

Mishel Yelitza Porras Ariza

Directora

MSc. Carla Cárdenas Bustos

Codirector

PhD. Luis Humberto Reyes

PhD. Diego Camilo Pradilla

Facultad de Ingenierías y Arquitectura

Programa de Ingeniería Química

**PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO POLYGLY Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES INTERFACIALES Y EMULSIFICANTES**

Mishel Yelitza Porras Ariza

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Ingeniero Químico**

Directora

MSc. Carla Cárdenas Bustos

Codirector

PhD. Luis Humberto Reyes

PhD. Diego Camilo Pradilla

Línea de Investigación:

Biología molecular, diseño de productos y procesos



TABLA DE CONTENIDO

IMPACTOS	4
OBJETIVO GENERAL	5
<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	5
PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO POLYGLY Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES INTERFACIALES Y EMULSIFICANTES	6
<i>RESUMEN</i>	6
1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	7
2. <i>MATERIALES Y METODOS</i>	12
2.1. Materiales.	12
Producción recombinante del péptido PolyGly a partir de <i>Escherichia coli</i>	12
2.2. Producción de la expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	12
2.3. Preparación de lisado de <i>E. coli</i> clarificado usando condiciones no desnaturalizantes.	13
2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio (tricina-SDS-PAGE).	14
Determinar los factores como mecanismo de lisis celular, concentraciones de buffers y el tiempo de elución que influyen en la purificación del péptido mediante cromatografía por afinidad.	15
2.5. Purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de presión media de proteínas marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.	15
2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio (tricina-SDS-PAGE) para purificación del péptido mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).	16
2.7. Modificaciones adicionales para mejorar la cromatografía.	17
Evaluación experimental de la actividad interfacial y emulsificante del péptido PolyGly en el sistema agua/decano.	17
2.8. Medición de tensión interfacial del péptido usado como surfactante en el sistema agua/decano.	17
2.9. Elaboración de emulsiones y medición de la estabilidad.	18
3. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	20
3.1. Obtención de las proteínas recombinantes expresadas en <i>E. Coli</i>	20
3.2. Purificación del péptido mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).	22
3.3. Purificación del péptido mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).	26
3.4. Western blot	27
3.5. Tensión interfacial y estabilidad en emulsiones.	33
4. <i>CONCLUSIONES</i>	42
<i>Referencias Bibliográficas</i>	43



IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO
Científico	<p>Al obtener un biosurfactante capaz de reducir la tensión interfacial de origen biológico, se espera que sirva de construcción y aporte al conocimiento de la generación estudiantil e investigaciones futuras.</p> <p>Documento de trabajo de grado de pregrado de ingeniería química.</p>	<p>Comunidad científica</p> <p>Grupo de investigación de diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes.</p> <p>Grupo de investigación de la Universidad de Pamplona.</p>
Tecnológico	<p>Obtención de un surfactante de origen biológico.</p>	<p>Grupo de investigación de diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes.</p> <p>Grupo de investigación de la Universidad de Pamplona.</p>
Ambiental	<p>Efectividad en la actividad interfacial usando los péptidos previamente diseñados para posible aplicaciones en emulsiones.</p> <p>Posiciona al biosurfactante en un mercado demandado por contaminantes.</p>	<p>A futuro beneficiara industrias petroquímica, farmacéutica, cosmética y alimentaria.</p>
Social	<p>Profesional en ingeniería química.</p>	<p>Comunidad científica,</p> <p>Sociedad colombiana.</p>



OBJETIVO GENERAL

Producción de un péptido a partir de *Escherichia coli* recombinante (polyGly) y evaluación de sus propiedades emulsificantes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Producción recombinante del péptido polyGly a partir de *Escherichia coli*.

Determinar los factores como mecanismo de lisis celular, concentraciones de buffers y el tiempo de elución que influyen en la purificación del péptido mediante cromatografía por afinidad.

Evaluar experimentalmente la actividad interfacial y emulsificante del péptido polyGly en el sistema agua/decano.



PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO POLYGLY Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES INTERFACIALES Y EMULSIFICANTES

RESUMEN

La producción de biosurfactantes representa una alternativa en la elaboración de productos más ambientalmente amigables, pues son moléculas tensioactivas obtenidas a base biológica. En este estudio, se evaluó la actividad emulsificante experimental de un péptido diseñado en un estudio previo elaborado en la Universidad de los Andes, en el que mediante un diseño racional basado en propiedades como la polaridad, estabilidad, conformaciones, perfiles de densidad de masa, orientaciones, energía de interacción y otras propiedades de los aminoácidos, a partir de dinámica molecular (MD) se seleccionó al péptido PolyGly con una de las secuencias con mejor capacidad de estabilizar emulsiones, para facilitar su posterior producción y purificación a nivel macroscópico. Para ello se realizó una producción recombinante del péptido, se purificó mediante cromatografía por afinidad y exclusión por tamaño, se liofilizó y se evaluó su estabilidad y tensión interfacial en la interfaz agua/decano. Debido a la adición de una cadena que codifica 16 aminoácidos en el diseño inicial del plásmido, el péptido pasó de pesar 3,72 kDa a 5,37 kDa; este aumento generó un cambio en la propiedades del péptido, aumentando la hidrofobicidad, generando inestabilidad emulsificante y carencia de concentración micelar crítica; sin embargo, exhibió una disminución en la tensión interfacial de 4,64 mN/m para la solución más concentrada (39,65 g/L) mediante el método de gota pendiente.

Palabras clave: Biosurfactante, *Escherichia coli*, péptido emulsificante, producción recombinante, tensión interfacial.

PURIFICATION OF THE POLYGLY PEPTIDE AND ASSESSMENT OF ITS INTERFACIAL AND EMULSIFYING PROPERTIES

ABSTRACT

The production of biosurfactants represents an alternative in the elaboration of more environmentally friendly products, since they are surfactant molecules obtained on a biological basis. In this study, the experimental emulsifying activity of a peptide designed in a previous study developed at the Universidad de los Andes was evaluated, in which through a rational design based on properties such as polarity, stability, conformations, mass density profiles, Orientations, interaction energy and other properties of amino acids, from molecular dynamics (MD), the PolyGly peptide was selected with one of the sequences with the best ability to stabilize emulsions, to facilitate its subsequent production and purification at the macroscopic level. For this, a recombinant production of the peptide was carried out, it was purified by affinity chromatography and size exclusion, it was lyophilized and its stability and interfacial tension at the water / decane interface were evaluated. Due to the addition of a chain encoding 16 amino acids in

the initial plasmid design, the peptide went from weighing 3.72 kDa to 5.37 kDa; This increase generated a change in the properties of the peptide, increasing hydrophobicity, generating emulsifying instability and lack of critical micellar concentration; however, it exhibited a decrease in interfacial tension of 4.64 mN / m for the more concentrated solution (39.65 g / L) by the sloping drop method..

Keywords: Biosurfactant, *Escherichia coli*, emulsifying peptide, recombinant production, interfacial tension.

1. INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son compuestos orgánicos conformados por dos partes químicas con diferentes polaridades, un grupo de cabeza con afinidad por las fases polares y un grupo de cola que es atraído por las fases no polares (Figura 1) (Pal et al., 2019; Tehrani-Bagha, 2016; Zhang et al., 2019). Por tanto, estos son solubles tanto en agua como en disolventes orgánicos (Kang et al., 2020). Debido a su particular estructura, los tensioactivos tienen la capacidad de adsorberse en superficies o interfaces, modificando su balance energético (Cosgrove, 2010; Kronberg et al., 2014; Van Hamme et al., 2006), y tienden a cambiar la tensión superficial/interfacial entre dos líquidos inmiscibles, actuando como emulsificantes, desemulsificantes, detergentes, dispersantes, espumantes y agentes humectantes (Tripathy et al., 2018). Según su grupo de carga, los tensioactivos (o anfífilos) se pueden caracterizar como zwitteriónicos (carga neta cero), no iónicos (sin carga), aniónicos (carga negativa) y catiónicos (carga positiva) (Yoshii et al., 2016).

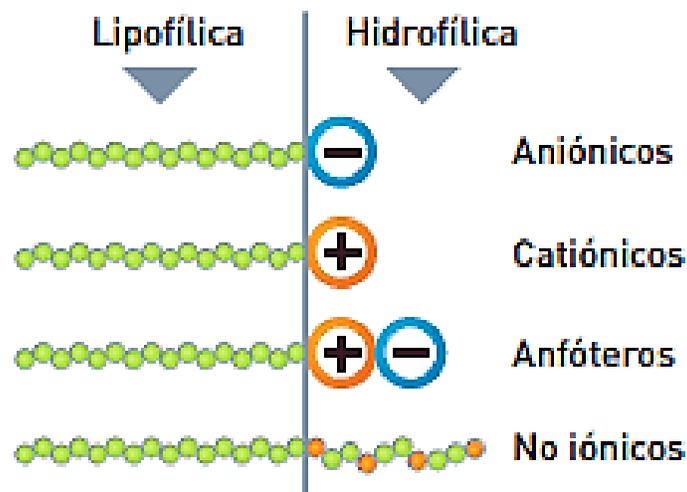


Figura 1. Clasificación de los tensioactivos (Yoshii et al., 2016).

Los tensioactivos naturales, renovables o biosurfactantes son moléculas anfifílicas producidas por organismos vivos (principalmente microorganismos) y proveedores de propiedades y características que los hacen posibles suplentes de los tensioactivos sintéticos (Henkel & Hausmann, 2019) y al ser ambientalmente seguros y biodegradables, los convierten en aspirantes interesantes para aplicaciones que



abarcen desde la cosmética hasta la recuperación de aceites (Jahan et al., 2020). En sus más variadas aplicaciones se utilizan para describir una diversidad de moléculas recombinantes, que, en conjunto, suman aproximadamente 2000 sustancias anfifílicas diferentes de origen biológico (Z. Liu et al., 2017); pues estas moléculas anfifílicas se prefieren a sus homólogos petro-químicos debido a su biodegradabilidad, baja toxicidad y eficiencia en condiciones extremas de temperatura y pH (Jahan et al., 2020). La naturaleza anfifílica de los tensioactivos los hace adecuados para su uso en numerosos productos industriales, incluidos medicamentos (Clarke et al., 1993; Torchilin, 2001), inhibidores de la corrosión para proteger el acero y otros metales corrosivos (El Achouri et al., 2001; Elachouri et al., 1995; Hegazy et al., 2010; Qiu et al., 2008), detergentes (Kang et al., 2020; Yada et al., 2019), desemulsionantes (Abdulraheim, 2018; Atta et al., 2018), agentes humectantes (Alexandrova et al., 2017), potenciadores de la recuperación de aceite (Howe et al., 2015; Nourafkan et al., 2018; Zhao et al., 2018), depresores del punto de fluidez (El Mehad, 2017; Gu et al., 2018), y formulaciones farmacéuticas (Steinhilber et al., 2013; Weiszhar et al., 2012).

Los biosurfactantes se dividen en aquellos que reducen la tensión interfacial y superficial, que son tensioactivos de bajo peso molecular; y los de alto peso molecular, que son agentes estabilizadores de emulsiones (Khan et al., 2015), se conoce que los péptidos más eficaces son los de peso molecular medio entre 1.000 y 4.000 Da (Montoya, 2004). La estructura y composición de cada molécula individual depende en gran medida de este efecto combinado de bioactividad y actividad interfacial (Henkel & Hausmann, 2019). Existe una amplia diversidad de microorganismos productores distribuidos en los más variados géneros, los cuales son los responsables de producir biosurfactantes con una diversidad estructural y funcional sobresaliente, abarcando diversas especies de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, (Gupta et al., 2019) donde sus pesos moleculares pueden oscilar entre 500 y 1500 Da (Van Hamme et al., 2006). En cuanto a la composición química, algunas de las clases existentes de biotensioactivos de bajo peso molecular son glicolípidos (ramnolípidos, trehalolípidos, soforolípidos y celobiolípidos), ácidos grasos, lipopéptidos, policétidoglucósidos y ácido espiculispórico (Henkel & Hausmann, 2019), mientras que los tensioactivos de alto peso molecular comprenden tensioactivos poliméricos (Domínguez Rivera et al., 2019) y lipoproteínas (surfactina, gramicidinas, serrawettina, viscosina y subtilisina) de origen microbiano (K. Liu et al., 2020; Van Hamme et al., 2006; Ward, 2010).

La elaboración de biosurfactantes mediante microorganismos se destaca por el poco tiempo de producción resultante de un ciclo de crecimiento más corto en comparación con plantas y animales, haciendo de los tensioactivos microbianos una de las principales alternativas para posibles exploraciones comerciales (Lang, 2002). En anteriores investigaciones se ha reportado el comportamiento de biosurfactantes de bajo y alto peso molecular de origen microbiano, estos se adsorben espontáneamente en varias interfaces y se auto ensamblan en solución acuosa, lo que da como resultado propiedades fisicoquímicas útiles como disminución de la tensión superficial e interfacial, baja concentración micelar crítica (CMC) y capacidad para solubilizar compuestos hidrófobos (Jahan et al., 2020).

La *Escherichia coli* (Figura 2) es la primera opción para la expresión de muchas proteínas heterólogas debido al vasto conocimiento sobre su genética, bioquímica y biología molecular (Green & Sambrook, 2012). Entre las ventajas que este microorganismo brinda como hospedero están, mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos; fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento a diferencia de las células de organismos superiores; existencia de gran variedad de vectores de expresión estables (Choi et al., 2006;

Jonasson et al., 2002), y por su rápido crecimiento se ha convertido en la plataforma de expresión más popular para la producción de proteínas recombinantes (Rosano & Ceccarelli, 2014). Uno de los objetivos de la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es maximizar la productividad. Se pueden alcanzar altos rendimientos volumétricos y específicos después de una cuidadosa selección de las cepas de expresión y la optimización de los parámetros de cultivo. Cabe destacar que más de 30.000 proteínas recombinantes se han expresado y purificado con éxito usando *E. coli* (Green & Sambrook, 2012)

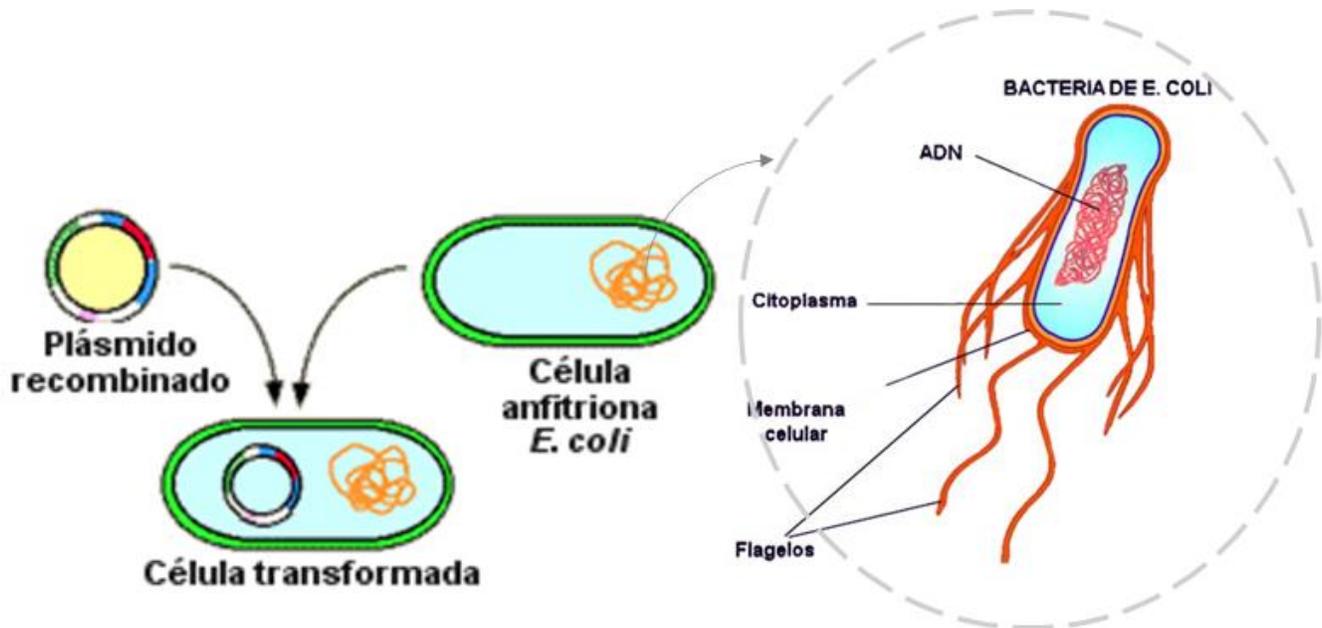


Figura 2. Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante (García et al., 2013).

Los sistemas de expresión heterólogos permiten la modificación de la proteína para optimizar la expresión, el análisis mutacional de sitios específicos dentro de la proteína y facilitar su purificación con etiquetas de afinidad diseñadas donde se requiere un alto grado de purificación de la proteína (Green & Sambrook, 2012). Los procedimientos de producción de péptidos y proteínas pequeñas, que normalmente comprenden la sobreexpresión de proteínas recombinantes o la síntesis química, son un desafío (Kent, 1988); pues, en comparación con la síntesis química (Andersson et al., 2000), los métodos de producción recombinante enfrentan dificultades en razón al tamaño naturalmente pequeño del péptido/proteína y la presencia de residuos altamente cargados dentro del péptido/proteína provocan una susceptibilidad a las proteasas presentes en la plataforma de expresión del huésped (Itakura et al., 1977; Kim et al., 2014; Li, 2011). La sobreexpresión de estas moléculas con específicamente una etiqueta de afinidad de mayor peso molecular es un enfoque prometedor porque le da al péptido/proteína pequeña una mayor estabilidad y una mayor resistencia proteolítica (Tang et al., 1997). El uso de proteínas recombinantes podría ser una mejor manera de obtener péptidos controlados genéticamente (Cai et al., 1998). Por estas razones, la producción de proteína recombinante es el método preferido, más expandible y viable para biomoléculas, especialmente si los péptidos tienen más de 25 aminoácidos (Rodríguez et al., 2014; Yin et al., 2012).

Pérez Bejarano et al. (2021) construyó un sistema de simulación con el paquete GROMACS (versión 2018.3) donde evaluó la actividad interfacial de diecisiete péptidos racionalmente diseñados frente a la del surfactante Tween 20® a nivel molecular. En este manuscrito se propuso estudiar la efectividad como surfactantes para reducir considerable la tensión interfacial de un sistema conformado por agua y un hidrocarburo. Para esta investigación el hidrocarburo seleccionado fue el decano, por tratarse de un alcano de cadena lineal sin ramificaciones; estas características facilitan la simulación gracias a que al no existir enlaces complicados se reducen en gran medida los tiempos de simulación (Pérez Bejarano et al., 2021). Usando simulaciones de dinámica molecular, dos de estos péptidos diseñados (Surf-UAC1, Surf-UAC2), presentaron resultados favorables mostrando que la metodología proporcionó datos precisos de tensión interfacial para la interfaz decano-agua, ya que se encuentra un error relativo del 2,5% entre las simulaciones MD y los datos experimentales. Posteriormente, Pérez Bejarano et al. (2021) llevo a cabo un diseño in-silico de los péptidos en base a las polaridades de los aminoácidos y otras propiedades fisicoquímicas para obtener moléculas con diferentes índices de hidropatía; además beneficiándose de su polaridad, en el diseño incluyo en el último tramo de su fase hidrofílica una etiqueta de poli histidina de seis residuos para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad.

El péptido Surf-UAC2 (denominado como PolyGly) diseñado por Pérez Bejarano et al. (2021) tiene como objetivo esquematizar experimentalmente la estructura de un tensioactivo, para ello definieron tres secciones en el péptido. Primero, un área hidrofóbica (resaltado con naranja en la Figura 3) compuesto por aminoácidos no polares capaces de interactuar a través de sus cadenas alifáticas con la fase oleaginosa del sistema interfacial. En segundo lugar, un área hidrófila (resaltado en azul en la Figura 3) compuesto por aminoácidos polares capaces de interactuar a través de enlaces de hidrógeno con la fase hidrófila del sistema interfacial. Finalmente, una sección de enlazadores flexibles (resaltados con blanco en la Figura 3) que mantiene una adecuada separación entre las áreas hidrofílicas/hidrofóbicas propiciando la formación de un péptido más estable y bioactivo (Chen et al., 2013). Adicionalmente, añadieron tres monómeros de los enlazadores flexibles más utilizados para el diseño de polipéptidos y proteínas de fusión (Argos, 1990; Rodríguez et al., 2014) en medio de las secuencias de aminoácidos del péptido: $(GGGGG)_3$, otorgando una polaridad intermedia a esta sección.

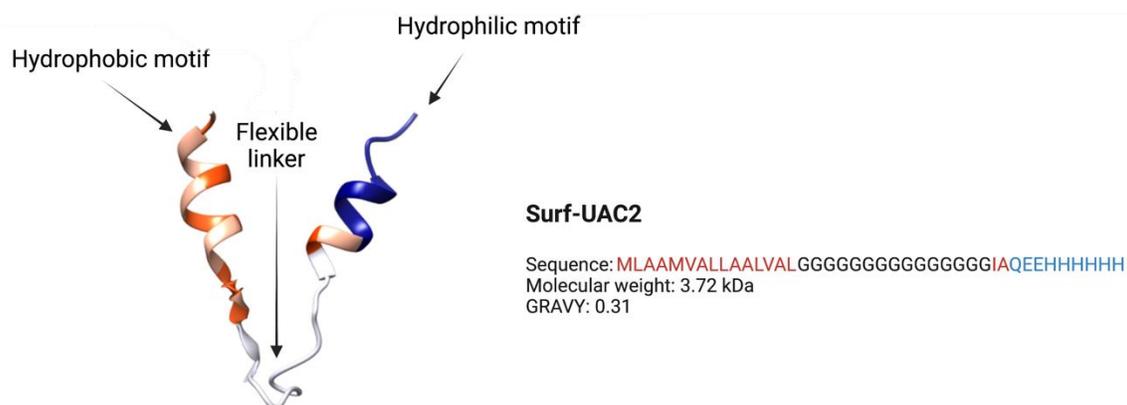


Figura 3. Estructura secundaria del péptido PolyGly (Surf-UAC2) (Pérez Bejarano et al., 2021). Los colores se muestran de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982): Azul para los más hidrófilos, blanco para enlazadores, y naranja para los más hidrófobos.

En el diseño racional Pérez Bejarano et al. (2021), estableció que el péptido no tendrían una secuencia de aminoácidos extensa, ya que se ha observado que estructuras complejas de aminoácidos como las proteínas se denaturan rápidamente al interactuar con interfaces o superficies (D'Imprima et al., 2019; Yano, 2012; Zhai et al., 2013) perdiendo sus propiedades funcionales (Xiong, 1997). De esta manera, el péptido está compuesto por 41 aminoácidos de los cuales predominan la glicina (G), alanina (A), histidina (H), leucina (L), y para el caso de la metionina (M), valina (V), ácido glutámico (E), la isoleucina (I) y la glutamina (Q), cada una de ellas proporcionar una carga neta de $-2e$.

Como se ha descrito previamente, el péptido PolyGly, posee una cola de seis histidinas ubicadas en el extremo N-terminal de la proteína (Pérez Bejarano et al., 2021). Esta etiqueta de poli-histidina permite su unión específica a una fase estacionaria (David S. Hage, 2005) que contiene cationes divalentes (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) (Soltaninasab et al., 2022) inmovilizados por agentes quelantes (ácido iminodiacético (IDA), ácido nitriloacético (NTA), ácido aspártico carboximetilado (CM-ASP)) (Bornhorst & Falke, 2000; Owczarek et al., 2019) en la resina de la columna de afinidad. El agente que se inmoviliza se conoce como como "ligando de afinidad" presente en la fase estacionaria, y junto a el grupo imidazol presente en His-tag (residuos de la cola de histidinas) (Maria Del R. Rocha Pizasa, 2005) forma un complejo de coordinación que da como resultado la alta selectividad de proteínas con residuos de histidina agrupados que se retienen fuertemente sobre un soporte cromatográfico poroso (Alfred Nobel, 2000). Este tipo particular de purificación de proteínas recombinantes con tag de histidina se denomina cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), generalmente usado con columnas de Ni^{2+} y de ácido iminodiacético (IDA) como el ligando quelante en este caso (Figura 4).

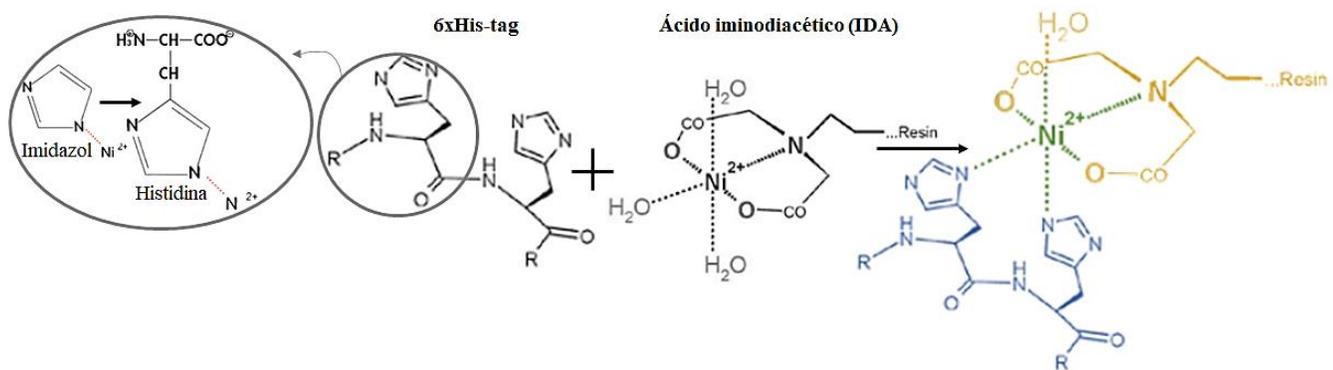


Figura 4. Purificación de proteínas usando etiquetas de afinidad de poli histidina en Níquel- ácido iminodiacético (Ni^{2+} -IDA). Esquema de unión de 2 residuos de histidina presentes en la cola de 6xHis conjugado a la fase estacionaria (presentada en azul). El ion de níquel (Ni^{2+}) está unido entre la etiqueta de proteína His y la molécula de IDA (presentado en verde). El agente quelante (molécula de IDA) está unido al soporte sólido en la columna (presentado en naranja).

Debido al reciente interés en reemplazar los emulsionantes de origen petroquímico por bioemulsionantes, se decide apuntar a la fabricación de productos derivados de recursos renovables por sus grandes beneficios que incluyen biodegradabilidad, respeto al medio ambiente y buen desempeño en condiciones extremas (Tao et al., 2019). Además, las materias primas de petróleo están disminuyendo progresivamente y es inminente una escasez de este recurso en el futuro; así mismo, la volatilidad de los

precios del petróleo podría, en algunas circunstancias, compensar los altos costos de producción de los biosurfactantes. En términos de modelo de negocio, incluso considerando las diferencias de costes de producción y el impacto sobre el cambio climático, los clientes premium están dispuestos a pagar un precio más alto por productos de base biológica que proceden de industrias con certificación ecológica (Hayes & Smith, 2019). Por estas razones, la producción de bioemulsionantes es una industria emergente necesita más atención e investigación (Smith & Ierapeprou, 2010).

La selección y diseño de péptidos como emulsionantes viables presenta algunas ventajas sobre otras biomoléculas. En primer lugar, tienen un tamaño molecular más pequeño y, por lo tanto, su rendimiento puede entenderse y predecirse más fácilmente y, en segundo lugar, debido a que los péptidos están formados por bloques de aminoácidos, tienden a ajustarse fácilmente a necesidades específicas mediante la adición, sustracción o sustitución de estos, permiten la manipulación de péptidos en la interfaz O / W (Ricardo et al., 2021).

Teniendo en cuenta la capacidad de los péptidos diseñados por Pérez Bejarano et al. (2021) para adsorber y disminuir la tensión interfacial de las interfaces fluido-fluido. Este estudio tiene como objetivo producir, purificar y evaluar la actividad interfacial, la estabilidad en emulsiones, la energía de interacción del péptido PolyGly de 41 aminoácidos y compararla con la del surfactantes Tween 20® en la interfaz decano-agua.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales.

Los reactivos ampicilina, NaCl, extracto de levadura, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 imidazol, $NiCl_2$, etanol, ácido acético glacial, ácido fosfórico, dodecil sulfato de sodio (SDS), NaOH, glicerol, glicina, Coomassie Brilliant Blue, glutaraldehído, Tris-base, y tricina se adquirieron en *JT Baker Chemicals*®. Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) en *OMNI Chemicals*®. Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, beta-mercaptoetanol, y Tween-20 en *Fisher Scientific*®. Resina Sephadex G-25 y resina Profinity™ IMAC y células de expresión en *Thermo Fisher Scientific Inc*®. El péptido PolyGly conjugado con *E. coli* es un producto generado mediante *Benchling* y *Gromacs*.

Producción recombinante del péptido PolyGly a partir de *Escherichia coli*.

2.2. Producción de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli*.

Se elaboró el caldo de Lisogenia (LB) para crecimiento de la bacteria con 5g de triptona, 5g de cloruro de sodio y 2,5g de extracto de levadura aforado a 500 mL con agua extra purificada. Se procedió a elaborar un cultivo en el que se introduce el plásmido que codifica la proteína deseada en una cepa huésped de expresión; es decir, se elaboró un cultivo de 10 mL para desarrollar las células hasta una fase exponencial, que contiene la cepa huésped, en este caso PolyGly, el cual será purificado como péptido, ampicilina y medio para el crecimiento de la bacteria (LB); seguidamente se dejó en una incubadora shaker por aproximadamente 20 horas y se midió la densidad óptica (O.D.) para conocer la concentración celular de

las bacterias con una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Genesys® 10S UV-VIS. Alcanzada esta fase semilogarítmica del crecimiento (O.D.=0.6-0.8), se procedió a la inducción de la expresión proteica recombinante mediante isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), en el que se elaboró un nuevo cultivo de 200 mL agregando 2 mL de este agente inductor además de 200 μ L de ampicilina, un volumen de cultivo de 10 mL dependiente del valor del O.D. y se dejó crecer a las células durante 24 horas a 37 °C con agitación en una incubadora shaker a 250 rpm. Al cumplirse el tiempo, se usó una centrifuga refrigerada para separar el sobrenadante del pellet o solidos sedimentados del cultivo previamente inducido, durante 20 minutos a una velocidad de 4.000 RCF y 4°C. El sobrenadante se desechó y se pesaron los sólidos que quedaron en el fondo como consecuencia de la centrifugación (Alfred Nobel, 2000) (Figura 5).

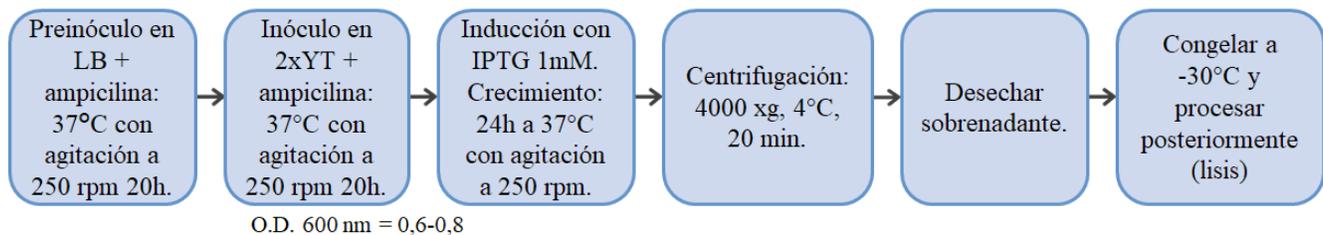


Figura 5. Protocolo para producción heteróloga del péptido PolyGly expresado en *Escherichia coli* (Alfred Nobel, 2000).

2.3.Preparación de lisado de *E. coli* clarificado usando condiciones no desnaturalizantes.

Finalizada la expresión proteica, el sedimento bacteriano obtenido se sometió a diferentes procesos de ruptura y homogenización para la posterior purificación de la proteína. Para ello, el sedimento se resuspendió en una proporción 1:10 (p/v) de buffer de lisis, para a continuación iniciar la ruptura celular (agitador mecánico, agitación con vórtex, y sonicador). La suspensión celular se sometió a ultrasonido cubierto de hielo en todo momento para evitar la degradación de la proteína. Este procedimiento se llevó a cabo mediante 10 ciclos a intervalos de 1 minuto cada uno, donde posteriormente pasó por un baño ultrasonido, cada ciclo de 3 minutos para reducir la producción de espuma generada por la agitación a 15.000 rpm. (Alfred Nobel, 2000). Después de la lisis, se centrifugó la muestra homogenizada a 4.000 RFC durante 20 min a 4 °C para sedimentar los cuerpos en inclusión, y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente se midió la concentración de la proteína usando 2 μ L de sobrenadante en un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral (nanodrop) (Figura 6). Finalmente se utiliza un gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio para obtener una determinación aproximada de la concentración total de la proteína (Alfred Nobel, 2000).

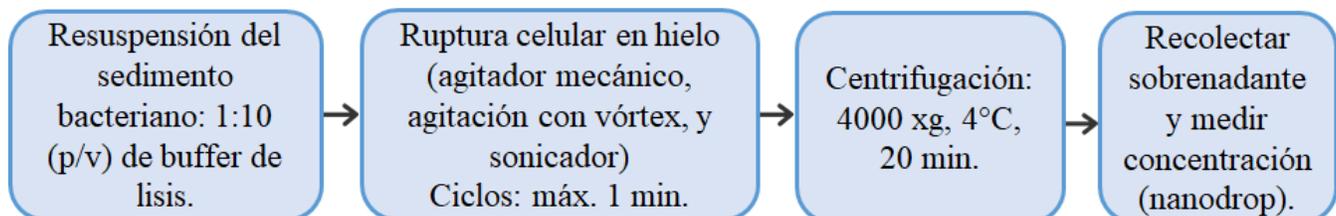


Figura 6. Protocolo para ruptura celular del péptido PolyGly expresado en *Escherichia coli* (Alfred Nobel, 2000).

2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio (tricina-SDS-PAGE).

La separación de proteínas de baja masa molecular (1-30 kDa) o péptidos fragmentados derivados de la digestión enzimática se llevan a cabo en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio (tricina-SDS-PAGE) (Haider et al., 2012). La electroforesis y posteriores procedimientos se realizaron a temperatura ambiente. Se elaboraron los geles teniendo en cuenta que debían poseer un gel de resolución (área de corrida) y un gel de apilamiento (área de concentración donde se aplicaron las muestras). Inicialmente se preparó la mezcla (Agua ultrapura/Tris 2.5M, pH 8.8/Acril:bisacril/APS/TEMED) para el gel de resolución, y se vertió en un sistema de molde con placas de vidrio utilizando un aparato de fundición de mini-gel (Haider et al., 2012) dejando un espacio de 2 cm en la parte superior de las placas del gel, y se esperó 1 hora hasta polimerizarse, se preparó la mezcla (Agua ultrapura/Tris 2.5M, pH 8.8/Acril:bisacril/APS/TEMED) para el gel de apilamiento, se inyectó sobre el gel de resolución polimerizado en el molde del gel, llenando hasta la parte superior del molde y se insertó el peine para crear los pozos de carga. Al cabo de 1 hora de secado, cuando el gel se encontró polimerizado, se retiraron los peines y el sistema de moldes, para luego colocarlos en el conjunto del electrodo. (Bio-Rad Labs, n.d.) Cuando el gel estuvo en condiciones óptimas y polimerizado para usarse se procedió a preparar las todas las muestras que se añadirán en él. Para ello se seleccionan 10 muestras de preferencia su orden en que se incluyen los lisados y el marcador de peso para observar la presencia del péptido PolyGly, cabe destacar que al realizar la electroforesis con estas muestras los geles mostrarán todas las impurezas que posee el lisado ya que no han sido purificadas. Las muestras que se añadieron al gel en la cámara de electroforesis debían poseer 10 μL buffer de carga el cual permitirá el desplazamiento de las proteínas a lo largo de la corrida y 10 μL de muestra lisada, las cuales fueron denaturadas o calentada a 70°C durante 5 min, antes de ser añadidas al gel, además del marcador de peso para estos geles, que fueron calentados a 60°C por 2 minutos. Posteriormente se añaden 20 μL de muestra denaturada en cada pozo del gel y se aplica un voltaje constante de 180 V, es de resaltar que dicha corrida no se puede detener hasta que el frente de corrida toque la parte inferior del gel (Haider et al., 2012).

Terminada la electroforesis se fijó el gel durante 25 min (con agitador) con la solución fijante de glutaraldehído al 5% (v / v), luego de esta fijación se tiñó el gel durante 20 minutos (con agitador) con una solución de tinción de Coomassie Brilliant Blue. Finalmente se realizó la decoloración durante 20 min (utilizando un agitador) con una solución de ácido acético al 10% (v / v) (Haider et al., 2012). Cabe destacar que el tiempo de decoloración de estos geles de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE) recomendado es de 20 min, sin embargo, se han observado mejores resultados dejándolo desteñir durante 24 horas (Figura 7). Después de la decoloración, se visualizaron las bandas de proteína (Haider et al., 2012).

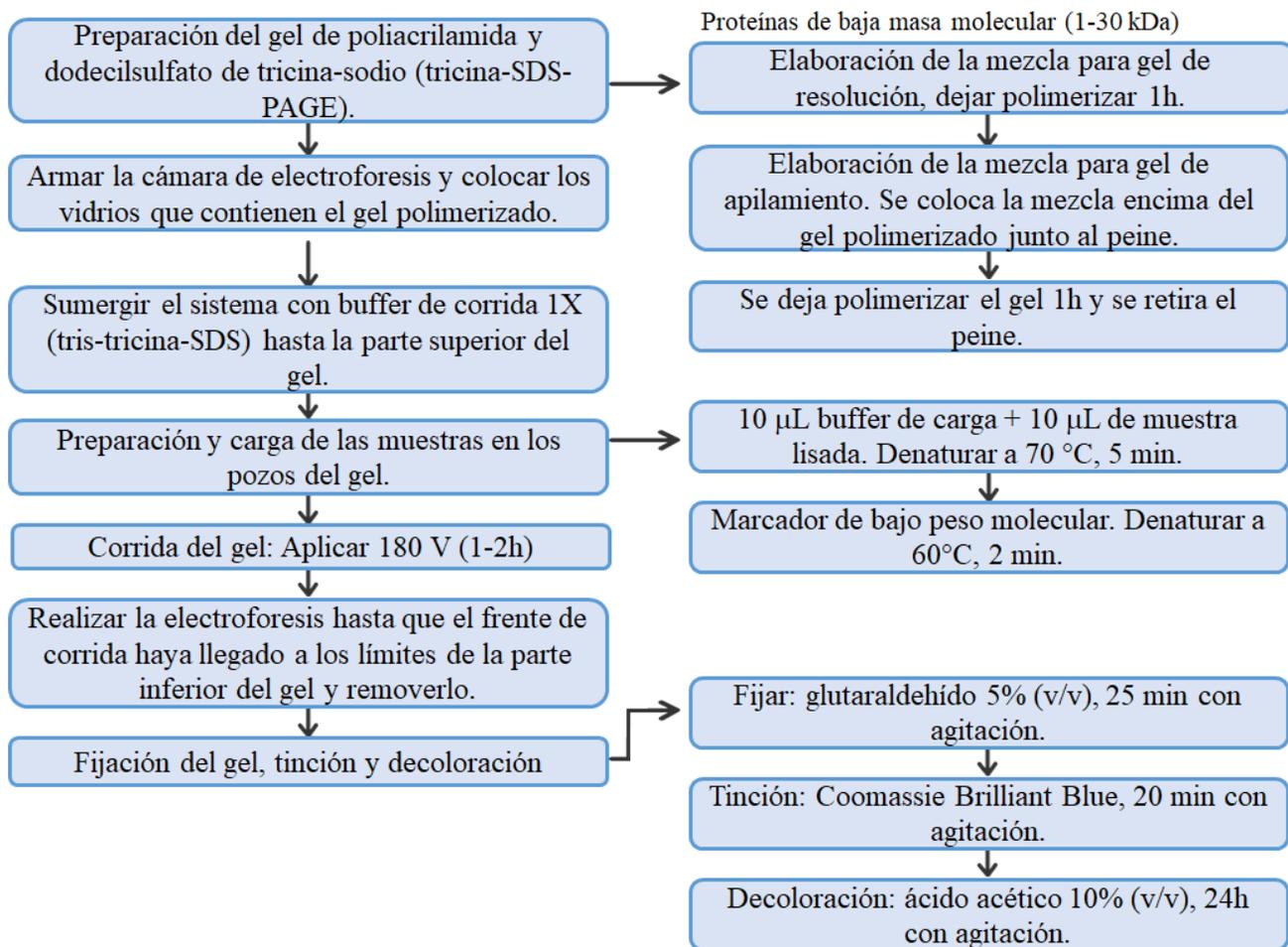


Figura 7. Protocolo para electroforesis de proteínas (Haider et al., 2012).

Determinar los factores como mecanismo de lisis celular, concentraciones de buffers y el tiempo de elución que influyen en la purificación del péptido mediante cromatografía por afinidad.

2.5. Purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de presión media de proteínas marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.

Finalizada la ruptura celular, el sobrenadante de lisado bacteriano se sometió a un proceso de purificación de la proteína. En este método, se usó una columna empaquetada y un gradiente de imidazol para determinar la purificación óptima de proteínas marcadas con His. Para ello, se añadió 1mL de resina de níquel, se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna con buffer de unión, este buffer varió en función de las propiedades de la muestra a purificar. En este caso se elaboró con fosfato de sodio dibásico 50mM como tampón de partida general; además de cloruro de sodio 300 mM, imidazol 5 mM, y se ajustó el pH a 8,0. Se cargó la columna con solución de carga de iones y solución de iones. Este proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad en una columna de resina de níquel incluye dos etapas de purificación en la que se obtienen lavados, con el fin de eliminar impurezas, y eluciones, en la que se

recoge el péptido purificado “sin desechos” pues estos afectarán las mediciones posteriores. Continuando con el proceso, se agregó 2 mL del sobrenadante de lisado bacteriano y se procedió a recoger fracciones de 1 mL donde se lavó la resina con al menos 5 volúmenes de columna de buffer de lavado, este buffer posee bajas concentraciones de imidazol (0-20 mM) ya que al por el ligando de afinidad el cual retiene la proteína objetivo hace que otros componentes de la muestra con poca o ninguna unión se eluyan (David S. Hage, 2005), para eliminar los desechos y mejorar la separación de las proteínas no útiles. Este procedimiento se reiteró hasta conseguir una concentración aproximada a 0 mg/mL de proteínas en la muestra recogida para continuar con las eluciones y liberar la proteína objetivo del ligando de afinidad para su recolección o análisis. Las proteínas se eluyeron usando una alta concentración de imidazol (100-500 mM). Se pueden lograr niveles más altos de pureza optimizando las concentraciones de imidazol, que mejoran la separación de proteínas, estas concentraciones se modifican aleatoriamente para observar los mejores resultados. Las eluciones se llevaron a cabo con 5 a 10 volúmenes de columna de buffer de elución, y se procedió a recolectar entre 5 y 10 fracciones de 1 ml de muestra (Figura 8). Estos lavados y eluciones recolectados se utilizaron posteriormente en una cámara de electroforesis para conocer su efectiva purificación y presencia del péptido deseado, pues en los geles elaborados se debía presenciar el péptido con un peso de 3,7 kDa sí realmente fue purificado con éxito, de no ser así se reitera todo el procedimiento desde la producción del péptido (Alfred Nobel, 2000).

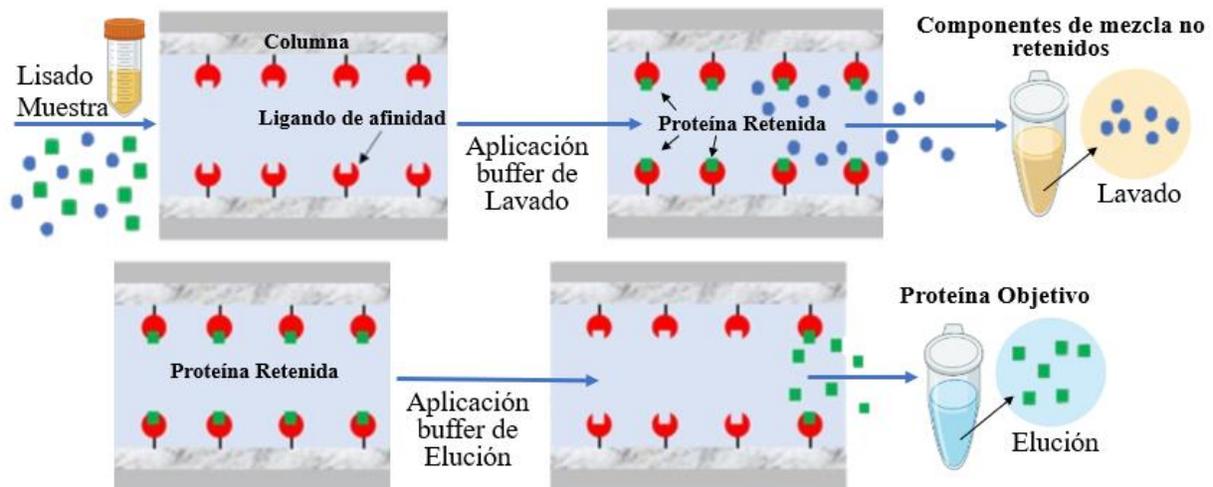


Figura 8. Mecanismo de obtención de la proteína objetivo, mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) de níquel. La que la proteína se une al ligando de afinidad inmovilizado y los componentes de mezcla no retenidos se recolectan como lavados. Luego se pasa una fase móvil fuerte, o buffer de elución, a través de la columna para liberar el objetivo y generar su recolección (Rodríguez et al., 2020).

2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de tricina-sodio (tricina-SDS-PAGE) para purificación del péptido mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

Como se mencionó anteriormente, se debían usar geles de tris-tricina para péptidos y proteínas pequeñas (Bio-Rad Labs, n.d.) y que se debían elaborar los geles con un área de resolución y de apilamiento (ver

sección 2.4). Las mezclas que fueron añadidas al gel se prepararon mezclando 10 μL de la muestra (elución, lavado o lisado) con 10 μL de la mezcla de digestión o buffer de carga, se denaturaron a 70 ° C durante 5. Luego se preparó el marcador de peso y se calentó a 65 ° C durante 2 minutos. Se seleccionaron 9 muestras aleatorias entre lavados y eluciones; se llenó la cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X (tris-tricina-SDS) hasta la parte superior del gel, y se inyectaron las muestras en los pozos del gel además del marcador de bajo peso molecular para esta clase de geles. Se cerró la cámara con la tapa proporcionando aislamiento eléctrico y se aplicó un voltaje constante de 180 V. Cuando se terminó la electroforesis se fijó el gel durante 25 min (con agitador) con la solución fijante de glutaraldehído al 5% (v / v), luego de esta fijación se tiñó el gel durante 20 minutos (con agitador) con una solución de tinción de Coomassie Brilliant Blue. Finalmente se realizó la decoloración durante 20 min (utilizando un agitador) con una solución de ácido acético al 10% (v / v) (Haider et al., 2012). Cabe destacar que el tiempo de decoloración de estos geles de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE) recomendado es de 20 min, sin embargo, se han observado mejores resultados dejándolo desteñir durante 24 horas (Figura 7). Después de la decoloración, se visualizaron las bandas de proteína.

2.7.Modificaciones adicionales para mejorar la cromatografía.

Se evaluaron los posibles errores y modificaciones para el proceso de purificación, descritos de manera más detallada en la sección de discusión. Entre los cambios propuestos, se presentó una alternativa en el método de purificación, pues se realizaron ensayos mediante cromatografía de exclusión por tamaño en columnas de filtración de gel con resina Sephadex TM G-25 (Harvard Apparatus, n.d.), se modificaron los buffers para el lavado, las eluciones y carga de iones en la que se usaba fosfato de sodio dibásico y se cambió por bifosfato de sodio (Alfred Nobel, 2000), la poliacrilamida empleada en la preparación de los geles de tricina-SDS-PAGE, se desechó y se emplearon nuevos reactivos. Con el fin de evitar saturación de impurezas, se realizó una prueba de diálisis para disminuir la cantidad de proteína total de los lisados, y evitar que estos se vieran muy concentrados en los geles; el método de tinción empleado era mediante Coomassie Brilliant Blue, sin embargo como alternativa adicional se realizó una prueba con tinción mediante plata, ya que esta técnica también se utiliza para detectar proteínas después de la separación electroforética en geles de poliacrilamida (Chevallet et al., 2006). Finalmente se realizó un western blot, con el fin de detectar el peso real del péptido ya que por un error en el diseño del plásmido el peso del péptido aumento de 3,7 kDa a 6,5 kDa y por consiguiente se creía que las técnicas utilizadas para purificación y medición no estaban funcionando.

Evaluación experimental de la actividad interfacial y emulsificante del péptido PolyGly en el sistema agua/decano.

2.8.Medición de tensión interfacial del péptido usado como surfactante en el sistema agua/decano.

Después de verificar la pureza del péptido con las bandas de proteína en los geles de (tricina-SDS-PAGE), se liofilizaron las eluciones extraídas de la columna de cromatografía, se determinó la concentración del péptido diluido en 20 mL de agua. Al presentar una concentración muy elevada y solidos suspendidos, se realizaron 5 diluciones en serie a la mitad de concentración cada una, y se midió la tensión interfacial mediante el método de la Gota Pendiente (Figura 9). Una gota de líquido en este caso la dilución de

péptido-agua se dejó suspendida en el extremo de un tubo capilar y se determinó la tensión a partir de la elongación vertical (deformación) que provoca la fuerza de gravedad en decano (Raquel E. Anton, 2005).

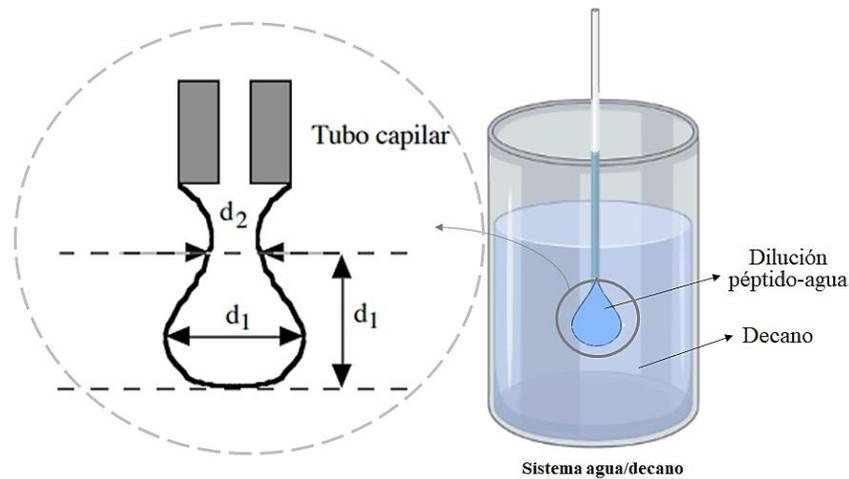


Figura 9. Método de gota pendiente. (Izq.) Parámetros geométricos de la gota; d_1 , diámetro máximo de la gota; d_2 , diámetro de la gota a distancia d_1 de la extremidad de la gota y (Der.) Sistema agua/decano (Raquel E. Anton, 2005).

Cuando se dejó colgar la gota del capilar, se produjo una geometría de equilibrio entre la fuerza de gravedad que tiende a estirar la gota y la fuerza de tensión que tiende a encogerla. La medida de los diámetros d_1 y d_2 definidos en la Figura 9 permite hallar la tensión interfacial mediante los nomogramas de Andreas, Hauser y otros, sin embargo, en este caso las imágenes en forma de gota se capturaron con un tensiómetro óptico PAT-1 y la tensión interfacial en la interfaz agua/decano se calculó mediante el método de análisis de forma de gota simétrica.

2.9. Elaboración de emulsiones y medición de la estabilidad.

Para las emulsiones, se mezclan dos líquidos inmiscibles en un sistema termodinámicamente inestable de gotitas dispersas en una fase continua. Las gotitas se estabilizan con la ayuda de especies tensioactivas, comúnmente denominadas emulsionantes o tensioactivos (Milton J. Rosen & Joy T. Kunjappu, 2004).

Se prepararon emulsiones inversas en un rango de concentraciones en peso de la fase dispersa del 80%, con una cantidad del emulsificante (péptido purificado) de 4% p/p, y el restante de fase continua (decano). Se utilizó un proceso de semi-lotes para la preparación de todas las emulsiones. Primero, se realizó una etapa de homogenización de la fase dispersa (dilución péptido-agua elaboradas previamente); en cuanto a la fase continua se inició con agitación por 2 minutos a 700 rpm. Seguidamente se incorporó la fase dispersa gota a gota en la fase continua, para ello se utilizó una bomba peristáltica Fishel scientific, fijando el caudal de incorporación de 0,1 mL/s. Finalmente, una segunda etapa de homogenización del producto por 8 minutos mediante agitación mecánica a 1400 rpm para permitir una estabilización adecuada del producto. En las etapas de agitación y mezcla, se utilizó un agitador mecánico Dispermat, el cual permitió hacer el seguimiento del torque en función del tiempo (Diego Camilo Pradilla Ragua, 2013).

La caracterización de las emulsiones se realizó al terminar la preparación del producto homogenizado; la emulsión preparada se vertió inmediatamente en tubos especiales del Turbiscan y se programó el equipo para tomar la medida de altura de la fase acuosa separada en el tiempo, la cual se representa gráficamente (Figura 10). Dicha caracterización consistió realizar mediciones de transmisión y retrodispersión (Formulation Turbiscan Lab Analyzer, Francia) a diferentes concentraciones de tensioactivo total para seguir posibles fenómenos de inestabilidad (formación de crema, sedimentación, floculación, coalescencia o separación de fases) (Gomez et al., 2021).

La estabilidad de las emulsiones se estudió monitoreando la velocidad de clarificación en el tiempo o la altura de la fase acuosa clarificada (en mm), en ciclos de 30 minutos para cada emulsión. El funcionamiento de este equipo se basa en la difracción de luz que tiene lugar cuando una suspensión o emulsión es atravesada por un haz de luz infrarroja (880 nm). Este equipo analiza tanto la transmisión (sensores a 180°) como la retrodispersión a 135°, de un haz incidente de fotones, se requieren al menos 20 mL de muestra, sin embrago se utilizó 12,5 mL de emulsión y se introdujo en la cerda cilíndrica especial para este equipo, una vez iniciado el ensayo se produce el barrio periódico de la muestra, desde la base hasta la parte superior de la celda, obteniéndose los perfiles de luz transmitida y difractada en función de la altura de la muestra y con isolíneas de tiempo (Miguel Ángel Suárez Valdés, 2012).

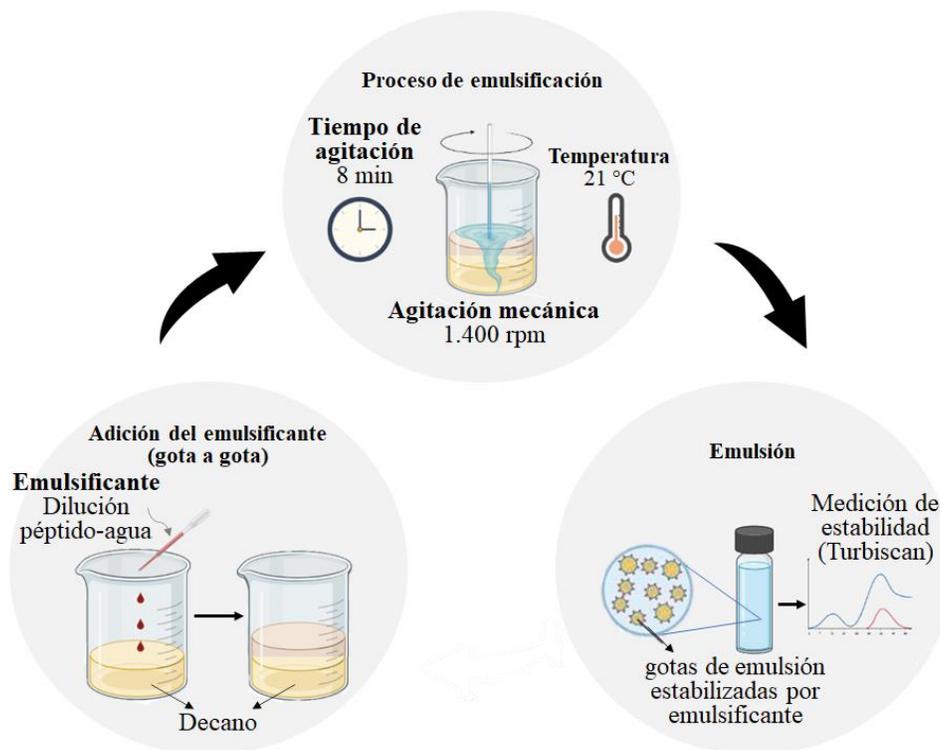


Figura 10. Proceso de emulsificación. Durante la etapa de adición y solubilización del emulsionante, el emulsionante se añade a una de las fases y se disuelve homogéneamente en la solución. A continuación, en la fase de interfaz y alineación de tensioactivo, las moléculas emulsionantes migran a la interfaz y alinean sus restos en función de su afinidad. La reducción de la tensión interfacial permite que la interfaz

se deforme con la ayuda de fuerzas mecánicas. Por último, se forman y estabilizan las gotas de un líquido dentro de la otra, y, por lo tanto, se produce la emulsión final (Ricardo et al., 2021).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de las proteínas recombinantes expresadas en *E. Coli*.

En la producción de la expresión de la proteína recombinante se menciona que se debe añadir un agente inductor para que este inicie la producción del péptido que posteriormente será purificado, en este estudio se elaboró un cultivo con agente inductor para verificar su comportamiento, sin embargo, como su nombre lo indica, un cultivo al no poseer un agente inductor no producirá el péptido, este paso, se realizó con el fin de verificar el correcto crecimiento de la proteína recombinante obteniendo una respuesta favorable. Debido a que como se expresó anteriormente la producción es un procedimiento riguroso y se desean mitigar la mayor cantidad de errores para a continuación realizar una correcta purificación del péptido.

Para la primera prueba, la muestra se lisó con sonicador y revelaron los sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly en un gel convencional de poliacrilamida-SDS. Según el resultado arrojado (Figura 11) se descubrió que era necesario empezar a emplear los gels de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE); debido a que estos de uso convencional únicamente revelan proteínas de peso molecular mayores a 5 kDa (Thermo Fisher Scientific™), resaltando que el peso del péptido deseado es de 3,7kDa. Como se observa en la Figura 11, el gel de poliacrilamida-SDS posee una gran cantidad de bandas, pero con pesos mucho más elevados con respecto al del péptido PolyGly, aunque, este gel, revela en la zona inferior una gran banda en 5 kDa, lo que revela la presencia de una proteína de este peso o menor, no se corroborar con exactitud el peso que marca, por consiguiente, se realizó una nueva prueba de electroforesis, usando un gel de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE) (Figura 12) que revela proteínas desde 1000 Da. Con este gel se obtuvo una banda muy pronunciada con el peso de 14,2 kDa, sin embargo, este valor no es apto para el del péptido PolyGly y se hacen nuevas mediciones únicamente reveladas en gels de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE).

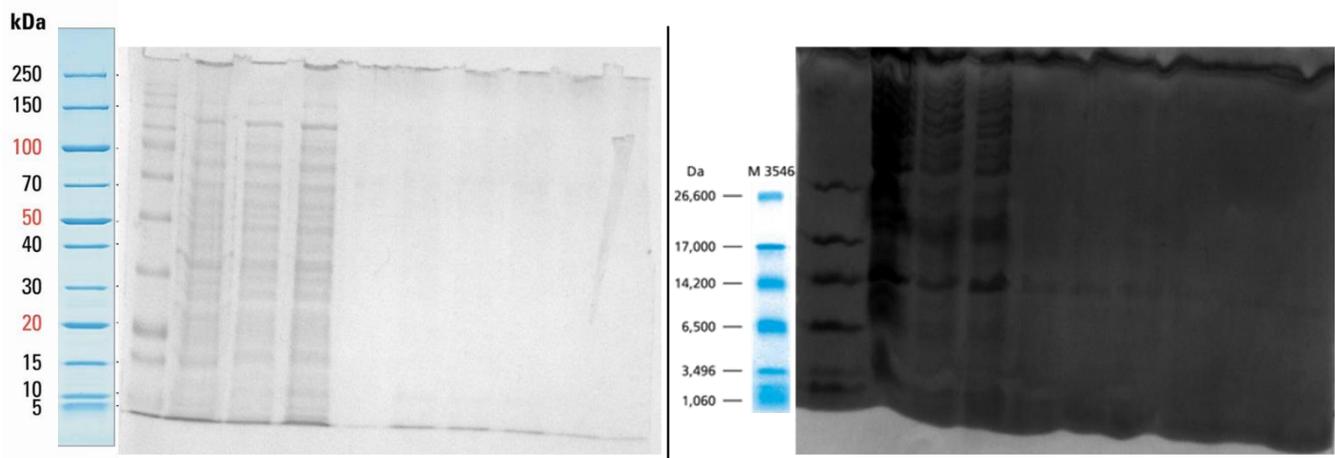


Figura 11. Diferencia visual entre (Izq.) Gel de SDS-PAGE en el que no se observa la presencia del péptido y (Der.) Gel de Tricina-SDS-PAGE, en el cual hay bandas que representa la presencia de una proteína, pero por su peso molecular no hace referencia al péptido PolyGly.

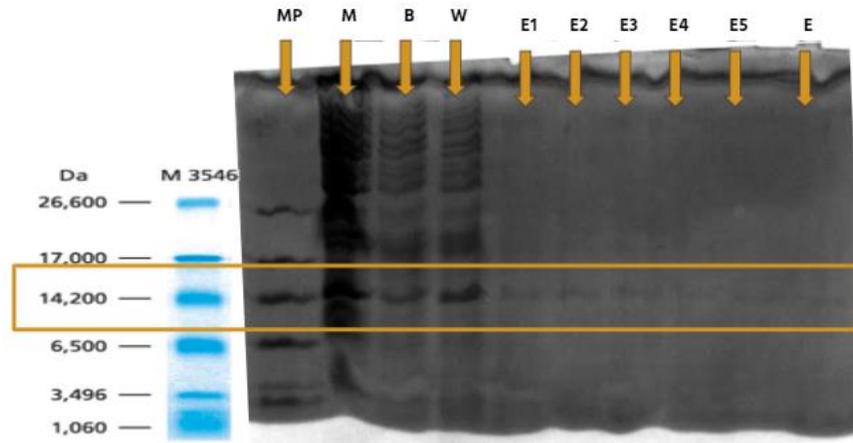


Figura 12. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante en *E. coli* expresada en la cepa PolyGly para la purificación del lisado con sonicador en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carriles 2 y 3, muestra lisada y vinculante, respectivamente; carril 4, lavados (20 mM imidazol); carril 5,6,7,8,9, eluciones 1- 5 respectivamente; carril 10, eluciones 6-10. Se evidencian bandas muy pronunciadas en 14,2 kDa correspondientes a una proteína diferente a la del péptido PolyGly.

Ahora bien, para el segundo caso, se buscó una alternativa de lisado en la que se empezó a implementar un agitador mecánico a 15.000 rpm obteniendo mayor cantidad de proteína total lisada y se realizó la revelación de proteínas en gel de poliacrilamida-(tricina-SDS-PAGE). Se tomó la decisión de utilizar esta velocidad ya que a velocidades más pequeñas no hay una correcta lisis, y a velocidades muy elevadas hay formación de espuma, ocasionando pérdidas en la muestra y si se mantiene por muchos minutos, se desintegra la proteína. Para este caso se recolectaron 10 muestras de lisado, a las cuales se les midió la cantidad de proteína total (tabla 1) presente en cada muestra de lisado mediante un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral, con el fin de verificar la mejoría en el método de lisis.

Tabla 1. Concentración de proteína total (mg/mL) después de lisar con agitador mecánico a 15.000 rpm (nanodrop). Los lisados se acompañan de la letra A, debido a que fue la primer lisis con dispermat a 15.000 rpm y así evitar confusiones con próximas lisis.

Lisado	mg/mL	Muestra en el gel
1A	8,37	-
2A	9,21	4
3A	9,04	7
4A	9,04	6
5A	9,32	3
6A	9,18	5
7A	0,02	-
8A	9,03	8

9A	9,40	2
10A	9,52	1

En cuanto a la medición de la proteína en el gel de Tricina-SDS-PAGE, se evaluaron las mejores 8 muestras con concentración más elevada descritas en la tabla 1, adicionalmente se realizó un lisado utilizando agitación con perlas de vidrio y se añadió en el gel, sin embargo, al medir su concentración total de proteína arrojó un valor de 7, 87 mg/mL, el cual fue muy bajo en comparación a los demás lisados y por consiguiente se descartó este método de lisis. En la Figura 13, se muestra la cantidad de proteína total presente en cada muestra, y se evidencia una gran banda en 6,5kDa para todas las muestras. Lo que confirma el acertado uso del método de agitación mecánica para lisis celular, pues se evidencia gran cantidad de proteína en todo el gel.

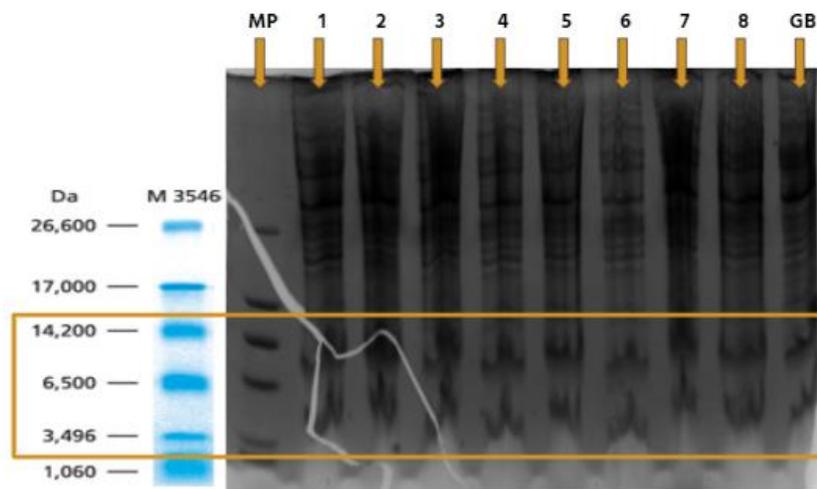


Figura 13. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante de *E. coli* expresada en la cepa PolyGly para lisis con agitador mecánico (15.000 rpm) en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carriles 2,3,4,5,6,7,8,9, sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly (1-8) respectivamente; carril 10, sobrenadante de lisado bacteriano con agitación más perlas de vidrio. Se evidencia la presencia de gran cantidad de proteína en 6,5 kDa.

3.2.Purificación del péptido mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

Teniendo en cuenta la cantidad de proteína total presente en los lisados, se escogió el lisado 4A pues fue el lisado con más cantidad de sobrenadante recolectado y así no se desperdiciaban otros con menor cantidad, para realizar la primera purificación mediante cromatografía por afinidad como se muestra en la Figura 14. Para esta purificación se manejó una concentración de 20mM de imidazol en el buffer de lavado, esto con el fin de evitar que las proteínas contaminantes no etiquetadas se unieran a la resina pues estos contaminante generalmente se unen mayormente en condiciones no desnaturizantes que en condiciones desnaturizantes (Alfred Nobel, 2000). Estas bajas concentraciones de imidazol ayudan a minimizar la unión inespecífica de proteínas que contienen residuos de histidina no contiguos al competir con ellos por los sitios de unión disponibles en el metal de transición (Alfred Nobel, 2000). Sin embargo,

como se observa en la Figura 14, el lisado 4A no posee una buena resolución en el gel y por ende se determinó que cuando su concentración de proteína total fuera mayor a 8 mg/mL, debe ser diluido; así mismo, se marca una banda en 6,5 kDa en los lavados, pero no en las eluciones, lo que quiere decir, que se debe variar la concentración de imidazol para optimizar la unión (Alfred Nobel, 2000).

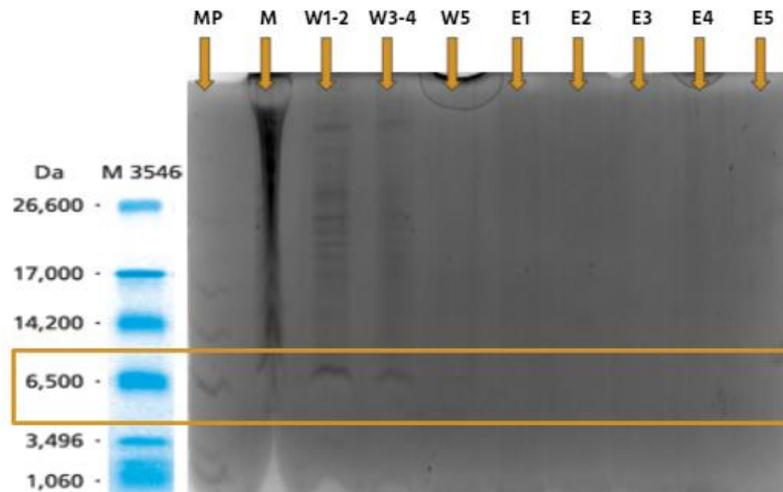


Figura 14. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* para el lisado 4 purificado en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, sobrenadante de lisado (4A) bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly; carril 3, lavado 1 y 2; carril 4, lavados 3 y 4; carril 5, lavado 5; carriles 6,7,8,9,10, eluciones (1-5) respectivamente. Se evidencia la presencia de gran cantidad de proteína en 6,5 kDa y una efectiva purificación en los lavados con respecto a la muestra.

Debido a la carencia de péptido en las eluciones, se tomó la decisión de concentrar a vacío durante 3 horas estas muestras y realizar nuevamente un gel (Figura 15). Es de resaltar que el objetivo era encontrar el péptido presente en las bandas de 3,5 kDa, pues este es el peso del péptido aproximado. Las demás bandas se descartan ya que pueden ser sales que quedan de la purificación o “impurezas” residuo de la lisis.

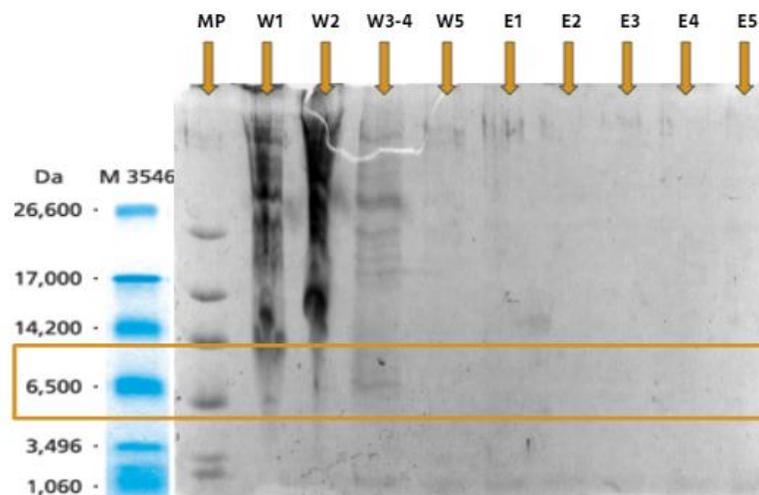


Figura 15. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* de las soluciones concentradas a vacío del lisado 4 en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, lavado 1 concentrado; carril 3, lavado 2 concentrado; carril 4, lavado 3 y 4 concentrado; carril 5, lavado 5 concentrado; carriles 6,7,8,9,10, eluciones (1-5) concentradas respectivamente.

Así mismo, se probó la purificación con el lisado 5A y 2A, ya que ocupaban el tercer y cuarto puesto en lisados con mayor cantidad de proteína, obteniendo el mismo resultado en el gel como con el lisado 4 (Figura 14). Cabe destacar que los lisados 10A y 9A al tener la mayor cantidad de proteína total, no se seleccionaron, debido que al ser los últimos lisados posiblemente por el tiempo y la velocidad, la proteína estuviese desintegrada.

Según los resultados de los lisados anteriores, se realizó una nueva lisis mediante agitación mecánica aumentando la velocidad de 15.000 rpm a 16.800 rpm, ya que aún a esta velocidad no había formación de espuma y seguía siendo adecuada para no desintegrar la proteína, en la que solo se recolectaron 4 sobrenadantes de lisado bacteriano. En la tabla 2 se observa la cantidad de proteína total obtenida después de la lisis mediante dispermat, cabe destacar que los lisados están acompañados de la letra B en la tabla 2, puesto que hace referencia a la segunda lisis con agitación mecánica en la que se aumentó la velocidad.

Tabla 2. Concentración de proteína total (mg/mL) después de lisar con agitador mecánico a 16.800 rpm (nanodrop). Los lisados se acompañan de la letra B, ya que hace referencia a la segunda lisis elaborada con agitación mecánica aumentando la velocidad a 16.800 rpm.

Lisado	mg/mL
1B	21,75
2B	21,87
3B	22,94
4B	21,22

Se inició la purificación mediante cromatografía por afinidad con el lisado 1B, para este caso se modificó el buffer de lavado cambiando la concentración del imidazol de 20mM a 10 mM, para la electroforesis se diluyeron algunas soluciones en los geles debido a la alta concentración de proteína presente para obtener una mejor resolución de las bandas en los carriles, estas diluciones se aplicaron cuando la cantidad de proteína sobrepasaba los 8 mg/mL. Adicionalmente en el gel de la purificación del lisado 1B (Figura 16), se añadió un residuo de la resina usada en la cromatografía para verificar la correcta purificación de las muestras, pues se creía que había un error en la cromatografía ya que en los geles anteriores no se revelaba, ni se presenciaba el péptido en la banda de 3,5 kDa.

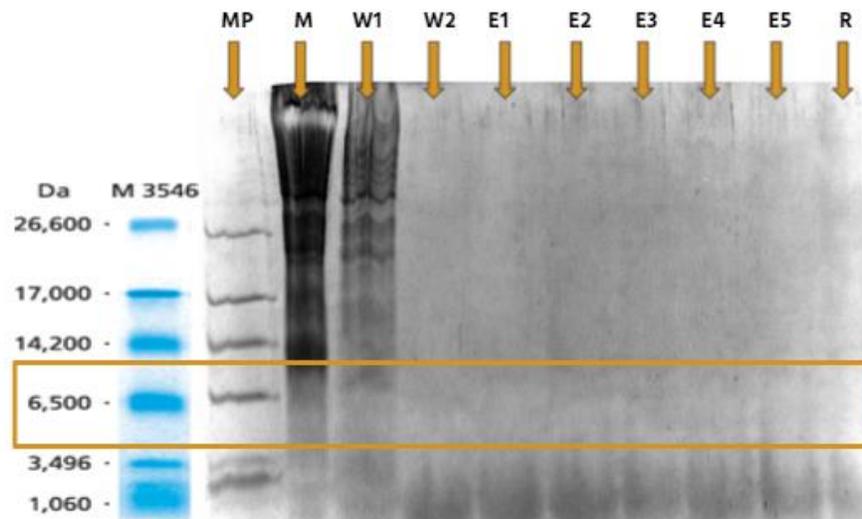


Figura 16. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* de la purificación del sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly (lisado 1B) con agitador mecánico (16.800 rpm) en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, lisado 1B (diluido); carril 3, lavado 1 (diluido); carril 4, lavado 2 (diluido); carriles 5,6,7,8,9, eluciones (1-5) respectivamente; carril 10, muestra de la resina IMAC. Se evidencia la presencia de proteína en 6,5 kDa en el lavado 1 y 2.

Sin embargo, modificando las concentraciones de imidazol y añadiendo un residuo de la resina de níquel usada no se logra verificar el péptido, por lo tanto, se realizó un nuevo gel con las mismas condiciones, pero con otro método de tinción de proteínas y así verificar si la tinción de los geles con azul de Coomassie estaba fallando y por ende no se revelaban las bandas en los geles para el peso de 3,7 kDa.

El método alternativo a la tinción con azul de Coomassie fue la tinción con plata, pues es un método sensible que detecta proteínas y ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida (Merril et al., 1981). Aunque es un método de tinción rentable y eficiente, necesita de múltiples pasos, carecen de reproducibilidad (Heukeshoven & Dernick, 1985), y poseen sensibilidad relativamente alta (Yan et al., 2000). Aun así, se aplicó para descartar y comprobar otros métodos. Nuevamente se realizó la electroforesis con el lisado 1A en un gel de Tricina-SDS-PAGE, se fijó durante al menos 30 minutos con una solución de ácido acético al 5% y etanol al 30%. Se enjuagó brevemente con agua. Luego se aumentó la sensibilidad mediante una solución con tiosulfato de sodio al 10% y se enjuagó; se tiñó en una solución que contenía etanol al 5%, ácido nítrico al 1% y nitrato de plata al 0,1% durante 30 min, se reveló la imagen en la solución de revelado (carbonato de potasio anhidro, formaldehído al 37% tiosulfato al 10%) pasados 20 minutos, se detuvo el desarrollo usando solución de parada (Tris y ácido acético) durante 30 min, y se enjuagó con agua (Rabilloud, 2012).

Se determinó al observar el gel presentado en la Figura 17, que en este tipo de tinción; algunos sensibilizadores de iones de plata pueden interferir con la identificación de proteínas debido a la introducción de enlaces cruzados en las proteínas con plata (Yan et al., 2000), por ende el gel presentado

se ve de tal manera, deteriorándolo y evitando la revelación de las bandas y los carriles; y se descartó para próximas tinciones, volviendo al método de tinción anterior.

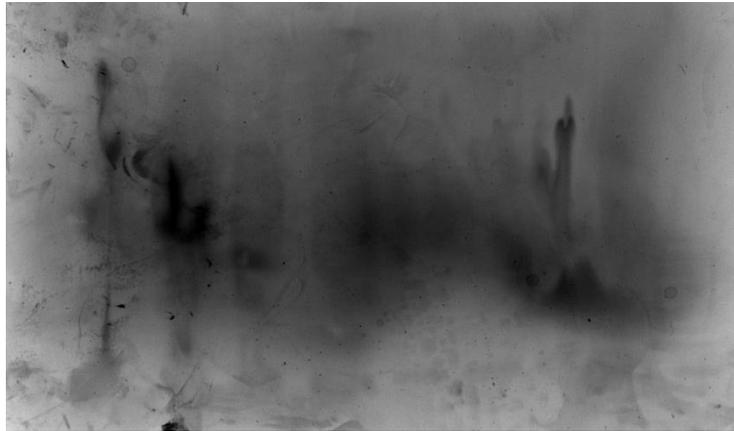


Figura 17. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* de la purificación del lisado 1B en gel de Tricina-SDS-PAGE teñido con nitrato de plata.

3.3. Purificación del péptido mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Debido a la carencia del péptido en la banda de su peso (3,7 kDa), se creyó que la resina de níquel en la cromatografía por afinidad estaba fallando, y se implementó la cromatografía de exclusión por tamaño para el lisado 2B, usando nuevos buffers, pero obteniendo un gel con bandas en 6,5 kDa como se evidencia en la Figura 18.

Para la cromatografía de exclusión por tamaño se empleó la resina de cromatografía Sephadex™ (Harvard Apparatus, n.d.) y para el buffer de elución se empleó fosfato de sodio dibásico 50mM, bifosfato de sodio 50mM, cloruro de sodio 150mM, se filtró y se ajustó el pH a 7.0.

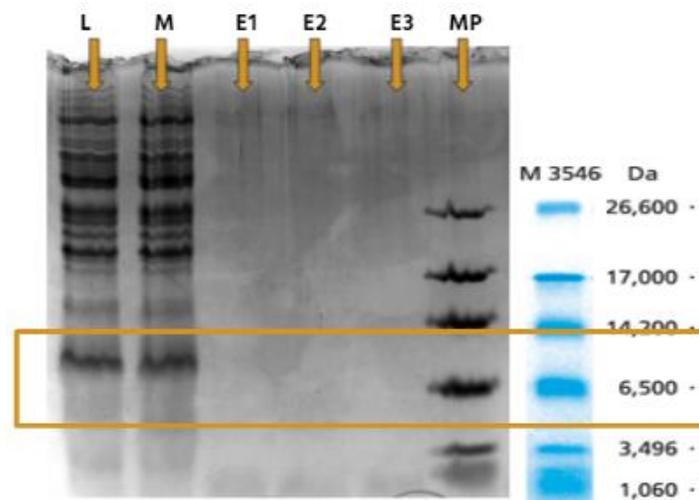


Figura 18. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* para el sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly (lisado 1B) purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, lisado 1B; carril 2, muestra recolectada de la columna, carriles 3,4,5, eluciones (1-3) respectivamente; carril 5, marcador de masa molecular. Se evidencia la presencia de gran cantidad de proteína en 6,5 kDa en el lisado y la muestra.

3.4. Western blot.

Luego de realizar dos tipos de cromatografía y aun no reconocer la presencia del péptido de 3,7 kDa, se realizó un western blot en un laboratorio externo al de la Universidad de los Andes (VECOL S.A) con el lisado 2B, con el fin de detectar esta proteína específica, la cantidad relativa, el peso molecular y las modificaciones, como la degradación o las alteraciones postraduccionales del péptido (Moritz, 2020).

El Western blot se utiliza para retirar e identificar proteínas. Se separa una mezcla de proteínas en función del peso molecular y, por tanto, por tipo, mediante electroforesis en gel. Estos resultados luego se transfieren a una membrana que produce una banda para cada proteína. A continuación, la membrana se incubaba con anticuerpos marcadores específicos de la proteína de interés (anti-His Tag para el caso del péptido PolyGly con residuos de Histidina). El anticuerpo no unido se lava dejando solo el anticuerpo unido a la proteína de interés y los anticuerpos unidos se detectan revelando la película. Como los anticuerpos solo se unen a la proteína de interés, debe ser visible una banda. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente; por lo tanto, hacer un estándar puede indicar la cantidad de proteína presente (T. Mahmood & Yang, 2012).

Ahora bien, el resultado obtenido por el western blot como se observa en la Figura 19, arroja que la proteína esperada se encontraba en la banda de 6,5 kDa, y no 3,7 kDa. Lo que evidencia que desde un inicio las técnicas utilizadas no presentaron fallas, pues siempre revelaron que el peso del péptido era 6,5 kDa, entonces el cambio del peso fue un error en el diseño del plásmido planteado por Pérez Bejarano et al. (2021). Teniendo en cuenta esto, se continuó con la purificación mediante cromatografía por afinidad y se replanteó el diseño del plásmido y sus cambios con este aumento en el peso.

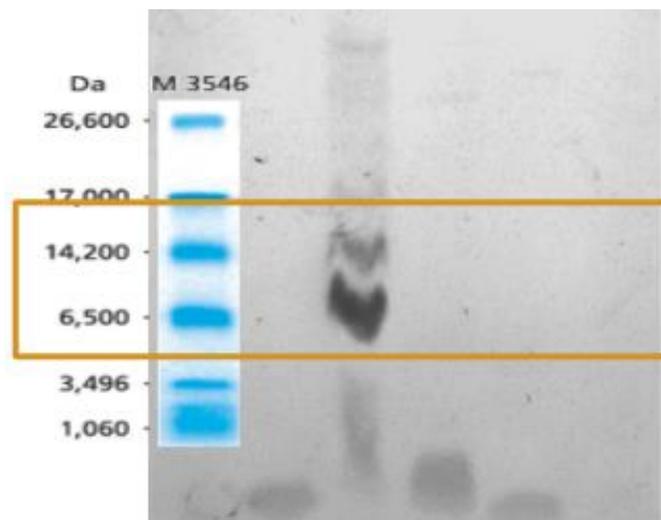


Figura 19. Resultado del western blot en electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* en gel de Tricina-SDS-PAGE. Se detectó que el péptido se encontraba en 6,5 kDa.

A raíz del resultado obtenido por el western blot se descubrió que el diseño inicial del plásmido posee además del gen, una etiqueta adicional con 16 aminoácidos (T7 tag, se puede observar en la Figura 21), pues esta etiqueta posee una metionina que corresponde a la secuencia AUG que es el codón de inicio, sin embargo no posee un codón de terminación que señala un alto en la síntesis de proteínas, es decir, el gen continuó sintetizándose hasta que encontró el codón de parada en la etiqueta de seis histidinas (6xHis, se puede observar en la Figura 21) ubicadas en el extremo N-terminal de la proteína como se muestra en el mapa del plásmido (Figura 20). Esta modificación tiene como consecuencia la variación en el peso molecular del péptido y por lo tanto en su propiedad emulsificante y tensiones interfacial y superficial al ser usado como surfactante y la hidrofobicidad, pues cada cadena tiene su propio conjunto de aminoácidos, ensamblados en un orden determinado y si la secuencia de la cadena A comienza y acaba en extremos diferentes, la secuencia de la cadena B también será diferente y un cambio en la secuencia de ADN del gen puede modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Incluso, cambiar tan solo un aminoácido en la secuencia de una proteína puede afectar la estructura y la función generales de la misma.

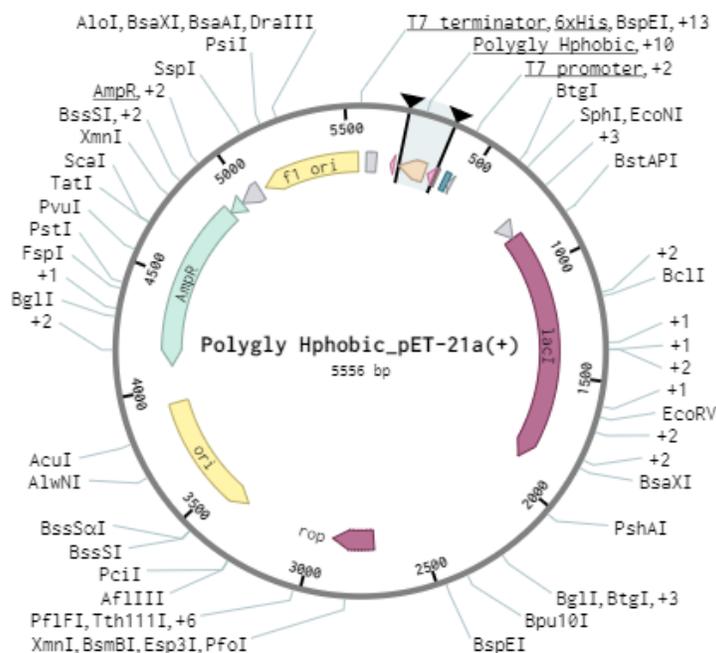


Figura 20. Representación esquemática del vector PolyGly Hphobic_pET-21^a(+). El plásmido contiene una región promotor (T7 promoter). El vector incluye las regiones que corresponden al gen de resistencia a antibióticos, en este caso a la ampicilina y al origen de replicación en bacterias. Mapa del plásmido PolyGly (Benchling, n.d.).

Ahora bien, teniendo en cuenta los cambios cabe resaltar que el péptido prediseñado inicialmente (PolyGly) poseía una secuencia de 41 aminoácidos, con un peso de 3720,1943 Da, y una hidrofobicidad de 40.48 Kyte-Doolittle (Thermo Fisher Scientific, n.d.), pero con la adición de la etiqueta T7-Tag ahora tiene un peso de 5377,0863 Da pues aumentó a 57 aminoácidos, y una hidrofobicidad de 45,26 Kyte-Doolittle (Thermo Fisher Scientific, n.d.). Este aumento en la secuencia de la proteína se determina con el ADN del gen que la codifica generando una alteración en las funciones generales de la proteína.

El aumento del carácter hidrófobo del tensioactivo disminuye la CMC, induce su transición a una concentración más baja y aumenta la solubilización, pero el aumento del carácter hidrófilo del tensioactivo aumenta la CMC (M. E. Mahmood & Al-koofee, 2013).

Para entenderlo mejor, la Figura 21 y Figura 22 explican el cambio en el gen de acuerdo con sus pesos y secuencias de aminoácidos.

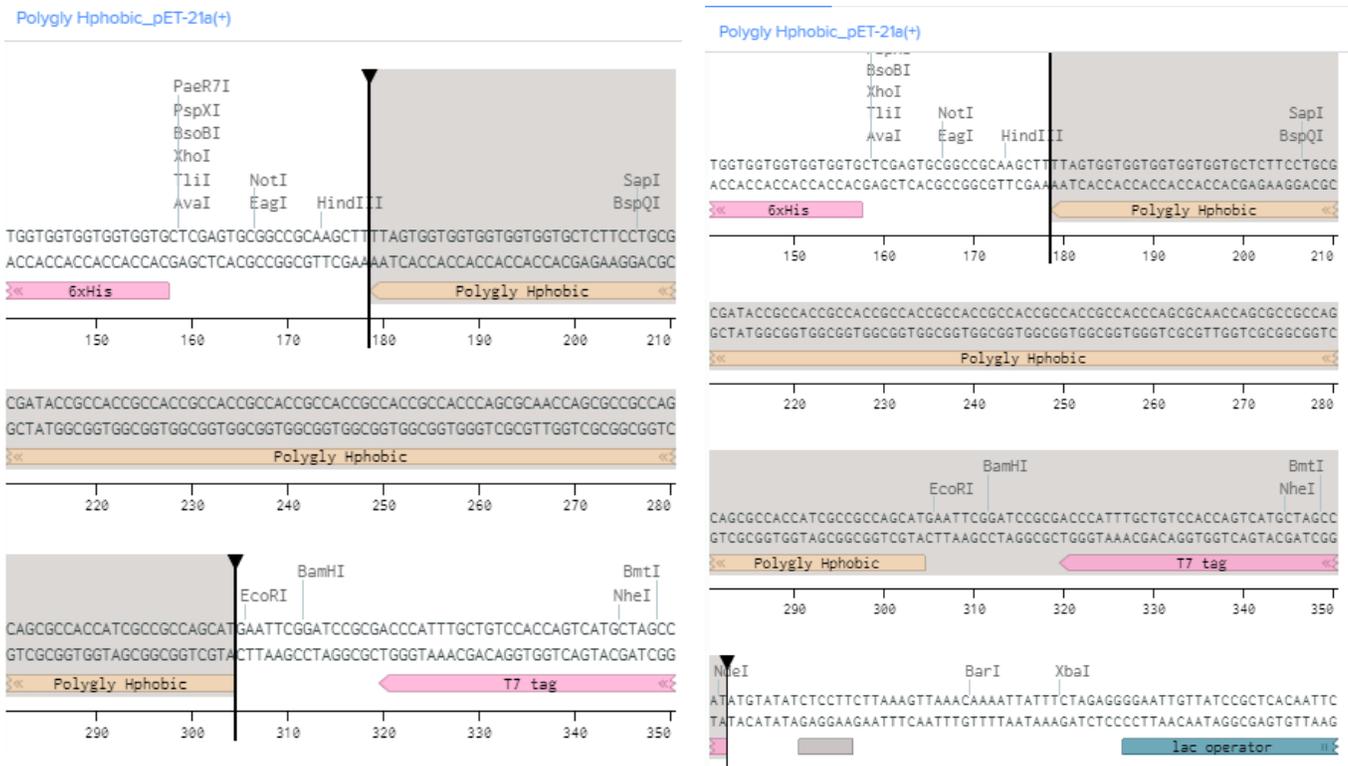


Figura 21. Características del péptido PolyGly antes y después de ser modificado con una secuencia de 16 aminoácidos. (Izq.) Mapa lineal del plásmido seleccionando el codón de inicio de la secuencia y codón de terminación para la secuencia de 41 aminoácidos del péptido PolyGly (MLAAMVALLAALVALGGGGGGGGGGGGGGGGIAQEEHHHHH). Y (Der.) Mapa lineal del plásmido seleccionando el codón de inicio de la secuencia y codón de terminación para la secuencia de 57 aminoácidos del péptido PolyGly (MASMTGGQQMGRGSEFMLAAMVALLAALVALGGGGGGGGGGGGGGGGIAQEEHHHHH) (Benchling, n.d.).

Properties		Properties	
Position	304-182 (reverse)	Position	352-182 (reverse)
Summary	MLAA...HHHH* 41 AAs	Summary	MASM...HHHH* 57 AAs
Molecular Weight 	3720.19 Da	Molecular Weight 	5377.07 Da
Isoelectric Point (pI)	6.24	Isoelectric Point (pI)	6.25
Extinction Coefficient		Extinction Coefficient	
Cys fully reduced	0.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully reduced	0.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	0.000	Abs 0.1% (1 g/l)	0.000
Cys fully oxidized	0.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully oxidized	0.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	0.000	Abs 0.1% (1 g/l)	0.000
Instability Index	60.63 (unstable)	Instability Index	54.02 (unstable)

Figura 22. Características del péptido PolyGly antes y después de ser modificado con una secuencia de 16 aminoácidos. (Izq.) Propiedades del péptido PolyGly seleccionando el codón de inicio de la secuencia y codón de terminación para la secuencia de 41 aminoácidos (MLAAMVALLAALVALGGGGGGGGGGGGGGGGGGIAQEEHHHHHH). Y (Der.) Propiedades del péptido PolyGly seleccionando el codón de inicio de la secuencia y codón de terminación para la secuencia de 57 aminoácidos (MASMTGGQQMGRGSEFMLAAMVALLAALVALGGGGGGGGGGGGGGGGGGIAQEEHHHHHH) (Benchling, n.d.).

Teniendo en cuenta el resultado del western blot y la modificación genética del péptido, se confirmó que el péptido se encontraba en la región de 6,5 kDa, no obstante, esto no quiere decir que el péptido pese eso, sino por cuestiones de resolución y tamaño no se puede observar en un menor rango en el marcador de peso. Así mismo, se continuó purificando mediante cromatografía por afinidad, aunque se modificaron algunos buffers cambiando el fosfato de sodio dibásico por bifosfato de sodio (Alfred Nobel, 2000) para obtener mejores resultados. Se reiteró el procedimiento de purificación con el lisado 3B y se reveló en el gel como se muestra en la Figura 23. Como alternativa para observar bandas en las eluciones se concentraron a vacío todas las muestras con una concentración menor a 3 mg/mL y se revelaron en un nuevo gel (Figura 23) para comprobar las muestras antes y después de concéntralas a vacío (Tabla 3).

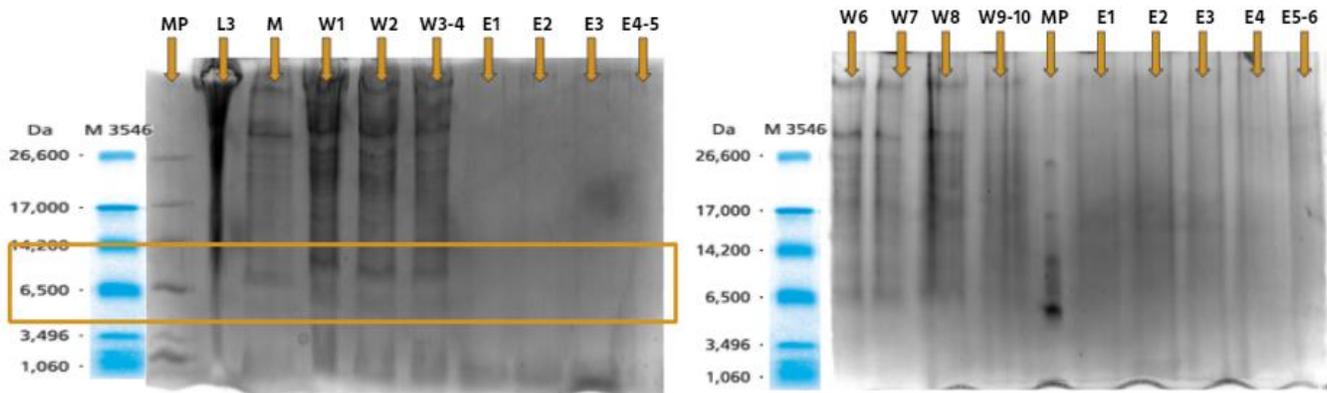


Figura 23. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa polyGly de *E. coli* de la purificación del sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly (lisado 3B) en gel de Tricina-SDS-PAGE. (Izq.) Lisado sin concentrar muestras. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, lisado 3B; carril 4, lisado recolectado después de pasar por la columna; carriles 4,5, lavados 1 y 2 respectivamente; carril 6, lavado 3 y 4; carriles 7,8,9, eluciones (1-3) respectivamente; carril 10, elución 4 y 5. Se evidencia la presencia de gran cantidad de proteína en 6,5 kDa. (Der.) Lisado con muestras concentradas a vacío. Carril 1,2,3, lavados concentrados (1-3) respectivamente; carril 4, lavado 9 y 10 concentrados; carril 5, marcador de masa molecular; carriles 6,7,8,9, eluciones concentradas (1-4) respectivamente; carril 10, eluciones 5 y 6 concentradas. Se evidencia una leve banda en 6,5 kDa en los lavados, pero no en las eluciones.

Tabla 3. Concentración de proteína total (mg/mL) antes y después de concentrar a vacío las muestras de la purificación mediante cromatografía por afinidad para el lisado 3B.

MUESTRA	Antes	Después
	mg/mL	
Lisado 3		22,94
Muestra		19,59
W1		7,74
W2		5,84
W3		5,35
W4		3,84
W6	2,38	6,31
W7	2,01	5,64
W8	1,56	11,06
W9	1,36	8,47
W10	1,06	8,93
E1	0,85	10,08
E2	0,99	11,47
E3	0,78	7,49
E4	0,67	7,17
E5	0,26	5,83
E6	0,47	5,19

Finalmente, se realizó una diálisis por difusión, con el fin de disminuir la cantidad de proteína presente en el lisado, para ello se tomó el lisado 4B y se reveló en el gel (Figura 24) después de este proceso de separación por 24 horas, y se purificó; las muestras de lavado y eluciones presentes en el gel fueron concentradas a vacío por 3 horas. Este proceso de separación se desarrolló, mediante una membrana de intercambio iónico, controlado por difusión de los componentes dentro de la membrana, por lo que el intercambio de da de manera lenta y gradual, especialmente en los casos de separación de moléculas grandes (Zheleznov et al., 1998). Este módulo permite altas tasas de transferencia de masa debido a la gran área efectiva de la membrana la cual tiene un límite molecular de 2000 Da (Fuchs et al., 2002). En la tabla 4 se presenta la concentración del lisado 4B antes y después de someterse a la diálisis por difusión, en la que se observa, además los lavados y eluciones recogidos de la cromatografía por afinidad después de la diálisis y de concentrar a vacío. Destaca notablemente la efectiva disminución en la concentración del lisado, pues paso de poseer 22,94 mg/mL de proteína total sin ser purificada, a 6,65 mg/mL de proteína total después de la diálisis por difusión. Aun así, en la Figura 24 se observa en los pozos de lisado, diálisis, y lavados la gran cantidad de desechos y contaminantes presentes en la muestra, posicionando a la diálisis como un método de separación acertado en cuanto a la disminución de proteína, pero no efectivo ya que aún posee grandes contaminantes de gran tamaño molecular y para usar el péptido en pruebas como surfactante debe tener una pureza aproximada visualmente del 80%.

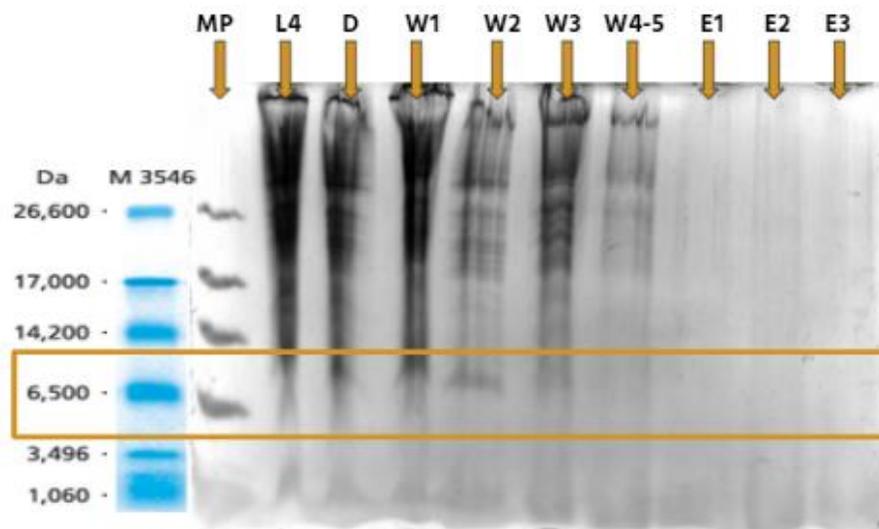


Figura 24. Análisis de electroforesis de la proteína recombinante expresada en la cepa PolyGly de *E. coli* del sobrenadante de lisado bacteriano recogido de células bacterianas que llevan el péptido PolyGly (lisado 4B) dializado y purificado en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, lisado 4B; carril 3, muestra del lisado 4B después de la diálisis; carriles 4,5,6, lavados (1-3 concentrados) respectivamente; carril 7, lavado 4 y 5 concentrados; carriles 8,9,10; eluciones (1-3 concentradas) respectivamente. Se evidencia la presencia en los lavados una proteína en la zona de 6,5 kDa.

Tabla 4. Concentración de proteína total (mg/mL) antes y después de concentrar a vacío las muestras de la purificación mediante cromatografía por afinidad para la diálisis del lisado 4B.

MUESTRA	mg/mL	
	Antes	Después
L4	22,94	
D	6,65	
W1	3,39	7,53
W2	1,69	4,42
W3	0,48	7,44
W4	0,50	3,98
W5	0,28	3,20
E1	0,05	3,01
E2	0,07	0,41
E3	0,06	0,93

Se propone para un posterior estudio la eliminación de los aminoácidos añadidos mediante digestión enzimática extrayendo el ADN de la muestra generando la ruptura mediante las enzimas NdeI y EcoRI añadidas al plásmido (Figura 25).

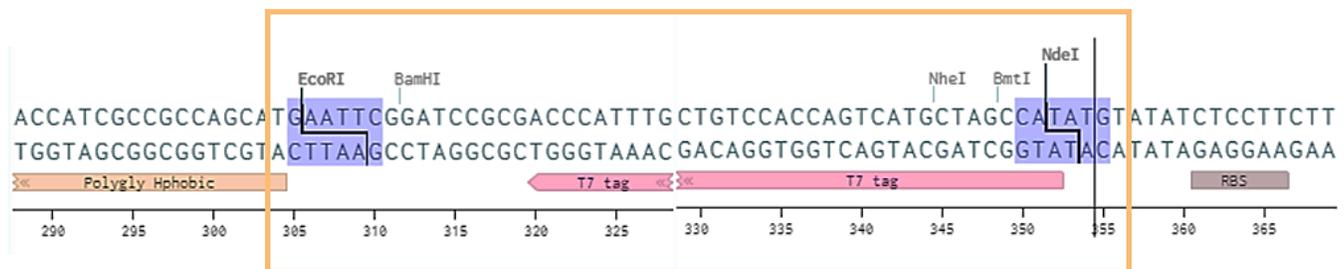


Figura 25. Mapa del plásmido (Benchling, n.d.). Diseño de la digestión enzimática para romper el gen y disminuir el tamaño molecular del péptido, dejándolo nuevamente en 3,72 kDa, ya que se eliminarían los 16 aminoácidos adicionales. La zona sombreada marca el inicio y fin de la digestión con sus respectivas enzimas digestivas; el inicio de la ruptura empieza con la enzima “NdeI” y terminar con la enzima “EcoRI”.

3.5. Tensión interfacial y estabilidad en emulsiones.

Con el fin de probar la tensión interfacial en la interfaz agua/decano, así como la capacidad de estabilizar emulsiones comportándose como un surfactante se liofilizaron las eluciones de la cromatografía de exclusión por tamaño, que contenía el péptido purificado, y se obtuvo 0,7931 g de péptido (Figura 26), el cual se diluyó en 20 mL de agua, para conseguir una concentración de 39,65 g/L. Esta solución presentó una sobre saturación debido a su elevada concentración y, por lo tanto, sólidos suspendidos. Para comprobar la presencia del péptido en esa solución y verificar que las pruebas de tensión y estabilidad si se estuviera realizando con el péptido y no con sales o impurezas, se verificó en un gel de Tricina-SDS-PAGE (Figura 27), y se comparó con el gel que presentaba el lisado inicial antes de la purificación por tamaño (Figura 18).



Figura 26. Obtención del péptido purificado y liofilizado extraído de las eluciones mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

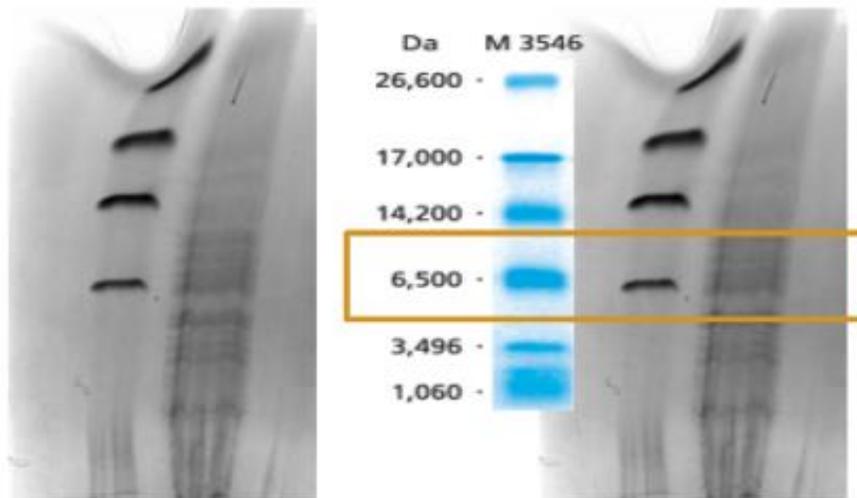


Figura 27. Análisis de electroforesis de la disolución del agua-péptido PolyGly para verificación de presencia del péptido purificado e impurezas, en gel de Tricina-SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2 disolución. Se evidencia la presencia de gran cantidad de proteína entre 3 y 14 kDa.

Comparando el barrido en el gel de Tricina-SDS-PAGE de la disolución del péptido en agua, con el lisado inicial antes de realizarse la cromatografía de exclusión por tamaño, se obtuvo una pureza del 80%, esto se debe a que la purificación de proteínas recombinantes (expresadas en *E. coli*) con tag de histidina puede realizarse mediante IMAC (immobilized metal affinity chromatography), generalmente con columnas de Ni²⁺ o mediante anticuerpos primarios anti poli-histidina como la cromatografía de exclusión por tamaño generado puridades elevadas de hasta el 80% (Kaur et al., 2018).

Se realizaron 5 diluciones (Figura 28) en serie, a la mitad de concentración cada una como se muestran en la tabla 5; siendo la disolución inicial (D0) de péptido-agua la más concentrada y la dilución 5 (D5) la menos concentrada; usadas posteriormente para medición de tensión interfacial. En la figura 28, se observa gran turbidez en la solución agua-PolyGly debido a su elevada concentración, así como sólidos suspendidos; dicha turbidez disminuye a medida que se diluyen las soluciones, obteniendo una solución D5, mas clara y sin sólidos precipitados.



Figura 28. Representación visual comparativa de las diluciones elaboradas a partir de la solución madre “Agua-PolyGly”.

Tabla 5. Concentración de diluciones elaboradas a partir de la solución madre Agua-PolyGly.

MUESTRA (10 mL)	Concentración (g/L)
D0 (Agua-PolyGly)	39,65
D1	19,825
D2	9,9125
D3	4,9562
D4	2,4781
D5	1,2390

Las imágenes en forma de gota se capturaron con un tensiómetro óptico y la tensión interfacial en la interfaz agua/decano se obtuvo mediante el método de gota pendiente. El equipo se calibró y se ajustó correctamente para garantizar la precisión de la tensión interfacial medida. Se consideró la precisión de las mediciones de tensión interfacial porque la tensión interfacial medida entre el decano y el agua desionizada en condiciones ambientales alcanzó un valor de 51,76 mN/m. Este valor es consistente con el reportado en la literatura (56,47 dyn/cm o mN/m) (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007), con un error entre ellos igual a 8,34%. Dado que el error es menor al 10% se concluye que las mediciones pueden ser congruentes o de confianza, pues por afectos del movimiento y temperatura, estos valores pueden variar.

Los resultados de tensión interfacial calculados para el sistemas agua/decano se tabularon en promedio en la Tabla 6, teniendo en cuenta que a cada medición se le realizó una iteración para mitigar variaciones.

La menor tensión interfacial se alcanza para el sistema que cuenta con la mayor concentración siendo esta la solución madre con la cantidad total de péptido purificado (0,7931 g).

Tabla 6. Resultados promedio de tensión interfacial para el sistema agua/decano a diferentes concentraciones de péptido.

MUESTRA (10 mL)	Concentración (g/L)	Tensión Interfacial (mN/m)
D0 (Agua-PolyGly)	39,65	4,6499120
D1	19,825	12,1364188
D2	9,9125	18,3628726
D3	4,9562	25,1464033
D4	2,4781	30,0071984
D5	1,2390	35,0844408

Dichos valores se graficaron (Figura 29) con el fin de hallar y comprobar su concentración micelar crítica (CMC). Mediante el ajuste de datos en equilibrio se obtuvo una CMC de 7,2 g/L; sin embargo este valor es errado ya que para obtener una correcta medición de CMC, el sistema debe ser estable; por lo tanto, no presenta CMC definida usando el método de gota pendiente, no obstante, este método se aplica para tensiones intermedias, ya que es poco preciso para tensiones muy altas (la gota es esencialmente esférica) y que por otra parte la gota tiende a descolgarse si la tensión es muy baja ($\gamma < 0,01$ dina/cm) (Jean L. Salager & Raquel Anton, 2005) como en el caso de la solución madre. Para un surfactante que posea CMC, la variación a medida que disminuye la tensión interfacial debe variar mínimamente e ir presentando un comportamiento constante después de llegar a un punto de estabilidad. En el caso del péptido usado como surfactante, a medida que disminuye la tensión interfacial, el diámetro de la gota disminuirá, ya que, al estar determinada por la gravedad, a mayor diámetro, menor estabilidad y por ende la gota se desprenderá del capilar. De esta manera, este modelo no se ajusta al comportamiento general de un surfactante, y para medir tensión interfacial menor a 5 mN/m o cercanas a 0, se deberá cambiar la técnica de medición de tal forma que se logró conocer el valor de estas tensiones interfaciales ultra bajas, empleando el método de la gota giratoria que alcanza mediciones de hasta de 0,0001 dina/cm (Jean L. Salager & Raquel Anton, 2005). Es importante para tener una mejor medición controlar la presión y la temperatura dentro de la celda para cada experimento en la modalidad de gota pendiente, pues la tensión interfacial, varía en escala logarítmica.

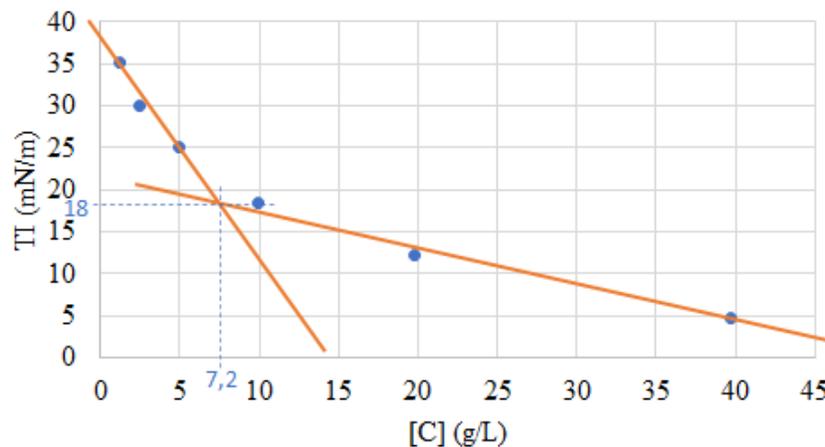


Figura 29. Valores de tensión interfacial en diferentes concentraciones de péptido-agua en interfaz agua/decano. Las barras señalan la desviación standard del valor medio. La intersección en el cambio de la pendiente representaría la CMC (7,2 mN/m), sin embargo, este sistema no posee CMC ya que es inestable.

Para verificar el comportamiento del péptido y su carencia de concentración micelar crítica, se comparó la estabilidad de su tensión interfacial respecto a tensioactivos sintéticos como Tween - 20 (monolaurato de polioxietilensorbitán), Tween - 60 (monoestearato de polioxietilensorbitán), Tween - 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Arlancel - 60 (estearato de sorbitán) y Arlancel - 80 (oleato de sorbitán) (Figura 30).

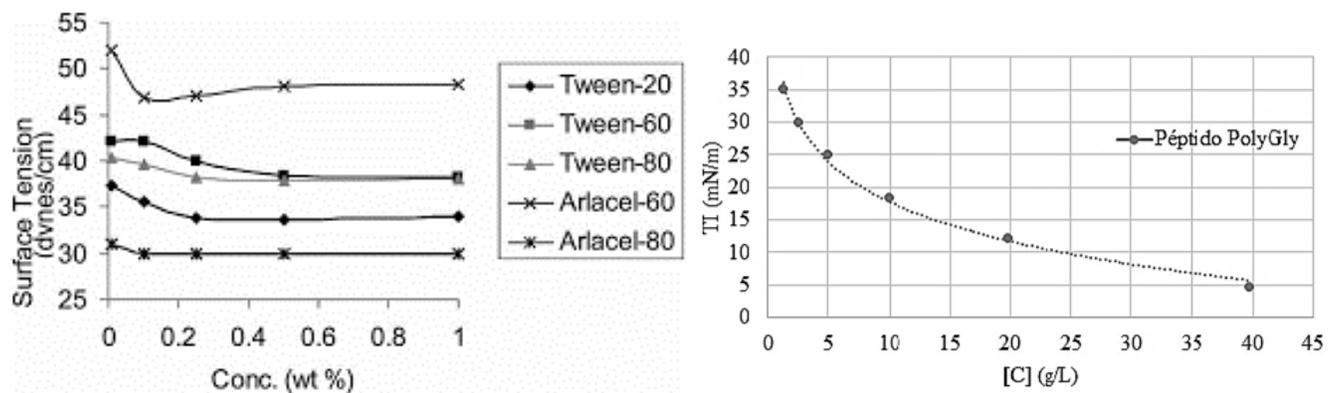


Figura 30. Variación en la tensión interfacial en función de la concentración de: (Izq.) surfactantes sintéticos (Kothekar et al., 2007) en comparación al comportamiento no estable del (Der.) Péptido PolyGly usado como surfactante.

Estas diluciones se utilizaron para la medición de la estabilidad y el poder emulsionante en el sistema agua/decano. Se prepararon emulsiones W/O con un 20% en peso de fase oleosa y una concentración de tensioactivo aproximadamente del 4% en peso. La fase oleosa la conforma 2,5 mL de n-Decano y la fase dispersa está constituida por una mezcla de 10 mL de péptido purificado y agua desionizada en una relación en masa 1/5.

Mediante retrodifusión de luz o “backscattering”, se determinó la variación de la intensidad de luz retrodifusa en todo el volumen de la muestra y en función del tiempo. Para ello, se introdujeron 12.5 ml de emulsión en un vial y se introdujo en el compartimento del equipo turbiscan y se inició la lectura de intensidad de luz retrodifusa o “backscattering”. Se obtuvo un gráfico de la variación del porcentaje de “backscattering” respecto a la altura de la muestra (Figura 31.1-Figura 31.5). Este principio funciona de tal manera que: si el “backscattering” varía de forma similar en todo el volumen de la muestra indica que es homogénea, y hubo una acetada estabilización por parte del tensioactivo. Sí la intensidad de la luz retrodifusa aumenta en la parte inferior de la muestra y disminuyen la parte superior es indicativo de la existencia de sedimentación; si por el contrario disminuye en la parte inferior de la muestra y aumenta en la parte superior, se produce el desestabilización por cremado y finalmente sí se observa una disminución de la intensidad de luz retro difusa en la zona central es indicativo de la existencia de coalescencia (Lendínez Gris, 2016).

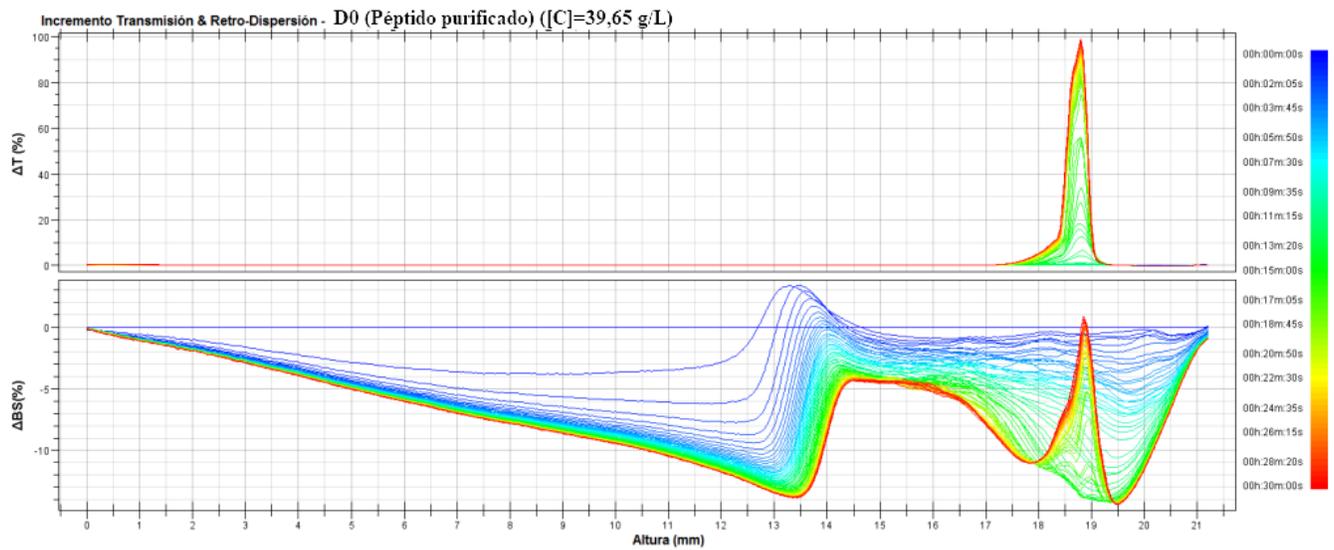


Figura 31.1. Variación de la intensidad de la luz retrodifusa o “backscattering” BS y transmitancia T para distintos tiempos en función de la altura de emulsiones inversas W/O (agua/decano), para la disolución inicial (D0) de péptido purificado-agua.

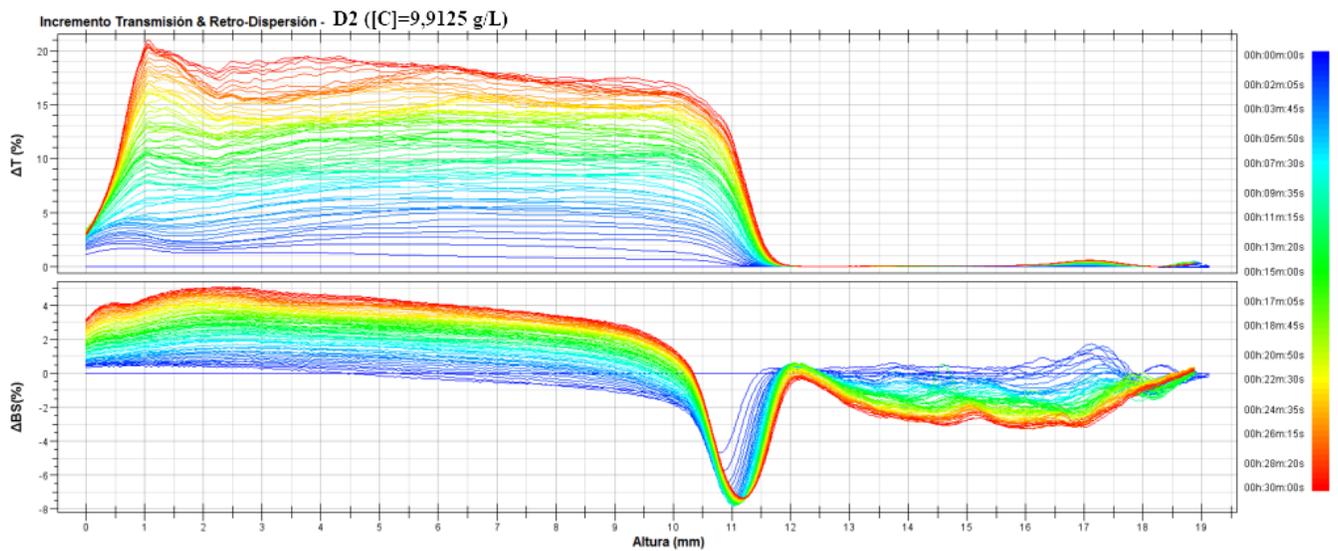


Figura 31.2. Variación de la intensidad de la luz retrodifusa o “backscattering” BS y transmitancia T para distintos tiempos en función de la altura de emulsiones inversas W/O (agua/decano), para la dilución 2 (D2).

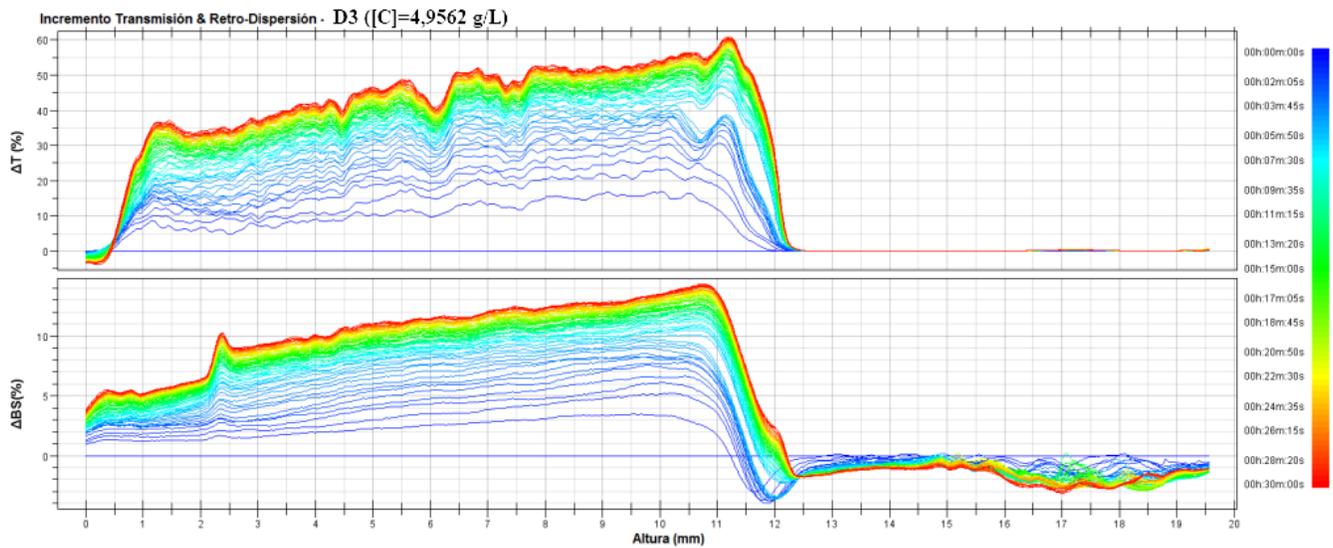


Figura 31.3. Variación de la intensidad de la luz retrodifusa o “backscattering” BS y transmitancia T para distintos tiempos en función de la altura de emulsiones inversas W/O (agua/decano), para la dilución 3 (D3).

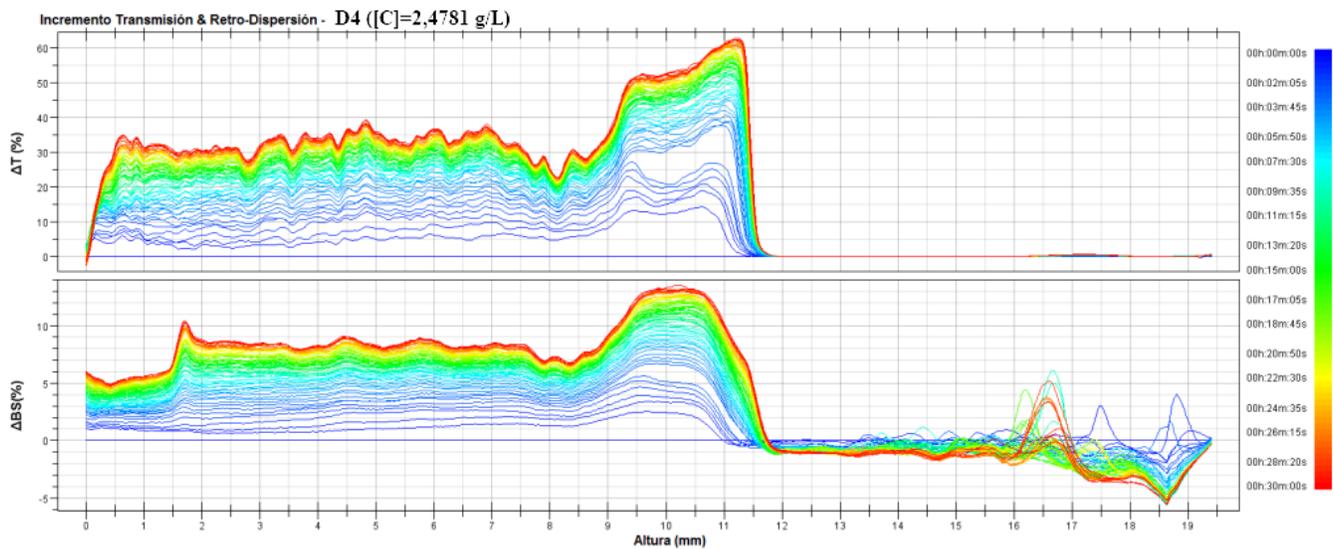


Figura 31.4. Variación de la intensidad de la luz retrodifusa o “backscattering” BS y transmitancia T para distintos tiempos en función de la altura de emulsiones inversas W/O (agua/decano), para la dilución 4 (D4).

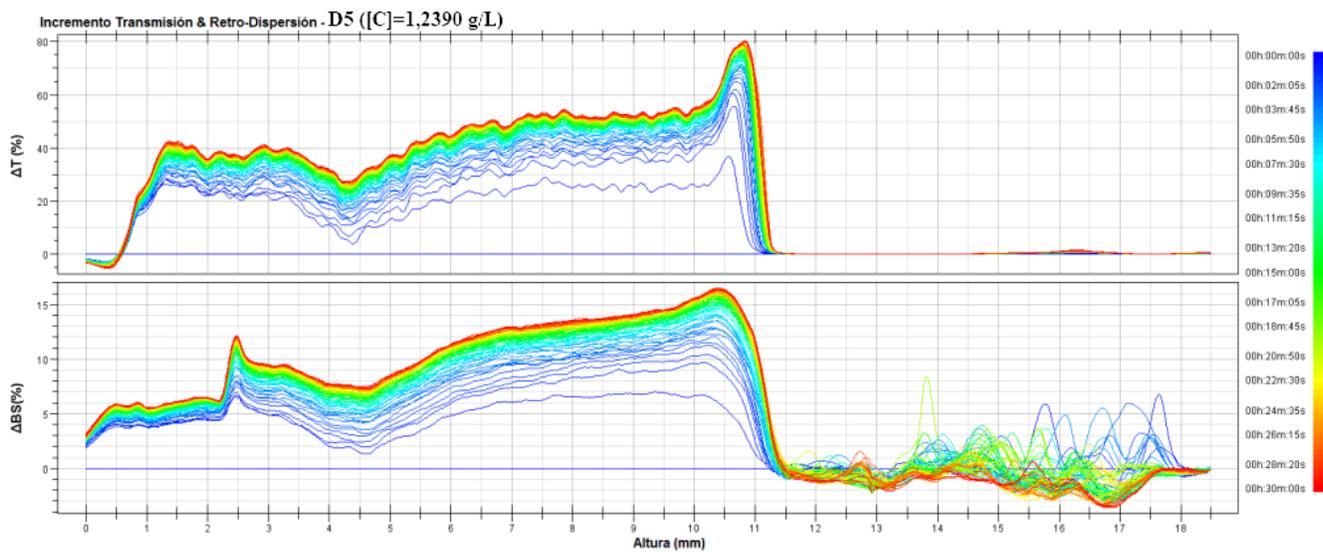


Figura 31.5. Variación de la intensidad de la luz retrodifusa o “backscattering” BS y transmitancia T para distintos tiempos en función de la altura de emulsiones inversas W/O (agua/decano), para la dilución 5 (D5).

La acción de un emulsionante en la formación de emulsión se genera inicialmente cuando este se disuelve en una de las fases, se difunde a la interfaz cuando están en contacto porque las porciones polares y apolares del emulsionante muestran afinidades individuales por las fases acuosa y orgánica, respectivamente. Antes de que el tensioactivo se adsorba en la interfaz, la magnitud de la tensión interfacial es proporcional a la repulsión entre las moléculas de los líquidos y los valores altos de tensión interfacial implican una interfaz difícil de deformar. Cuando el tensioactivo se divide en la interfaz, esta repulsión disminuye porque las moléculas de tensioactivo tienen afinidad por ambas fases. En consecuencia, la tensión interfacial se reduce (Farn, 2007; Jonsson et al., 1998). En términos de escalas de tiempo, la migración y penetración de un tensioactivo emulsionante en la interfase debe ocurrir rápidamente para evitar procesos de coalescencia que normalmente se desencadenan tan pronto como las gotas comienzan a formarse (“Encycl. Colloid Interface Sci.,” 2013). Finalmente, una vez que se produce la emulsión, las moléculas del emulsionante deben permanecer en la interfaz para formar una capa empaquetada cerrada con alta elasticidad de película donde las interacciones estéricas y electrostáticas entre los emulsionantes en las gotitas vecinas evitan la floculación, la maduración de Ostwald y la coalescencia (“Encycl. Colloid Interface Sci.,” 2013).

De esta manera, se explica la formación de fases que se observan en la Figura 32, y no una emulsión “homogénea”. Esto se debe a que el proceso de envasado del recipiente en el que se agitó la emulsión debe pasar al vial de medición de retrodifusión del luz específico del equipo, este proceso demoró al menos 2 min y por ende, se detiene la formación de la emulsión antes de ser medido formando una fase de coalescencia en la parte superior, de la misma manera, con las gráficas de “backscattering” presentadas en la Figura 31, se puede afirmar que después de 11mm en cada dilución ocurre un cambio repentino en la transmitancia leída por el equipo, lo que hace referencia a una zona coalescencia pues el “backscattering” disminuye.

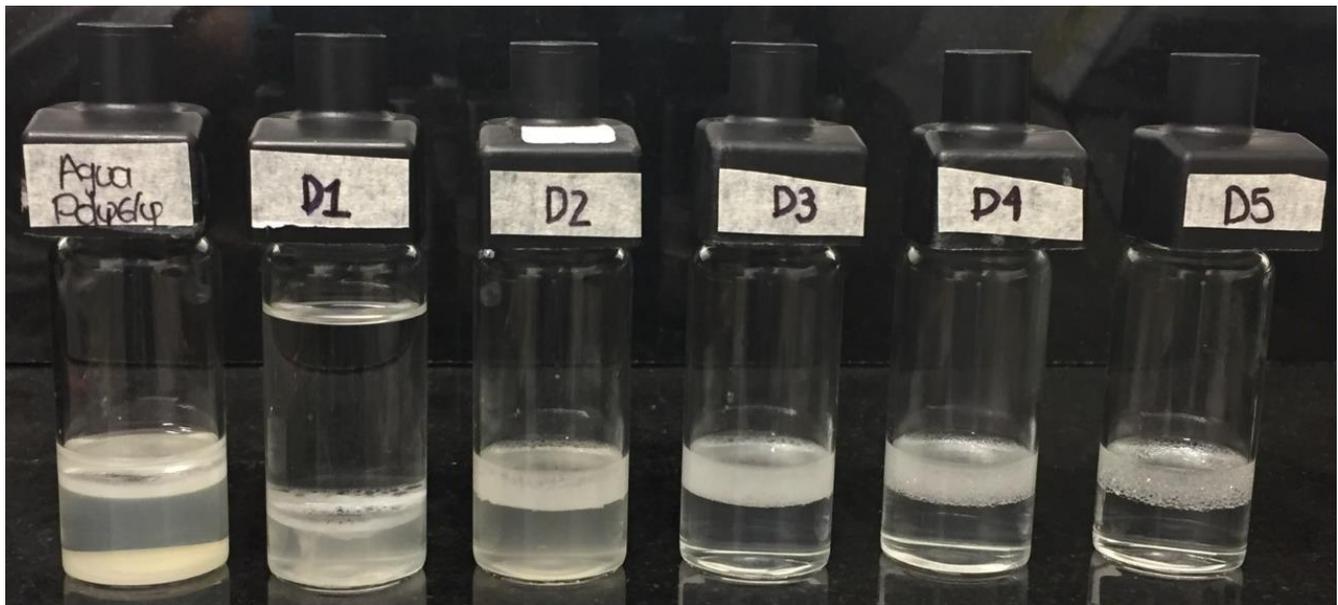


Figura 32. Variación visual de estabilidad para cada emulsión a partir de las diluciones elaboradas con solución madre “Agua-PolyGly”.

Debido a la poca estabilidad generada en las emulsiones y su color traslucido, se dejó planteado un próximo análisis para verificar si las emulsiones generada son macro o micro emulsiones. Pues, se esperaba que la formación fueran macro emulsiones, ya que, estas son inestables termodinámica y cinéticamente, pues necesita adición de energía en forma de agitación para ser creada, adicionalmente presenta un comportamiento poli disperso, ya que las gotas generadas en la interfaz son de distintos tamaños, y su color generalmente tiene a ser opaco. Por otro lado, las micro emulsiones son poco frecuentes ya que son estables termodinámicamente, es decir, no necesitan energía para formarse, son mono dispersas, entonces cada gota tiene el mismo tamaño, lo que las hace traslucidas. Por consiguiente, para verificar si el péptido usado como surfactante generó una micro o macro emulsión se deberá analizar microfotografías ópticas la cual arrojarán la dispersión de gotas presentes.

Así mismo, teniendo en cuentas las características de un emulsionante, este se debe adsorber preferiblemente en la interfaz en lugar de permanecer en la mayor parte del fluido, formar una capa condensada en la interfaz que depende de la relación de reparto, y reducir la tensión interfacial en la misma escala de tiempo en que se produce la emulsión (Milton J. Rosen & Joy T. Kunjappu, 2004); sin embargo, faltaría caracterización más detallada de las emulsiones para permitir una estabilización adecuada. De hecho, se propone que esta caracterización incluya 3 partes: caracterización reológica, microfotografías ópticas y medición del tamaño de partícula.

El comportamiento reológico de las emulsiones se debería medir utilizando un reómetro híbrido (DHR-1, TA Instruments, Reino Unido) equipado con una geometría de cilindro concéntrico a un espacio constante de 5920 μm y una temperatura de 40 ° C. Para la determinación de los tamaños medios y distribuciones del tamaño de gotas (DTG) se debería emplear el analizador de difracción láser MasterSizer



3000 (Malvern Instruments) con lente de 45 mm. Este sistema está basado en el principio de dispersión de luz láser emitida a una longitud de onda de 633 nm aproximadamente (Gomez et al., 2021).

4. CONCLUSIONES

Al analizar los resultados se observó que es necesaria la adición de isopropil- β - d-tiogalactopiranosido (IPTG) como agente inductor hasta una concentración final de 1 mM, ya que, el cultivo bacteriano inducido se vuelve competente para la transformación del plásmido y así recuperar el péptido producido.

Según los resultados observados se encontró que los factores que más influye en la purificación del péptido a partir de cromatografía de afinidad son el proceso de lisis celular y la concentración de los buffers, especialmente el de imidazol, mientras que el tiempo de elución no mostro cambios en la concentración de proteína. Para los dos métodos de lisis celular aquí estudiados, se encontró que al realizar la lisis por medio de agitación mecánica la concentración del péptido luego de la purificación aumenta al doble comparada con el método de agitación con perlas de vidrio. Respecto a los buffers utilizados en el proceso de purificación se determinó que las concentraciones bajas de imidazol (0–20 mM) en tampones de lisis, unión y lavado, minimizan la unión inespecífica de proteínas que contienen residuos de histidina no contiguos.

El valor de tensión interfacial de las diluciones a diferentes concentraciones de péptido PolyGly en agua disminuyó a medida que la concentración de biosurfactante aumentaba, mostrando su aplicabilidad para emulsionar soluciones. Se encontró que al utilizar el péptido como surfactante la cantidad de empleada fue demasiado alta y afectaba de manera significativa las propiedades finales de las emulsiones. Por lo tanto, se propone utilizar concentraciones más bajas de surfactante. Para el caso de la solución madre (péptido purificado - agua) con concentración de 39,65 g/L, se obtuvo una caída pronunciada para la tensión interfacial de 4,64 mN/m, pero con un tamaño de gota casi imperceptible e inestable, lo cual afectó la determinación de la concentración micelar crítica (CMC). Con el fin de poder llevar a cabo dicha medición y obtener una gota estable se debe cambiar el método de medición de gota pendiente a gota giratoria, y así obtener valores de tensión interfacial entre 0 y 4,64 mN/m.

Debido a que el tamaño del péptido no fue el esperado, se propone realizar un corte enzimático en el plásmido y eliminar la cadena que codifica para los 16 aminoácidos adicionales, con el fin de obtener un péptido con el tamaño de 3,7 kDa. Por otro lado, se plantea para próximas investigaciones, la elaboración de la caracterización reológica, medición de la dispersión y tamaño de las gotas por medio microfotografías ópticas, con respecto al aumento de la concentración y así determinar factores que no proporcionan una estabilidad adecuada a la emulsión.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de los Andes, por hacerme parte de ella, por brindarme la oportunidad de generar e impartir nuevos conocimientos. A la Universidad de Pamplona, por permitirme desarrollar como una profesional llena de pasión, conocimiento y entrega en el área investigativa, a sus docentes y a



mi directora Carla Cárdenas por su compromiso. A mis co-directores de proyecto de grado Diego Pradilla, y Luis Reyes por motivarme y hacer parte de este proceso de formación. A compañeros, amigos, y familia, por representar la entrega y el apoyo moral en cada obstáculo.

Referencias Bibliográficas

- Abdulraheim, A. M. (2018). Green polymeric surface active agents for crude oil demulsification. *Journal of Molecular Liquids*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.153>
- Alexandrova, L., Grigorov, L., Khristov, K., & Petkova, H. (2017). Effects of pH on wetting behavior of 'star-like' block copolymer surfactant solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 519. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.070>
- Alfred Nobel. (2000). *Profinity™ IMAC Resins Instruction Manual*. Bio-Rad Laboratories. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001677B.PDF>
- Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B., & Verlander, M. (2000). Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55(3). [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7)
- Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of Molecular Biology*, 211(4). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90085-Z)
- Atta, A. M., Abdullah, M. M. S., Al-Lohedan, H. A., & Ezzat, A. O. (2018). Demulsification of heavy crude oil using new nonionic cardanol surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.154>
- Benchling. (n.d.). *Plasmid PolyGly Hphobic*. Retrieved November 26, 2021, from <https://benchling.com/s/seq-c5lys1m6sB7ReGwnEQli/edit>
- Bio-Rad Labs. (n.d.). *Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell Instruction Manual*. Retrieved November 24, 2021, from <https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in Enzymology* (Vol. 326). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Cai, M., Huang, Y., Sakaguchi, K., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., & Craigie, R. (1998). An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in Escherichia coli. *Journal of Biomolecular NMR*, 11(1). <https://doi.org/10.1023/A:1008222131470>
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>



- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. In *Chemical Engineering Science* (Vol. 61, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>
- Clarke, J. G., Wicks, S. R., & Farr, S. J. (1993). Surfactant mediated effects in pressurized metered dose inhalers formulated as suspensions. I. Drug/surfactant interactions in a model propellant system. *International Journal of Pharmaceutics*, 93(1–3). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90181-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90181-E)
- Cosgrove, T. (2010). *Colloid Science: Principles, Methods and Applications, 2nd Edition* (2nd ed.).
- D'Imprima, E., Floris, D., Joppe, M., Sánchez, R., Grininger, M., & Kühlbrandt, W. (2019). Protein denaturation at the air-water interface and how to prevent it. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.42747>
- David S. Hage. (2005). *Handbook of Affinity Chromatography* (2nd ed., Vol. 92). Taylor and Francis Group.
- Diego Camilo Pradilla Ragua. (2013). *Diseño multi-escala aplicado a procesos de emulsificación-emulsiones directas e inversas* [Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/11846>
- Diller, T., Thompson, J., & Steer, B. (2021). Biological validation of a novel process and product for quantitating western blots. *Journal of Biotechnology*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.012>
- Domínguez Rivera, Á., Martínez Urbina, M. Á., & López y López, V. E. (2019). Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 35, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>
- El Achouri, M., Kertit, S., Goultaya, H. M., Nciri, B., Bensouda, Y., Perez, L., Infante, M. R., & Elkacemi, K. (2001). Corrosion inhibition of iron in 1 M HCl by some gemini surfactants in the series of alkanediyl- α,ω -bis-(dimethyl tetradecyl ammonium bromide). *Progress in Organic Coatings*, 43(4). [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(01\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(01)00208-9)
- El Mehbad, N. (2017). Efficiency of N-Decyl-N-benzyl-N-methylglycine and N-Dodecyl-N-benzyl-N-methylglycine surfactants for flow improvers and pour point depressants. In *Journal of Molecular Liquids* (Vol. 229). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.12.075>
- Elachouri, M., Hajji, M. S., Kertit, S., Essassi, E. M., Salem, M., & Coudert, R. (1995). Some surfactants in the series of 2-(alkyldimethylammonio) alkanol bromides as inhibitors of the corrosion of iron in acid chloride solution. *Corrosion Science*, 37(3). [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(94\)00134-R](https://doi.org/10.1016/0010-938X(94)00134-R)
- Encyclopedia of Colloid and Interface Science. (2013). In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*.



<https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8>

- Farn, R. J. (2007). Chemistry and Technology of Surfactants. In *Chemistry and Technology of Surfactants*. <https://doi.org/10.1002/9780470988596>
- Fuchs, C., Köster, D., Wiebusch, S., Mahr, K., Eisbrenner, G., & Märkl, H. (2002). Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 93(3). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00402-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00402-3)
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacchiMonitor*, 22(2).
- Gomez, J. D., Pradilla, D., & Alvarez, O. (2021). A Multiscale Approach to the Design and Manipulation of Oil-in-Water Emulsion-Based Products. *International Journal of Chemical Engineering*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8897983>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (4th ed., Vol. 1). John Inglis.
- Gu, X., Zhang, F., Li, Y., Zhang, J., Chen, S., Qu, C., & Chen, G. (2018). Investigation of cationic surfactants as clean flow improvers for crude oil and a mechanism study. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.01.045>
- Guclu-Ustundag, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3). <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
- Gupta, P. L., Rajput, M., Oza, T., Trivedi, U., & Sanghvi, G. (2019). Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. In *Natural Products and Bioprospecting* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0215-0>
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, 869. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8
- Harvard Apparatus. (n.d.). *Guide to Gel Filtration or Size Exclusion Chromatography*. Retrieved November 25, 2021, from <https://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/Guide+for+Gel+Filtration.pdf>
- Hayes, D. G., & Smith, G. A. (2019). Biobased Surfactants: Overview and Industrial State of the Art. In *Biobased Surfactants*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00001-0>
- Hegazy, M. A., Abdallah, M., & Ahmed, H. (2010). Novel cationic gemini surfactants as corrosion inhibitors for carbon steel pipelines. *Corrosion Science*, 52(9). <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2010.04.034>
- Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Diversity and Classification of Microbial Surfactants. In *Biobased Surfactants*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00002-2>



- Heukeshoven, J., & Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *ELECTROPHORESIS*, 6(3). <https://doi.org/10.1002/elps.1150060302>
- Howe, A. M., Clarke, A., Mitchell, J., Staniland, J., Hawkes, L., & Whalan, C. (2015). Visualising surfactant enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.08.032>
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., & Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198(4321). <https://doi.org/10.1126/science.412251>
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 275). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Jean L. Salager, & Raquel Anton. (2005). *Métodos De Medición De La Tensión Superficial O Interfacial*. Universidad de Los Andes. https://firp-ula.org/wp-content/uploads/2019/06/S205_MedicionTension.pdf
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/ba20010099>
- Jonsson, B., Lindman, B., & Holmberg, K. (1998). Surfactants and polymers in aqueous solutions. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 14(5). <https://doi.org/10.1109/MEI.1998.714652>
- Kang, W., Mushi, S. J., Yang, H., Wang, P., & Hou, X. (2020). Development of smart viscoelastic surfactants and its applications in fracturing fluid: A review. In *Journal of Petroleum Science and Engineering* (Vol. 190). <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107107>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 106). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kent, S. B. H. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Khan, M. N. H., Gunawan, T. S., Rahman, M. T., & Khan, S. (2015). Evaluation of various leakage current paths with different switching conditions. *Proceedings - 5th International Conference on Computer and Communication Engineering: Emerging Technologies via Comp-Unication Convergence, ICCCE 2014*. <https://doi.org/10.1109/ICCCE.2014.83>
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2014). De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1). <https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>



- Kothekar, S. C., Ware, A. M., Waghmare, J. T., & Momin, S. A. (2007). Comparative analysis of the properties of Tween-20, Tween-60, Tween-80, Arlacel-60, and Arlacel-80. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(3). <https://doi.org/10.1080/01932690601108045>
- Kronberg, B., Holmberg, K., & Lindman, B. (2014). *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers* (1st ed., Vol. 9781119961246). Wiley.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(1–2). [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00007-9)
- Lendínez Gris, M. C. (2016). Estudio de emulsiones altamente concentradas de tipo W/O: relación entre tamaño de gota y propiedades. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.001>
- Liu, K., Sun, Y., Cao, M., Wang, J., Lu, J. R., & Xu, H. (2020). Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.005>
- Liu, Z., Li, Z., Zhong, H., Zeng, G., Liang, Y., Chen, M., Wu, Z., Zhou, Y., Yu, M., & Shao, B. (2017). Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 5, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.021>
- Mahmood, M. E., & Al-koofee, D. a F. (2013). Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 13(4).
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9). <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maria Del R. Rocha Pizasa. (2005). *Utilidad De Una Etiqueta De Poli-Fflstidina Para La Purificacion De La Hormona Del Crecimiento Bovino Recombinante* [Universidad Autonoma De Nuevo Leon]. <http://eprints.uanl.mx/1673/1/1080127594.PDF>
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 212(4489). <https://doi.org/10.1126/science.6162199>
- Miguel Ángel Suárez Valdés. (2012). *Emulsificación Con Membranas: Emulsión Monodispersas Y Parámetros De Paso De Escala* [Universidad de Oviedo]. https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/13459/TD_miguelangelsuarezvaldes.pdf?



sequence=2&isAllowed=y

- Milton J. Rosen, & Joy T. Kunjappu. (2004). *Surfactants and Interfacial Phenomena* (3rd ed.). <https://books.google.com.co/books?id=pdTsgREZp5QC&lpg=PR15&ots=-84HXfsSrR&lr&hl=es&pg=PR15#v=onepage&q&f=false>
- Montoya, J. L. M. (2004). Nuevos tensioactivos. *OFFARM*, 23.
- Moritz, C. P. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>
- Nourafkan, E., Hu, Z., & Wen, D. (2018). Controlled delivery and release of surfactant for enhanced oil recovery by nanodroplets. *Fuel*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.01.013>
- Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>
- Pal, N., Samanta, K., & Mandal, A. (2019). A novel family of non-ionic gemini surfactants derived from sunflower oil: Synthesis, characterization and physicochemical evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.111>
- Pérez Bejarano, J. V., Fajardo Rojas, F., Alvarez, O., Burgos, J. C., Reyes, L. H., & Pradilla, D. (2021). *Novel Biosurfactants: Rationally Designed Surface-Active Peptides and in Silico Evaluation at the Decane-Water Interface*. Universidad de los Andes.
- Qiu, L. G., Wu, Y., Wang, Y. M., & Jiang, X. (2008). Synergistic effect between cationic gemini surfactant and chloride ion for the corrosion inhibition of steel in sulphuric acid. *Corrosion Science*, 50(2). <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2007.07.010>
- Rabilloud, T. (2012). Silver staining of 2D electrophoresis gels. *Methods in Molecular Biology*, 893. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6_5
- Raquel E. Anton. (2005). *Tensión Interfacial*. Universidad de Los Andes. https://es.firp-ula.org/wp-content/uploads/2019/06/S203_Tension.pdf
- Ricardo, F., Pradilla, D., Cruz, J. C., & Alvarez, O. (2021). Emerging emulsifiers: Conceptual basis for the identification and rational design of peptides with surface activity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094615>
- Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., & Hage, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 1157). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>
- Rodríguez, V., Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2014). Design and implementation of a high yield



- production system for recombinant expression of peptides. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-65>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Smith, B. V., & Ierapepritou, M. G. (2010). Integrative chemical product design strategies: Reflecting industry trends and challenges. In *Computers and Chemical Engineering* (Vol. 34, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.02.039>
- Soltaninasab, S., Ahmadzadeh, M., Shahhosseini, S., & Mohit, E. (2022). Evaluating the efficacy of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for host cell protein (HCP) removal from anti-HER2 scFv expressed in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106004>
- Steinhilber, D., Witting, M., Zhang, X., Staegemann, M., Paulus, F., Friess, W., Kuchler, S., & Haag, R. (2013). Surfactant free preparation of biodegradable dendritic polyglycerol nanogels by inverse nanoprecipitation for encapsulation and release of pharmaceutical biomacromolecules. *Journal of Controlled Release*, 169(3). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.008>
- Tang, W., Sun, Z. Y., Pannell, R., Gurewich, V., & Liu, J. N. (1997). An efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator. *Protein Expression and Purification*, 11(3). <https://doi.org/10.1006/pep.1997.0800>
- Tao, W., Lin, J., Wang, W., Huang, H., & Li, S. (2019). Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from Bacillus subtilis CICC 20034. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1221-y>
- Tehrani-Bagha, A. R. (2016). Cationic gemini surfactant with cleavable spacer: Emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 508. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.08.020>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Peptide Synthesis and Proteotypic Peptide Analyzing Tool*. Retrieved November 26, 2021, from <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/protein-biology/peptides-proteins/custom-peptide-synthesis-services/peptide-analyzing-tool.html>
- Thermo Fisher Scientific™. (n.d.). *Estándar de proteínas de amplia gama sin tñir PageRuler™ en electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y western blott*. Retrieved December 17, 2021, from <https://www.fishersci.es/shop/products/pageruler-unstained-broad-range-protein-ladder/p-4530011>
- Torchilin, V. P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 73, Issues 2–3). [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00299-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00299-1)
- Tripathy, D. B., Mishra, A., Clark, J., & Farmer, T. (2018). Synthesis, chemistry, physicochemical



- properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. In *Comptes Rendus Chimie* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.11.005>
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. In *Biotechnology Advances* (Vol. 24, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001>
- Ward, O. P. (2010). Microbial biosurfactants and biodegradation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_5
- Weiszhar, Z., Czucz, J., Révész, C., Rosivall, L., Szebeni, J., & Rozsnyay, Z. (2012). Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, tween-80 and tween-20. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.016>
- Xiong, Y. L. (1997). Protein Denaturation and Functionality Losses. In *Quality in Frozen Foods*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_8
- Yada, S., Matsuoka, K., Nagai Kanasaki, Y., Gotoh, K., & Yoshimura, T. (2019). Emulsification, solubilization, and detergency behaviors of homogeneous polyoxypropylene-polyoxyethylene alkyl ether type nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 564. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.030>
- Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H., & Dunn, M. J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21(17). [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200011\)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200011)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6)
- Yano, Y. F. (2012). Kinetics of protein unfolding at interfaces. In *Journal of Physics Condensed Matter* (Vol. 24, Issue 50). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/50/503101>
- Yin, L. M., Edwards, M. A., Li, J., Yip, C. M., & Deber, C. M. (2012). Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303602>
- Yoshii, N., Fujimoto, K., & Okazaki, S. (2016). Molecular dynamics study of the structure of anionic SDS, cationic DTAC, zwitterionic DDAO, and nonionic C12E8 spherical micelles in solution. *Journal of Molecular Liquids*, 217. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.062>
- Zhai, J. li, Day, L., Aguilar, M. I., & Wooster, T. J. (2013). Protein folding at emulsion oil/water interfaces. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 18, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.002>
- Zhang, D., Sha, M., Pan, R., Lin, X., Xing, P., & Jiang, B. (2019). Synthesis and properties study of novel fluorinated surfactants with perfluorinated branched ether chain. *Journal of Fluorine Chemistry*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2018.11.001>



Purificación del péptido PolyGly y evaluación de sus propiedades interfaciales y emulsificantes

Mishel Yelitza Porras Ariza

- Zhao, M., Lv, W., Li, Y., Dai, C., Wang, X., Zhou, H., Zou, C., Gao, M., Zhang, Y., & Wu, Y. (2018). Study on the synergy between silica nanoparticles and surfactants for enhanced oil recovery during spontaneous imbibition. *Journal of Molecular Liquids*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.034>
- Zheleznov, A., Windmüller, D., Körner, S., & Bøddeker, K. W. (1998). Dialytic transport of carboxylic acids through an anion exchange membrane. *Journal of Membrane Science*, 139(1). [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(97\)00271-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(97)00271-8)