (homogenizador) de ruptura celular.

Cuadro 3.2. Constantes empíricas de la ruptura celular de *Salmonella typhi*.

	k	r
R1	1.654	1.389

Complejidad celular

En los citogramas de dispersión, las partículas en las muestras se colocan en relación a su tamaño (abcisas) y a la complejidad en términos de su asociación y granularidad estructural (ordenadas), definiendo las áreas: Q1, Q2, Q3 y Q4. El sector Q1 se refiere a los eventos (partículas analizadas en el citómetro) con menor tamaño de partículas y mayor complejidad, en Q2 se incluyen eventos de mayor tamaño y mayor complejidad relativa, Q3 representa muestras con menor tamaño y de baja complejidad, y finalmente Q4 incluye muestras de mayor tamaño y menor complejidad relativa.

La localización de los eventos de una muestra que ha sido sometida a un proceso de ruptura celular se correlaciona con el grado de ruptura alcanzado en la muestra:

1) Para una muestra en que se obtuvo una baja ruptura celular después de ser tratada en el homogenizador, se espera tener células completas que reflejarán eventos de tamaño variable (según la distribución de tamaños celulares) pero baja complejidad granular, localizados en los sectores Q3 y Q4.

2) En muestras de homogenización con alta eficiencia de ruptura celular, el tamaño de los eventos registrados en el citómetro tiende a incrementarse por el rompimiento de células que originan partículas como grandes segmentos de membrana. La liberación de detritus celulares también incrementa la complejidad granular en la muestra. Todo esto produce un desplazamiento de eventos hacia los sectores Q1 y Q2 del citograma que se correlaciona con un incremento en la eficiencia del método de ruptura celular.

En la Figura 3.7 se indican las áreas del citograma destacando el sector Q3, que concentraría eventos asociados a células completas en la muestra; y al sector Q2, que representa muestras con alto rompimiento celular.

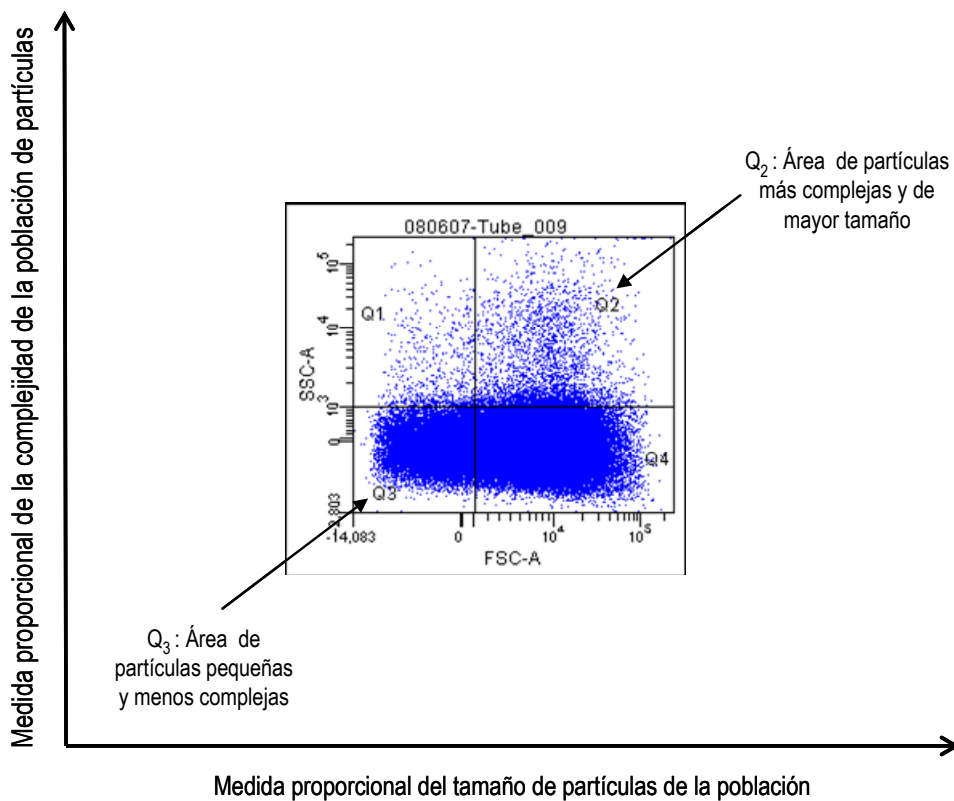


Figura 3.7. Citograma de dispersión de la muestra sin procesar por el homogenizador.

En la Figura 3.8, se presentan los citogramas para cada pase (H1-H5) por el homogenizador. Se observa como la migración de los eventos hacia el área Q2 se va incrementando con cada pase, lo anterior muestra que las características de las muestras respecto a su complejidad celular se modifica. Este resultado se correlacionó de manera adecuada con la pérdida de la viabilidad celular. El cambio de la complejidad de las muestras se atribuye de manera indirecta al hecho de que la ruptura celular esta ocurriendo.

Es importante señalar que en el tercer pase (H3) el número de eventos en el cuadrante Q2 no es mayor que en el segundo pase como se esperaba, pero esto es debido a una toma de muestra incorrecta dado que se mantiene una tendencia en la migración de los eventos hacia el área Q2 en el cuarto y quinto pase de la muestra por el homogenizador.

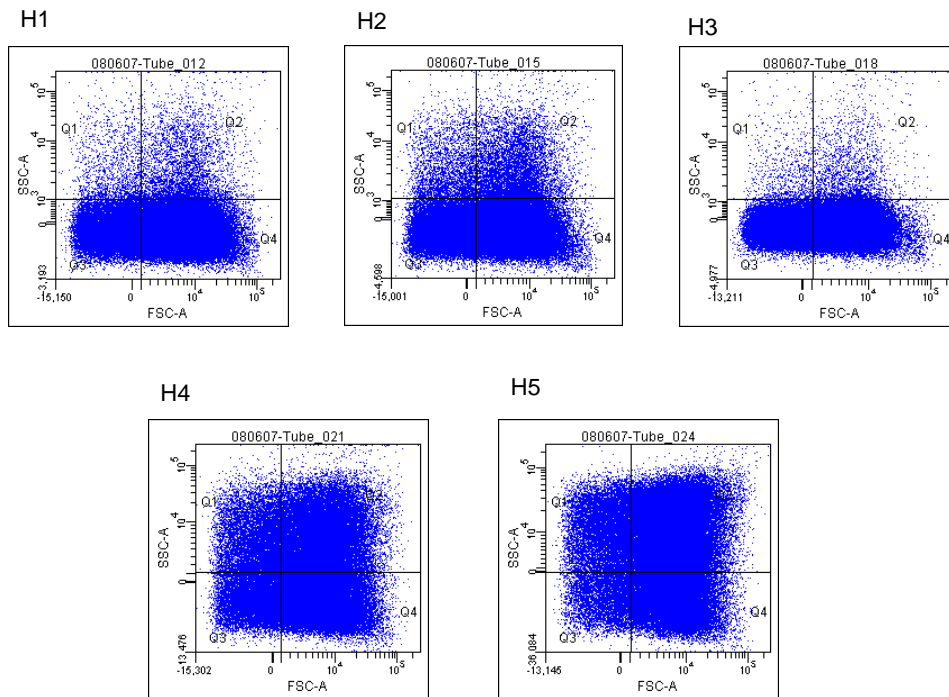


Figura 3.8. Citograma de dispersión de la suspensión celular después de cada pase por el homogenizador.

Los resultados numéricos de cada una de las áreas se muestran en el Cuadro 3.3, en los cuales se observa el incremento del número de eventos en el cuadrante Q2, así mismo su porcentaje correspondiente. Además, también se nota la disminución en el cuadrante Q3, el cual representa las características de menor número de partículas y menor complejidad celular. Esta migración de eventos indicó que la muestra fue cambiando su complejidad celular con cada uno de los pases por el homogenizador.

Cuadro 3.3. Distribución y porcentaje de los eventos en la Citometría de flujo

Muestra	# Eventos				% de eventos			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
SB	741	3,899	16,436	78,924	0.7	3.9	16.4	78.9
H1	1,542	4,373	25,546	68,539	1.5	4.4	25.5	68.5
H2	3,310	7,915	27,769	61,006	3.3	7.9	27.8	61.0
H3	886	2,237	29,128	67,749	0.9	2.2	29.1	67.7
H4	9,406	33,588	12,778	44,228	9.4	33.6	12.8	44.2
H5	11,501	52,635	6,235	29,629	11.5	52.6	6.2	29.6

Cuantificación de proteínas liberadas al medio

La cuantificación de proteínas liberadas al medio como medida indirecta de la ruptura celular, se realizó por el método de Lowry con el uso de una curva tipo para la subsiguiente cuantificación de la muestra proveniente del proceso de ruptura. En la Figura 3.9 se puede apreciar la concentración de proteínas provenientes de cada muestra, SB para la muestra antes de tratar, H1-H5 para las muestras procesadas en el homogenizador.

La concentración de proteínas liberadas se incrementa en el primer pase por el homogenizador manteniéndose en el mismo orden (3 mg mL^{-1}) hasta en tercer pase. El contenido de proteínas se reduce después de haber pasado la muestra por el homogenizador cuatro y cinco veces.

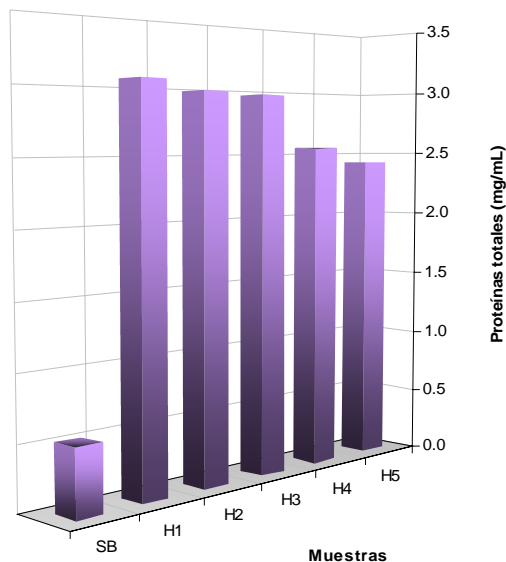


Figura 3.9. Proteínas totales en la suspensión celular después de cada pase por el homogenizador.

La cuantificación de proteínas liberadas se incrementa en el primer pase, lo cual indicó que la ruptura celular ocurrió al hacer pasar la muestra por el homogenizador. Este resultado correlacionó adecuadamente con la pérdida de la viabilidad celular y la medida de la granularidad de la muestra.

La disminución del contenido de proteínas en el citoplasma después del tercer pase pud ser atribuida a que las proteínas liberadas que están en contacto directo con enzimas, también de citoplasma, que actúan hidrolizándolas, o bien pudo ocurrir la desnaturalización de las proteínas, debido al incremento de temperatura durante el proceso. La disminución en la concentración de proteínas liberadas por las posibles causas mencionadas, no excluye que estos efectos le ocurran también a las proteínas de membrana.

El incremento de proteínas liberadas indicó claramente la ruptura celular. Sin embargo, fue necesario demostrar la presencia de las proteínas de membrana: porinas de *Salmonella typhi*, para lo cual, se llevó a cabo la extracción de estas proteínas como a continuación se describe.

Cuantificación de proteínas de membrana

Las muestras provenientes del primer y segundo pase se trataron para obtener proteínas de membrana, usando en método de Nikaido modificado (Nikaido, 1983). Se cuantificó el contenido de proteínas totales por el método de Lowry, esta cuantificación dio como resultado $0.2039 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas totales para el extracto celular después de haber procesado la muestra por el homogenizador una sola vez. Para la muestra que se procesó dos veces el resultado fue de $0.2644 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas totales.

Estos resultados indican la presencia de proteínas, contenidas en el producto final del proceso de extracción. Lo anterior no indicó directamente la presencia de la porina, proteína de interés, por lo que fue necesario implementar una técnica de identificación. Ésta se realizó por medio de un corrimiento en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y una reacción específica antígeno-anticuerpo, a través del inmunoensayo enzimático conocido como ELISA.

Identificación de proteínas de membrana

SDS-PAGE. El gel para la identificación de proteínas se tiñó con azul de Coomassie usando como referente el marcador de peso molecular adecuado. Se puede observar (Figura 3.10a) la presencia de bandas que corresponden a la identificación del trímero (condiciones no desnaturalizantes) de la proteína de membrana de *Salmonella typhi*, las cuales de acuerdo al marcador molecular tienen un peso molecular en el rango de 100- 150 kDa. También se observan bandas que corresponden a la identificación del monómero (condiciones desnaturalizantes) de la proteína de membrana de *Salmonella typhi*, con un peso molecular en el rango de 35-37 kDa, Figura 3.10b.

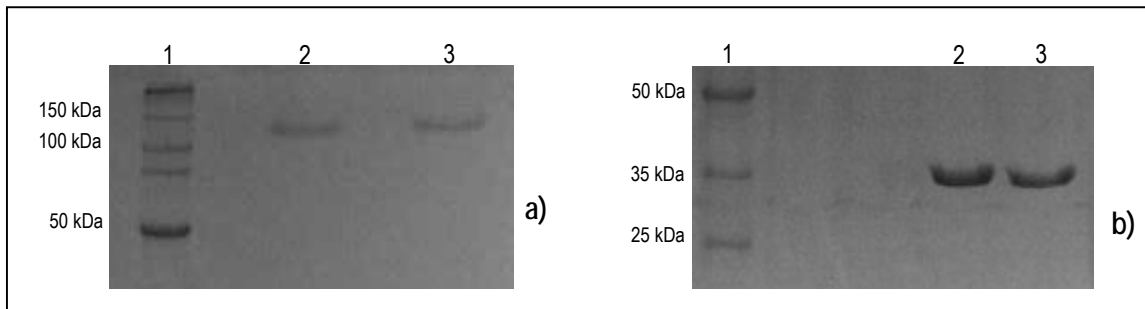


Figura 3.10. SDS-PAGE. 1, marcador de peso molecular; 2, proteínas de membrana externa con un pase por el homogenizador y 3, proteínas de membrana externa con dos pases por el homogenizador.

En la Figura 3.10 a y b, se corroboró la presencia de las proteínas de membrana y se estimó su peso molecular. Cabe destacar que las muestras no están purificadas es decir, no fueron procesadas en la columna de separación por lo que se justificaría la presencia de otras bandas, aunque este no es el caso. El análisis de proteínas de membrana usando SDS-PAGE para la identificación de porinas de membrana externa ha sido utilizado por otros autores (Arockisamy y Krishnaswamy, 2000).

ELISA. El control positivo que se usó fue una muestra identificada como porina de *Salmonella typhi* (cD. Nora Ríos S., Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica), de acuerdo a los valores de absorbancia obtenidos tras este reconocimiento, fue claro que se trató de un reconocimiento específico, es decir, las proteínas de membrana de *Salmonella typhi* son reconocidas a diluciones bajas del anticuerpo; interpretándose así que los sitios de reconocimiento de la porina son rápidamente saturados por el anticuerpo, asegurando de esta manera la especificidad del reconocimiento, además de tratarse de una proteína control ya estandarizada para esta reacción y por ende, todas aquellas muestras que resulten positivas y que sean seleccionadas tras un corte estadístico como el antes señalado, pueden considerarse positivas a dicho reconocimiento.

Es preciso considerar también los valores de la serie de controles negativos, de los cuales el valor promedio obtenido fue menor a 0.05, el cual sugiere que no existe reacción de reconocimiento entre los distintos reactivos del ensayo con el antígeno de prueba, y con ello los resultados obtenidos tanto con el control positivo como con los valores de las muestras son confiables.

Los resultados numéricos se presentan en el Cuadro 3.4, en donde se incluyen: el promedio de las lecturas, su desviación estándar y el punto de corte, el cual es una relación de la desviación estándar de

las lecturas de cada muestra por el número de repeticiones del ensayo (2) más el promedio de la lectura del control negativo. Este valor establece que todas las lecturas por encima del punto de corte fueron consideradas lecturas de reconocimiento positivo.

Cuadro 3.4. Lecturas de absorbancia de muestras y controles (+) y (-)

Muestras	Concentración	DO (490nm)		Promedio	Desv. Est	Punto de corte
OmpC-H1	10 µg/mL	0.441	0.412	0.427	0.021	0.085
	5 µg/mL	0.340	0.332	0.336	0.006	0.055
	2.5 µg/mL	0.289	0.257	0.273	0.023	0.089
OmpC-H2	10 µg/mL	0.413	0.368	0.391	0.032	0.108
	5 µg/mL	0.31	0.302	0.306	0.006	0.055
	2.5 µg/mL	0.263	0.251	0.257	0.008	0.061
Control (+)		0.411	0.403	0.407	0.006	
Control (-)		0.062	0.044	0.053	0.013	

Estos resultados se representan en un gráfico de absorbancia a 490 nm en función de la dilución utilizada del antígeno y sus respectivos controles, positivo y negativo. En la Figura 3.11, se aprecian los valores de densidad óptica a 490 nm de las muestras, productos de la extracción de la proteína de membrana: OmpC-H1 para la extracción proveniente de la muestra del primer pase por el homogenizador y OmpC-H2 para dos pases por el homogenizador.

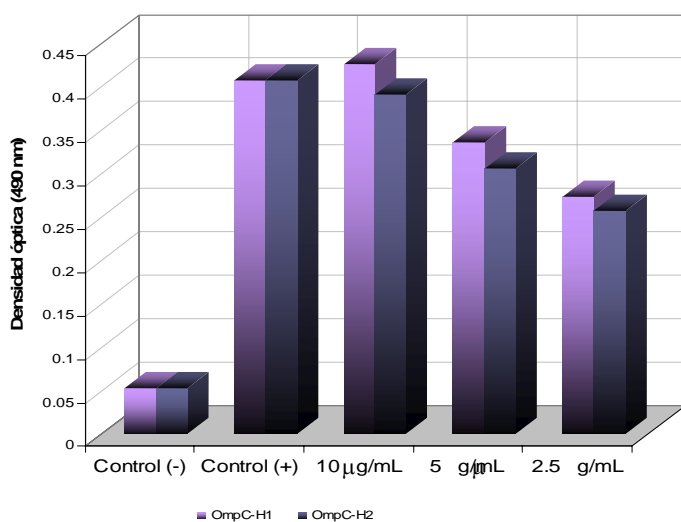


Figura 3.11. Absorbancia de muestras en función de la concentración de antígeno y controles (+ y -).

De acuerdo con los datos del Cuadro 3.4 y la Figura 3.11, se puede afirmar que en los extractos obtenidos de la extracción del primer y segundo pase por el homogenizador contienen la proteína de interés (porina de *Salmonella typhi*), lo que finalmente asegura que el proceso de ruptura ocurre, y que la proteína de membrana se puede extraer siguiendo el esquema de obtención y purificación establecido para tal fin.

CONCLUSIONES

En el perfil de la pérdida de la viabilidad celular, se estableció una relación empírica entre la relación de organismos presentes después de cada tratamiento y los organismos presentes sin ser tratados por el homogenizador, la distribución de los eventos en los resultados de citometría indicaron cualitativamente que la muestra cambió en complejidad con cada uno de los pases, lo anterior se interpretó como una medida indirecta de ruptura celular por lo que, los resultados tanto de sobrevivencia como de citometría correlacionaron adecuadamente al cuantificar la cantidad de proteína liberada al medio, donde se observó un incremento de este contenido entre el primer y tercer pase, con una disminución en el cuarto y quinto pase probablemente por la acción de enzimas desnaturizantes y la temperatura del proceso de ruptura.

Los resultados de identificación de la proteína de membrana de *Salmonella typhi* (porina) por: SDS-PAGE con un peso molecular de 36-37 kDa y el inmunoensayo (ELISA) con reconocimiento positivo, aseguran la presencia de la proteína de interés en el sobrenadante de la etapa de extracción de proteínas de membrana, de una suspensión que fue tratada con homogenizador como método de ruptura celular para la recuperación de porinas.

Con la pérdida del 98.5 % en el segundo pase de la suspensión por el homogenizador y la disminución del contenido de proteínas liberadas al medio en el tercer pase se puede establecer que: 1300 bar y 2 pases, son las condiciones del proceso de ruptura celular en homogenizador APV 2000, que favorecen recuperación de porinas de *Salmonella typhi*, con el menor daño a la proteína.

Finalmente se obtuvieron 0.94 miligramos de proteína total por cada gramo de biomasa húmeda producida, lo cual es superior a los obtenidos usando el sonicador (0.32 mg) como método de ruptura celular, mismo que se usa en el procedimiento tradicional de la recuperación de la porina.

BIBLIOGRAFIA

1. Arockiasamy, A. y Krishnaswamy, S. (2000). Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface Antigen from *Salmonella typhi* for structure- functions studies: a method applicable to enterobacterial mayor outer-membrane protein. *Analytical Biochemistry*. 283, 64-70.
2. Ayazi P. S., Siddiqi, S.F. y Titchener-Hooker, N. J. (1995). A physical model of high-pressure disruption of bakers' yeast cells. *Chemical Engineering Science*. 50 (9), 1383-1391.
3. Balasundaram, B. y Harrison S. T. L. (2005). Disruption of brewers' yeast by hidrodynamic cavitation: process variables and their influence on selective release. *Biotechnology and Bioengineering*. 94 (2), 303-311.
4. Barnadas, R. R. y Sabés, M. (2001). Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *Internacional Journal of Pharmaceutics*. 213 (1-2), 175-186.
5. Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Bacteriology*. 181 (16), 4725-4733.
6. Bury, D. Jelen, P. y Kaláb M. (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2 (1), 23-29.
7. Cabeen, M. T. y Jacobs-Warner Ch. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 601-610.
8. Chisti, Y. y Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microbiology Technology*. 8, 194-204.
9. Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. (2006). High-Pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 32 (4), 201-216.

10. Engler C.R. y Robinson, C. W. (1981). Disruption of *Candida utilis* cells in high pressure flow devices. *Biotechnology and Bioengineering*. 23(4), 765-780.
11. Fonseca, L. P. y Cabral, J. M. S. (2002). Penicillin acylase release from *Escherichia coli* cells by mechanical cell disruption and permeabilization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 77 (2), 159-167.
12. Geciova, J., Bury, D. y Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry- a review. *International Dairy Journal*. 12(6), 541-553.
13. Gowtham, V. S. y van den Berg, Bert. (2006). Crystal structure of the monomeric porin OmpG. *Journal of Molecular Biology*. 360 (4), 750-759.
14. Harrison, S.T.L. (1991). Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*. 9 (2), 217-240.
15. Harrison S.T., Denis J. S. y Chase, H. A. (1991). Combined chemical and mechanical processes for the disruption of the bacteria, *Bioseparation*. 2(2), 95-105.
16. Lowry, O. H., N. J, Rosebrough, A.L. Lewis, F. A. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193, 265-274.
17. Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*. 13 (3), 491-551.
18. Nikaido H. (1983). Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phase lambda receptor protein. *Methods in Enzymology*. 97, 85-105.
19. Roberts, A.D., Zhang, Z., Young, T. W. y Thomas, C. R., (1994). Direct determination of the strength of brewing yeast cells using micromanipulations. *Ins. Engng. Ann. Res. Event, University College London*, 73-75.

20. Shiu, C., Zhang, Z. y Thomas C.R. (2002). A Comparison of the Mechanical Properties of Different Bacterial Species. *Applied Microbiology*. 2(4), 155-162

21. Wong, H. H., O'Neill, B.K. y Middelberg, A. P. J., (1997). A mathematical model for *Escherichia coli* debris size reduction during high pressure homogenization based on grinding theory. *Chemical Engineering Science*. 52 (17), 2883-2899.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de las tres etapas abordadas del proceso de producción de biomasa de *Salmonella typhi* para la obtención de porinas, base de una vacuna tentativa contra fiebre tifoidea permiten establecer las conclusiones que a continuación se mencionan.

Se logró el diseño de un medio de cultivo sintético con glucosa como única fuente de carbono para el crecimiento de *Salmonella typhi*, identificando la concentración adecuada de sulfato de hierro que no promoviera la precipitación y consecuente no disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo diseñado y al pH como variable de proceso a controlar durante el crecimiento del microorganismo en inóculo (400 ml). Con lo anterior, se lograron desarrollos cinéticos equivalentes de *Salmonella typhi* creciendo en medios sintético y complejo.

La determinación del coeficiente global de transferencia de masa (k_{ia}), permite asegurar que el oxígeno no representará un factor limitante en el crecimiento de *Salmonella typhi* en cultivo lote en biorreactor.

Por otro lado, la implementación del cultivo en lote en biorreactor al proceso de producción, permitió disminuir el volumen de operación de 10 l (matraz) a 4 l (biorreactor). El cultivo en lote en biorreactor usando medio complejo alcanzó una densidad óptica superior con respecto al cultivo en matraz y en medio sintético fue mayor que en el medio complejo tanto en matraz, como en biorreactor.

La implementación del homogenizador para lograr la ruptura celular *Salmonella typhi*, disminuye el tiempo de esta operación unitaria en comparación con el sonicador, donde 1300 bar y dos pases por el homogenizador son las mejores condiciones para lograr el mejor grado de ruptura celular.

En contexto, los objetivos generales y específicos, establecidos para este trabajo se cumplieron satisfactoriamente, aportando nuevos procedimientos en el proceso, que a nivel de producción se traducen en lograr un incremento en la producción de la proteína de membrana de *Salmonella typhi*, porina.