

## RESUMEN

La coenzima Q10 (CoQ10) es un cofactor que participa en la transferencia de electrones en la membrana plasmática de los procariontes y la membrana mitocondrial interna de los eucariotas para la generación de energía en forma de ATP. La CoQ10 es interesante debido a su poder antioxidante. Gracias a esta característica ha sido empleada para ayudar a contrarrestar los efectos de muchas enfermedades como, por ejemplo, hipertensión, VIH, alzheimer, parkinson, enfermedades cardiacas, entre otras. Además, ha adquirido cierta importancia en la industria química farmacéutica, debido a que es un potente factor anti-edad y es comúnmente adicionado en la elaboración de cremas faciales y corporales. También se puede encontrar la CoQ10 formando parte de suplementos alimentarios.

El propósito de este proyecto es mejorar la producción de CoQ10, mediante una cepa modificada de *E. coli* en distintas condiciones de cultivo y operación y, a la vez, comprobar si los resultados son comparables con microorganismos nativos productores de la CoQ10.

En esta tesis se trabajó con una cepa recombinante denominada *Escherichia coli* CC2.D, en la cual se ha deletado el gen de la octaprenil difosfato sintasa y se ha incorporado el gen de la decaprenil difosfato sintasa de la cepa nativa *Sphingomonas baekryungensis*. Esta delección se realizó para favorecer la síntesis de la CoQ10.

Se realizaron dos etapas: la primera etapa se llevó a cabo en matraces 500 mL llenándolos con una cantidad total de 100 mL, utilizando dos medios de cultivo (Medio Luria Bertani (LB) y Medio M9+4 g/L de glucosa) y a dos temperaturas (30 y 37°C). Al comparar ambas temperaturas, se logra definir la temperatura óptima que corresponde a 37°C obteniendo el mayor contenido de CoQ10, el cual, corresponde a 0,56 mgCoQ10/g célula en medio de cultivo LB. Posteriormente, en la segunda etapa se realizaron las fermentaciones a escala biorreactor de 3L, utilizando 1.5L de medio de cultivo (LB y M9+4 g/L de glucosa) a distintas velocidades de agitación (300, 600 y 900rpm) a 37°C. Al comparar las tres velocidades de agitación en ambos medios, el mayor contenido de CoQ10 corresponde a 900 rpm con 0,430 mgCoQ10/g célula a las 7 horas de cultivo en medio de cultivo LB. El comportamiento de la cepa *E. coli* CC2.D se vio influenciada por las diferentes condiciones de cultivo empleadas y se observó una variación durante el tiempo de biomasa, contenido de CoQ10 y de VTO.

## INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivo general.....	4
1.2. Objetivos específicos .....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Coenzima Q (ubiquinona) .....	5
2.2. Coenzima Q10 (CoQ10) .....	6
2.2.1. Funciones y aplicaciones de la CoQ10 en la medicina fisiológica.....	7
2.3. Productores naturales de CoQ10.....	11
2.4. Generalidades de <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.4.1. Biosíntesis de CoQ8 en <i>E. coli</i> .....	13
2.4.2. Modificaciones que incrementan el contenido de CoQ10 en <i>E. coli</i> .....	15
2.4.3. <i>Escherichia coli</i> CC2.D.....	18
2.5. Influencia de las diferentes condiciones de cultivo en el contenido de CoQ10 en <i>E. coli</i> .....	19
2.5.1. Efecto de la temperatura sobre el contenido de CoQ10 .....	19
2.5.2. Efecto de la velocidad de agitación sobre el contenido de CoQ10.....	20
2.5.3. Composición del medio de cultivo .....	21
2.6. Respiración bacteriana .....	22
2.6.1. Efecto causado por la modificación de condiciones aerobias a anaerobia sobre el contenido de CoQ10 en <i>E. coli</i> .....	22
2.7. Transferencia de oxígeno en fermentaciones en biorreactor.....	24
2.7.1. Parámetros que caracterizan la transferencia de oxígeno en cultivos celulares ...	25
2.7.2. Efectos hidrodinámicos en biorreactores .....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
3.1. Microorganismo y mantenimiento de la cepa .....	27
3.2. Composiciones de los medios de cultivo utilizados .....	27
3.3. Propagación en placa .....	29
3.4. Preparación de inóculo .....	29
3.5. Metodología experimental.....	30
3.5.1. Experiencia a nivel matraz.....	30

3.5.2. Experiencia a nivel biorreactor .....	31
3.6. Métodos Analíticos.....	33
3.6.1. Determinación de concentración de biomasa .....	33
3.6.2. Determinación de concentración de glucosa por DNS.....	33
3.6.3. Determinación de ácidos orgánicos.....	33
3.6.4. Extracción y cuantificación de CoQ10 .....	34
3.7. Cálculo de parámetros cinéticos .....	34
3.7.1. Velocidad específica de crecimiento de biomasa .....	34
3.7.2. Rendimiento de glucosa en biomasa.....	35
3.7.3. Productividad volumétrica de CoQ10 .....	35
3.7.4. Velocidad específica de consumo de oxígeno .....	35
3.7.5. Velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono .....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Caracterización de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D en dos medios de cultivo a 30°C y 37°C ...	37
4.1.1. Medición del pH en el término de las fermentaciones.....	40
4.2. Crecimiento celular y producción del contenido de CoQ10 a nivel biorreactor .....	41
4.2.1. Crecimiento celular y evolución del contenido de CoQ10 a diferentes velocidades de agitación.....	41
4.2.2. Evolución de la TOD, VTO, VTCO <sub>2</sub> y RQ a diferentes velocidades de agitación ..	44
4.2.3. Relación entre la VTO y la acumulación de CoQ10.....	45
4.2.4. Presencia de ácido acético en el cultivo de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D.....	48
5. DISCUSIÓN .....	50
6. CONCLUSIÓN .....	54
7. RECOMENDACIONES .....	55
8. REFERENCIAS .....	56
9. ANEXOS.....	61
9.1. Anexo A: Procedimiento para preparación de stock celular .....	61
9.1.1. Solución de glicerol .....	61
9.1.2. Solución stock de ampicilina.....	61

9.2. Anexo B: Preparación de medio de cultivo LB, Agar y Ampicilina .....	62
9.3. Anexo C: Metodología cuantificación de biomasa .....	63
9.3.1. Curva de calibrado .....	63
9.3.2. Determinación de la concentración celular de cultivo .....	63
9.4. Anexo D: Curvas de calibrado de biomasa .....	64
9.4.1. Espectrofotómetro marca UV mini-1240 V en medio de cultivo LB .....	64
9.4.2. Espectrofotómetro marca Unico en medio de cultivo LB .....	65
9.4.3. Espectrofotómetro marca Hanon medio de cultivo LB .....	66
9.4.4. Espectrofotómetro marca Hanon en medio M9+4 g/L de glucosa .....	67
9.4.5. Espectrofotómetro marca Único en medio M9+4 g/L de glucosa .....	68
9.5. Anexo E: Metodología de cuantificación de glucosa .....	69
9.5.1. Preparación del reactivo DNS .....	69
9.5.2. Construcción de curva de calibrado .....	69
9.5.3. Procedimiento para determinación de azúcares reductores .....	69
9.5.4. Curva de calibrado del DNS .....	70
9.6. Anexo F: Metodología de análisis de ácidos orgánicos .....	71
9.6.1. Curva de calibrado de los ácidos orgánicos .....	71
9.6.2. Condiciones cromatográficas .....	71
9.6.3. Curvas de calibrado del ácido acético .....	72
9.7. Anexo G: Metodología para la preparación de la curva de calibrado de CoQ10 en HPLC .....	73
9.7.1. Curva de calibrado de CoQ10 .....	73
9.7.2. Determinación de la cantidad de CoQ10 en las muestras .....	73
9.7.3. Condiciones cromatográficas .....	73
9.7.4. Curva de calibrado de CoQ10 .....	74

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.: Estructura de la Coenzima Q. ....	5
Figura 2.2.: Estructura química de la coenzima Q10.....	7
Figura 2.3.: Sistema de transferencia de electrones en las bacterias.....	8
Figura 2.4.: Estados de oxidación de la CoQ10 presente en la célula.....	8
Figura 2.5.: Variación de contenido de CoQ10 según la edad en distintos órganos del cuerpo humano.....	10
Figura 2.6.: Ruta metabólica de la cepa <i>E. coli</i> para la obtención de CoQ8. ....	14
Figura 2.7.: Ruta metabólica que conduce a la formación de la CoQ10.....	16
Figura 2.8.: Ruta metabólica de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D para la obtención de CoQ10.....	18
Figura 2.9.: Resultados obtenidos para <i>E. coli</i> BL21(Se reemplaza <i>ispB::ddsA</i> ) con respecto al efecto de la temperatura en el contenido total de CoQ10 y CoQ9.....	20
Figura 2.10.: Resultados obtenidos para <i>E. coli</i> BL21 (se reemplaza <i>ispB::ddsA</i> ), con respecto al efecto de la velocidades de agitación en el contenido de CoQ9 y CoQ10 .....	21
Figura 2.11.: El efecto de la limitación de oxígeno en la cepa <i>E. coli</i> MC4100, con respecto del contenido de las quinonas.....	23
Figura 2.12.: Efecto sobre el contenido de DMK8 causado en la producción de la cepa <i>E. coli</i> MC4100 en condiciones anaerobias. ....	24
Figura 2.13.: Etapas y resistencias de la transferencia de oxígeno desde la burbuja de gas a la célula .....	25
Figura 4.1.: Cinética de crecimiento de biomasa de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D a nivel de matraz, Medios de cultivo: M9 + 4(g/L) glucosa, a 30 y 37°C .....	37
Figura 4.2.: Cinética de crecimiento de biomasa de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D a nivel matraz, Medio de cultivo LB a 30 y 37°C.. ....	38
Figura 4.3.: Valores de pH en el término de cada cultivo celular de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D, utilizando medio de cultivo M9 + 4 (g/L) glucosa y LB a temperaturas de 30 y 37°C.....	40
Figura 4.4.: Cinética de crecimiento (◆) y consumo de glucosa (●) (A), Contenido de CoQ10 de la cepa <i>E.coli</i> CC2.D.....	41
Figura 4.5.: Evolución de la Biomasa (◆), TOD (◆), VTO(▲), VTCO <sub>2</sub> (■) y RQ (●) en cultivos de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D.....	44
Figura 4.6.: Relación de la CoQ10 con la VTO en los medios de cultivos: (A) M9 + 4g/L glucosa y (B) LB.. ....	46
Figura 4.7.: Perfiles de q <sub>O2</sub> en los medios de cultivos: (A) M9 + 4g/L glucosa y (B) LB .....	47

Figura 4.8.: Presencia de ácido acético durante el cultivo de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D en medio de cultivo M9 + 4(g/L) glucosa y LB. ....	48
Figura 9.1: Curva de calibrado para la determinación de biomasa para <i>E. coli</i> CC2.D.....	64
Figura 9.2.: Curva de calibrado para la determinación de biomasa para <i>E. coli</i> CC2.D.....	65
Figura 9.3.: Curva de calibrado para la determinación de biomasa para <i>E. coli</i> CC2.D.....	66
Figura 9.4.: Curva de calibrado para la determinación de biomasa para <i>E. coli</i> CC2.D.....	67
Figura 9.5.: Curva de calibrado para la determinación de biomasa para <i>E. coli</i> CC2.D.....	68
Figura 9.6.: Curva patrón para la determinación de azúcares reductores por método del DNS utilizando glucosa. ....	70
Figura 9.7.: Curva de calibrado del ácido acético.....	72
Figura 9.8.: Curva de calibrado para CoQ10.....	74

## INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.: Enfermedades y dosis recomendadas de CoQ10 .....	9
Tabla 2.2.: Producción de CoQ10 por microorganismo productores naturales.....	12
Tabla 2.3.: Resumen de modificaciones genéticas en <i>E. coli</i> recombinante. ....	17
Tabla 3.1.: Composición de medio de cultivo M9 suplementado con glucosa .....	28
Tabla 3.2.: Composición de medio de cultivo Luria Bertani (LB) .....	29
Tabla 3.3.: Diseño experimental por triplicado a nivel matraz .....	30
Tabla 3.4.: Diseño experimental por duplicado a nivel biorreactor .....	31
Tabla 4.1.: Parámetros cinéticos y rendimiento de la glucosa en biomasa, de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D.....	39
Tabla 4.2.: Parámetros cinéticos y rendimientos de glucosa en biomasa de la cepa <i>E. coli</i> CC2.D a nivel biorreactor.....	43
Tabla 9.1.: Medio de cultivo LB-Agar .....	62

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.: Velocidad específica de crecimiento de biomasa .....	34
Ecuación 2.: Rendimiento de glucosa en biomasa.....	35
Ecuación 3.: Productividad volumétrica de CoQ10 .....	35
Ecuación 4.: Velocidad específica de consumo de oxígeno.....	35
Ecuación 5.: Velocidad de transferencia de oxígeno.....	36
Ecuación 6.: Velocidad de transferencia de dióxido de carbono .....	36

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

Las coenzimas en general son cofactores orgánicos no proteicos que actúan como intermediarios metabólicos para transportar grupos químicos entre diferentes reacciones. Existen diferentes tipos de coenzimas tales como, por ejemplo, la coenzima A que es la encargada de la transferencia de grupos acetilos (por ejemplo, en la descarboxilación del ácido pirúvico) y de grupos acilo; también está la coenzima B12 cuya importancia radica en la transferencia de grupo metilos o hidrogeno entre moléculas o la coenzima Q la cual es un componente de la cadena transportadora de electrones y participa en la respiración celular aeróbica generando energía en forma de ATP (Kawamukai, 2002; Takahashi, *et al.*, 2006).

En particular, la coenzima Q (CoQ) es también conocida como ubiquinona. Esta coenzima se compone de un anillo de benzoquinona que se une con una cadena de 6-10 unidades de isoprenoides (Cluis, *et al.*, 2011; Lu, *et al.*, 2013). Los distintos tipos de CoQ que existen se pueden diferenciar por el número de unidades de isoprenoides que contienen. Un tipo de CoQ que se encuentra de forma natural en el organismo humano es la coenzima Q10 (CoQ10).

En los últimos años se ha generado un gran interés en la producción de CoQ10 debido a los beneficios que tiene en la salud, concretamente, en el tratamiento de diversas enfermedades como, por ejemplo, cardiovasculares, neurodegenerativas y enfermedades mitocondriales (Zahiri, *et al.*, 2006). Además, es un poderoso antioxidante que protege a las células del daño provocado por radicales libres (Cluis, *et al.*, 2007). Las aplicaciones de la CoQ10 han aumentado con la incorporación en la industria farmacéutica y cosmética (Parmar, *et al.*, 2013). Por esta razón se desea mejorar el rendimiento de CoQ10 para satisfacer las crecientes demandas de la industria.

La CoQ10 puede ser producida tanto por síntesis química y como por fermentación microbiana (Tian, *et al.*, 2010a; Qiu, *et al.*, 2012; Lu, *et al.*, 2013). Actualmente, la fermentación microbiana es la más utilizada a nivel industrial puesto que se pueden utilizar bacterias y levaduras que crecen rápidamente en un medio de cultivo a bajo costo.

Existen distintos tipos de microorganismos nativos que han sido reportados. Estos son capaces de producir CoQ10 como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Paracoccus* y *Sphingomonas baekryungensis* (Ha, *et al.*, 2007; Bule y Singhal, 2009) entre otros.

Muchas empresas biotecnológicas a nivel mundial han aprovechado el amplio conocimiento existente sobre la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) en cuanto a sus características metabólicas, cinéticas, su gran versatilidad para crecer en condiciones extremas de agitación y condición de cultivo suave (T° y pH) o para desarrollar cepas genéticamente dotadas de condiciones metabólicas especiales con el fin de lograr procesos con mayor productividad. En décadas pasadas la rápida y extensa acumulación de conocimientos sobre la biología y la genética de *E. coli*, ha convertido a este microorganismo en el hospedero más apto para ser utilizado como productor de CoQ10. Desde el punto de vista industrial, el principal objetivo es lograr altos niveles de producción de CoQ10 con estrategias de ingeniería metabólica especialmente de *E. coli*, análisis y modificaciones de las rutas metabólicas claves para la optimización de las estrategias de fermentación (Dien Ndikubwimana y Lee, 2014). Además, *E. coli* puede crecer rápidamente en equipos de fermentación que son de fácil adquisición y, también, alcanzar altas densidades celulares utilizando medios de cultivo sencillos y económicos (Qiu, *et al.*, 2012).

La bacteria *E. coli* nativa es productora de CoQ8, por lo tanto, requiere de varios pasos bioquímicos de modificación y optimización para la producción de CoQ10. Una de estas modificaciones genéticas es la expresión de la enzima decaprenil difosfato sintasa (DPS) codificada por el gen *ddsA* junto con la eliminación de la octaprenil difosfato sintasa (OPS) codificada por el gen *ispB*. Con esta modificación se da origen a la cepa recombinante *E. coli* CC2.D (cepa nativa *E. coli* MG1655). De acuerdo a lo anterior, la cepa *E. coli* CC2.D solo sintetizará CoQ10 en reemplazo de la CoQ8 (Cluis, *et al.*, 2011).

En este trabajo se pretende estudiar las mejores condiciones de cultivo de la cepa *E. coli* CC2.D con respecto del contenido de CoQ10 para que sea competitiva con cepas nativas productoras de CoQ10. Para lograr este objetivo se analizará el comportamiento de la cepa *E. coli* CC2.D con distintas variables de operación (temperatura y velocidad de agitación) y distintos medios de cultivos. A la fecha sólo se ha reportado una experiencia para analizar el efecto de la velocidad de agitación y la temperatura en el contenido CoQ10 en una cepa de

*E. coli* BL21 (Li, *et al.*, 2013), en la cual se ha evidenciado que el aumento de la temperatura provoca un efecto negativo mientras que el aumento de la velocidad de agitación provoca un efecto positivo en el contenido de CoQ10 en las células. Con respecto a los medios de cultivo solo se han analizado distintas fuentes de carbono para aumentar las expresiones de diferentes genes que interfieren en la ruta de síntesis de CoQ10.

### **1.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la temperatura a nivel matraz y velocidad de agitación a nivel biorreactor sobre el contenido de CoQ10 en la cepa *E. coli* CC2.D (modificada por ingeniería metabólica) utilizando dos medios de cultivos.

### **1.2. Objetivos específicos**

Caracterizar el crecimiento de la cepa *E. coli* CC2.D a nivel matraz y de reactor en cultivos por lote.

Definir una temperatura de cultivo que permita alcanzar mejores resultados del contenido de CoQ10 a nivel matraz.

Evaluar el efecto de la velocidad de agitación a 300, 600 y 900 rpm en el contenido de CoQ10 a nivel biorreactor utilizando la temperatura seleccionada del objetivo anterior.

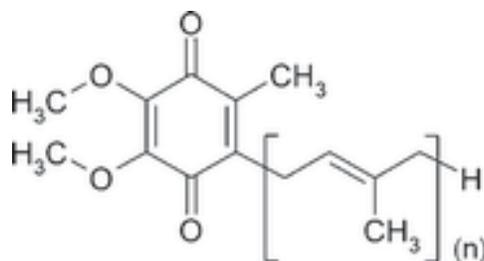
Caracterizar la evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) para evaluar la existencia de limitaciones y poder relacionarlo con el contenido de CoQ10.

## CAPITULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Coenzima Q (ubiquinona)

Las coenzimas Q (CoQ) son moléculas que se encuentran en el dominio hidrofóbico de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares. Se componen de un anillo de benzoquinona polar y una cadena lateral de unidades de isoprenoides apolar (Meganathan, 2001), cuya estructura se representa en la Figura 2.1. Los diversos tipos de ubiquinonas se diferencian por el número de unidades de isopentenil difosfato (IPP) que contiene la cadena. La mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos, tienen principalmente ubiquinonas con 10 unidades de isoprenoides y pequeñas cantidades de ubiquinonas con nueve unidades de isoprenoides. Las ratas y los ratones poseen principalmente ubiquinonas con nueve unidades de isoprenoides. Las levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* contienen 10 unidades de isoprenoides, *Saccharomyces cerevisiae* 6 unidades y bacterias como *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, 8 y 10 unidades respectivamente (Nowicka y Kruk, 2010).



**Figura 2.1.:** Estructura de la Coenzima Q. La letra n entre paréntesis se refiere al número de repeticiones isoprenoides (adaptada de Meganathan, 2001).

En las células eucariontes la CoQ se encuentra predominantemente en la membrana mitocondrial interna. Su función principal es la transferencia de electrones desde deshidrogenasa unidas a la membrana de los distintos complejos y, además, actúa como cofactor para las proteínas de desacoplamiento (Lenaz, *et al.*, 2007; Zhu, *et al.*, 2007). Las células de las bacterias poseen varias quinonas estructuralmente diferentes, las más comunes corresponden a CoQ, menaquinona (MK) y demetilmenaquinona (DMK). Estas quinonas se encuentran en la membrana citoplasmática, donde participan como portadores

de electrones en la respiración y en la formación de enlaces disulfuros (Yoshida, *et al.*, 2006; Martin, *et al.*, 2007). La CoQ participa en la respiración aerobia, mientras que la MK y las DMK tienen papeles en la respiración anaerobia (Bekker, *et al.*, 2007b).

## 2.2. Coenzima Q10 (CoQ10)

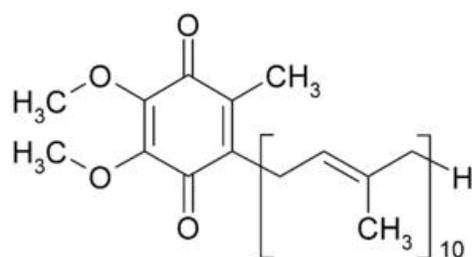
En 1957 Crane, trabajando en la Universidad de Wisconsin (EE.UU), por primera vez a partir de un extracto lipídico de la mitocondria del corazón de un bovino, aisló compuestos que identificó como coenzima Q, nombrándolos así por su participación en la cadena de transporte de electrones (Borekova, *et al.*, 2008). Por otro lado, Folkers en 1958 se dedicó a purificar y determinar la estructura de la CoQ10, además, realizó la síntesis de un gran número de otros factores nutricionales, como la vitamina B6, ácido pantoténico, biotina, vitamina B12 y ácido mevalónico, en los laboratorios Merk (Borekova, *et al.*, 2008).

Posteriormente, en 1963 Yamamura en Japón es el primero en utilizar CoQ7 como análogo de la CoQ10 en el tratamiento de personas que padecían de insuficiencia cardiaca congestiva, lo cual, no funcionó ya que no se obtuvieron resultados claros sobre el efecto de la CoQ7. En esa misma década, Mellors y Tappel (Mellors, *et al.*, 1967) encontró que la CoQ6 en su forma reducida (CoQH<sub>2</sub>), funcionaba como antioxidante. Más tarde, el mismo Folkers documentó que las personas con enfermedades cardiacas presentan deficiencia de CoQ10 (Borekova, *et al.*, 2008).

Solo una década más tarde, en Suecia, la CoQ10 adquiere gran importancia como un antioxidante depredador de radicales libres. Mitchell, originario de Inglaterra, recibe el Premio Nóbel en 1978 por su contribución al entendimiento de la transferencia biológica de energía a través de la formulación de la teoría quimiosmótica, la cual incluye el papel vital del movimiento de protones de la CoQ10 en los sistemas de transferencia de energía (Borekova, *et al.*, 2008). En 1980 este compuesto alcanza su auge en un número considerable de tratamientos clínicos y se convierte en tema importante de diversas investigaciones.

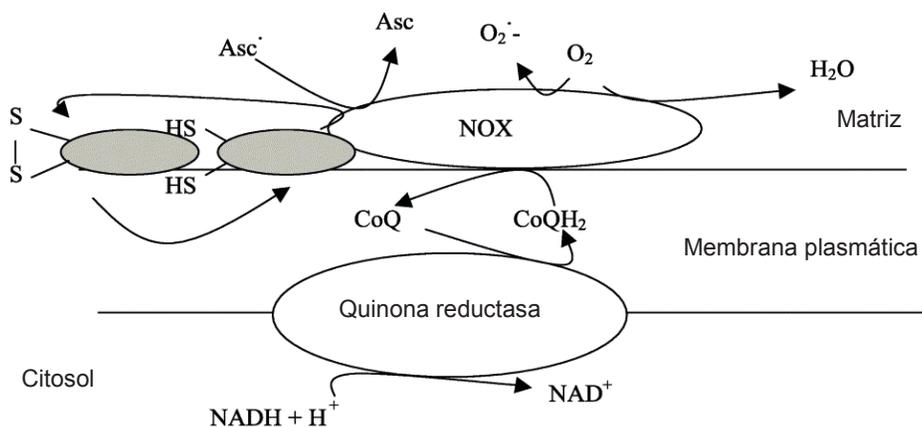
### 2.2.1. Funciones y aplicaciones de la CoQ10 en la medicina fisiológica

La CoQ10 (2, 3 dimetoxi-5 metil-6-poli-isopreno parabenzoquinona), es una molécula que se caracteriza por ser un potente antioxidante liposoluble, debido a su capacidad de ser soluble en grasas y por ende ser móvil a través de las membranas celulares. La estructura general de la CoQ10 se presenta en la Figura 2.2. Está formada por una parte soluble en grasa que consta de una cadena lateral de 10 unidades de isoprenoides (50 átomos de carbono) y la otra parte con el grupo funcional benzoquinona que es soluble en agua. Su peso molecular corresponde a 863,34 g/mol, con una densidad aproximada de 1,1 g/mL (Sohal y Forster, 2007).



**Figura 2.2.:** Estructura química de la coenzima Q10 (adaptada de Meganathan, 2001).

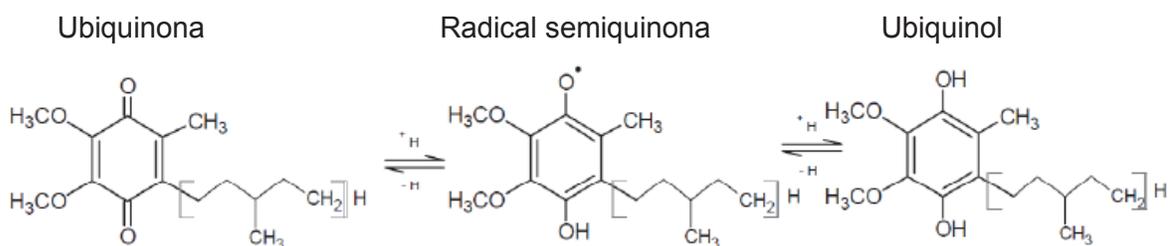
La CoQ10 cumple un importante rol como transportador, ya que en el interior de la membrana interna mitocondrial transporta electrones desde el complejo I (NADH-reductasa) o desde el complejo II (succinato deshidrogenasa) hasta el complejo III (CoQ-citocromo c reductasa) (Ernster y Dallner, 1995; Choi, *et al.*, 2009b; Kawamukai, 2009). En la Figura 2.3 se presenta un diagrama del sistema de transferencia de electrones que ocurre en la membrana mitocondrial de las bacterias. Es por eso que la CoQ10 es un cofactor fundamental en el proceso de respiración celular debido a que su función transportadora de electrones está directamente involucrada en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), siendo ésta la forma principal de energía almacenada por el organismo; este tipo de energía es indispensable para los seres vivos, ya que sin esta molécula no se podría llevar a cabo diversas funciones celulares, tales como el metabolismo celular, la glicolisis o la regeneración celular y, en consecuencia, no habría vida (Yoshida, *et al.*, 2006; Borekova, *et al.*, 2008).



**Figura 2.3.:** Sistema de transferencia de electrones en las bacterias (adaptada de Turunen, *et al.*, 2004).

La característica química principal de la CoQ10 es que se pueden encontrar alternativamente tres estados de oxidación responsables de diversas funciones en el organismo:

- 1- Ubiquinona (CoQ), completamente oxidada, a la cual se le puede adicionar de manera consecutiva dos átomos de hidrogeno, dando lugar a una estructura parcialmente reducida.
- 2- Radical semiquinona que es una forma intermedia (CoQH).
- 3- Ubiquinol, estado totalmente reducido. Los tres estados se presentan en la Figura 2.4.



**Figura 2.4.:** Estados de oxidación de la CoQ10 presente en la célula (adaptado de Kawamukai, 2002).

Los seres humanos por naturaleza tienen la capacidad de sintetizar CoQ10, a través de la dieta, se puede obtener una concentración adicional de la CoQ10 principalmente a partir de productos tales como pescado, carne, aceite, vegetales, frutos secos, trigo y suplementos

alimentarios. Sin embargo algunos autores han documentado que en el organismo humano la habilidad de síntesis de CoQ10 comienza a declinar a la edad de 20 años.

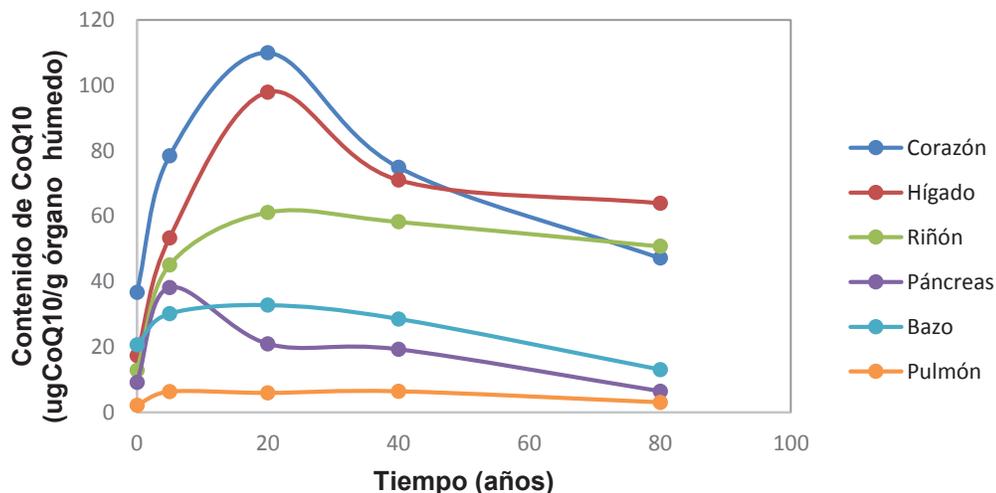
Entre los primeros síntomas en el déficit de energía, se pueden mencionar desordenes de salud en el organismo de los cuales se pueden causar enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, cáncer, hipertensión o alteraciones cardiovasculares, entre otras. Además, la incidencia de peroxidación lipídica aumenta y, finalmente, la célula puede morir (Galpern y Cudkowick, 2007). En la Tabla 2.1 se muestran tanto las enfermedades como las dosis recomendadas en miligramos de CoQ10 al día. Estos datos son obtenidos a partir de MedlinePlus (2015).

**Tabla 2.1.:** Enfermedades y dosis recomendadas de CoQ10 (MedlinePlus, 2015)

<b>Enfermedad</b>	<b>mg CoQ10 al día</b>
Insuficiencia cardíaca en adultos	100
Presión arterial alta	120 a 200
Parkinson	300 a 2400
Distrofia muscular	100
Sida (VIH)	200

La CoQ10 se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas, vesículas y principalmente en el interior de las mitocondrias de cada una de las células del organismo. Se encuentra en altas concentraciones en células de alto requerimiento energético, principalmente en los órganos tales como el corazón, hígado, músculos y el páncreas.

En la Figura 2.5 se representa la concentración relativas de CoQ10 para diferentes tipos de células con alto requerimiento energético en función del tiempo (años) (Lipshutz, 2004).



**Figura 2.5.:** Variación de contenido de CoQ10 según la edad en distintos órganos del cuerpo humano (adaptada de Lipshutz, 2004).

Por otro lado, se sabe que los niveles de producción de CoQ10 se ven disminuidos drásticamente hasta un 75% en personas de la tercera edad, en tanto que las que utilizan medicamentos disminuyen aún más el porcentaje de producción de CoQ10 en el organismo. También en pacientes con cáncer se han reportado documentos que constatan que la producción de la CoQ10 disminuye casi un 30% (MedlinePlus, 2015).

La CoQ10 se ha utilizado como un agente importante para disminuir el daño oxidativo mitocondrial en la célula (Jeya, *et al.*, 2010). La administración oral de CoQ10 puede ser absorbida directamente por las mitocondrias, lo que mejora la biodisponibilidad de la molécula reduciendo así el daño de oxidativo.

Las personas optan por buscar alternativas que les ayuden a recuperar las concentraciones perdidas de CoQ10 por acción de enfermedades, cirugías, entre otras causas. Es por ello que en el mercado actual se ofrecen una amplia gama de alternativas para el consumo de esta sustancia tales como, por ejemplo, píldoras, líquidos, cápsulas en polvo, cremas, entre otras.

En la actualidad, la comercialización de la CoQ10 se realiza fundamentalmente mediante alimentos, en forma de innumerables productos funcionales y suplementos deportivos o nutracéuticos entre otros. Debido a la creciente demanda de la industria farmacéutica y

cosmética, la investigación sobre el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos se ha intensificado para disminuir los costos de producción industrial de la CoQ10.

### **2.3. Productores naturales de CoQ10**

Con el objetivo de desarrollar una plataforma de producción microbiana, muchos científicos han estudiado los productores naturales de la CoQ10 (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides* entre otros) logrando mejoras en los rendimientos con la utilización de la mutagénesis química, la cual, corresponde a la estrategia exitosa hasta la fecha en el desarrollo comercial para la obtención de CoQ10 a través de la optimización de las condiciones operacionales de la fermentación microbiana (Choi, *et al.*, 2005).

En la Tabla 2.2 se presenta un resumen de los niveles de producción de CoQ10 por distintos microorganismos encontrados en literatura que son los productores naturales de esta coenzima. Cabe mencionar que el microorganismo que posee mayor contenido de CoQ10 por biomasa corresponde a *Agrobacterium tumefaciens*, alcanzando un valor de 11,84 mg de CoQ10 por gramo de biomasa, la más alta documentada por este microorganismo (Ha, *et al.*, 2008).

**Tabla 2.2.:** Producción de CoQ10 por microorganismo productores naturales

Microorganismos	Modalidad de cultivo	Biomasa (g/L)	Volumen (L)	Concentración de CoQ10 (mg/L)	Contenido de CoQ10 (mgCoQ10/g de biomasa)	Referencia
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Lote	39,8	1,75	60	1,5	Choi, <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATTC4452	Lote	46	1,75	87,6	1,9	Choi, <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KY-8593	Lote	52,6	2	75	1,2	Cluis, <i>et al.</i> , 2007
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATTC4452	Lote alimentado	64,5	2,8	763,7	11,84	Ha, <i>et al.</i> , 2008
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KCCM 10413	Lote	55,6	2	389,8	7,01	Ha, <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomona denitrificans</i>	Lote alimentado	32	2	27,6	0,86	Yoshida, <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomona diminuta</i>	Lote	6,31	2,5	38,56	1,51	Bule y Singhal, 2009
<i>Pseudomonas</i> N84	Lote	36,8	15 <sup>a</sup>	2,02	1,2	Jeya, <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodobacter rubrum</i>	Lote	1,56	3	5,16	3,32	Tian, <i>et al.</i> , 2010b
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Lote	3,02	150 <sup>b</sup>	19,15	6,34	Yoshida, <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> FERM-P4675	Lote	36,2	1,75	97,2	2,7	Choi, <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> KY8598	Lote	3,02	150 <sup>c</sup>	19,15	6,34	Choi, <i>et al.</i> , 2005

a) Cepa nativa, cultivada en un biorreactor de 30 L.

b) Cepa nativa, cultivada a 30°C en un biorreactor de 300 L.

c) Cepa mutante de *R. sphaeroides*, cultivada a 30°C en un biorreactor industrial de 300 L.

## **2.4. Generalidades de *Escherichia coli***

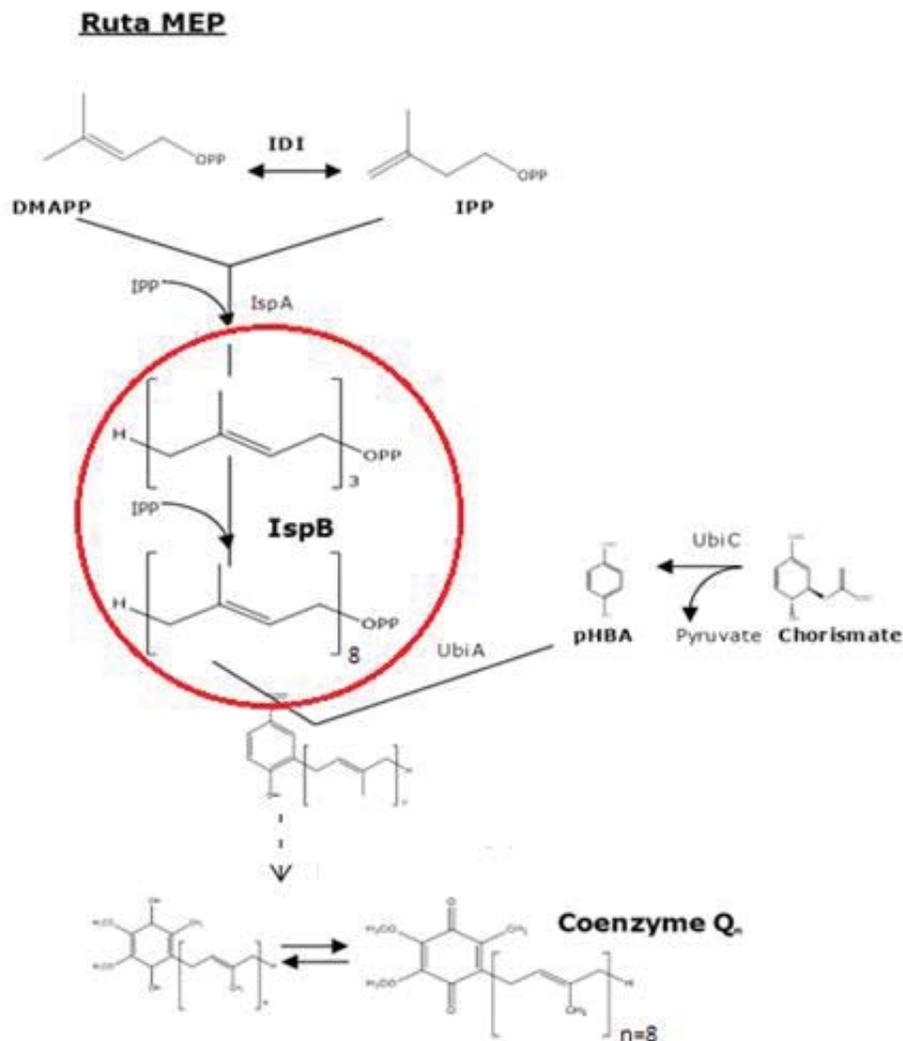
*E. coli* es uno de los microorganismos anaerobios facultativos (sobrevive a varios niveles de oxigenación) más estudiado y utilizado tanto genética como fisiológicamente. Esto es debido a que posee múltiples ventajas entre las que destacan, la rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), es de fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medio de cultivo o equipamiento, es de alta eficiencia en la incorporación de material foráneo con una gran variedad de vectores de expresión y mutantes (Jeya, *et al.*, 2010).

De esta manera, empresas biotecnológicas han aprovechado el amplio conocimiento existente de la cepa *E. coli*, como sus características metabólicas y cinéticas, su gran versatilidad para crecer en condiciones extremas de agitación y condiciones de cultivo suaves (T° y pH), para desarrollar cepas genéticamente dotadas de condiciones metabólicas especialmente con el fin de lograr mayor contenido de CoQ10 (Cluis, *et al.*, 2011).

### **2.4.1. Biosíntesis de CoQ8 en *E. coli***

*E. coli* sintetiza naturalmente la CoQ8 en lugar de CoQ10. Sin embargo, la ruta de biosíntesis de CoQ8 se conoce casi en su totalidad lo cual resulta un buen hospedero para la producción de CoQ10.

La vía de biosíntesis de la CoQ8 se compone de dos partes: 1) la vía de metil-eritritol fosfato (MEP) y, 2) la vía del corismato. En la ruta del MEP, las enzimas que participan en la biosíntesis de la cadena de isoprenoides de 8 unidades corresponden a octaprenil difosfato sintasa (OPS). La ruta metabólica para la obtención de CoQ8 se representa en la Figura 2.6.

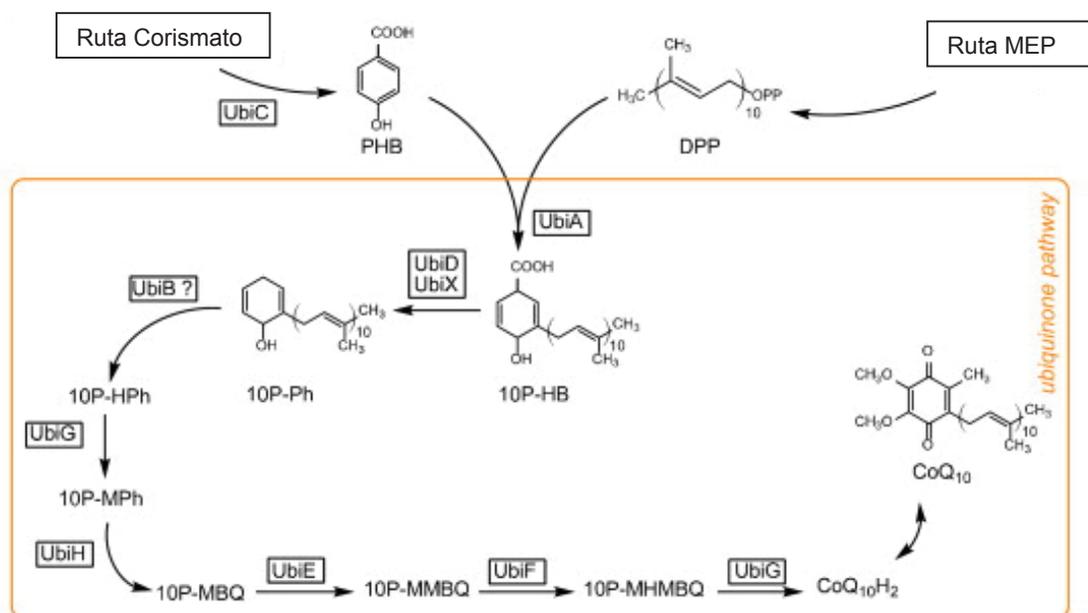


**Figura 2.6.:** Ruta metabólica de la cepa *E. coli* para la obtención de CoQ<sub>8</sub> (Cluis, *et al.*, 2011). MEP: 2-C-Me-2-D-Eritritol-4-fosfato, IPP: isopentil difosfato, DMAPP: dimetilalil difosfato; OPP: octaprenil difosfato, pHBA: p-hidroxibenzoato, IspB: octaprenil difosfato sintasa, UbiA: transferasa decaprenil PHB, UbiC: liasa del corismato, ispA: farnesil difosfato sintasa, IDI: isomerasa difosfato de isopentenilo.

#### 2.4.2. Modificaciones que incrementan el contenido de CoQ10 en *E. coli*

La biosíntesis de la CoQ10 por *E. coli* se ha realizado por la expresión del gen que codifica la enzima decaprenil difosfato sintasa (DPS) a partir de cepas productoras de CoQ10, junto con la eliminación de la enzima octaprenil difosfato sintasa (OPS), con el fin de eliminar la síntesis de CoQ8 (Cluis, *et al.*, 2011).

El conocimiento de la ruta bioquímica y los genes implicados en la biosíntesis de CoQ10 ha llevado a nuevas estrategias genéticas para la obtención de CoQ10. Las modificaciones que han sido realizadas por la sobreexpresión de 1 desoxo-D-xilulosa 5 fosfato sintasa (DXS) de la vía de metil-eritritol fosfato (MEP) con el objetivo de aumentar la disponibilidad de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Choi, *et al.*, 2009a). Otra estrategia que se ha realizado fue la modificación de los genes farnesil difosfato (*ispA*) que provocan un aumento en la producción de isopentil difosfato (IPP), promoviendo de esta manera mayor cantidad de moléculas disponibles para las reacciones posteriores y la sobreexpresión de *UbiC* (enzima que codifica el gen, es la corismato liasa), el cual convierte corismato en *p*-hidroxibenzoato (PHB). Con esta sobreexpresión se promueve el aumento de precursores para la biosíntesis de CoQ10 (Jeya, *et al.*, 2010). Además, se realizaron la sobreexpresión de *UbiB*, *UbiG* y *UbiH* (Cluis, *et al.*, 2007). En la Figura 2.7 se muestra la ruta metabólica para la biosíntesis de CoQ10 a partir de la ruta del MEP y del Corismato.



**Figura 2.7.:** Ruta metabólica que conduce a la formación de la CoQ<sub>10</sub> (adaptada de Cluis, et al., 2011).

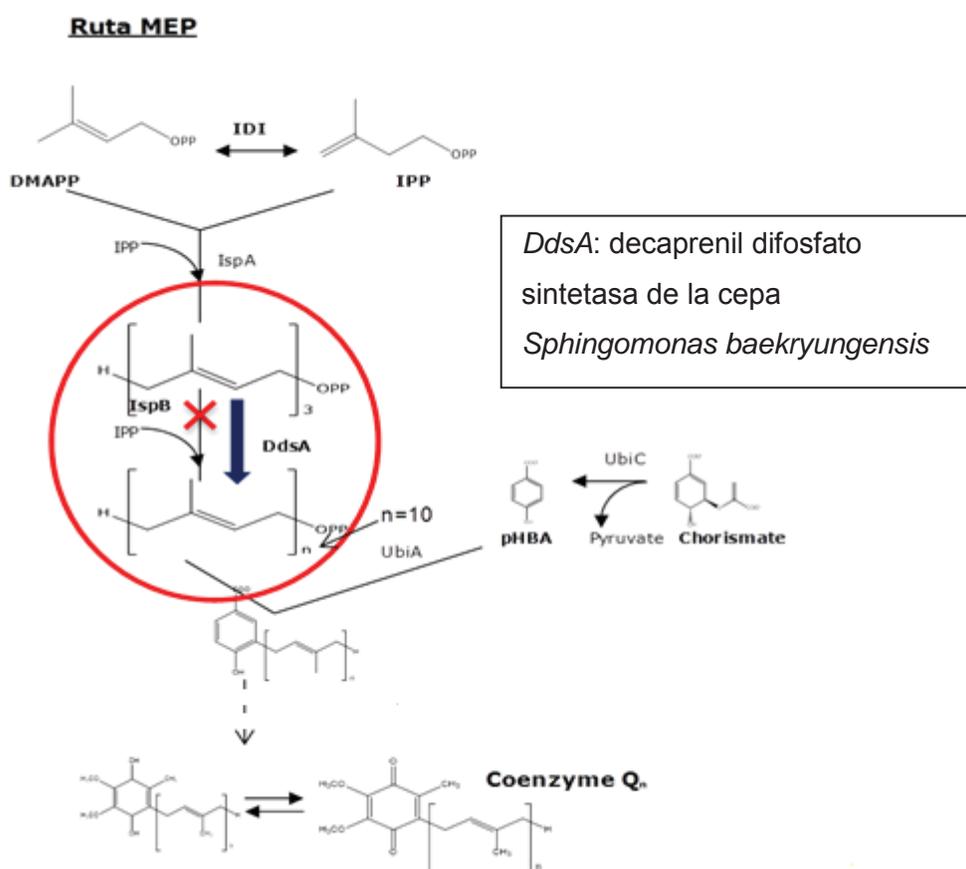
Se presenta un resumen en la Tabla 2.3 de las diversas modificaciones que se han realizado en literatura a las rutas metabólicas de *E. coli*, la sobreexpresión de distintos genes heterólogos, además, distintas modalidades de cultivo y medios de cultivo con el propósito de lograr mejores resultados en la producción del contenido de CoQ<sub>10</sub>. Cabe mencionar que estas modificaciones en *E. coli* aún están bajo los niveles de producción de CoQ<sub>10</sub> en comparación con cepas productoras nativas de CoQ<sub>10</sub> como *Agrobacterium tumefaciens*, alcanzando un valor de 11,84 mg de CoQ<sub>10</sub> por gramo de biomasa (Ha, et al., 2008).

**Tabla 2.3.:** Resumen de modificaciones genéticas en *E. coli* recombinante.

<i>E. coli</i> recombinante	Gen	Cepa de origen	Medio de cultivo	Modalidad	Contenido de CoQ10 (mgCoQ10/g célula)	Referencia
	Se reemplaza <i>ispB</i> por					
<i>E. coli</i> ( <i>ispB::ddsA</i> , <i>pyKFA</i> y <i>gapA::gapC</i> )	<i>ddsA</i> y se reemplaza <i>gapA</i> por <i>gapC</i>	<i>Gluconobacter</i> <i>Suboxydans</i>	LB	Matraz	0,94±0,12	Kim, <i>et al.</i> , 2006
	Se elimina <i>pykFA</i>		LB	Lote	0,44±0,08	
		<i>Agrobacterium</i>				
<i>E. coli</i> BL PQR	Se incorpora <i>idi</i> y <i>ddsA</i>	<i>Tumefaciens</i> , <i>Streptococcus</i> <i>Pneumoniae</i>	LB	Matraz	2,7	Zahiri, <i>et al.</i> , 2006
			LB	Lote	0,75	
<i>E. coli</i> ( <i>ispB::ddsA</i> )	Se incorpora <i>dxs</i> y <i>ddsA</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Aeruginosa</i>	LB	Lote alimentado	0,94	Kim, <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> DH5	Se incorpora <i>ddsA</i> , <i>ubiC</i> y <i>ubiA</i>	<i>Agrobacterium</i> <i>Tumefaciens</i>	LB	Lote	0,59	Zhang, <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i> BL21 (pACDdsA)	Se incorpora <i>ddsA</i>	<i>Gluconobacter</i> <i>Suboxydans</i>	LB	Lote alimentado	0,29	Park, <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> CC2.D	Se reemplaza <i>ispB</i> por <i>ddsA</i>	<i>Sphingomonas</i> <i>baekryungensis</i>	M9	Matraz	0,45	Cluis, <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coli</i> MC4100	Mutación en el gen <i>j7623</i>	<i>Gluconobacter</i> <i>Suboxydans</i>	Evans	Matraz	0,23	Bekker, <i>et al.</i> , 2007a
<i>E. coli</i> BL21	Se reemplaza <i>ispB</i> por <i>ddsA</i>	<i>Rhizobium</i> <i>radiobacter</i>	LB	Matraz	0,33	Parmar, <i>et al.</i> , 2013

### 2.4.3. *Escherichia coli* CC2.D

*Escherichia coli* CC2.D es una cepa recombinante de la *E. coli* MG1655. Con esta cepa se trabajará en este trabajo. La modificación genética que presenta esta cepa es la eliminación del gen de la octaprenil difosfato sintasa y la incorporación del gen de la decaprenil difosfato sintasa de la cepa nativa *Sphingomonas baekryungensis*. La ruta metabólica de la cepa *E. coli* CC2.D que se representa en la Figura 2.8.



**Figura 2.8.:** Ruta metabólica de la cepa *E. coli* CC2.D para la obtención de CoQ10 (Cluis, et al., 2011). MEP: 2-C-Meil-2-D-Eritritol-4-fosfato, IPP: isopentil difosfato, DMAPP: dimetilalil difosfato; OPP: octaprenil difosfato, pHBA: p-hidroxibenzoato, IspB: octaprenil difosfato sintasa, DdsA: decaprenil difosfato sintasa, UbiA: transferasa decaprenil PHB, UbiC: liasa del corismato, ispA: farnesil difosfato sintasa, IDI: isomerasa difosfato de isopentenilo.

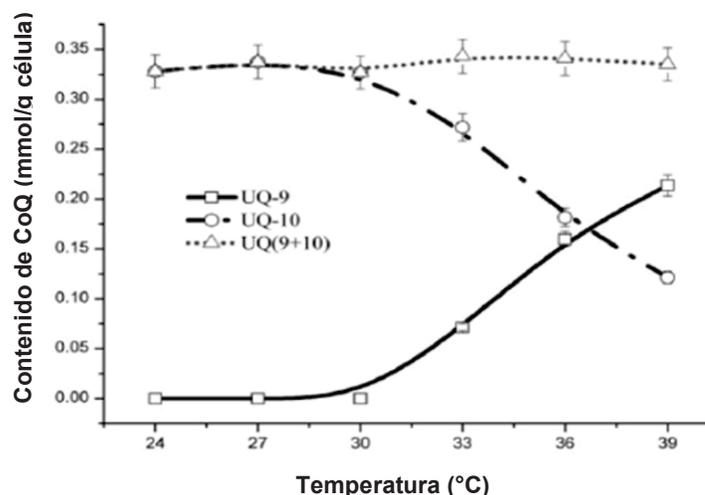
## **2.5. Influencia de las diferentes condiciones de cultivo en el contenido de CoQ10 en *E. coli***

El óptimo crecimiento de la *E. coli* está estrechamente relacionado con las condiciones de cultivo empleadas tales como, por ejemplo, pH, temperatura, velocidad de agitación y composición del medio de cultivo. Hasta la fecha existe solo una investigación a nivel matraz realizada por Li, *et al* (2013) sobre la producción de CoQ10 en distintas condiciones de cultivo estudiando el efecto de la temperatura y la velocidad de agitación, utilizando la cepa *E. coli* BL21 (a esta cepa se le reemplazó el gen *ispB* por el gen *ddsA*).

### **2.5.1. Efecto de la temperatura sobre el contenido de CoQ10**

El estudio realizado por Li, *et al* (2013) acerca del efecto de la temperatura sobre contenido de CoQ9 y CoQ10 consistió en someter la cepa bajo distintas temperaturas de incubación (24, 30, 33, 36 y 39°C), manteniendo la velocidad de agitación a 200 [rpm] y con un pH inicial de 7.2. Para ello se utilizaron matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB).

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.9, los cuales muestran que al incrementar la temperatura, la suma del contenido de CoQ9 más el contenido de CoQ10, se mantiene constante a 0,325 mmol/g célula. A los 27°C se aprecia el máximo contenido de CoQ10 el cual corresponde a 0,325 mmol/g célula. En tanto que a los 39°C se obtiene el máximo valor en el contenido de CoQ9 correspondiente a 0,22 mmol/g célula. A los 37°C se aprecia que la curva de CoQ9 y CoQ10 se juntan obteniendo como valor de 0,175 mmol/g célula. Es decir, a partir de la investigación realizada por Li, *et al* (2013), se aprecia que la máxima temperatura de 39°C, el contenido de CoQ9 aumenta hasta 0,22 mmol/g célula mientras que el contenido de CoQ10 disminuye a 0,125 mmol/g célula.

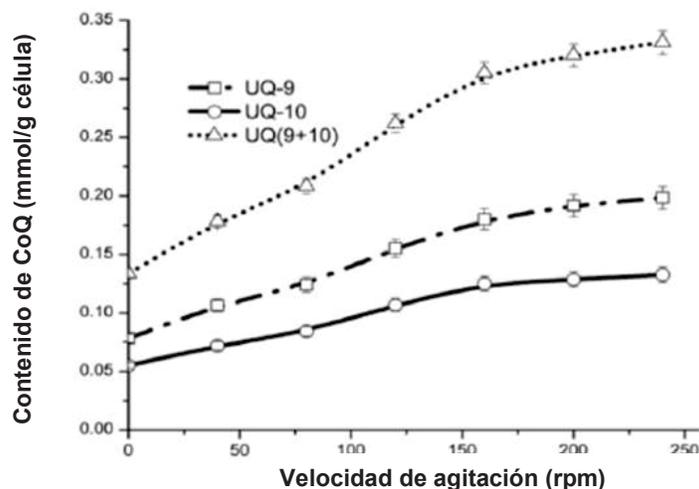


**Figura 2.9.:** Resultados obtenidos para *E. coli* BL21 (Se reemplaza *ispB::ddsA*) con respecto al efecto de la temperatura en el contenido total de CoQ10 y CoQ9, con una velocidad de agitación de 220 rpm y un pH inicial 7.2.

### 2.5.2. Efecto de la velocidad de agitación sobre el contenido de CoQ10

El estudio realizado por Li, *et al* (2013), consistió en evaluar el contenido de CoQ9 y CoQ10, a distintas velocidades de agitación 40, 80, 120, 160, 200 y 240 rpm, manteniendo las condiciones de operación a 37°C (temperatura óptima de crecimiento de la *E. coli*) y con un pH inicial de 7.2. Se utilizaron para ello, matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio de cultivo LB.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.10, los cuales muestran que al incrementar la velocidad de agitación hasta un cierto punto, se produce un aumento en el contenido de CoQ10. En un rango entre 50 hasta 150 rpm aumenta de 0,06 hasta 0,125 mmol/ g célula y en el rango de velocidades de agitación comprendido entre 150 hasta 240 rpm, el contenido de CoQ10 se mantiene aproximadamente constante en 0,125 mmol/g célula. Lo mismo sucede para la CoQ9, donde aumenta el contenido de CoQ9 de 0,10 hasta 0,175 mmol/g célula entre 50 y 150 rpm y luego desde 150 rpm el valor del contenido de CoQ9 se mantiene constante aproximadamente en torno a 0,175 mmol/g célula (Parmar, *et al.*, 2013).



**Figura 2.10.:** Resultados obtenidos para *E. coli* BL21 (se reemplaza *ispB::ddsA*), con respecto al efecto de la velocidades de agitación en el contenido de CoQ9 y CoQ10, a 37°C y pH 7.2.

### 2.5.3. Composición del medio de cultivo

La mayoría de las investigaciones hasta el momento se han centrado en el aumento de la producción de CoQ10 en distintas modalidades de cultivo matraz y biorreactor y en distintos medios de cultivo (Tabla 2.3).

El estudio de la regulación de los genes que participan en la biosíntesis de la CoQ10 se ha realizado bajo distintas composiciones de medios de cultivo. Tal es el caso del gen que es codificado por la liasa Corismato (*ubiC*), este gen se estudió mediante la vinculación de su región reguladora y la incorporación de un operon *LacZ* y se insertaron en la cepa *E. coli* MC4100 (Soballe y Poole, 1997). La expresión génica en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono era 2,4 veces mayor bajo condiciones aerobias que bajo condiciones anaeróbicas. Cuando la glucosa fue reemplazada por maltosa, glicerol o lactosa, la expresión del gen aumento desde 1.3 hasta 1.8 veces bajo condiciones aerobias. Además, se realizaron pruebas con el gen *ubiG* midiendo la expresión donde se obtuvo mayor valor bajo condiciones aerobias que bajo condiciones anaerobias (Soballe y Poole, 1997). También, se realizaron estudios de los genes *ubiD* y *ubiX* utilizando *E. coli* MC4100 bajo diferentes fuentes de carbono: succinato, glicerol y glucosa, obteniendo 3,7 veces mayor contenido de CoQ10 mg/nmol de biomasa en un medio mínimo alimentándolo con succinato en comparación con un medio de cultivo LB alimentado con glucosa. En basa a estos

antecedentes se pretende en este trabajo evaluar un medio mínimo (M9) suplementado con 4 g/L de glucosa y uno complejo (LB) para ver cuál será el mejor medio para la obtención de mayor contenido de CoQ10.

## **2.6. Respiración bacteriana**

Las ubiquinonas (CoQ8), demetilmenaquinona (DMK8) y las menaquinonas (MK8) son quinonas que realizan funciones distintas en *E. coli*. Las CoQ8 están principalmente implicadas en la respiración aerobia, por otro lado las MK8 y DMK8 su principal función es ser portador de electrones en la respiración anaerobia (Wallace y Young, 1977; Soballe y Poole, 2000; Brondijk, *et al.*, 2002). Si la célula utiliza DMK8 o MK8 dependerá de la fuente de carbono y aceptor final de electrones que esté presente en el medio de crecimiento (Unden, 1988, Wissenbach, *et al.*, 1990).

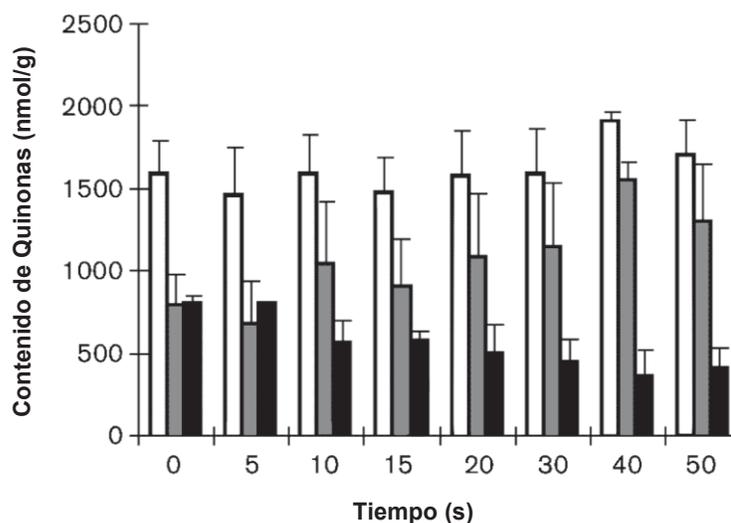
### **2.6.1. Efecto causado por la modificación de condiciones aerobias a anaerobias sobre el contenido de CoQ10 en *E. coli***

Se reporta una experiencia sobre el efecto provocado por un cambio en las condiciones aerobias a condiciones anaerobias sobre el contenido de CoQ10 en *E. coli*. Esta experiencia fue realizada por Bekker, *et al* (2007), la cual consiste en utilizar una cepa de *E. coli* MC4100 (cepa mutante derivada de *E. coli* JC7623). Las células crecieron en medio de cultivo Evans (Evans, *et al.*, 1970) a 37°C y con un pH de 7.0, utilizando tampón fosfato sódico a una concentración de 100 [mM], añadiendo glucosa y tiamina hasta alcanzar concentraciones finales de 50 mM en ambas.

La experiencia de cultivo por lote se llevó a cabo en un reactor Bioflo III con una tasa de dilución constante de  $0,35 \pm 0,01$  (h<sup>-1</sup>) utilizando glucosa como única fuente de carbono y energía. El cambio de aerobio a anaerobio se realizó cambiando el gas de entrada del aire por nitrógeno. El estado anaerobio se logró mediante el burbujeo de nitrógeno al medio de cultivo, consiguiendo una disminución de oxígeno bajo los valores de sensibilidad del electrodo (durante 3 min).

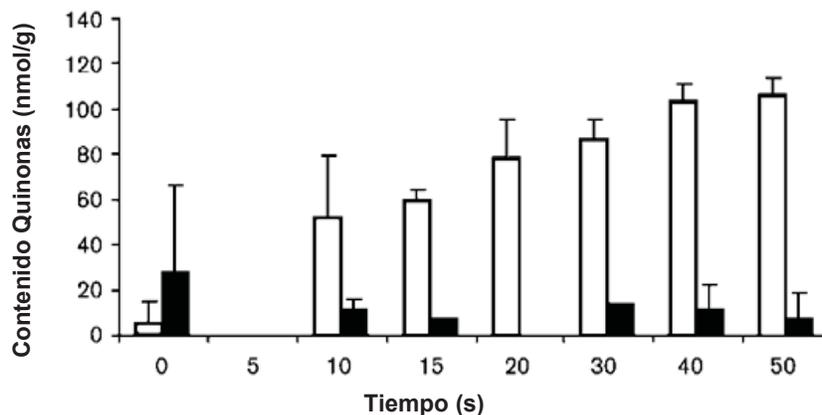
Se analizaron los estados redox de las quinonas en el tiempo, con una frecuencia de 5 segundos. En la Figura 2.11 se muestran los resultados obtenidos en la experiencia de

Bekker, *et al* (2007), los cuales a los 5 segundos no hay variación en el contenido de las quinonas, y dentro de los 10 segundos, la cantidad de CoQ8 mostró una disminución y luego al finalizar los 40 segundos de limitación del suministro de oxígeno el valor se redujo a la mitad de la cantidad inicial de CoQ8.



**Figura 2.11.:** El efecto de la limitación de oxígeno en la cepa *E. coli* MC4100, con respecto del contenido de las quinonas. El eje x muestra el tiempo de muestreo. Las barras del gráfico indican el contenido (nmol/g) de CoQ8+UQ8H2 (blancas); UQ8H2 (grises); CoQ8 (negras) (Bekker, *et al.*, 2007a).

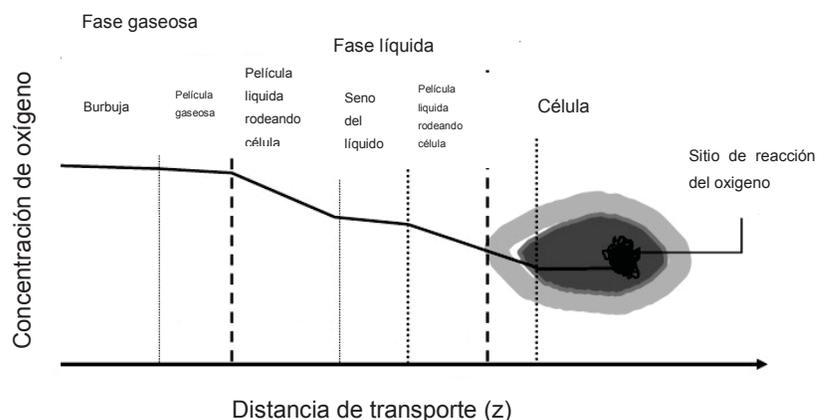
Durante el período de análisis a  $t=40$  s se analizaron las quinonas DMK8 y las MK8. En la Figura 2.12 se muestran los resultados que se obtuvieron en la investigación, donde se puede observar un aumento de 21 veces el contenido inicial de las DMK8 al cabo de 50 s y en cuanto a las MK8 no hubo un aumento significativo durante el análisis en el mismo tiempo.



**Figura 2.12.:** Efecto sobre el contenido de DMK8 causado en la producción de la cepa *E. coli* MC4100 en condiciones anaerobias. Las barras del gráfico indican el contenido de DMK8 (blancas); MK8 (negras) (Bekker, *et al.*, 2007a).

## 2.7. Transferencia de oxígeno en fermentaciones en biorreactor

Durante los bioprocesos aerobios el oxígeno es transferido desde la burbuja de gas a la fase líquida y finalmente a la célula, donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. El transporte de oxígeno desde la burbuja de aire hasta la célula puede ser representado por un número de etapas y resistencias. El conjunto de estas etapas se pueden observar en la Figura 2.13. En primer lugar, la transferencia de oxígeno se realiza desde el interior de la burbuja a la película gaseosa, luego se observa el movimiento a través de la interfase gas-líquido, seguido por la difusión a través de la película de líquido estancado circundante a la burbuja, el transporte a través del seno del líquido, la difusión a través de la película de líquido estancado circundante de la célula, el movimiento a través de la interfase líquido-célula y, finalmente, el transporte a través del citoplasma al sitio de reacción bioquímica. Las resistencias de la película líquida alrededor de la burbuja usualmente controlan la velocidad de transferencia global (García-Ochoa y Gómez, 2009).



**Figura 2.13.:** Etapas y resistencias de la transferencia de oxígeno desde la burbuja de gas a la célula (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

### 2.7.1. Parámetros que caracterizan la transferencia de oxígeno en cultivos celulares

Las fermentaciones usualmente se llevan a cabo bajo condiciones optimizadas previamente (temperatura, pH, presión y nutrientes), con un modo de operación también previamente seleccionado (lote, lote alimentado y continuo). Cada una de estas condiciones va a afectar directa o indirectamente a la transferencia de oxígeno a las células por lo que su caracterización se vuelve fundamental. Un suministro suficiente de oxígeno es un requerimiento fundamental para el cultivo de los microorganismos aerobios. Los parámetros clave para tal propósito son la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y el coeficiente de transferencia de masa volumétrico ( $K_L a$ ).

La VTO es un parámetro de importancia, ya sea para caracterización o para controlar un cultivo celular (Klockner y Buchs, 2012). Por esta razón la condición de velocidad de transferencia de oxígeno ha sido a menudo como el principal criterio para la selección, diseño y escalamiento de los biorreactores. Una estimación adecuada de la VTO en diferentes escalas y bajo diferentes condiciones de operación es relevante para la predicción de rutas metabólicas, es decir, para poder explicar qué proporción de carbono se dirige hacia una vía u otra, tanto para el crecimiento como para la producción de cualquier metabolito de interés (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

### **2.7.2. Efectos hidrodinámicos en biorreactores**

El éxito de muchos procesos biotecnológicos a escala industrial depende de una agitación y aireación efectiva de los fluidos presentes. La hidrodinámica desarrollada en un biorreactor promueve la transferencia de masa y calor entre las fases y la distribución uniforme de los nutrientes durante un proceso fermentativo. Durante el cambio de escala surgen problemas asociados con la hidrodinámica de biorreactores que consecuentemente reducen, en algunos casos, el rendimiento de un bioproceso, respecto de la escala utilizada. La viscosidad de los caldos de cultivo con células suspendidas frecuentemente afecta a la transferencia de masa y, de este modo, a la productividad. Además, al incrementar la velocidad de agitación y aireación podría causar estrés por esfuerzo de corte y daño celular (García-Ochoa y Gómez, 2009).

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismo y mantenimiento de la cepa

El microorganismo utilizado en este trabajo fue la cepa *E. coli* CC2.D, derivada de la cepa nativa de *E. coli* MG1655. La cepa *E. coli* CC2.D presenta una delección en el gen *ispB* de la octaprenil difosfato sintasa y la incorporación del gen de la decaprenil difosfato sintasa (*ddsA*) a partir de la cepa *Sphingomonas baekryungensis* (Cluis, *et al.*, 2011) para la obtención final de CoQ10. Es importante señalar que la cepa *E. coli* CC2.D fue proporcionada por el Dr. Vincentt JJ Martín de Universidad Concordia, Canadá.

Esta cepa fue mantenida en una solución de medio de cultivo LB con glicerol al 65% en una proporción 1:1, cuyo protocolo de preparación se describe en el anexo A. Este stock celular fue mantenido en crioviales de 1.5 mL a una temperatura de -80°C en un ultrafreezer.

#### 3.2. Composiciones de los medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo utilizados para las diferentes experiencias de laboratorio fueron: M9 suplementado con glucosa (medio definido) y Luria Bertani (medio complejo). Las composiciones de ambos medios de cultivo se muestran a continuación en las Tablas 3.1 y 3.2.

**Tabla 3.1.:** Composición de medio de cultivo M9 suplementado con glucosa

Compuesto	Fórmula	Concentración [g/L]	Marca
Fosfato disódico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,8	Sigma
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3	Sigma
Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	0,5	Sigma
Cloruro de amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1	Sigma
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4$	0,24	Sigma
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	0,011	Sigma
Tiamina	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	0,001	Sigma
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	4	Sigma

Los compuestos de fosfato disódico, fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio y cloruro de amonio se disolvieron en agua destilada para formar una solución. Por otro lado, el sulfato de magnesio, el cloruro de calcio y la glucosa se disolvieron por separado con agua destilada para evitar precipitaciones. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave marca LaBTEch a 121°C durante 20 minutos, modelo LAC-5100sD. La glucosa también se esterilizó por separado para evitar reacciones Maillard. La tiamina también se realizó por separado, se disolvió en agua esterilizada, la solución fue filtrada a través de filtros de 0,2 µm (marca Filterlab) luego se guardó en viales de 1,5 mL en refrigeración a -4°C. Una vez estériles todas las soluciones se mezclaron bajo una campana de flujo laminar marca Lab-tech, modelo LCB-0121V. El pH del medio se ajustó a 7.0 empleando NaOH a 2N.

**Tabla 3.2.:** Composición de medio de cultivo Luria Bertani (LB)

Compuesto	Fórmula	Concentración [g/L]	Marca
Triptona	-	10	BD
Cloruro de sodio	NaCl	10	Sigma
Extracto de levadura	-	5	BD

Los componentes del medio de cultivo LB se disolvieron en agua destilada ajustando el pH a 7.0 con ácido sulfúrico 2N. El proceso de esterilización se realizó a 121°C por 20 min en autoclave Lab Tech, modelo LAC-5100sD.

En ambos medios de cultivo (M9+4 (g/L) glucosa y LB) se incorporó una concentración de ampicilina ( $C_{16}H_{18}N_3O_4S$ ) con una concentración final de 100 (mg/L), la cual fue filtrada a través de filtros de 0,2  $\mu$ m (marca filterlab), además se agregó una concentración de 1 mM IPTG (agente inductor para la expresión del gen *ddsA*) transcurrida una hora desde el inicio del proceso fermentativo.

Las fermentaciones a nivel matraz se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio de cultivo. A nivel biorreactor se utilizó un reactor Bioflo 115 de 3 litros, con 1.5 L de medio de cultivo.

### 3.3. Propagación en placa

El primer paso en la propagación del microorganismo consiste en tomar una muestra de la cepa desde el criovial de almacenamiento y propagar en placas Petri que contienen medio de cultivo LB, agar y ampicilina, cuyas concentraciones se describen en el anexo B. Posteriormente, la placa es colocada en una estufa marca Memmert a 37°C por 12 horas.

### 3.4. Preparación de inóculo

Se inoculó con una colonia de la cepa *E. coli* CC2.D aislada desde una placa Petri bajo campana de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones y se agregó un volumen de

una solución de ampicilina de 50 mg/mL hasta alcanzar una concentración final de ampicilina de 100 mg/mL. Luego se procedió a la agitación del inóculo en un shaker marca LabTech modelo LMS-1003, durante el transcurso de la noche (15 horas), a una velocidad de agitación de 250 rpm y a una temperatura de 37°C.

### 3.5. Metodología experimental

#### 3.5.1. Experiencia a nivel matraz

En las experiencias a nivel matraz, se evaluó el efecto de dos temperaturas y dos medios de cultivos sobre el contenido producido de CoQ10 por la cepa *E. coli* CC2.D. Para ello, se diseñó experimentalmente un análisis por triplicado que consta de un total de 12 experiencias. En la Tabla 3.3 se presenta el diseño experimental a nivel matraz.

**Tabla 3.3.:** Diseño experimental por triplicado a nivel matraz

Medio de cultivo	Temperatura °C
M9 + 4(g/L) glucosa	30
	37
LB	30
	37

En todas las experiencias se realizó el seguimiento de sus respectivas cinéticas de crecimiento. Cada fermentación comenzó con una concentración de biomasa de la cepa *E. coli* CC2.D de 0,1 g/L. Las muestras se tomaron utilizando pipetas en intervalos de 1 hora y se extrajeron en una campana de flujo laminar, con el fin de impedir la contaminación del matraz. Además, se realizó la medición de pH en el término de cada fermentación.

Con los resultados obtenidos a nivel matraz se procedió a realizar la etapa en biorreactor. La finalidad es evaluar el efecto de la velocidad de agitación en el biorreactor ocupando los mismos medios de cultivo que en los matraces.

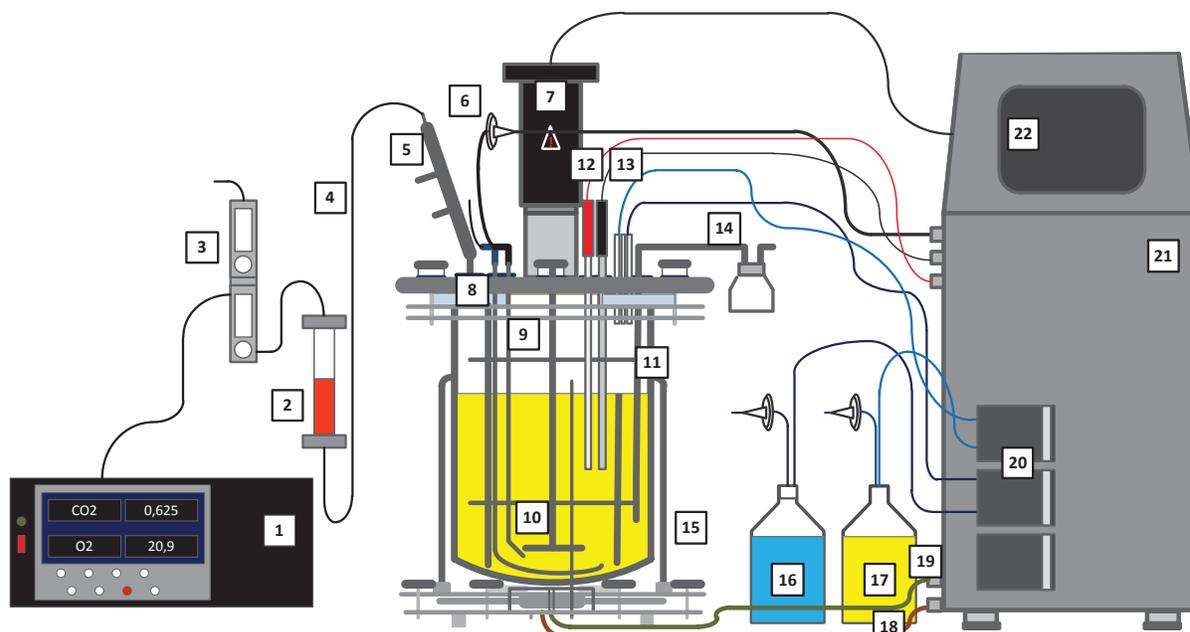
### 3.5.2. Experiencia a nivel biorreactor

A nivel biorreactor se analizó el efecto de la velocidad de agitación en dos medios de cultivo. En la Tabla 3.4 se describe el diseño experimental de los análisis que se realizaron por duplicado los cuales consistieron en un total de 12 experiencias.

**Tabla 3.4.:** Diseño experimental por duplicado a nivel biorreactor

Medio de cultivo	Velocidad de Agitación (rpm)
M9+4(g/L) glucosa	300
	600
	900
LB	300
	600
	900

Los cultivos fueron desarrollados en modalidad por lote en un reactor con una capacidad volumétrica de 3 L de marca Bioflo 115. El volumen que se trabajó fue de 1.5 L de medio de cultivo, controlando la temperatura a 37°C con chaqueta calefactora y el pH en 7,0 con NaOH 2N y HCl 2M (adición automática). Se trabajó con un flujo de aire de 1 (vvm). Las velocidades de agitación que se utilizaron fueron 300, 600 y 900 rpm. No se realizó control del oxígeno disuelto (TOD) y esta se midió con un sensor de oxígeno polarográfico y los gases de salida (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) fueron cuantificados por un analizador de gases marca Teledyne Analytical Instruments modelo 7500 con un sensor paramagnético (para el O<sub>2</sub>) y uno infrarrojo (para el CO<sub>2</sub>). Previamente, el flujo de salida de los gases se canalizó a través de una columna de sílica con el objetivo de retirar la humedad de estos y evitar el deterioro del equipo. Posteriormente, se utilizó un rotámetro para verificar que el analizador reciba el flujo necesario para la medición correspondiente a 0,5 L/min. El tiempo de fermentación fue de 12 horas, con toma de muestras cada 1 hora por triplicado. En la Figura 3.1 se muestra un esquema del sistema experimental utilizado.



**Figura 3.1.:** Esquema del sistema experimental utilizado a nivel Biorreactor.

Número	Equipo o instrumento	Número	Equipo o instrumento
1	Analizador de gases	12	Electrodo de pH
2	Columna desecadora de gases de salida	13	Electrodo de oxígeno
3	Rotámetro Cole Parmer	14	Sistema de muestreo
4	Salida de gases del biorreactor	15	Reactor Bioflo 115
5	Condensador	16	Solución de NaOH
6	Filtro de aire Millipore 0,22 [um]	17	Solución de HCl
7	Motor del biorreactor	18	Entrada de agua al biorreactor
8	Entrada de aire al biorreactor	19	Salida de agua al biorreactor
9	Entrada de oxígeno al biorreactor	20	Bombas peristálticas
10	Impulsor tipo turbina Rusthon	21	Sistema de control del bioreactor
11	Chaqueta de calefacción	22	Monitor automatizado

### **3.6. Métodos Analíticos**

#### **3.6.1. Determinación de concentración de biomasa**

La concentración de biomasa se cuantificó midiendo la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro. Para obtener la concentración celular, el valor de densidad óptica fue correlacionado con la concentración celular en g/L (determinada por peso seco). Los detalles de la metodología se muestran en el anexo C y las correspondientes curvas de calibrado para la determinación de biomasa en el anexo D

#### **3.6.2. Determinación de concentración de glucosa por DNS**

El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ ), el cual, es reducido en medio básico en presencia de algún azúcar presentando un color amarillo anaranjado. La intensidad del color final tras la reacción depende de dicho azúcar. Además, se adiciona tartrato de sodio potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) que actúa como un estabilizante de color (Miller, 1959). La longitud de onda utilizada en el espectrofotómetro fue de 540 nm. Las ventajas de este método son la posibilidad de utilizarlo para la medición de soluciones de azúcares diluidos, por su rapidez y precisión. Los detalles de la técnica se muestran en el anexo E.

#### **3.6.3. Determinación de ácidos orgánicos**

Dentro de los productos generados por *E. coli* se encuentran los ácidos orgánicos: acético, láctico, fórmico, fumárico, oxálico, pirúvico y succínico. La cuantificación de estos ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía en HPLC, el cual, se determina la cantidad de cada ácido orgánico, utilizando como patrón estándar 70 mg/L de etanol grado HPLC (con columna Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm, marca Bio-rad), se realizó una centrifugación previa para obtener el sobrenadante en diferentes puntos de la cinética de la cepa *E. coli* CC2.D. El procedimiento se describe en el anexo F.

### 3.6.4. Extracción y cuantificación de CoQ10

La extracción de CoQ10 se realizó a partir de *E. coli* CC2.D, con la obtención del pellet, el cual fue almacenado por 24 horas a -18°C. El pellet fue tratado con 6 mL de éter de petróleo y 6 mL de metanol a -18°C, se agito por 1 min con vortex (marca LAb-tech V-1plus) y luego se centrifugó (centrifuga marca ThermScientific, modelo SL 16R) durante 5 min a 10000 rpm. Posteriormente, la fase superior se depositó en viales de centelleo, luego se agregó 3 mL de éter de petróleo y se realizó el mismo procedimiento. Finalmente, se procedió al secado de las muestras con nitrógeno gaseoso y se almacenaron también en atmosfera de nitrógeno a -4°C. Antes de medir las muestras por cromatografía en HPLC (High-performance liquid chromatography), se deben resuspender en 500 µL de etanol grado HPLC y agitar durante dos minutos en vortex.

La medición de CoQ10 se realizó mediante cromatografía en HPLC (con columna Symmetry V18, 4,6 x 150 mm, marca Waters) utilizando como fase móvil una mezcla de solventes etanol y metanol en la proporción de 70% y 30% respectivamente. La curva de calibrado de CoQ10 se muestran en el anexo G.

## 3.7. Cálculo de parámetros cinéticos

### 3.7.1. Velocidad específica de crecimiento de biomasa

Para la determinación de la velocidad específica de crecimiento se utilizó la siguiente expresión:

$$X = X_0 e^{\mu \cdot t}$$

Ecuación 1

donde X: Concentración de biomasa de *E. coli* CC2.D (g/L)

X<sub>0</sub>: Concentración inicial de biomasa de *E. coli* CC2.D (g/L)

μ: Velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>)

t: Tiempo (h)

### 3.7.2. Rendimiento de glucosa en biomasa

El rendimiento de glucosa se ha calculado desde t=0 horas hasta t=9 horas con la siguiente expresión:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

Ecuación 2

donde  $Y_{x/s}$ : Rendimiento de glucosa en biomasa (g/g)

$\Delta X$ : Concentración de masa celular producida (g/L) ( $X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}$ )  $X_{\text{final}} = X_{t=9h}$

$\Delta S$ : concentración del sustrato consumido (g/L) ( $S_{\text{final}} - S_{\text{inicial}}$ )  $S_{\text{final}} = S_{t=9h}$

### 3.7.3. Productividad volumétrica de CoQ10

La productividad volumétrica se ha calculado con la siguiente expresión:

$$Q_{CoQ10} = \frac{P}{V * t}$$

Ecuación 3

donde  $Q_{CoQ10}$ : Productividad volumétrica (g/L\*h)

P: Masa producto (g)

V: Volumen muestra (L)

t: tiempo (h)

### 3.7.4. Velocidad específica de consumo de oxígeno

La velocidad específica de consumo de oxígeno se ha calculado con la siguiente expresión:

$$q_{o2} = \frac{1}{X} VTO$$

Ecuación 4

donde  $q_{o2}$ : Velocidad específica de consumo de oxígeno (mmol/gh)

VTO: Velocidad de transferencia de oxígeno (mmol/Lh)

X: Concentración de biomasa (g/L)

### 3.7.5. Velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la velocidad de transferencia de dióxido de carbono (VTCO<sub>2</sub>) fueron determinadas a partir del análisis de gases y calculadas realizando balance de masa a la fase gaseosa (Kayser, *et al.*, 2005).

$$VTO = \frac{M_{O_2} F_G^E}{V(t) V_M} \left( X_{O_2}^E(t) - X_{O_2}^S(t) \frac{1 - X_{O_2}^E(t) - X_{CO_2}^E(t)}{1 - X_{O_2}^S(t) - X_{CO_2}^S(t)} \right)$$

Ecuación 5

$$VTCO_2 = \frac{M_{CO_2} F_G^E}{V(t) V_M} \left( X_{CO_2}^S(t) \frac{1 - X_{O_2}^E(t) - X_{CO_2}^E(t)}{1 - X_{O_2}^S(t) - X_{CO_2}^S(t)} - X_{CO_2}^E(t) \right)$$

Ecuación 6

donde

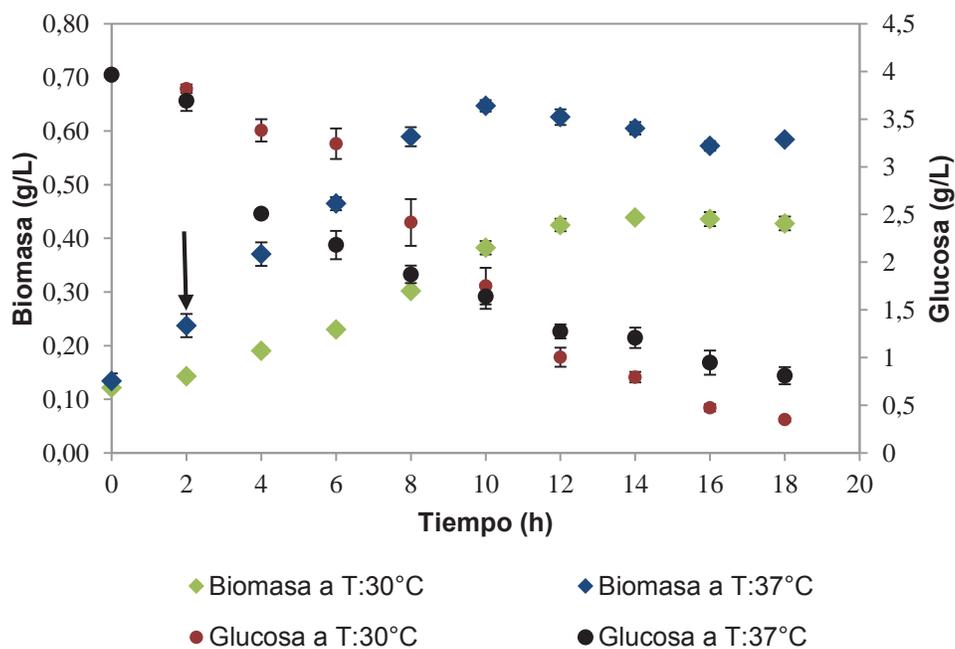
- VTO :Velocidad de transferencia de oxígeno (gO<sub>2</sub>/L\*h)
- VTCO<sub>2</sub> :Velocidad de transferencia de dióxido de carbono (gCO<sub>2</sub>/L\*h)
- M<sub>O<sub>2</sub></sub> : Masa molecular de oxígeno (g/mol)
- M<sub>CO<sub>2</sub></sub> :Masa molecular de dióxido de carbono (g/mol)
- F<sub>G</sub><sup>E</sup> :Flujo de aire a la entrada (L/h)
- V (t) :Volumen del reactor (L)
- V<sub>M</sub> :Volumen molar del gas ideal (L/mol), obtenido a partir de la ecuación de gases ideales (PV=nRT), a 100 KPa y 25°C. V<sub>M</sub>= 24,8 L/mol
- X<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>S</sup> :Fracción molar de CO<sub>2</sub> a la salida (mol CO<sub>2</sub>/ mol aire)
- X<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>E</sup> :Fracción molar de CO<sub>2</sub> a la entrada (mol CO<sub>2</sub>/mol aire)
- X<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>S</sup> :Fracción molar de O<sub>2</sub> a la salida (mol O<sub>2</sub>/mol aire)
- X<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>E</sup> :Fracción molar de O<sub>2</sub> a la entrada (mol O<sub>2</sub>/mol aire)

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1. Caracterización de la cepa *E. coli* CC2.D en dos medios de cultivo a 30°C y 37°C

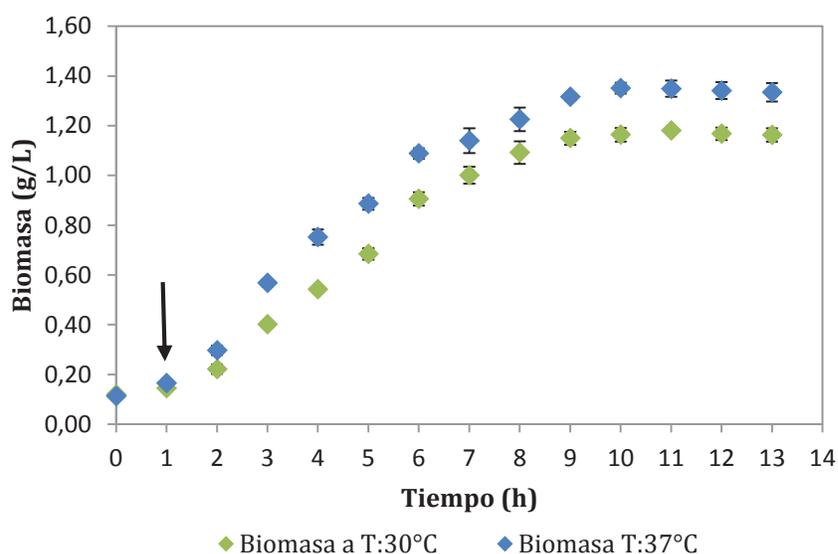
En una primera etapa se realizaron cultivos en matraces agitados con la cepa de *E. coli* CC2.D. Estos cultivos se realizaron con el propósito de caracterizar el crecimiento celular y analizar el contenido de CoQ10 en distintos medios de cultivos y temperaturas. En la Figura 4.1 se muestra la concentración de biomasa en la cepa *E. coli* CC2.D en función del tiempo. El crecimiento celular fue realizado en matraces agitados y utilizando como medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa. Se cuantificó la glucosa en el transcurso de la cinética de crecimiento.



**Figura 4.1.:** Cinética de crecimiento de biomasa de la cepa *E. coli* CC2.D a nivel de matraz, Medios de cultivo: M9 + 4(g/L) glucosa, a 30 y 37°C. La flecha corresponde a la adición de IPTG a ambos cultivos (100 mL de medio de cultivo, 250 rpm y con pH inicial de 7.0).

La concentración celular máxima para la cepa *E. coli* CC2.D a 30°C fue de 0,43 g/L a las 14 horas de cultivo y a 37°C fue 0,65 g/L a las 10 horas de cultivo. Se observó que la glucosa limitó el crecimiento celular, debido a que luego de las 18 horas se detectó a 30°C una concentración de 0,35 g/L y a 37°C de 0,81 g/L.

A continuación en la Figura 4.2 se muestran los resultados obtenidos para la cepa *E. coli* CC2.D utilizando como medio de cultivo LB a 30 y 37°C.



**Figura 4.2.:** Cinética de crecimiento de biomasa de la cepa *E. coli* CC2.D a nivel matraz, Medio de cultivo LB a 30 y 37°C. La flecha corresponde a la adición de IPTG a ambos cultivos (100 mL de medio de cultivo, 250 rpm y con pH inicial de 7.0).

La concentración celular máxima para la cepa *E. coli* CC2.D a 30°C fue 1,18 g/L a las 11 horas de cultivo y a 37°C fue 1,35 g/L a las 10 horas de cultivo.

A continuación, en la Tabla 4.1 se presentan los principales parámetros cinéticos asociados y el rendimiento de glucosa en biomasa en las experiencias a nivel matraz junto con el contenido de CoQ10 obtenido.

**Tabla 4.1.:** Parámetros cinéticos y rendimiento de la glucosa en biomasa, de la cepa *E. coli* CC2.D, a 30 y 37°C, pH inicial 7.0, 250 rpm y 100 mL de medio de cultivo.

Temperatura (°C)	Medio de cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g/g glucosa)	CoQ10 (mg/g célula)	CoQ10 (mg/L)	$Q_{CoQ10}$ (mg/Lh)
30	M9+G	0,11±0,01	0,10±0,03	0,42±0,04	16,81±0,99	1,58*10 <sup>-2</sup> ±0,03
37	M9+G	0,12±0,05	0,22±0,01	0,43±0,02	17,19±0,72	3,54*10 <sup>-2</sup> ±0,05
30	LB	0,27±0,03	-	0,42±0,02	16,79±0,97	5,16*10 <sup>-2</sup> ±0,11
37	LB	0,36±0,11	-	0,56±0,03	22,56±0,30	8,62*10 <sup>-2</sup> ±0,07

\*G: glucosa; LB: Luria Bertani

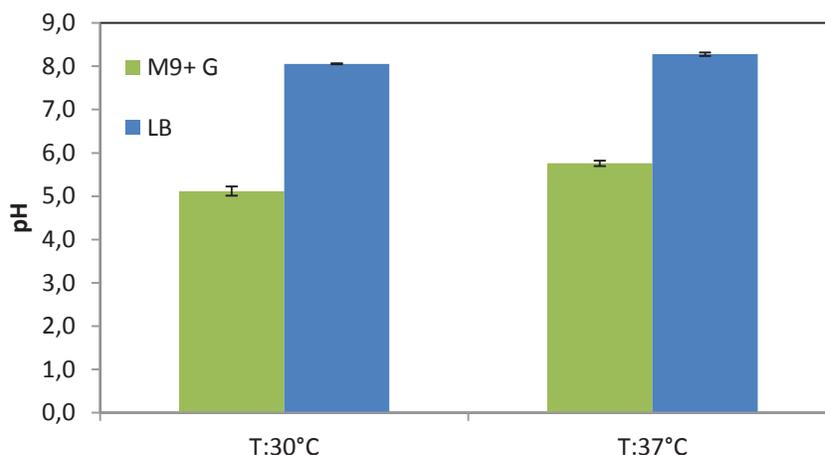
En el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa, el  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) a 30°C fue calculado entre las 2 a 12 horas de cultivo y a 37°C entre las 2 a 10 horas de cultivo (ambas  $\mu$  calculadas en fase exponencial del crecimiento celular). En el medio de cultivo LB el  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) a 30°C y 37°C fue calculado entre las 3 a 6 horas de cultivo. La velocidad específica de crecimiento del medio de cultivo LB fue de 37,6% mayor respecto del medio de cultivo M9 con 4 g/L de glucosa.

El contenido de CoQ10 en medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa a 30°C se obtuvo un valor de 0,42 (mgCoQ10/g célula) a las 10 horas de cultivo y a 37°C se obtuvo 0,43 (mgCoQ10/g célula) a las 8 horas de cultivo. Mientras que el contenido de CoQ10 en medio de cultivo LB a 30°C se obtuvo de 0,42 (mgCoQ10/g célula) a las 10 horas de cultivo y a 37°C se obtuvo 0,56 (mgCoQ10/g célula) a las 9 horas de cultivo.

La productividad volumétrica de la CoQ10 en el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa a 30°C fue calculada a las 10 horas y a 37°C a las 8 horas. En el medio de cultivo LB el valor de  $Q_{CoQ10}$  para ambas temperaturas fueron calculadas a las 9 horas.

#### 4.1.1. Medición del pH en el término de las fermentaciones

En la Figura 4.3 se representan los valores de pH en el término de cada cinética para ambas temperaturas utilizando medio de cultivo M9 suplementado con glucosa y LB.



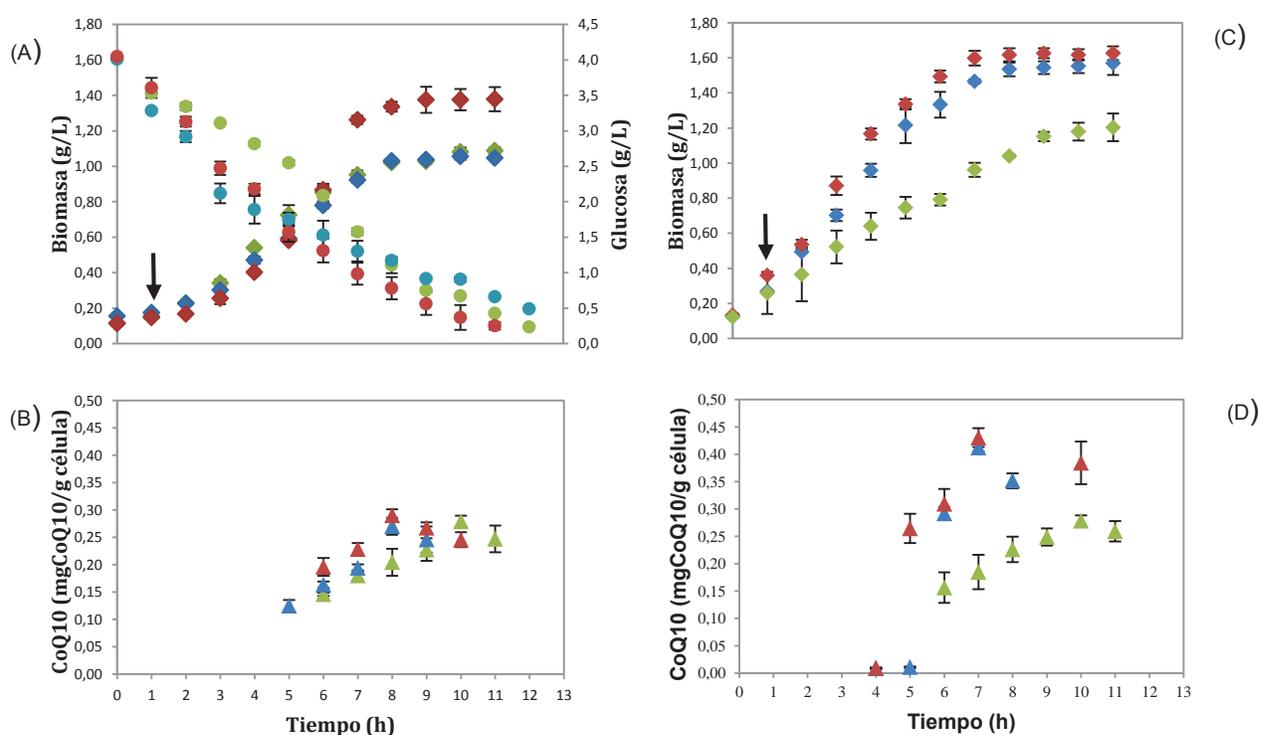
**Figura 4.3.:** Valores de pH en el término de cada cultivo celular de la cepa *E. coli* CC2.D, utilizando medio de cultivo M9 + 4 (g/L) glucosa y LB a temperaturas de 30 y 37°C (pH inicial 7.0, 250 rpm y 100 mL de medio de cultivo).

Con los resultados de la Figura 4.3 se observa que utilizando ambas temperaturas con un medio M9 suplementado con glucosa el pH disminuye al final de la fermentación llegando a valores de 5.11 y 5.76. Esto es debido a la presencia de ciertos tipo de ácidos, tal como el ácido acético, el cual es un metabolito que produce *E. coli* CC2.D durante su cultivo. En el otro caso cuando utilizamos medio de cultivo LB a 30 y 37°C el pH aumenta llegando a valores cercanos a 8.05 y 8.2. El aumento puede atribuirse a la producción de amonio durante la fermentación.

## 4.2. Crecimiento celular y producción del contenido de CoQ10 a nivel biorreactor

### 4.2.1. Crecimiento celular y evolución del contenido de CoQ10 a diferentes velocidades de agitación

A continuación, en la Figura 4.4 se presentan los resultados obtenidos para la cepa *E. coli* CC2.D, utilizando como medios de cultivos M9 suplementado con glucosa y LB a las velocidades de agitación de 300, 600 y 900 rpm.



**Figura 4.4.:** Cinética de crecimiento (◆) y consumo de glucosa (●) (A), Contenido de CoQ10 (▲)(B), (A) y (B) en medio de cultivo M9+ 4(g/L) glucosa. Cinética de crecimiento (◆) (C), Contenido de CoQ10 (▲) (D), (C) y (D) en medio de cultivo LB. Utilizando la cepa *E. coli* CC2.D en biorreactor a 300 rpm (color verde), 600 rpm (color azul) y 900 rpm (color rojo) (37°C, 1vvm, pH 7 y 1500 mL de medio de cultivo). La Flecha indica la adición de IPTG para ambos cultivos.

En referencia a los cultivos realizados con medio de cultivo M9 suplementados con 4 g/L de glucosa, a 300 rpm la concentración celular máxima obtenida fue de 1,08 g/L a las 10 horas de cultivo y la concentración de glucosa disminuyó hasta un valor de 0,43 g/L a las 11 horas de cultivo. Mientras que el valor máximo de CoQ10 fue de 0,279 (mgCoQ10/g célula) a las 10 horas de cultivo. En el caso de los cultivos realizados con una velocidad de agitación de 600 rpm, la concentración celular máxima obtenida fue de 1,03 g/L a las 8 horas de cultivo y la concentración de glucosa disminuyó hasta un valor de 0,65 g/L a las 11 horas. Mientras que el valor máximo de CoQ10 fue 0,270 (mgCoQ10/g célula) a las 8 horas de cultivo. Para una velocidad de agitación de 900 rpm la concentración celular máxima fue de 1,42 g/L a las 9 horas de cultivo, la concentración de glucosa disminuyó hasta un valor de 0,28 g/L a las 11 horas y el valor máximo alcanzado de CoQ10 fue 0,290 (mgCoQ10/g célula) a las 8 horas de cultivo.

Con respecto a los cultivos realizados con medio de cultivo LB a 300 rpm, la concentración celular máxima obtenida fue de 1,26 g/L a las 11 horas de cultivo, mientras que el valor máximo de CoQ10 fue 0,28 (mgCoQ10/g célula) a las 10 horas de cultivo. Para una velocidad de agitación de 600 rpm, la concentración celular máxima obtenida fue de 1,53 g/L a las 8 horas de cultivo, mientras que el valor máximo de CoQ10 fue 0,41 (mgCoQ10/g célula) a las 7 horas de cultivo. Por último, a una velocidad de agitación de 900 rpm la concentración celular máxima fue de 1,61 g/L a las 9 horas de cultivo, mientras que el contenido de CoQ10 fue 0,43 (mgCoQ10/g célula) a las 7 horas de cultivo.

A continuación, en la Tabla 4.2 se presentan los principales parámetros cinéticos y el rendimiento de glucosa en biomasa a nivel biorreactor en los medios de cultivo M9 + 4 g/L glucosa y LB.

**Tabla 4.2.:** Parámetros cinéticos y rendimientos de glucosa en biomasa de la cepa *E. coli* CC2.D a nivel biorreactor con distinta velocidad de agitación, concretamente, de 300, 600 y 900 rpm en medio de cultivo M9 suplementado con 4(g/L) glucosa y medio de cultivo LB.

Medio de Cultivo	Velocidad de agitación (rpm)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g/gglucosa)	CoQ10 (mgCoQ10/g célula)	CoQ10 (mg/L)	$Q_{CoQ10}$ (mg/Lh)
M9 + 4 (g/L)G	300	0,40±0,16	0,25±0,05	0,28±0,01	11,16±0,41	3,01*10 <sup>-2</sup> ±0,05
	600	0,31±0,04	0,26±0,06	0,27±0,02	10,80±0,63	3,47*10 <sup>-2</sup> ±0,11
	900	0,40±0,07	0,35±0,11	0,29±0,01	11,60±0,45	5,15*10 <sup>-2</sup> ±0,22
LB	300	0,25±0,12	-	0,28±0,01	11,13±0,44	2,72*10 <sup>-2</sup> ±0,17
	600	0,30±0,09	-	0,41±0,01	16,49±0,31	8,62*10 <sup>-2</sup> ±0,09
	900	0,39±0,07	-	0,43±0,02	17,21±0,63	9,79*10 <sup>-2</sup> ±0,14

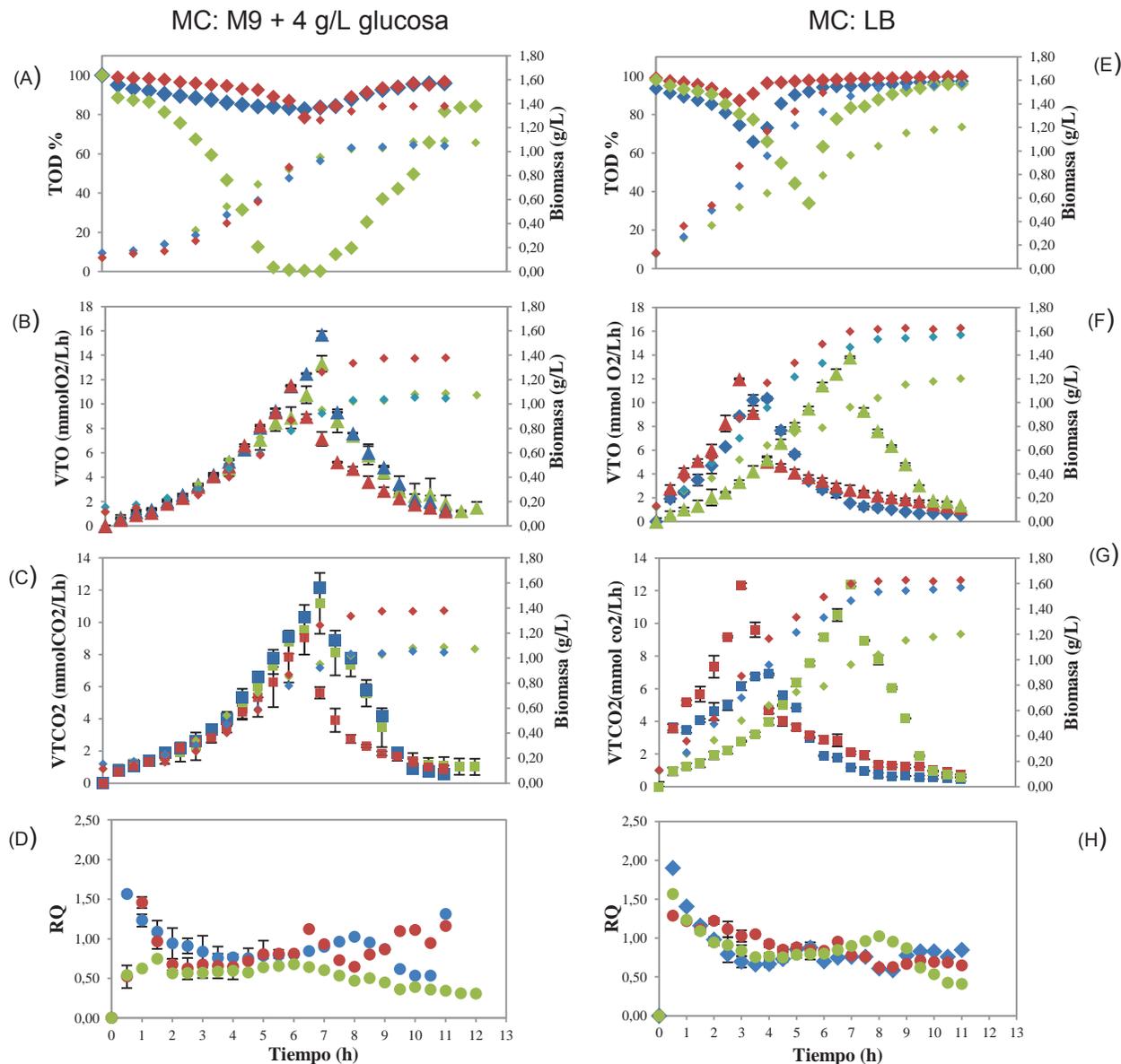
\*G: glucosa; LB: Luria Bertani

En el medio de cultivo M9 suplementado con glucosa, el  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) a 300 rpm fue calculado entre las 1 a 6 horas. Para 600 rpm fue calculado entre las 1 a 6 horas de cultivo y a 900rpm entre las 2 a 7 horas de cultivo. En el medio de cultivo LB el  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) a 300 fue calculado entre las 1 a 5 horas de cultivo, a 600 rpm fue calculado entre las 2 a 5 horas de cultivo y a 900rpm entre las 2 a 4 horas de cultivo.

La productividad volumétrica de la CoQ10 en el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa a una velocidad de agitación de 300 rpm fue calculada a las 10 horas, a 600 y 900 rpm fue calculada a las 8 horas del cultivo. En el medio de cultivo LB la  $Q_{CoQ10}$  a 300 rpm fue calculada a las 10 horas, a 600 rpm y a 900 rpm fue calculada a las 7 horas del cultivo.

#### 4.2.2. Evolución de la TOD, VTO, VTCO<sub>2</sub> y RQ a diferentes velocidades de agitación

En la Figura 4.5 se observan los perfiles de TOD, VTO, VTCO<sub>2</sub> y RQ a las diferentes velocidades de agitación estudiadas en los dos medios de cultivo.



**Figura 4.5.:** Evolución de la Biomasa (◆), TOD (◆), VTO(▲), VTCO<sub>2</sub> (■) y RQ (●) en cultivos de la cepa *E. coli* CC2.D en biorreactor a 300 rpm (color verde), 600 rpm (color azul) y 900 rpm (color rojo) (37°C, 1vvm, pH 7 y 1500 mL de medio de cultivo). MC: medio de cultivo.

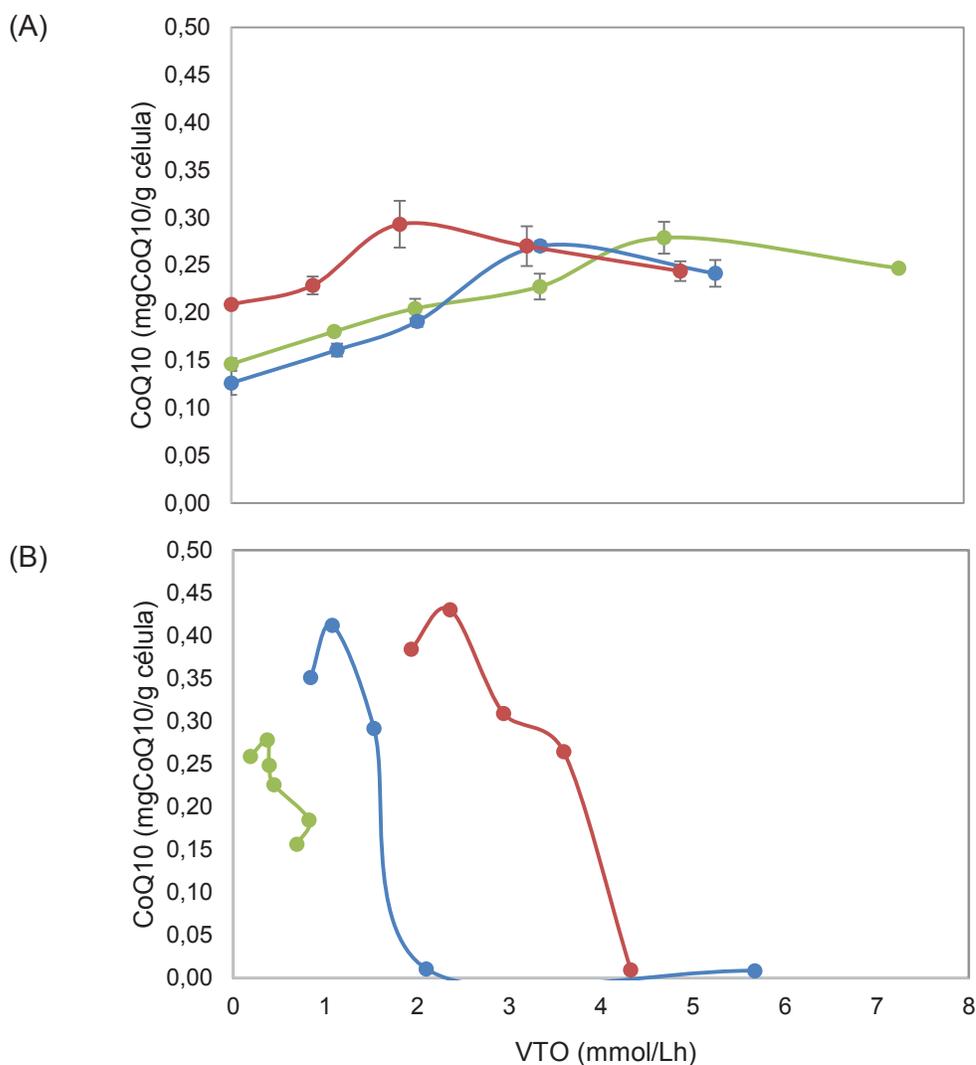
En medio de cultivo M9+ 4 g/L de glucosa a medida que aumenta la velocidad de agitación el perfil de TOD no tiene muchas variaciones. En los cultivos a 300 rpm se mantuvo en cero durante un corto periodo de tiempo mientras la cepa se encontraba en crecimiento, lo cual indica que el cultivo estuvo limitado por oxígeno. El incremento de la TOD en las velocidades de crecimiento coincide con el fin de la fase de crecimiento. En el medio de cultivo LB ocurre un comportamiento diferente, la TOD se incrementa cuando se encuentra en la mitad de la fase exponencial del cultivo en un periodo corto y luego aumenta su valor llegando a valores cercanos a 100%.

Los perfiles de la VTO muestran que en medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa las curvas son similares entre ellas y su máximo valor ocurre cuando baja la TOD, esto coincide con el inicio de la fase estacionaria. El caso del medio de cultivo LB sucede algo distinto en los perfiles de VTO, al aumentar la velocidad de agitación el tiempo en que aparece el máximo valor de VTO es menor. Ocurre lo mismo para la  $VTCO_2$ , en el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa las curvas son similares entre ellas y su máximo valor ocurre cuando baja la TOD, en cambio, en el medio de cultivo LB a mayor velocidad de agitación el máximo valor se obtiene en un menor tiempo.

El perfil del coeficiente respiratorio (RQ) para ambos medios de cultivos se observan valores muy similares, los cuales se mantienen constante durante la fermentación.

#### **4.2.3. Relación entre la VTO y la acumulación de CoQ10**

Con el propósito de establecer una relación entre la VTO y la producción de CoQ10 se construyó la Figura 4.6, donde se presentan los valores obtenidos de CoQ10 desde las 5 hasta las 11 horas del cultivo celular en función de la VTO en los dos medios de cultivo.

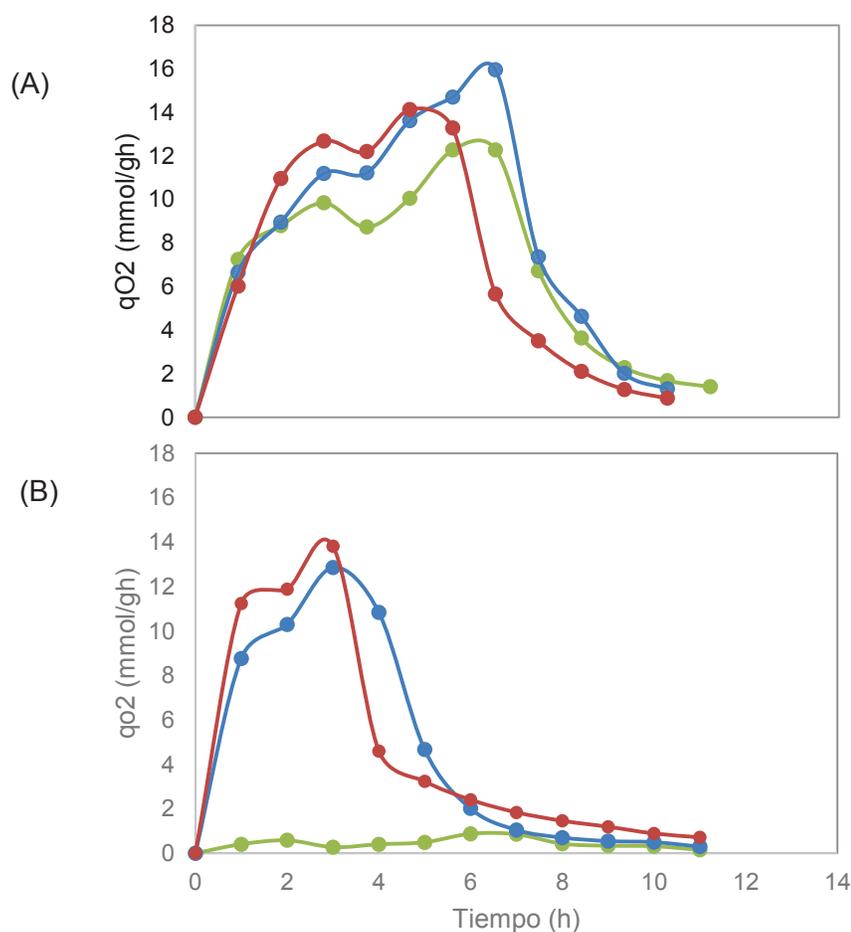


**Figura 4.6.:** Relación de la CoQ10 con la VTO en los medios de cultivos: (A) M9 + 4g/L glucosa y (B) LB. Utilizando la cepa *E. coli* CC2.D en biorreactor a 300 rpm (color verde), 600 rpm (color azul) y 900 rpm (color rojo) (37°C, 1vvm, pH 7 y 1500 mL de medio de cultivo).

En referencia a los cultivos realizados con medio de cultivo M9 suplementados con 4 g/L de glucosa, a una velocidad de agitación de 900 rpm sucedió que al aumentar la velocidad de agitación el valor máximo del contenido de CoQ10 se obtiene a una VTO de 57% menor en comparación con la velocidad de agitación a 600 rpm.

En el caso del medio de cultivo LB, sucede un comportamiento distinto a 900 rpm se obtienen el máximo valor del contenido de CoQ10 con una mayor VTO en comparación con las curvas obtenidas a las velocidades de agitación de 600 y 300 rpm.

Para buscar una respuesta a este comportamiento en ambos medios de cultivo, se realizó un análisis de velocidad de consumo de oxígeno a través de la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), considerando de esta manera la biomasa obtenida durante el cultivo. En la Figura 4.7 se presentan los perfiles de  $q_{O_2}$  en ambos medios de cultivo (M9+4g/L de glucosa y LB) utilizando distintas velocidades de agitación (300, 600 y 900 rpm).



**Figura 4.7.:** Perfiles de  $q_{O_2}$  en los medios de cultivos: (A) M9 + 4g/L glucosa y (B) LB.

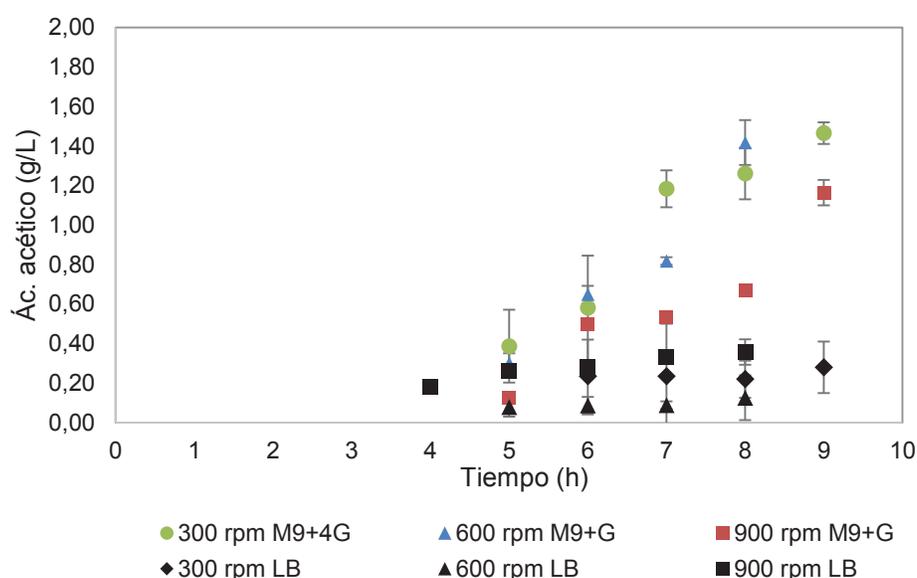
Utilizando la cepa *E. coli* CC2.D en biorreactor a 300 rpm (color verde), 600 rpm (color azul) y 900 rpm (color rojo) (37°C, 1vvm, pH 7 y 1500 mL de medio de cultivo).

Los perfiles obtenidos con el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa a distintas velocidades de agitación, se observó que a 600 rpm se obtiene 27,8% mayor el valor de  $q_{O_2}$  con respecto a 900 rpm en un tiempo de 6 horas. En el medio de cultivo LB se presenta mayor valor de  $q_{O_2}$  a 900 rpm de 16,5% respecto a 600 rpm. Al comparar ambos

medios de cultivo, se observa que los mayores valores obtenidos son del medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa, esta diferencia en la velocidad de consumo del oxígeno presente en el medio puede deberse al metabolismo que utilice la cepa *E. coli* CC2.D en diferentes medios de cultivo.

#### 4.2.4. Presencia de ácido acético en el cultivo de la cepa *E. coli* CC2.D

En la Figura 4.6 se observa el perfil del ácido acético en función del tiempo durante el cultivo celular (tomados en los puntos donde se analizó el contenido de CoQ10) a las diferentes velocidades de agitación estudiadas.



**Figura 4.8.:** Presencia de ácido acético durante el cultivo de la cepa *E. coli* CC2.D en medio de cultivo M9 + 4(g/L) glucosa y LB.

En el caso de la fermentación realizada en medio de cultivo M9 suplementada con 4 g/L de glucosa, la concentración de ácido acético resultó ser de un orden de magnitud inferior en comparación con la biomasa producida. La concentración máxima se obtuvo a las 9 horas de iniciado el cultivo (valor de 1,46 g/L) a 300 rpm. Con una velocidad de agitación de 600 rpm se obtuvo un valor de 1,42 g/L a las 8 horas y a una velocidad de agitación de 900 rpm se obtuvo un valor de 1,16 g/L a las 9 horas. Al estudiar las distintas velocidades de agitación en medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa, se observó que el máximo valor se obtuvo cuando la biomasa comienza su fase estacionaria. La concentración de ácido acético en medio de cultivo LB a una velocidad de agitación de 300 rpm se observó que el

máximo valor es de 0,27 g/L a las 9 horas. Con una velocidad de agitación de 600 rpm se obtuvo un valor máximo de 0,125 g/L a las 8 horas y a una velocidad de agitación de 900 rpm el máximo valor corresponde a 0,36 g/L a las 8 horas de la fermentación.

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

Al analizar el contenido de CoQ10 a 30°C en ambos medios de cultivo a nivel matraz, se observó valores semejantes, mientras que a 37°C se aprecia una diferencia en el contenido de CoQ10 siendo mayor en el medio de cultivo LB que en el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa. Una explicación para este hecho puede ser que a 30°C no se aprecian diferencias entre la composición de ambos medios de cultivo con respecto al efecto que ejercen dichos medios sobre el contenido de CoQ10. El medio de cultivo LB es un medio complejo, lo cual se aprovechan adecuadamente los nutrientes favoreciendo el crecimiento celular de la cepa *E. coli* CC2.D. Además, se debe hacer hincapié en que a 37°C se produce un 25% más de CoQ10 en comparación a 30°C. Lo anterior sugiere que en esta experiencia existe una relación entre la temperatura y el medio de cultivo, de modo que a mayor temperatura, mayor será el efecto del medio de cultivo sobre el contenido de CoQ10 (refiriéndose al medio de cultivo LB). Esta situación se contrapone con los estudios realizados por Li, *et al* (2013) sobre el contenido de CoQ10 debido a que en sus estudios el planteaba que al aumentar la temperatura disminuye el contenido de CoQ10 en un medio de cultivo LB (cepa utilizada *E. coli* BL21).

La presencia de ácidos y amonios a nivel matraz, provocaron una disminución y un aumento de pH al término de la fermentación. En el medio M9 suplementado con 4 g/L glucosa a ambas temperaturas se obtuvieron valores de pH ligeramente ácidos (5,11 – 5,76). Por otra parte, en medio LB el pH aumenta, llegando a valores cercanos de 8,05 a 8,28 mientras que la cepa *E. coli* CC2.D crece de manera óptima a valores de pH que fluctúan entre 6 y 7. El pH extremo disminuye significativamente la tasa de crecimiento de las células y puede causar la muerte celular (Diaz-Ricci, *et al.*, 1991). El pH es otro factor limitante para el crecimiento celular además del agotamiento de nutrientes y de la acumulación de metabolitos tóxicos. *E. coli* utiliza como azúcares (glucosa y glicerol) como fuentes de carbono, las cuales, producen ácido acético y por lo tanto disminuyen el pH del medio de cultivo (Conner y Kotrola, 1995). Esta explicación se respalda por un estudio realizado por Sezonov, *et al* (2007), donde se utilizó la cepa *E. coli* K12 (cepa de origen *E. coli* MG1655), la cual detuvo su crecimiento en medio LB al alcanzar un pH 9, dando cuenta de que si no se regula el pH este puede causar inhibición en el crecimiento de una cepa.

La composición de los medios complejos tales como el LB es el más utilizado en estudios realizados sobre el crecimiento de la cepa *E. coli*. El medio de cultivo LB es formulado en base a productos enzimáticos (peptona o también llamado triptona), extracto de levadura (contiene ácidos nucleicos, lípidos y otros nutrientes esenciales) y cloruro de sodio. La composición química favorece el crecimiento de la cepa obteniendo mejores rendimientos y productividad en el contenido de CoQ10. Los resultados obtenidos reflejan una velocidad específica de crecimiento de 40% mayor en medio de cultivo LB en comparación con la velocidad específica de crecimiento en medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa que es un medio mínimo que contiene sales minerales y como fuente de carbono glucosa.

Para el cultivo de *E. coli* CC2.D a nivel biorreactor, con respecto a la cinética de crecimiento a distintas velocidades de agitación para ambos medios, se obtuvieron valores diferentes de velocidad específica de crecimiento a 300 rpm en ambos medios de cultivo ( $0,40 \text{ h}^{-1}$  medio de cultivo M9 + 4g/L de glucosa y  $0,25 \text{ h}^{-1}$  en medio de cultivo LB). Por otra parte se obtuvieron valores similares operando el biorreactor a una velocidad de agitación de 600 rpm tanto para la fermentación en medio de cultivo LB como en medio de cultivo M9 + 4 g/L de glucosa, se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento de  $0,30 \text{ h}^{-1}$  y  $0,31 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. En tanto que, bajo una velocidad de agitación de 900 rpm, trabajando en medio de cultivo LB como en medio de cultivo M9 + 4 g/L de glucosa, se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento de  $0,39 \text{ h}^{-1}$  y  $0,40 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. Además se ha reportado en un estudio realizado por Zahiri, *et al* (2006), el cual dice que al utilizar un medio de cultivo LB a 700 rpm con modalidad de cultivo por lote se ha alcanzado una velocidad específica de crecimiento de  $0,35 \text{ h}^{-1}$ , estudio el cual se asemeja a los resultados obtenidos para el cultivo de *E. coli* CC2.D a escala biorreactor.

Al analizar el contenido de CoQ10 a 300, 600 y 900 rpm para el medio M9 se obtuvieron valores similares, lo mismo ocurre para el medio de cultivo LB (Figura 4.2). Por lo tanto, la velocidad de agitación en el rango estudiado, no afecta de manera significativa en el contenido de CoQ10, no así el medio de cultivo a utilizar, el cual, si afecta sobre el contenido de CoQ10. Esto quiere decir que influye la composición de los medios de cultivo ya que, como se mencionó anteriormente, el medio LB es un medio complejo que aumenta la tasa de crecimiento de la cepa *E. coli* CC2.D. Estos resultados concuerdan con el reporte hecho por Li, *et al* (2013), donde utilizó una cepa de *E. coli* BL21 en medio de cultivo LB a distintas

velocidades de agitación, concluyendo que al aumentar la velocidad de agitación el contenido de CoQ10 tiende a un aumento leve, a medida que aumenta gradualmente la velocidad de agitación.

La evolución de la TOD y de VTO en los cultivos celulares demostró que el crecimiento bacteriano solo fue limitado por oxígeno a una velocidad de agitación de 300 rpm en medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa. La VTO en esta condición subió durante un periodo de tiempo corto de 2 horas. Bajo condiciones de limitación de oxígeno, el oxígeno disuelto no se acumula, lo que implica que la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) es equivalente a la VTO. Por otra parte a una velocidad de agitación de 600 y 900 rpm se mantiene en un valor aproximadamente constante durante la fermentación no bajando de un valor de 80% de TOD.

Los resultados observados de TOD en medio de cultivo LB no presentan limitaciones por oxígeno durante el cultivo celular en las velocidades de agitación estudiadas, a 300 rpm la TOD baja hasta un valor aproximadamente de 20%, en comparación con las velocidades de agitación más altas que no hay tanta variación de la TOD. Algunos reportes han demostrado que la producción de CoQ10 tiende a aumentar a bajas condiciones de aireación, tanto en *R. radiobacter* y *R. sphaeroides* (Kuratsu, *et al.*, 1984; Choi, *et al.*, 2005; Ha, *et al.*, 2007b). En el caso del contenido de CoQ10 en cepas mutantes como es el caso de *A. Tumefaciens*, la producción de CoQ10 se aumentó cuatro veces al reducir las concentraciones de oxígeno disuelto de 20% a 5% (Choi, *et al.*, 2005). Estos resultados muestran que los niveles de OD deben mantenerse bajo para aumentar el contenido de CoQ10.

El uso de *E. coli* como huésped para la producción de CoQ10 ofrece varias ventajas, incluyendo la capacidad para optimizar rutas metabólicas y condiciones experimentales que juegan un importante papel en aumentar la producción de CoQ10. En esta investigación hemos tratado de buscar las mejores condiciones de cultivo y operacionales (temperatura y velocidad de agitación). El objetivo principal fue aumentar el contenido de CoQ10 en la cepa *E. coli* CC2.D. Sin embargo al comparar con los resultados obtenidos del estudio realizado por Cluis, *et al* (2011) el contenido de CoQ10 son muy parecidos a pesar que se realizaron distintos ensayos con los distintos medios de cultivo y distintas condiciones de operacional a nivel matraz y biorreactor. Por otro lado, al comparar el valor obtenido de CoQ10 con las cepas productoras nativas, el valor sigue siendo inferior a los productores naturales como *A.*

*tumefaciens* que producen 11,84 mgCoQ10/g célula utilizando una modalidad de lote alimentado (Ha, *et al.*, 2008).

Al comenzar el cultivo en biorreactor con medio de cultivo LB, aproximadamente a la 5 horas de cultivo se controló el pH mediante la adición de HCl. Es probable que el incremento del pH sea resultado de la liberación de amonio al medio extracelular, provocando una disminución de la masa celular. Por otro lado en el medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa disminuyó su pH a las 5 horas desde el inicio del cultivo, se controló con la adición de 2N de NaOH, el medio tendió a la acidificación, y se observa en la figura 4.6 que las concentraciones de ácido acético se fueron aumentando en el transcurso de la fermentación a las distintas velocidades de agitación estudiadas.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIÓN**

Mediante este proyecto fue posible discernir la mejor temperatura a nivel matraz para favorecer la producción de CoQ10. La temperatura que mayor contenido de CoQ10 se logró alcanzar, fue a 37°C, observando que el medio de cultivo tiene un efecto sobre el contenido de CoQ10.

Al aumentar la velocidad de agitación a nivel biorreactor se observó que la mayor acumulación de contenido de CoQ10 se produce en el medio de cultivo LB, donde la velocidad de agitación no es un factor preponderante sobre los valores obtenidos. Por lo tanto el medio de cultivo a utilizar influye sobre el contenido de CoQ10.

En ambas experiencias realizadas a nivel matraz y a nivel biorreactor se obtuvieron mayores valores de la biomasa y del contenido de CoQ10 en medio de cultivo LB, siendo este el medio de cultivo más apropiado para nuevos estudios con la cepa *E. coli* CC2.D para la producción de CoQ10.

## **CAPÍTULO 7**

### **RECOMENDACIONES**

A pesar de utilizar un medio de cultivo definido y complejo no se realizó un análisis de la distribución del carbono, cuya fuente de carbono era la glucosa. Se recomienda realizar la ruta del carbono para saber con claridad donde se emplea el carbono en la producción de metabolitos.

Considerando que la producción del contenido de CoQ10 en la modalidad de lote sigue siendo bajo su valor en comparación con productores naturales, se recomienda trabajar con otra modalidad de cultivo como lote alimentado, el cual se ha evidenciado un aumento de la producción de CoQ10 en cepas modificadas.

Para futuros estudios, se recomienda hacer control de la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de la CoQ10 en la cepa *E. coli* CC2.D, utilizando distintos medios de cultivo o medios de cultivo enriquecidos con compuestos como el glicerol, succinato, entre otros. La razón por la que se recomienda hacer este control con respecto a los genes es porque se ha evidenciado que utilizar ciertos medios de cultivo limitan la expresión de genes que están involucrados en la ruta de biosíntesis de CoQ10.

## CAPÍTULO 8

### REFERENCIAS

Bekker, M., G. Kramer, A. Hartog, M. Wagner, C. De Koster, K. Hellingwerf and M. T. de Mattos. 2007a. Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology*. 153(6): 1974-1980.

Bekker, M., G. Kramer, A. F. Hartog, M. J. Wagner, C. G. de Koster, K. J. Hellingwerf and M. J. Teixeira de Mattos. 2007b. Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology*. 153(6): 1974-1980.

Borekova, M., J. Hojerova, V. Koprda and K. Bauerova. 2008. Nourishing and health benefits of coenzyme Q10-a review. *Czech journal of food sciences*. 26(4): 229-241.

Brondijk, T., D. Fiegen, D. Richardson and J. Cole. 2002. Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation. *Molecular microbiology*. 44(1): 245-255.

Bule, M. V. and R. S. Singhal. 2009. Use of carrot juice and tomato juice as natural precursors for enhanced production of ubiquinone-10 by *Pseudomonas diminuta* NCIM 2865. *Food Chemistry*. 116(1): 302-305.

Choi, J.-H., Y.-W. Ryu and J.-H. Seo. 2005. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. *Applied microbiology and biotechnology*. 68(1): 9-15.

Choi, J.-H., Y.-W. Ryu, Y.-C. Park and J.-H. Seo. 2009a. Synergistic effects of chromosomal *ispB* deletion and *dxs* overexpression on coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* gene. *Journal of Biotechnology*. 144(1): 64-69.

Choi, J.-H., Y.-W. Ryu, Y.-C. Park and J.-H. Seo. 2009b. Synergistic effects of chromosomal *ispB* deletion and *dxs* overexpression on coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* gene. *Journal of biotechnology*. 144(1): 64-69.

Cluis, C. P., A. M. Burja and V. J. Martin. 2007. Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. *Trends in biotechnology*. 25(11): 514-521.

Cluis, C. P., A. Ekins, L. Narcross, H. Jiang, N. D. Gold, A. M. Burja and V. J. J. Martin. 2011. Identification of bottlenecks in *Escherichia coli* engineered for the production of CoQ10. *Metabolic Engineering*. 13(6): 733-744.

Conner, D. E. and J. S. Kotrola. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1): 382-385.

Diaz-Ricci, J., L. Regan and J. Bailey. 1991. Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*. 38(11): 1318-1324.

Dieu Ndikubwimana, J. d. and B. Lee. 2014. Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q10. *Biotechnology Letters*. 36(10): 1917-1926.

Ernster, L. and G. Dallner. 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1271(1): 195-204.

Evans, C., D. Herbert and D. Tempest. 1970. *Micro-organisms. Methods in microbiology*. 2: 277.

Galpern, W. R. and M. E. Cudkowicz. 2007. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion*. 7: S146-S153.

Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*. 27(2): 153-176.

Ha, S.-J., S.-Y. Kim, J.-H. Seo, D.-K. Oh and J.-K. Lee. 2007. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(5): 974-980.

Ha, S.-J., S.-Y. Kim, J.-H. Seo, W.-I. Sim, H.-J. Moon and J.-K. Lee. 2008. Lactate increases coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(6): 887-890.

Jeya, M., H.-J. Moon, J.-L. Lee, I.-W. Kim and J.-K. Lee. 2010. Current state of coenzyme Q10 production and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(6): 1653-1663.

Kawamukai, M. 2002. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of bioscience and bioengineering*. 94(6): 511-517.

Kawamukai, M. 2009. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnology and applied biochemistry*. 53(4): 217-226.

Kayser, A., J. Weber, V. Hecht and U. Rinas. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology*. 151(3): 693-706.

Kim, S.-J., M.-D. Kim, J.-H. Choi, S.-Y. Kim, Y.-W. Ryu and J.-H. Seo. 2006. Amplification of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase level increases coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 72(5): 982-985.

Klößner, W. and J. Büchs. 2012. Advances in shaking technologies. *Trends in biotechnology*. 30(6): 307-314.

Kuratsu, Y., M. Sakurai, H. Hagino and K. Inuzuka. 1984. Aeration-Agitation Effect on Coenzyme Q10. Production by *Agrobacterium species*. *Journal of fermentation technology*. 62(3): 305-308.

Lass, A. and R. S. Sohal. 1998. Electron Transport-Linked Ubiquinone-Dependent Recycling of  $\alpha$ -Tocopherol Inhibits Autooxidation of Mitochondrial Membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 352(2): 229-236.

Lenaz, G., R. Fato, G. Formiggini and M. L. Genova. 2007. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*. 7, Supplement(0): S8-S33.

Li, J. 2013. Culture Conditions affect the Category and Production of Ubiquinones in a Recombinant *Escherichia coli* with an Exogenous Decaprenyl Diphosphate Synthase. Maxwell Science Publication.

Li, J., Z. Yuanyuan, X. Mingquan and L. Xiaochun. 2013. Culture Conditions Affect the Category and Production of Ubiquinones in a Recombinant *Escherichia coli* with an Exogenous Decaprenyl Diphosphate Synthase. Maxwell Science Publication.

Lipshutz, B. H. 2004. Strategies and Tactics in Organic Synthesis; Volume 4. pp. 269-292. Academic Press.

Liu, J.-F., Z.-J. Zhang, A.-T. Li, J. Pan and J.-H. Xu. 2011. Significantly enhanced production of recombinant nitrilase by optimization of culture conditions and glycerol feeding. *Applied microbiology and biotechnology*. 89(3): 665-672.

Lu, W., Y. Shi, S. He, Y. Fei, K. Yu and H. Yu. 2013. Enhanced production of CoQ10 by constitutive overexpression of 3-demethyl ubiquinone-9 3-methyltransferase under tac promoter in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemical Engineering Journal*. 72(0): 42-47.

Martin, S. F., I. Burón, J. C. Espinosa, J. Castilla, J. M. Villalba and J. M. Torres. 2007. Coenzyme Q and protein/lipid oxidation in a BSE-infected transgenic mouse model. *Free Radical Biology and Medicine*. 42(11): 1723-1729.

Medline Plus. Coenzima Q-10. En: Medline Plus sitio oficial. Referido el 02 de Marzo 2015. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/938.html>.

Meganathan, R. 2001. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 203(2): 131-139.

Mellors, A., L. Tappel, L. Sawant and D. Desai. 1967. Mitochondrial swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation by lysosomes *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 143(2): 299-309.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3): 426-428.

Nowicka, B. and J. Kruk. 2010. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1797(9): 1587-1605.

Park, Y.-C., S.-J. Kim, J.-H. Choi, W.-H. Lee, K.-M. Park, M. Kawamukai, Y.-W. Ryu and J.-H. Seo. 2005. Batch and fed-batch production of coenzyme Q10 in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Applied microbiology and biotechnology*. 67(2): 192-196.

Parmar, S. S., A. Jaiwal, O. P. Dhankher and P. K. Jaiwal. 2013. Coenzyme Q10 production in plants: current status and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*.(0): 1-13.

Qiu, L., H. Ding, W. Wang, Z. Kong, X. Li, Y. Shi and W. Zhong. 2012. Coenzyme Q10 production by immobilized *Sphingomonas sp.* ZUTE03 via a conversion–extraction coupled process in a three-phase fluidized bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 50(2): 137-142.

Soballe, B. and R. K. Poole. 1997. Aerobic and anaerobic regulation of the ubiCA operon, encoding enzymes for the first two committed steps of ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS letters*. 414(2): 373-376.

Soballe, B. and R. K. Poole. 2000. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 146(4): 787-796.

Sohal, R. S. and M. J. Forster. 2007. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion*. 7: S103-S111.

Takahashi, S., Y. Ogiyama, H. Kusano, H. Shimada, M. Kawamukai and K.-i. Kadowaki. 2006. Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant. *FEBS Letters*. 580(3): 955-959.

Tian, Y., T. Yue, J. Pei, Y. Yuan, J. Li and Y. M. Lo. 2010a. Effects of cell lysis treatments on the yield of coenzyme Q10 following *Agrobacterium tumefaciens* fermentation. *Food Science and Technology International*. 16(2): 195-203.

Tian, Y., T. Yue, Y. Yuan, P. K. Soma, P. D. Williams, P. A. Machado, H. Fu, R. J. Kratochvil, C.-i. Wei and Y. M. Lo. 2010b. Tobacco biomass hydrolysate enhances coenzyme Q10 production using photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresource Technology*. 101(20): 7877-7881.

Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G. 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1660(1), 171-199.

Uden, G. 1988. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their fnr-independent expression. *Archives of microbiology*. 150(5): 499-503.

Wallace, B. and I. Young. 1977. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli* . Studies with a ubiA menA double quinone mutant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 461(1): 84-100.

Wissenbach, U., A. Kröger and G. Uden. 1990. The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*. 154(1): 60-66.

Yoshida, H., Y. Kotani, K. Ochiai and K. Araki. 1998. Production of ubiquinone-10 using bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*. 44(1): 19-26.

Yoshida, Y., M. Hayakawa, Y. Habuchi and E. Niki. 2006. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q in vivo by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1760(10): 1558-1568.

Zahiri, H. S., K. A. Noghabi and Y. C. Shin. 2006. Biochemical characterization of the decaprenyl diphosphate synthase of *Rhodobacter sphaeroides* for coenzyme Q10 production. *Applied microbiology and biotechnology*. 73(4): 796-806.

Zhang, D., B. Shrestha, Z. Li and T. Tan. 2007. Ubiquinone-10 production using *Agrobacterium tumefaciens* dps gene in *Escherichia coli* by coexpression system. *Molecular biotechnology*. 35(1): 1-14.

Zhu, J., T. Egawa, S. R. Yen, L. Yu and C. A. Yu. 2007. Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome bL during ubiquinol oxidation in cytochrome bc1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(12): 4864-4869.

## CAPÍTULO 9

### ANEXOS

#### 9.1. Anexo A: Procedimiento para preparación de stock celular

- Inocular 10 mL de medio Luria Bertani (LB) más 50 mg/mL de ampicilina, con una colonia de *E. coli* CC2.D.
- Crecer a 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm durante toda la noche.
- Centrifugar a 10000 rpm por 5-10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 0,5 mL de medio LB (sin antibiótico).
- Agregar 0,5 mL de solución de glicerol.
- Agitar y almacenar a -80°C en tubo eppendorf o criovial.

##### 9.1.1. Solución de glicerol

- Glicerol 65% (v/v).
- 0,1 M MgSO<sub>4</sub>.
- 0,025 M Tris-HCl a pH 8 (se puede utilizar base Tris ajustando pH con HCl).
- Esterilizar por filtración.

##### 9.1.2. Solución stock de ampicilina

- 50 mg/mL en agua desionizada.
- Esterilizar por filtración en filtros de 0,22 µm.
- Almacenar a -20°C, en tubos eppendorf.

## 9.2. Anexo B: Preparación de medio de cultivo LB, Agar y Ampicilina

El medio de cultivo LB- Agar está formado por la siguiente composición:

**Tabla 9.1.:** Medio de cultivo LB-Agar

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar-Agar	15

La concentración final de la ampicilina en la placa de Petri es de 100 mg/L.

### **9.3. Anexo C: Metodología cuantificación de biomasa**

#### **9.3.1. Curva de calibrado**

- Se tomó una muestra de cultivo en la fase de crecimiento exponencial y se realizaron diluciones para obtener absorbancias en el rango óptimo de medición comprendido entre 0,1 y 0,8.
- Se midió la absorbancia a la longitud de onda de 600 nm.
- Las muestras tomadas (3 por cada matraz) de 30 mL. Se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min.
- Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con solución de NaCl 25 mM. Este procedimiento se realizó dos veces.
- Se resuspendió el pellet con una pequeña cantidad de solución de NaCl 25 mM y se colocó en capachos de aluminio previamente secados a 105°C durante 24 horas y pesados.
- Se secó hasta un peso constante y se calculó su concentración.
- Se presentó gráficamente los valores de absorbancia versus concentración celular y se consideró solo el rango lineal.

#### **9.3.2. Determinación de la concentración celular de cultivo**

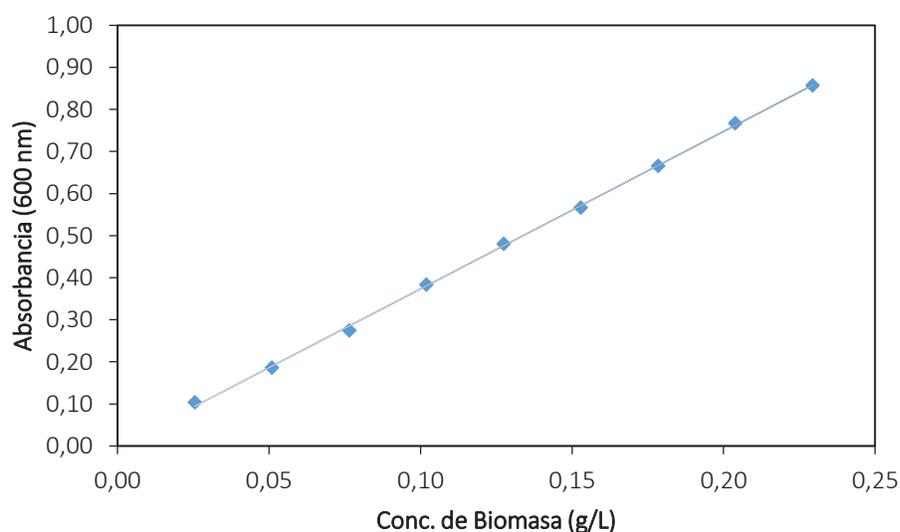
- Se tomó una muestra de cultivo y se diluyó de tal forma que los valores de absorbancia estuvieron comprendidos en la zona lineal de la curva de calibrado.
- Se interpoló la concentración utilizando la curva de calibrado previamente realizada.

## 9.4. Anexo D: Curvas de calibrado de biomasa

Se realizaron 3 curvas de calibrado para la determinación de biomasa (g/L) de cada medio de cultivo, donde se utilizaron tres espectrofotómetros con las mismas condiciones para analizar la repetibilidad de los resultados. Los espectrofotómetros utilizados corresponden a las siguientes marcas Shimadzu, Hanon, Unico.

### 9.4.1. Espectrofotómetro marca UV mini-1240 V en medio de cultivo LB

En la Figura 9.1 se muestra la curva de calibrado de biomasa de *E. coli* CC2.D realizada por duplicado, se utilizó medio de cultivo Luria Bertani (LB) a 37°C. Las condiciones de operación a pH inicial de 7.0 y la velocidad de agitación a 250 rpm.



**Figura 9.1:** Curva de calibrado para la determinación de biomasa para *E. coli* CC2.D, utilizando como medio de cultivo LB a 37°C, pH 7.0 y una velocidad de agitación de 250 rpm.

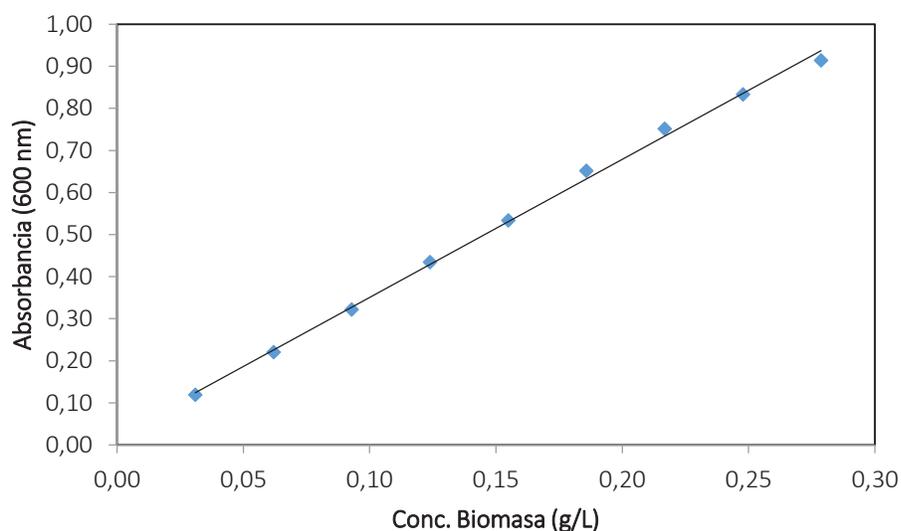
Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 3,7413x - 0,0007$$

$$R^2 = 0,9995$$

#### 9.4.2. Espectrofotómetro marca Unico en medio de cultivo LB

En la Figura 9.2 se muestra la curva de calibrado de biomasa de *E. coli* CC2.D obtenida al utilizar medio de cultivo Luria Bertani (LB) a 37°C. Las condiciones de operación a pH inicial de 7.0 y la velocidad de agitación a 250 rpm.



**Figura 9.2.:** Curva de calibrado para la determinación de biomasa para *E. coli* CC2.D, utilizando como medio de cultivo LB a 37°C, pH 7.0 a una velocidad de agitación de 250 rpm.

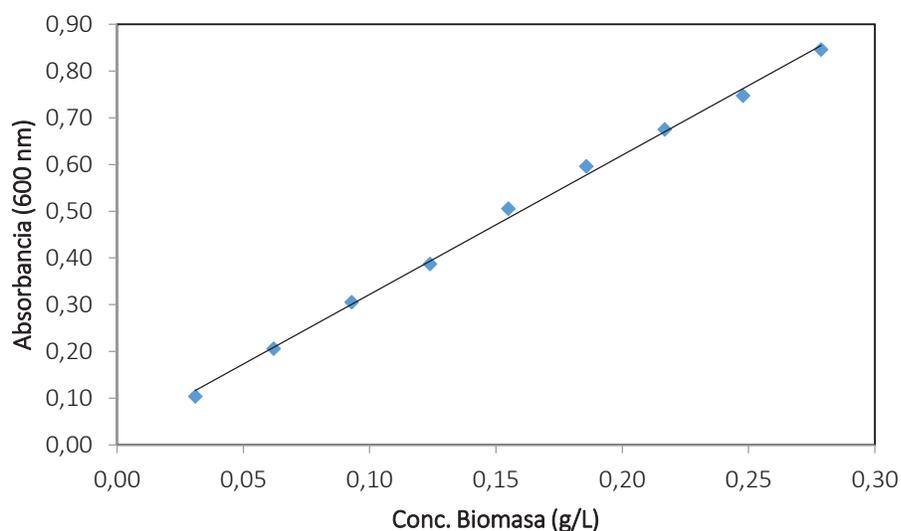
Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 3,2798x - 0,00229$$

$$R^2 = 0,9979$$

### 9.4.3. Espectrofotómetro marca Hanon medio de cultivo LB

En la Figura 9.3 se muestra la curva de calibrado de biomasa de *E. coli* CC2.D, al utilizar medio de cultivo Luria Bertani (LB) a 37°C. Las condiciones de operación a pH inicial de 7.0 y la velocidad de agitación a 250 rpm.



**Figura 9.3.:** Curva de calibrado para la determinación de biomasa para *E. coli* CC2.D, utilizando como medio de cultivo LB a 37°C, pH 7.0 a una velocidad de agitación de 250 rpm.

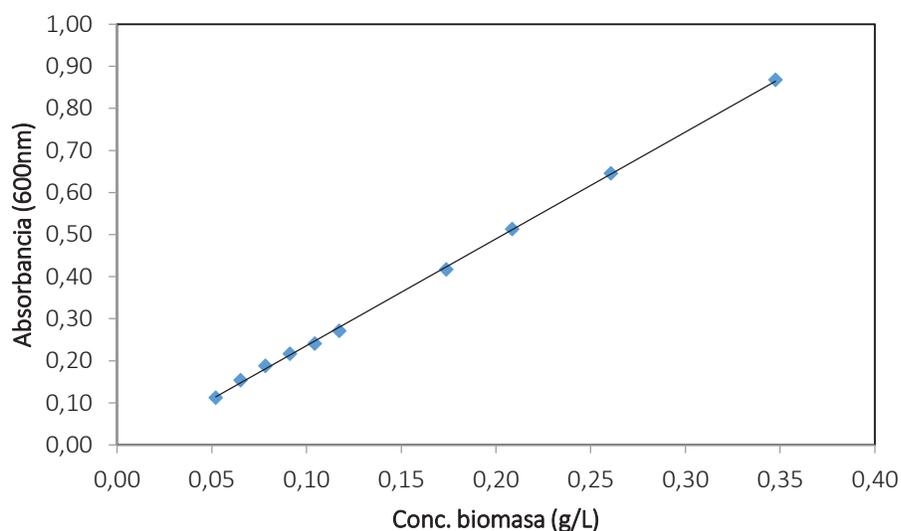
Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 2,981x + 0,0238$$

$$R^2 = 0,9975$$

#### 9.4.4. Espectrofotómetro marca Hanon en medio M9+4 g/L de glucosa

En la Figura 9.4 se muestra la curva de calibrado de biomasa de *E. coli* CC2.D, al utilizar medio de cultivo M9 suplementado con 4 g/L de glucosa a 37°C. Las condiciones de operación a pH inicial de 7.0 y la velocidad de agitación a 250 rpm.



**Figura 9.4.:** Curva de calibrado para la determinación de biomasa para *E. coli* CC2.D, utilizando como medio de cultivo M9+ 4g/L de glucosa a 37°C, pH 7.0 a una velocidad de agitación de 250 rpm.

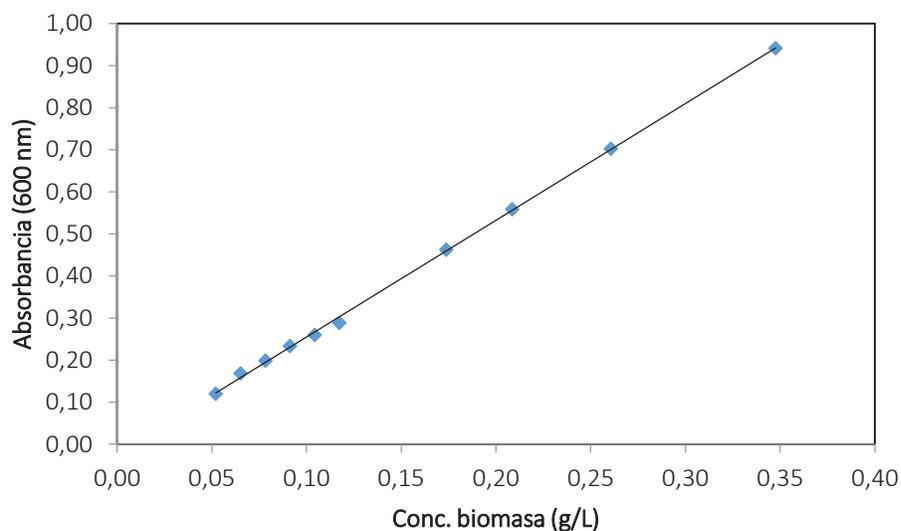
Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 2,5412x - 0,00186$$

$$R^2 = 0,9995$$

#### 9.4.5. Espectrofotómetro marca Único en medio M9+4 g/L de glucosa

En la Figura 9.5 se muestra la curva de calibrado de biomasa de *E. coli* CC2.D al utilizar medio de cultivo M9 suplementado con glucosa a 37°C. Las condiciones de operación a pH inicial de 7.0 y la velocidad de agitación a 250 rpm



**Figura 9.5.:** Curva de calibrado para la determinación de biomasa para *E. coli* CC2.D, utilizando como medio de cultivo M9 + 4g/L de glucosa a 37°C, pH 7.0 a una velocidad de agitación de 250 rpm.

Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 2,7736x - 0,0226$$

$$R^2 = 0,9994$$

## **9.5. Anexo E: Metodología de cuantificación de glucosa**

### **9.5.1. Preparación del reactivo DNS**

- En un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada se disolvieron 1,6 g de NaOH.
- Luego se disolvieron 30 g de tartrato de sodio de potasio.
- Se calentó con agitación y se agregó lentamente 1 g de ácido dinitrosalicílico.
- Una vez frío se aforó a 100 mL con agua destilada.
- Se almacena protegido de la luz hasta análisis.

### **9.5.2. Construcción de curva de calibrado**

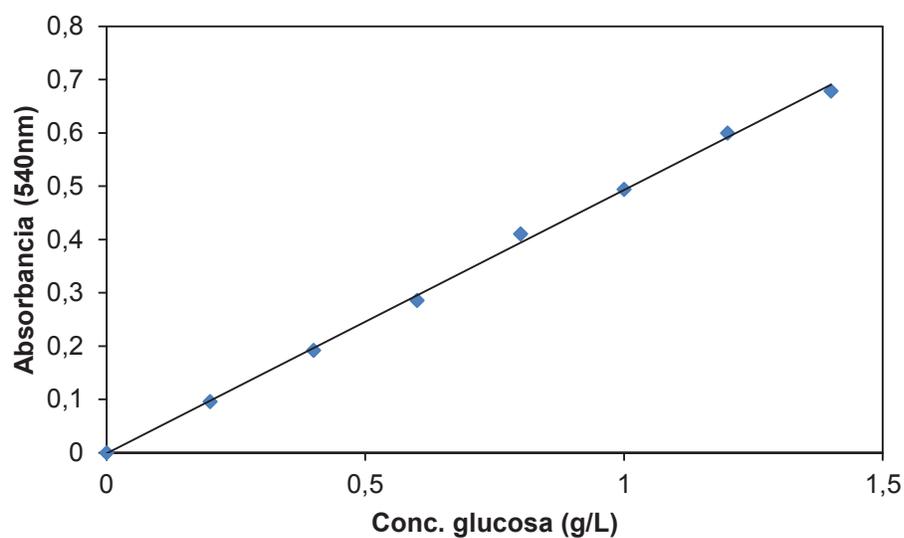
- Se preparó una solución estándar de glucosa de 2 g/L.
- En tubos de ensayo con tapa rosca se mezcló 1 mL de solución estándar de glucosa con 1 mL de reactivo DNS.
- Se colocaron los tubos tapados en baño a ebullición por 5 min.
- Se enfrió en baño con hielo y se agregaron 10 mL de agua destilada.
- Se dejó reposar unos minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. El blanco que se utilizó fue agua destilada.
- Se representó gráficamente la absorbancia versus concentración de glucosa (Figura 9.6).

### **9.5.3. Procedimiento para determinación de azúcares reductores**

- Se tomó un volumen de 1 mL de muestra.
- Se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 5 min.
- Se separa y almacena el sobrenadante en tubo de eppendorf de 2 mL a 4°C hasta su medición.
- Luego se mezcló 1 mL del sobrenadante (diluído) con 1 mL de reactivo DNS.
- Se siguió el procedimiento anterior descrito y, posteriormente, se interpoló el valor de la concentración a través de los valores obtenidos de absorbancia utilizando el gráfico de la curva patrón.

#### 9.5.4. Curva de calibrado del DNS

En la Figura 9.6 se muestra la curva de calibrado para la glucosa.



**Figura 9.6.:** Curva patrón para la determinación de azúcares reductores por método del DNS utilizando glucosa.

Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 0,4941x - 0,0012$$

$$R^2 = 0,9986$$

## **9.6. Anexo F: Metodología de análisis de ácidos orgánicos**

### **9.6.1. Curva de calibrado de los ácidos orgánicos**

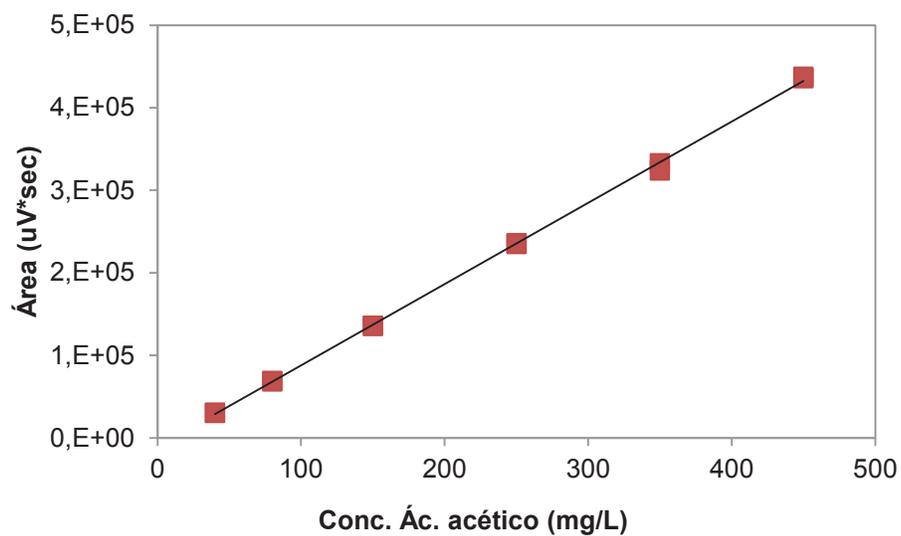
- Se preparó una solución de los ácidos (acético, láctico, fórmico, fumárico, oxálico, pirúvico y succínico) del patrón estándar de concentración de 600 mg/L.
- Se realizaron diluciones seriadas con agua miliQ, para obtener una curva de calibrado de concentraciones de 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 mg/L.
- Luego se graficó concentración v/s área (uV\*sec).

### **9.6.2. Condiciones cromatográficas**

- Temperatura de trabajo a 35° C.
- Fase Móvil (condiciones isocráticas) Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5 mM.
- Flujo de trabajo es de 0.6 ml/min.
- Detección por UV 215 nm.
- Volumen de inyección de 20 µL.
- Presión de 750 psi.
- Tiempo de Metodología 33 minutos.

### 9.6.3. Curvas de calibrado del ácido acético

En la Figura 9.7 se muestra la curva de calibrado del ácido acético.



**Figura 9.7.:** Curva de calibrado del ácido acético.

Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 984,12x - 104666$$

$$R^2 = 0,9994$$

## **9.7. Anexo G: Metodología para la preparación de la curva de calibrado de CoQ10 en HPLC**

### **9.7.1. Curva de calibrado de CoQ10**

- Se preparó una muestra estándar de CoQ10 (marca Merck) de 164 mg/L en etanol grado HPLC.
- La muestra estándar se diluyó en tubos eppendorf en las siguientes concentraciones: 2; 4; 6; 10; 14; 18; 20; 40 y 60 mg/L.
- Se agregó etanol grado HPLC hasta aforar los 100 mL.
- Se filtraron las muestras con filtros estériles de 0,22  $\mu\text{m}$ , antes de ser ingresadas a los viales.
- Se grafica en concentración de CoQ10 mg/L versus área ( $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ ).
- Luego se determinó el tiempo de retención correspondiente a la CoQ10.

### **9.7.2. Determinación de la cantidad de CoQ10 en las muestras**

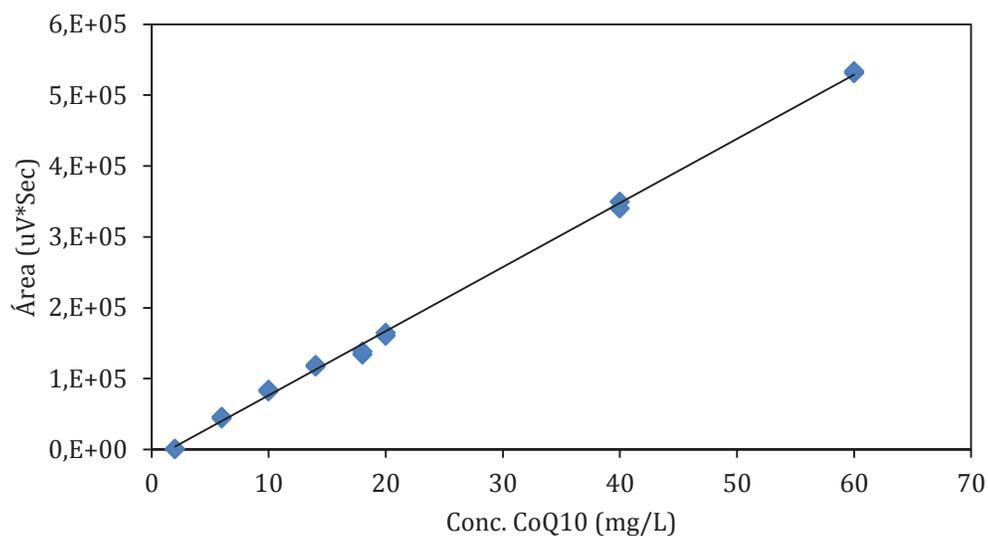
- Se resuspendió la muestra seca con 500  $\mu\text{l}$  de etanol grado HPLC, se agitó durante 2 minutos medidos por temporizador. Posteriormente se midió en HPLC.

### **9.7.3. Condiciones cromatográficas**

- Temperatura de trabajo de la columna a 25°C.
- Fase móvil (condiciones isocráticas) etanol y metanol a una proporción de 70/30.
- Flujo de trabajo es de 1 mL/min.
- Detección por UV.
- Longitud de onda es de 273 nm.
- Volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ .
- Presión de 1350 psi.
- Tiempo de metodología es de 15 min.
- El método encontrado en el software de coenzima Q, indica que el etanol debe situarse en el canal A y el metanol en el canal B.

#### 9.7.4. Curva de calibrado de CoQ10

En la Figura 9.8 se muestra la curva de calibrado para CoQ10.



**Figura 9.8.:** Curva de calibrado para CoQ10 (a 25°C, con flujo de trabajo de 1 mL/min, fase móvil etanol y metanol en proporción de 70/30)

Tras la realización de una regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$y = 9048,5x - 14233$$

$$R^2 = 0,9984$$