

**ACTIVIDAD INTERFACIAL EN EL SISTEMA DODECANO-AGUA DE LAS MUTACIONES 6 Y 12 DE LA
PROTEÍNA TRANSMEMBRANAL A (OMPA) PROVENIENTES DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI***

LISETH DANIELA VILLAMIZAR GOMEZ

**PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA**



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PAMPLONA, DICIEMBRE 2022



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria *Escherichia coli*

Liseth Daniela Villamizar Gomez

ACTIVIDAD INTERFACIAL EN EL SISTEMA DODECANO-AGUA DE LAS MUTACIONES 6 Y 12 DE LA PROTEÍNA TRANSMEMBRANAL A (OMPA) PROVENIENTES DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

LISETH DANIELA VILLAMIZAR GOMEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de

INGENIERA QUÍMICA

Director: ALEXANDER LUNA CORTES

Ingeniero Químico Esp. MSc. en Ingeniería Química

ANDRÉS GONZÁLEZ BARRIOS

Ingeniero Químico PhD. en Ingeniería Química

Codirector

LUIS HUMBERTO REYES

Ingeniero Químico PhD. en Ingeniería Química

Línea de Investigación:

Biología molecular, diseño de productos y procesos



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

Dedicatoria

Mi trabajo de grado está dedicado a Dios, a mi papá Eduardo Villamizar que sé que desde el cielo está muy orgulloso de todo lo que he logrado y de todo lo que voy a lograr, sin él nada de esto hubiera sido posible, a mi mamá Zulay Gomez Moreno que con su gran esfuerzo me ayudó a cumplir mi meta de ser ingeniera química y a mi abuela Carmen Moreno que siempre ha sido un gran apoyo para mí, ellos con sus palabras me orientaron y me animaron a terminar la carrera.

A mi familia y a mis amigos que siempre me extendieron su mano en los momentos que quise renunciar a mis sueños, cuando las cosas se ponían difíciles y no me sentía capaz de seguir, gracias por no dejarme desfallecer y por todo el amor brindado.



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad de los Andes por haberme permitido realizar mi trabajo de grado allí, principalmente al profesor Andrés González Barrios y al profesor Luis Humberto Reyes quienes me orientaron y me guiaron en este proceso, también quiero agradecer al profesor Alexander Luna Cortes por su asesoramiento, tiempo y acompañamiento durante este trabajo brindándome sus conocimientos a través de cada uno de las etapas de este proyecto. Por último, a mis compañeros Cristian, Camila, Roxana, Catalina y a mi familia que estuvieron presentes en mi formación académica.

Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO



RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Pregunta de investigación	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	12
4. METODOLOGÍA.....	16
4.1. Materiales.	16
4.2. Curva de crecimiento de las mutaciones 6 y 12 en E. coli.	16
4.3. Producción de la expresión de las mutaciones en E. coli.	17
4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tricina-dodecilsulfato sódico (tricina-SDS-PAGE) para comprobar la expresión de las proteínas (mutaciones).	19
4.5. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) Ni^{2+} de las mutaciones marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.	20
4.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tricina-dodecilsulfato sódico (tricina-SDS-PAGE) después de la purificación.....	22
4.7. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) Co^{2+} de las mutaciones marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.....	23
4.8. Medición de la tensión interfacial de las mutaciones 6 y 12 en el sistema dodecano-agua y elaboración de emulsiones.	24
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. Obtención de la curva de crecimiento de las mutaciones 6 y 12 en E. coli BL21.	27
5.2. Obtención de la expresión de las mutaciones 6 y 12 en E. coli.	29
5.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) de las mutaciones marcadas con histidina.....	32
5.4. Cuantificación de la tensión interfacial y estabilidad de la emulsión dodecano-agua.	40
6 CONCLUSIONES.....	46
7 RECOMENDACIONES	47
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48



RESUMEN

El empeño por desarrollar productos que no amenacen el medio ambiente llevó a los investigadores a buscar nuevas alternativas que pudieran reemplazar los productos derivados del petróleo, entre estos se encuentran los biosurfactantes, los cuales representan una alternativa para reemplazar a los surfactantes convencionales (Sarubbo et al., 2022). En la actualidad, se ha demostrado que ciertos tipos de proteínas son potenciales biosurfactantes, dentro de estas se encuentra la proteína transmembranal *OmpA*, la cual es ampliamente investigada (Aguilera-Segura et al., 2016; Andersen & Otzen, 2014; Cardona Jaramillo et al., 2020) y mediante modificaciones aleatorias en su gen ha mostrado mejor desempeño. En un estudio previo del grupo de investigación de la Universidad de los Andes esta proteína fue clonada y se le realizaron modificaciones aleatorias en el gen, obteniendo que los mutantes 6 y 12 eran potenciales biosurfactantes teniendo un valor interfacial menor que la proteína *OmpA*, estas pruebas se hicieron con el extracto proteico (sin purificar). La tensión interfacial afecta la transferencia de masa a través de la interfaz líquido-líquido y la estabilidad de sistemas dispersos, al momento de disminuir esta tensión con un biosurfactante la molécula de la fase dispersa es dispersada en la fase continua en forma de pequeñas gotas (Zhao et al., 2022). Este proyecto usó *E. Coli* BL21 con las mutaciones 6 y 12 que fueron inducibles con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), sobreexpresando las mutaciones con colas de histidina (codificada en el plásmido *PET6xHN-N*), que fueron purificadas mediante cromatografía por afinidad, se evaluó la tensión interfacial y su capacidad para estabilizar emulsiones en la interfaz dodecano-agua. Usar las proteínas como surfactantes tiene efectos positivos en la tensión interfacial ya que al usar el lavado 2 de ambas mutaciones exhibió una disminución de la tensión de 9.10 dyn/cm para la mutación 6 y 15.15 dyn/cm para la mutación 12, a diferencia del *tween 20* (surfactante derivado del petróleo) que tuvo una disminución de la tensión interfacial de 22.00 dyn/cm mediante el método de gota pendiente. Con el índice de estabilidad del turbiscan y el análisis de retrodifusión de luz “*backscattering*”, se obtuvo que la emulsión era más



estable con la mutación 6 en comparación a la emulsión preparada con la mutación 12.

Palabras clave: Proteína de membrana externa A (OmpA), tensión interfacial, biosurfactantes, emulsiones O/W, etiqueta de histidina.

ABSTRACT

The effort to develop products that do not threaten the environment has led researchers to seek new alternatives that can replace petroleum products, among these are biosurfactants, which represent an alternative to replace conventional surfactants. Currently, it has been shown that certain types of proteins are potential biosurfactants, within these are transmembrane protein OmpA, which has been widely investigated (Aguilera-Segura et al., 2016) and through random modifications in its gene has shown better performance. In a previous study by the research group of the Universidad de los Andes, this protein was cloned and random modifications were made to the gene, obtaining that mutants 6 and 12 were potential biosurfactants, having a lower interfacial value than the OmpA protein, these tests were made with the protein extract (unpurified). The interfacial tension affects the mass transfer through the liquid-liquid interface and the stability of dispersed systems, when this tension is reduced with a biosurfactant, the molecule of the dispersed phase is dispersed in the continuous phase in the form of small droplets (Zhao et al., 2022). This project used E. coli BL21 with mutations 6 and 12 that were inducible with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), overexpressing the histidine-tagged mutations (encoded on plasmid PET6xHN-N), which were purified by chromatography by affinity, the interfacial tension and its ability to stabilize emulsions at the dodecane-water interface were evaluated. Using proteins as surfactants has positive effects on interfacial tension since when using wash 2 of both mutations, it exhibited a decrease in tension of 9.10 dyn/cm for mutation 6 and 15.15 dyn/cm for mutation 12, unlike tween 20 (petroleum-derived surfactant) that had a decrease in interfacial tension of 22.00 dyn/cm by means of the hanging drop method. With the turbiscan stability index and



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

backscattering light analysis, it was found that the emulsion was more stable with mutation 6 compared to the emulsion prepared with mutation 12.

Keywords: Outer membrane protein A (OmpA), interfacial tension, biosurfactants, O/W emulsions, histidine tag.



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la comunidad científica ha ido evolucionando rápidamente con el fin de desarrollar productos sostenibles que no dependan de recursos no renovables (Othmani et al., 2022), los surfactantes son productos empleados en todo el mundo ya que tienen propiedades como emulsificación y dispersión (Madankar CS, 2022). Una emulsión es un sistema conformado por dos fases que son inmiscibles, en la cual por medio de un surfactante una de las fases es dispersada en la otra en forma de pequeñas gotas (Jose et al., 2022). Si la fase orgánica es dispersa en agua se denominan emulsiones *organic/water* (O/W) y en caso contrario serían emulsiones *water/organic* (W/O), las emulsiones por lo general son sistemas inestables, donde su estabilidad depende de surfactantes (Erich et al., 2016), estos son usados para estabilizar emulsiones en productos como, detergentes, alimentos, petróleo y productos relacionados con la salud (Othmani et al., 2022).

Una de las alternativas usadas en Colombia para el transporte de crudos es la tecnología de emulsiones, sin embargo, los riesgos ambientales son altos ya que pueden suceder derrames a través de fugas. Los surfactantes presentan preocupaciones ambientales debido a su fuente de origen, la mayoría de estos son derivados del petróleo, esto provoca dificultades en los ecosistemas, ya que tienen una degradación lenta (Banat et al., 2010), recientemente se ha publicado sobre el uso de tensoactivos biológicos (Kashif et al., 2022). El uso de biosurfactantes son una alternativa en la industria petrolera, que busca obtener una buena productividad en la recuperación mejorada de hidrocarburos, para evitar el uso de sustancias tóxicas (Segura et al., 2014). Los biosurfactantes son sintetizados a partir de microbios, un ejemplo de esto es a través de bacterias, como la *bacillus subtilis* y *pseudomonas aeruginosa* (Ng et al., 2022). Los biosurfactantes tienen ventajas sobre los emulsificantes convencionales para el uso en muchos campos, entre ellos el cuidado del medio ambiente y biomedicina (Segura et al., 2014), otras ventajas son, menor toxicidad, son biodegradables y tienen menor costo (Ng et al., 2022).



La bioeconomía en el proceso de producción de biosurfactantes utiliza materias primas baratas y promueve iniciativas para utilizar residuos, con los cuales se pueden obtener productos valiosos. La economía verde donde se reutiliza, se reduce y se reciclan residuos, garantiza la sostenibilidad de biosurfactante seguros y rentables (Linda Mgbechidinma et al., 2022). En el grupo de la Universidad de los Andes, la proteína OmpA ha demostrado un papel importante como biosurfactante potencial, y se ha demostrado que a través de evolución dirigida se pueden crear mutaciones que presentan mejores resultados al momento de estabilizar emulsiones.

1.1. Pregunta de investigación

¿Es posible la disminución de la tensión interfacial mediante el uso de un biosurfactante purificado y derivado de una proteína?

Teniendo en cuenta que los biosurfactantes son sustitutos prometedores para reemplazar a los surfactantes convencionales (Vaz et al., 2012), este trabajo tuvo como objetivo la purificación, cuantificación de la tensión interfacial y evaluación de la estabilidad de la emulsión (O/W) dodecano-agua con el efecto de las mutaciones 6 y 12 (por separado), que tienen potencial como biosurfactante, con el fin de crear una alternativa amigable con el medio ambiente, obteniendo que si es posible disminuir la tensión interfacial con el uso de biosurfactantes derivados de una proteína.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar las propiedades tensoactivas en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína *OmpA*.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer los parámetros que permitan obtener las mutaciones 6 y 12 de la proteína *OmpA* con una pureza elevada.
- Cuantificar la disminución en la tensión interfacial del sistema dodecano-agua por la acción de las mutaciones 6 y 12 de la proteína.
- Evaluar el efecto de las mutaciones 6 y 12 de la proteína *OmpA* sobre la estabilización en emulsiones dodecano-agua.



3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

Una de las alternativas para medir la estabilidad de una emulsión es la variación del número de gotas con respecto al tiempo, esta información no se puede obtener experimentalmente sino mediante la variación del tamaño de gota con el tiempo. En la práctica, dicha estabilidad es relacionada con el volumen de las fases separadas (Martín et al., 2016). El turbiscan es un instrumento usado para analizar la estabilidad de las emulsiones, este se fundamenta en el análisis multivariable de dispersión de luz, el cual envía fotones sobre la muestra desde una fuente de luz infrarroja con longitud de onda de 880nm, una vez los fotones son dispersados por las gotas que están presentes en la emulsión, emergen de la muestra y son recogidos por dos detectores, el detector de transmisión que es empleado para muestras transparentes o diluidas y el detector *backscattering* o retrodispersión que es empleado para muestras opacas o concentradas, este principio de funcionamiento es implementado para analizar la estabilidad de emulsiones agua-aceite en función del espacio y el tiempo (Medina León, 2020).

Los surfactantes comprenden una variedad de moléculas anfipáticas que tienen fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas, estas hacen posible la reducción de la tensión superficial en las interfases (Farias et al., 2021). La mayor parte del mercado de surfactantes se satisface con productos (surfactantes) químicos (Yea et al., 2019). Los biosurfactantes son productos naturales amigables con el medio ambiente y son generados de forma sostenible, es por esto que los biosurfactantes son vistos como un reemplazo de los surfactantes convencionales o derivados del petróleo (Sarubbo et al., 2022). Los biosurfactantes son de naturaleza anfipática por lo que reducen la tensión interfacial, una forma de clasificar los biosurfactantes es por su peso. Dentro de los biosurfactantes de alto peso molecular se encuentran las proteínas (Lustman, 2009).

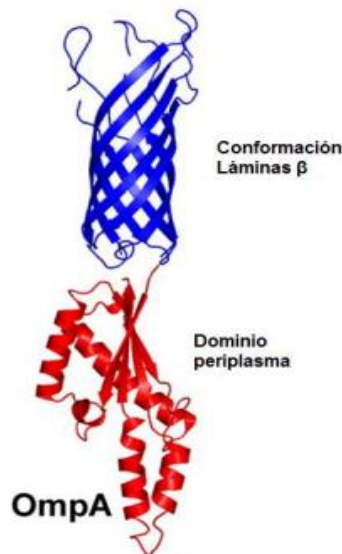
Las proteínas transmembranales son un objeto de estudio como agente biosurfactante, puesto que contienen cadenas hidrofóbicas e hidrofílicas, estas interactúan con el medio de la membrana y el



periplasma (Alejandra et al., 2014), la proteína de membrana externa A (*OmpA*) de *Escherichia coli* (*E. Coli*) tiene propiedades anfipáticas las cuales cumplen un papel importante en la formación de biopelículas en este microorganismo (Aguilera-Segura et al., 2016), su estructura está conformada por dos dominios, N-terminal y el C-terminal, que le confieren propiedades de surfactante (Alfonso & Santos, 2016), en la figura 1 se puede observar que la estructura terciaria de esta proteína está conformada por 170 residuos en el dominio N- terminal, con ocho cadenas β antiparalelas y 155 residuos en la C-terminal (dominio periplásmico) (Segura et al., 2014).

Figura 1

Modelo OmpA. El dominio de láminas β representa la parte hidrofóbica y el dominio periplasma la parte hidrofílica, estructura anfipática de la molécula que imita la acción de un tensoactivo (Segura et al., 2014).



Con el fin de obtener proteínas con características mejoradas, la investigadora francesa H. Arnold, del Instituto de Tecnología de California, inspiró sus investigaciones en la evolución dirigida de enzimas, esto imita la evolución natural. La evolución dirigida consiste en hacer mutaciones al azar o de



sitio dirigido al ADN el cual codifica para la proteína, para después hacer una detección de las variantes y seleccionar las que presentan mejoras en las propiedades deseadas (Diana M. Mate, 2019). Con el fin de desarrollar proteínas que exhiban mejores propiedades tensioactivas, estudios previos desarrollados en la Universidad de los Andes por los investigadores Vanessa Núñez Vélez, Silvia Restrepo Restrepo, Óscar Álvarez Solano Y Andrés González Barrios han demostrado que la proteína *OmpA* de (*E. Coli*) es un potencial biosurfactante. Además, las modificaciones aleatorias a esta proteína pueden mejorar su capacidad de reducir la tensión interfacial en el sistema dodecano-agua, ellos introdujeron mutaciones aleatorias a la secuencia del gen de *OmpA* (barajado de ADN), ampliando la gama de moléculas y mejorando la capacidad de esta para reducir la tensión interfacial. A los mutantes (extractos proteicos) se les realizaron pruebas de tensión interfacial al exponerlos en la interfaz dodecano-agua, se les evaluaron los cambios de tensión interfacial, cada extracto de proteína se añadió a 2mL de la emulsión hasta una concentración de 0,055% y esto fue homogenizado con un sonicador, la tensión interfacial fue cuantificada con tensiómetro óptico y la técnica seleccionada fue el método de la gota pendiente con el método de ajuste de perfil de gota Young-Laplace, aquí se encontró que dos mutantes denominados 6 (7,5 mN/m) y 12 (19,8 mN/m) alcanzaron un valor de tensión interfacial menor que la proteína original *OmpA* (27,3mN/m). Estas mutaciones se encontraban en un plásmido el cual no tenía colas de histidina. En un trabajo posterior las mutaciones fueron transferidas al vector de clonación *PET6xHN-N*, el cual tenía 6 colas de histidina (ver figura 2) (Mendoza Ospina et al., 2020), el uso de estas “colas” permiten la unión a la fase estacionaria los cuales contienen grupos quelantes de Ni^{2+} para hacer posible la purificación (Bernabeu Zornoza, 2015). Para poder obtener estas proteínas (mutaciones) purificadas, una alternativa es mediante cromatografía por afinidad, esta técnica de separación es selectiva ya que se basa en interacciones coordinadas entre iones metálicos inmovilizados en un material de soporte y algunos residuos de aminoácidos expuestos en este caso la histidina, las proteínas



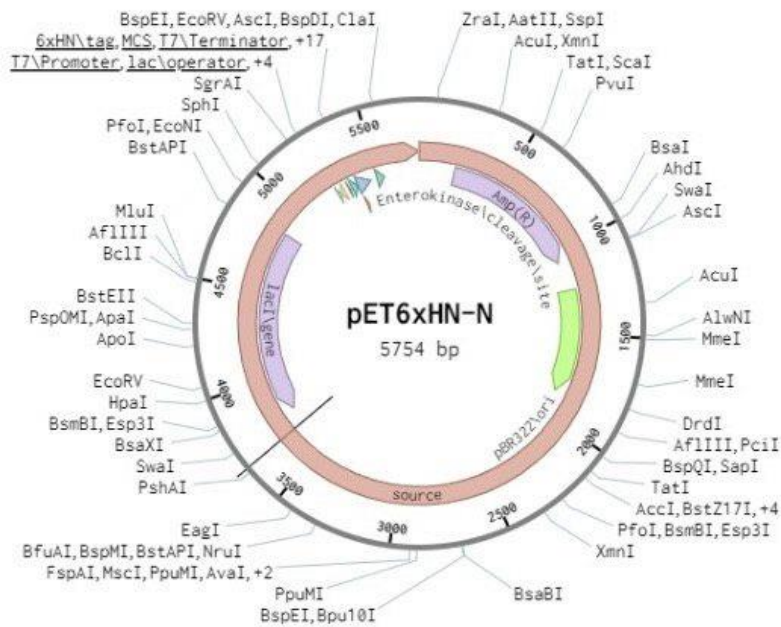
Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

marcadas con una etiqueta de histidina (tag-his) se unen a la fase estacionaria en la resina de la columna haciendo posible la purificación de estas mismas (Fioravante & Bueno, 2022).

Figura 2

Mapa del plásmido pET6xHN – N. El gen represor es el lacI. La región de resistencia a la ampicilina se denomina Amp (R) y el sitio 6xHN es donde se encuentran las colas de histidina.





4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales.

Agar-agar, triptona, NaCl (usado en la purificación), extracto de levadura, NaH_2PO_4 , ampicilina (usada para el cultivo celular, las bacterias resistentes pueden seguir creciendo y multiplicarse), medio LB, imidazol (usada en la purificación para eluir las proteínas con cola de histidina), etanol, ácido acético, acetato de sodio, NiCl_2 , glicerol, tris, lisozima, EDTA, acetato de sodio, TEMED, APS, acrilamida, bis-acrilamida, dodecilsulfato de sodio (SDS), glutaraldehído, azul de Coomassie, isopropil-1-tio- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), resina Profinity™ IMAC, beta-mercaptoetanol, tricina. *E. Coli* BL21 que contiene las proteínas de interés.

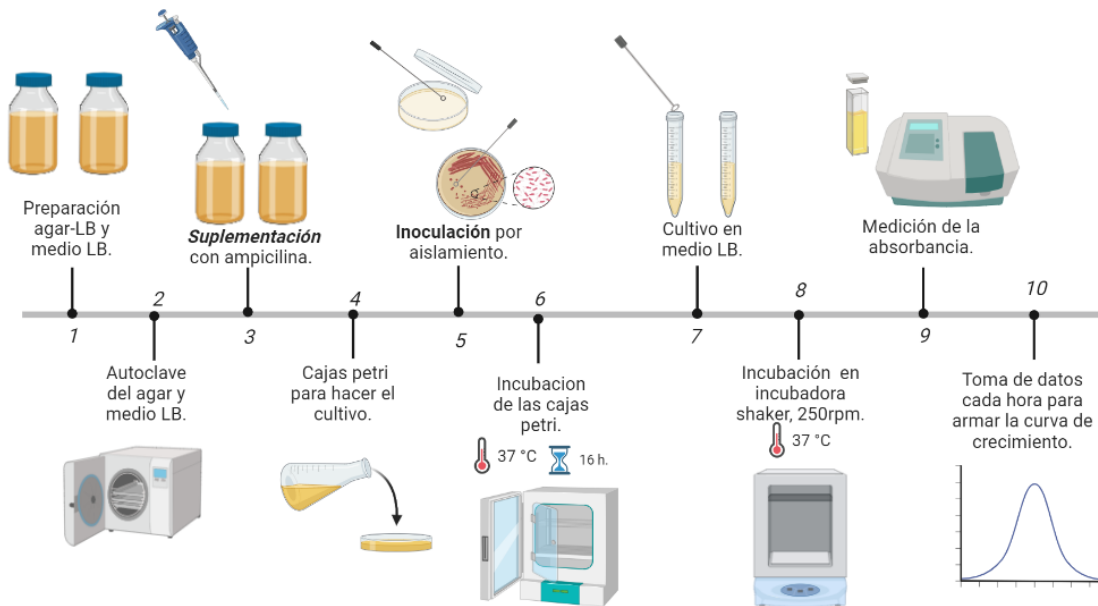
4.2. Curva de crecimiento de las mutaciones 6 y 12 en *E. coli*.

Se preparó el cultivo en cajas petri (cada mutación por separado), con 1.5g agar-agar, 1g triptona, 1g *NaCl*, 0,5g extracto de levadura y 100mL de agua destilada, esta mezcla se puso en autoclave (Tuttle et al., 2021), posteriormente se suplementó con ampicilina (100 ug/mL) y se procedió a elaborar el cultivo de la bacteria con las mutaciones, es necesario hacer este procedimiento debido a que la bacteria *E. coli* y el plásmido donde se encuentran estas mutaciones está almacenado a -80°C . Con un asa metálica se inoculó por aislamiento cada caja petri, seguidamente se dejó en incubación durante 16 horas a 37°C para el crecimiento celular (se hicieron 4 cajas petri 2 para cada mutación). Se elaboró caldo de Lisogenia (LB) para el crecimiento de la bacteria en medio líquido (suplementado con ampicilina), en 2 tubos falcon se adicionaron 20 mL del medio LB en cada uno, a uno de ellos se le adicionó la bacteria con un asa metálica, esta se tomó de la caja petri (una unidad formadora de colonia), seguidamente los tubos falcon se dejaron en una incubadora shaker a 37°C y 250 rpm, cada hora se midió la absorbancia para conocer la concentración de oligonucleótido de la bacteria con una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro uv-vis, se tomaron datos durante 8 horas con el

fin de armar la curva de crecimiento y determinar el momento apropiado para realizar la inducción con IPTG, esto se hizo para cada mutación por separado (figura3) (Alfonso & Santos, 2016).

Figura 3.

Metodología seguida para la elaboración de la curva de crecimiento. Fuente: Elaboración propia.



4.3. Producción de la expresión de las mutaciones en *E. coli*.

Se elaboró un cultivo de 50 mL del medio LB suplementado con ampicilina (100 ug/mL) donde se introdujo la bacteria con la mutación, seguidamente se dejó en una incubadora shaker por aproximadamente 14 horas a 37 °C y 250 rpm, posteriormente se midió la densidad óptica (O.D) para preinocular un erlenmeyer en donde el cultivo empezó con un OD de 0.2 (punto inicial del cultivo), esto se calculó con la ecuación 1, $OD_{cultivo}$ hace referencia al OD del crecimiento celular, el V_1 es la cantidad de pre inóculo necesario para obtener un OD_{600} de 0.2. Se agregó el volumen calculado (V_1) al erlenmeyer y este fue aforado con medio LB más ampicilina (100 ug/mL) hasta 100 mL, se dejó en incubación a 37 °C y 250 rpm. Alcanzada la fase semilogarítmica del crecimiento (O.D) = 0.6-0.8, se sacó

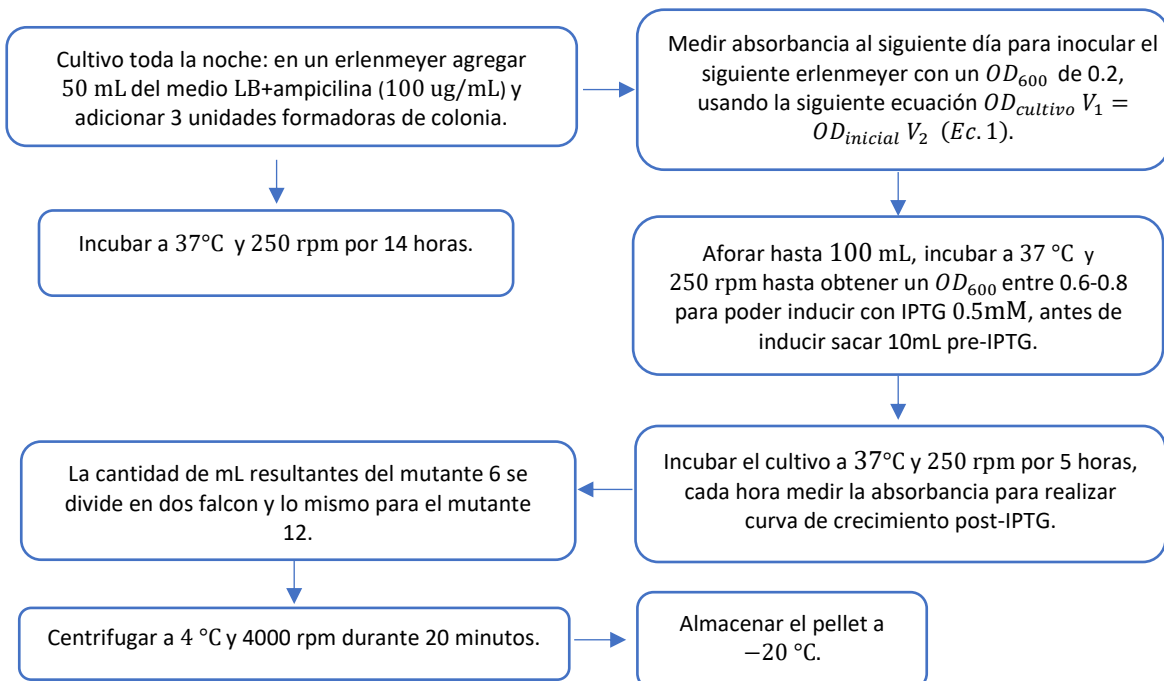


un control negativo (pre-IPTG) con el fin de observar si hubo expresión de la proteína después de la inducción. Se procedió a la inducción mediante isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) con una concentración de 0.5 mM, seguidamente se dejaron crecer las células durante 5 horas en una incubadora shaker a las mismas condiciones que estaban antes de la inducción, pasado este tiempo el volumen del erlenmeyer se dividió en dos falcon (fueron pesados), con el fin de obtener el pellet o sólidos sedimentados del cultivo usando una centrifuga refrigerada durante 20 minutos a una velocidad de 4000rpm y 4 °C, el sobrenadante fue desechado y los sólidos que quedaron en el fondo fueron pesados. Fueron almacenados a –20 °C, esto se realizó para cada mutación por separado (figura 4).

$$OD_{cultivo} V_1 = OD_{inicial} V_2 \text{ (Ec. 1)}$$

Figura 4.

Protocolo para la expresión de las mutaciones.





4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tricina-dodecilsulfato sódico (tricina-SDS-PAGE) para comprobar la expresión de las proteínas (mutaciones).

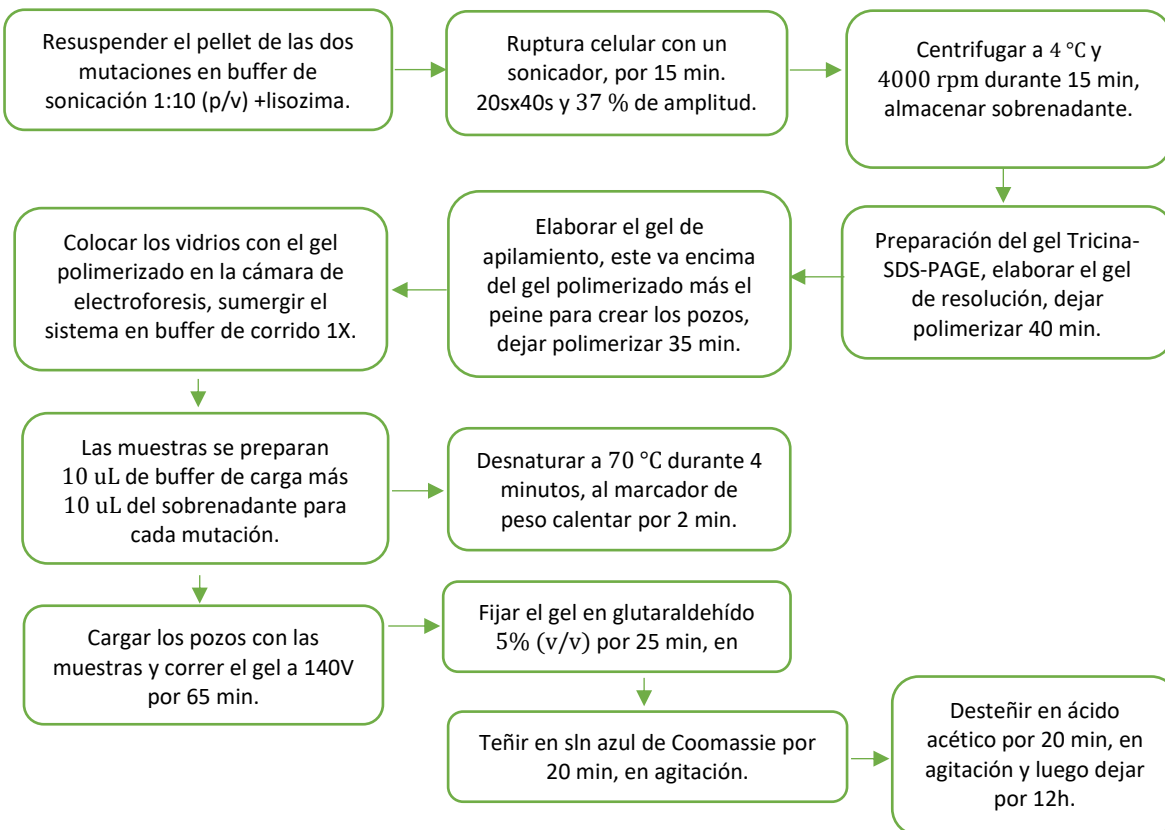
El sedimento bacteriano se sometió a un proceso de ruptura celular mediante un sonicador de punta. Para ello el pellet se resuspendió en buffer de sonicación, esta muestra fue sumergida en hielo para evitar la degradación de la proteína. El procedimiento se llevó a cabo con una amplitud del 37%, durante 15 minutos con pulsos de 20 segundos encendido y 40 segundos apagado. Después de la ruptura celular, la muestra fue centrifugada a 4 °C y 4000 rpm durante 20 minutos y se recolectó el sobrenadante. Para la separación de proteínas con un peso molecular menor de 30kDa especialmente entre 1 – 20kDa se usa el método electroforético tricina-dodecilsulfato sódico (tricina-SDS-PAGE) (Jiang et al., 2016). Lo primero que se realizó para la elaboración de los geles fue el gel de resolución, donde la muestra corre y lo segundo es el gel de apilamiento, donde se agregan las muestras. En un molde de placas de vidrio se vertió el gel de resolución (agua/acrilamida:bisacrilamida /tris 2.5M pH 8.8/TEMED/APS), dejando un espacio de 2cm en la parte superior de las placas y se dejó polimerizar por 40 minutos, seguidamente se inyectó el gel de apilamiento (agua/acrilamida:bisacrilamida /tris 2.5M pH 8.8/TEMED/APS) y se le insertó un peine para crear los pozos de carga, se dejó polimerizar durante 35 minutos (Haider et al., 2012). Una vez polimerizado el gel fue retirado el peine y el sistema de moldes, con el fin de ensamblar las placas de vidrio en el tanque de electroforesis vertical (BIO-RAD Labs., n.d.). La cámara de electroforesis se llenó con buffer de corrida 1X (agua/tricina/SDS/tris) hasta la parte superior del gel. Finalizado este paso se procedió a preparar las muestras que fueron cargadas en el gel, las muestras contenían 10 uL de buffer de carga más 10 uL del sobrenadante almacenado, antes de las muestras ser añadidas al gel fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 70 °C, junto con el marcador de peso, el cual fue calentado por 2 minutos a 60 °C. Las muestras fueron sembradas y se dejó correr el gel por 65 minutos con un voltaje de 140V. Terminada la electroforesis se separó el gel de las placas de vidrio y se dejó en solución de fijación durante 25 minutos (en agitación), luego se tiñó el gel con azul de



Coomassie por 20 minutos (en agitación), para finalizar se adicionó la solución de destinción durante 20 minutos, nuevamente se agregó solución de destinción y se dejó destañir durante toda la noche. La visualización de las bandas se realizó con un documentador de geles (figura 5) (Haider et al., 2012).

Figura 5.

Protocolo para electroforesis tricina-SDS-PAGE.



4.5. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) Ni^{2+} de las mutaciones marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.

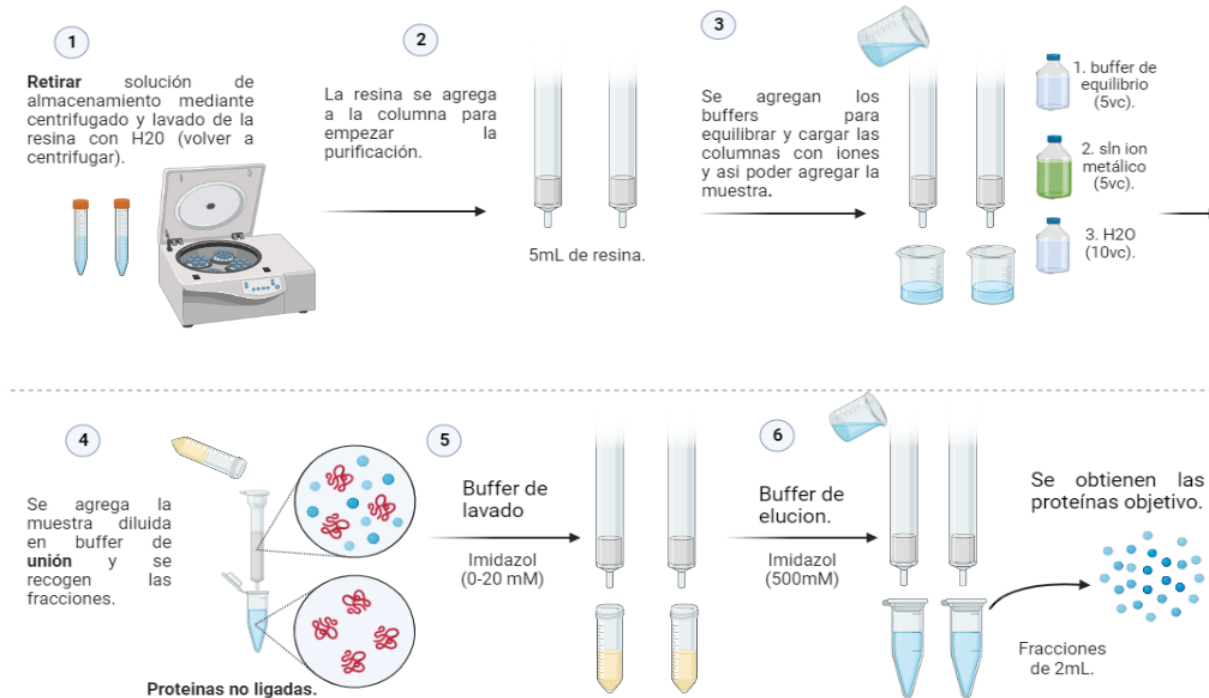
Finalizada la verificación de la expresión de las proteínas, se procedió a la purificación de las mutaciones. Para la preparación de la muestra se añadieron 15mL de la resina con la solución de almacenamiento en dos falcon, estos fueron centrifugados para retirarles la solución de almacenamiento quedando 5mL de la resina en cada falcon, posteriormente se lavó la resina con 5



volúmenes de columna con agua destilada y nuevamente fue centrifugada. La resina fue cargada a dos columnas empaquetadas (cada una con 5mL de resina) para así poder purificar al tiempo las dos mutaciones (cada sobrenadante del lisado en una columna diferente), se equilibraron las columnas con 5 volúmenes de columna con buffer de equilibrio pH 4.0, el cual fue elaborado con acetato de sodio y cloruro de sodio (NaCl) 300mM. Las columnas fueron cargadas con 5 volúmenes de columna con solución de ion metálico $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, las columnas se volvieron a equilibrar con 5 volúmenes de columna con buffer de equilibrio, con el fin de eliminar el exceso de iones metálicos. Las columnas se lavaron con 10 volúmenes de columna con agua desionizada y equilibradas con 5 volúmenes de columna con buffer de unión pH 8.0, este fue elaborado con fosfato sódico (NaH_2PO_4) 50 mM y cloruro de sodio 300 mM. Para la purificación de proteína en la columna empaquetada son necesarios 3 buffers, el primero el buffer de unión en donde las proteínas que no tienen colas de histidina son recogidas (no ligando), segundo el buffer de lavado en donde salen las proteínas con poca afinidad que no fueron retiradas con el buffer de unión, este buffer contiene concentraciones bajas de imidazol y por último el buffer de elución, en donde se recogen las fracciones con la proteína de interés, este buffer contiene concentraciones de imidazol elevadas (Alfred Nobel, 2000). El imidazol en la purificación es usado para eluir las proteínas marcadas con His, estas se unen a los iones Ni adheridos a la resina en la columna de cromatografía, el exceso de imidazol hace que se desplacen y se liberen las proteínas con la etiqueta (Patil, 2010). Se cargaron a las columnas los dos sobrenadantes del lisado bacteriano (cada sobrenadante en una columna) diluido con 5 volúmenes de columna con buffer de unión, se recogieron las dos fracciones en dos falcon. Continuando, se agregaron 5 volúmenes de columna de buffer de lavado el cual contiene bajas concentraciones de imidazol de (0 – 20mM), se recogieron las fracciones en dos falcon. Se continuó con las eluciones en donde se agregaron 5 volúmenes de columna de buffer de elución, este tenía una concentración de 500 mM de imidazol, se recolectaron entre 10 a 11 fracciones de a 2mL (figura 6) (Alfred Nobel, 2000).

Figura 6.

Metodología seguida para la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) Ni^{2+} . Fuente: Elaboración propia.



4.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tricina-dodecilsulfato sódico (tricina-SDS-PAGE) después de la purificación.

Anteriormente mencionado en la sección 5.4, los geles se elaboran con un área de resolución y un área de apilamiento. La cámara de electroforesis se llenó con buffer de corrida 1X (agua/tricina/SDS/tris). Las muestras que fueron añadidas en los pozos del gel, contenían 10 uL de buffer de carga más 10 uL de las muestras (proteínas no ligadas, lavado y eluciones), las muestras fueron desnaturaladas durante 5 minutos a 70 °C, junto con el marcador de peso y se escogieron 5 muestras aleatoriamente de eluciones. Las muestras fueron sembradas y se dejó correr el gel por 65 minutos con un voltaje de 140V. Terminada la electroforesis se separó el gel de las placas de vidrio y se



dejó en solución de fijación durante 25 minutos (en agitación), luego se tiñó el gel con azul de Coomassie por 20 minutos (en agitación), para finalizar se adicionó la solución de destinción durante 20 minutos, nuevamente se agregó solución de destinción y se dejó desteñir durante toda la noche. La visualización de las bandas se realizó con un documentador de geles (Haider et al., 2012).

4.7. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) Co^{2+} de las mutaciones marcadas con histidina utilizando condiciones no desnaturalizantes.

La cromatografía de afinidad es un método que se basa en la afinidad de las moléculas de interés por metales inmovilizados de una superficie. Estos metales de transición pueden ser Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} (Alfred Nobel, 2000). Se decidió utilizar otro tipo de metal para verificar si los resultados obtenidos con níquel estaban siendo precisos. Para el montaje de la columna de cobalto se usaron dos soportes universales, 2 columnas de cobalto y 2 pinzas, el montaje se puede evidenciar en anexos (figura 1), la columna funciona por (RBV) *resine bed volumes*, 1RBV es igual a 2mL. Una vez finalizado el montaje, se dejó asentar la resina por 5 minutos y se esperó que la solución de almacenamiento (etanol) saliera por gravedad. Se adicionaron 2 RBV del buffer de equilibrio cobalto a cada columna, este fue elaborado con (Na_2HPO_4) 50mM, NaCl 300mM, 10mM de imidazol y se ajustó el pH a 7.4. Se cargó a la columna la muestra obtenida de la lisis celular. Para esta columna es recomendado agregar máximo 1.5mL de la muestra, para evitar que la columna se obstruya. Se recolectó la muestra en dos falcon (proteínas lo ligadas). Finalizado este paso la columna se lavó con 6 RBV con el buffer de equilibrio cobalto y se recolectaron 3 lavados en 3 falcon, 4mL en cada uno, estos fueron marcados como lavado 1, 2 y 3 (para cada mutación). Para desligar la proteína de interés de la resina, se agregaron 8 RBV de buffer de lavado de heparina, este fue elaborado con (Na_2HPO_4) 50mM, NaCl 300mM, 250mM de imidazol y se ajustó el pH a 8.0. se recolectaron 4 eluciones en 4 falcon, cada uno con 4mL, estos fueron marcados como elución 1, 2, 3 y 4. Para regenerar la columna se agregaron 10 RBV de buffer de



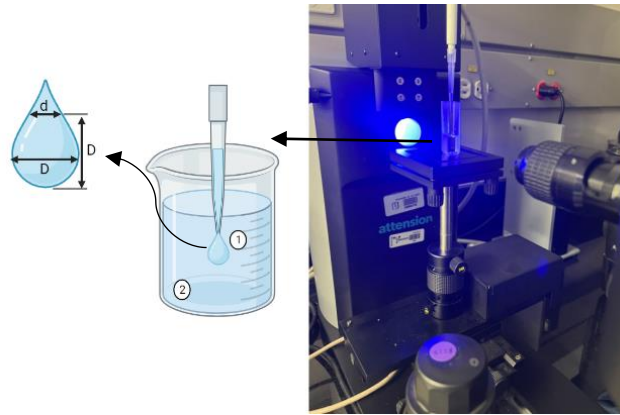
regeneración cobalto (20mM de MES, pH 5.0), luego se agregaron 10 RBV de agua tipo II y finalmente 10 RBV de etanol al 20%. La columna se almacenó con 1mL de etanol al 20% a 4°C (G-Biosciences, n.d.).

4.8. Medición de la tensión interfacial de las mutaciones 6 y 12 en el sistema dodecano-agua y elaboración de emulsiones.

Después de verificar la purificación de las proteínas en el gel de tricina, se cuantificaron las muestras obtenidas, el lavado 2 y la elución 1 con un espectrofotómetro UV-VIS (nanodrop), con el fin de preparar la dilución con 0.034% w/v de surfactante (en este caso proteína). Para cada concentración de proteína se midió la tensión interfacial mediante el método de gota pendiente y la ecuación de Young-Laplace. El método gota pendiente se considera como el principal y el más factible para medir la tensión interfacial, aunque este tiene consigo limitaciones, ya que no mide tensiones ultrabajas, alrededor de 10^{-3} mN/m (Esfandiarian et al., 2022). Mediante una punta de micropipeta se dejó suspendida una gota de la dilución agua-proteína en dodecano (figura7), donde la gota debió formar una geometría de equilibrio entre la fuerza de gravedad que tiende a estirar la gota y la tensión entre los líquidos que tiende a encogerla, el tensiómetro cuenta con una cámara de alta resolución que capturó las imágenes de la gota, estas fueron transferidas al *software OneAttension*, en donde se procesaron las imágenes y se obtuvieron los valores de tensión interfacial para cada dilución.

Figura 7.

Tensiómetro óptico y método de gota pendiente en el sistema dodecano-agua. 1 dilución agua-proteína, 2 dodecano. Parámetros geométricos de la gota, D diámetro máximo de la gota, d diámetro de la extremidad de la gota a D.



Las emulsiones preparadas fueron directas (O/W), se utilizó un proceso semi-batch, este consiste en incorporar la fase dispersa en la continua de manera paulatina (Tadros, 2004), en donde la fase dispersa fue 15% (n-dodecano) y 85% de la fase continua (dilución agua-proteína), se determinó la cantidad de agua a agregar debido a que el buffer que contenía a las proteínas era una solución de sales y este se toma como parte de la fase continua. Se homogenizó la fase continua con un agitador mecánico (Dispermat) durante 4 minutos a 700rpm y mediante una bomba peristáltica se agregó la fase dispersa gota a gota en la fase continua. El caudal de incorporación de la bomba fue de 0.1mL/s. Las dos fases fueron homogenizadas nuevamente con el agitador mecánico durante 10 minutos a 1400rpm. El montaje de la homogenización de la emulsión se encuentra en la figura 8.

La emulsión preparada se vertió en un vial de vidrio (se utilizaron 15mL de la emulsión), esto se introdujo en la cerda cilíndrica del turbiscan (figura 8) y el equipo se programó para tomar la medida de la altura de la fase acuosa separada en el tiempo durante 30 minutos, con esto se produce un barrido periódico desde la base de la muestra hasta la parte superior del vial, en donde se obtuvieron los perfiles de luz transmitida y difractada. Como se mencionó en la sección 4 el turbiscan es un equipo que mide la estabilidad de la emulsión y se fundamenta en el análisis multivariable de dispersión de luz. La muestra utilizada se preparó con la concentración de biosurfactante que mostró una mayor disminución de la tensión interfacial para cada proteína. Con los resultados obtenidos del turbiscan se siguieron



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

diferentes mecanismos de inestabilidad como sedimentación, formación de crema, floculación, coalescencia y separación de fases (Lee et al., 2022).

Figura 8.

(Izq.) Montaje utilizado para la homogenización de la emulsión con el uso del Dispermat. (Der.) equipo turbiscan, la celda cilíndrica se encuentra en la parte superior del equipo y los viales usados se encuentran en la parte inferior de la imagen.





5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención de la curva de crecimiento de las mutaciones 6 y 12 en *E. coli* BL21.

Mencionado anteriormente en la sección 5.2, la curva de crecimiento es necesaria para determinar el momento apropiado en el cual se debe realizar la inducción (Alfonso & Santos, 2016). En la figura 9 se muestra la curva de crecimiento obtenida para la mutación 6 contenida en *E. coli* BL21. En esta figura se puede observar que la fase exponencial comenzó en la hora 2 de las mediciones hasta más o menos la hora 7, después de la hora 7 se puede observar un comportamiento estacionario, donde la densidad del cultivo fue de 1.402. Con los resultados obtenidos de esta curva se determinó que el tiempo indicado para la inducción con IPTG con un OD_{600} de 0.6 a 0.8 es entre la hora 3 y la hora 4. Por otro lado, la figura 10 muestra la curva de crecimiento de la mutación 12, en donde la fase exponencial comenzó a la hora 3 de las mediciones hasta la octava hora, no se pudo observar la fase estacionaria durante las ocho horas de medición. Para la inducción de esta mutación se determinó que es entre la hora 3 hasta la hora 4. En anexos se encuentra la tabla 1 y 2 con los resultados obtenidos para la construcción de las curvas de crecimiento. Se decidió que la inoculación del cultivo para realizar la expresión se empezaría con un OD de 0.2, esto significó que la inducción se debía realizar cuando el cultivo tenía entre una hora a hora y media de incubación, en el rango de 0.6 a 0.8 (para las dos mutaciones).

Figura 9.

Curva de crecimiento de E. coli BL21 con el plásmido PET6xHN-N que contiene la mutación 6, en un volumen de 20mL de medio LB.



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

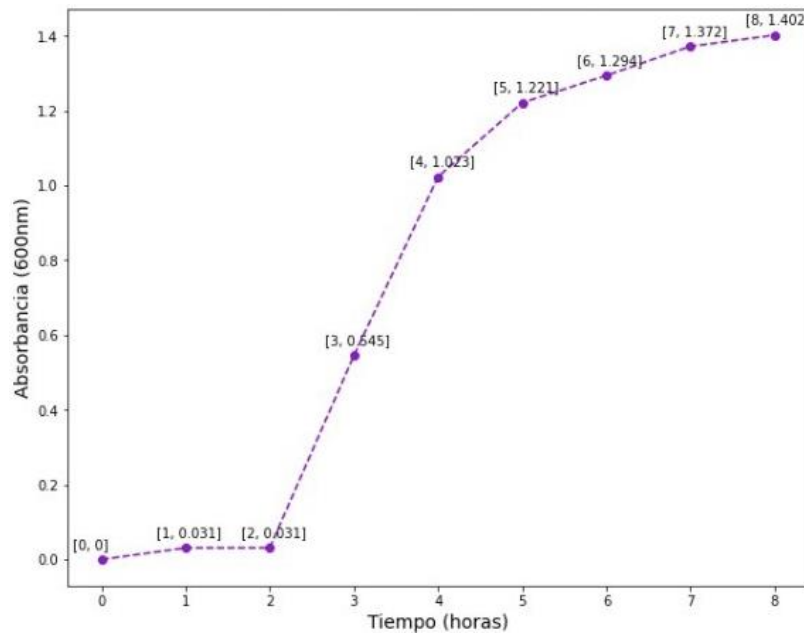
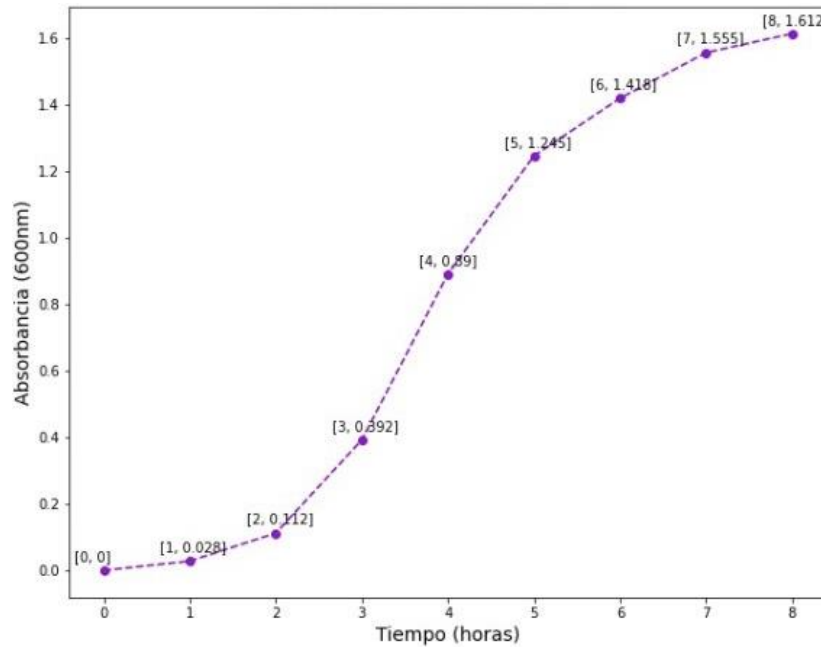


Figura 10.

Curva de crecimiento de E. coli BL21 con el plásmido PET6xHN-N que contiene la mutación 12, en un volumen de 20mL de medio LB.





5.2. Obtención de la expresión de las mutaciones 6 y 12 en *E. coli*.

En la expresión de las proteínas es importante tener en claro la concentración del agente inductor debido a que si la concentración de este es muy alta puede tener efectos tóxicos sobre la célula, el control de la inducción es un proceso difícil. Uno de los agentes más populares para la inducción es el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para las proteínas con el operón Lac (Khani & Bagheri, 2020). Para el primer cultivo se agregaron 50mL en dos erlenmeyer con 1 unidad formadora de colonia (de la mutación 6 y 12 respectivamente en cada erlenmeyer por separado), esto se dejó en incubación y 14 horas después su densidad óptica fue medida, 1.683 para la mutación 6 y 1.756 para la mutación 12, con esto se procedió a hacer un nuevo cultivo en el cual se inocularon 2 erlenmeyer, uno para cada mutación con la (Ec.1), para la mutación 6 se agregaron 11.88mL del cultivo *overnight* y se aforó hasta 100mL con medio LB suplementado con ampicilina. Para la mutación 12 se agregaron 11.39mL del cultivo *overnight* y se aforó de la misma manera que la mutación 6. Los 2 erlenmeyer se pusieron en incubación y una hora y media después su densidad óptica fue medida. Para la mutación 6 su densidad fue de 0.651 y para la mutación 12 fue de 0.641, antes de inducir se sacaron dos alícuotas de 10mL de cada mutación, con el fin de tener un control negativo y poder observar en la electroforesis si hay diferencia entre un cultivo sin inducir y el otro con inducción. Se indujo con 0.5mM de IPTG y se dejó por 5 horas en incubación, esto se centrifugó y el *pellet* fue almacenado a -20°C . La sonicación de este *pellet* se realizó con buffer de sonicación (NaH_2PO_4 , NaCl y Triton x – 100) adicionalmente se le agregó lisozima (1mg/mL). La lisozima es una enzima de origen natural que destruye las paredes celulares, mediante la destrucción del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetotiramámico y acetil glucosamina del peptidoglicano (Dong & Sun, 2021). Se decidió guardar el sobrenadante de la primera centrifugación (1.s) con el fin de observar si la expresión de la proteína estaba ocurriendo extracelular o intracelular. En el gel (figura 11 y 12) se observa que en (1.s) no hubo presencia de proteína, lo indica que la expresión ocurrió intracelular. Por otra parte, no se nota una gran diferencia entre el control



negativo (pre-IPTG) comparándolo con el post-IPTG, indicando que hubo problemas en la expresión. En la figura 11 y 12 se usó marcador de peso para proteínas con pesos moleculares de 10kDa a 250kDa, por lo cual la banda de las mutaciones se debía marcar por debajo de 10kDa.

Figura 11.

Resultados gel tricina-SDS-PAGE para la verificación de la expresión de la proteína con buffer de sonicación y lisozima para la mutación 6. Concentración de IPTG 0,5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 muestra pre-IPTG, carril 6 (1.s) primer sobrenadante y carril 9 muestra post-IPTG.

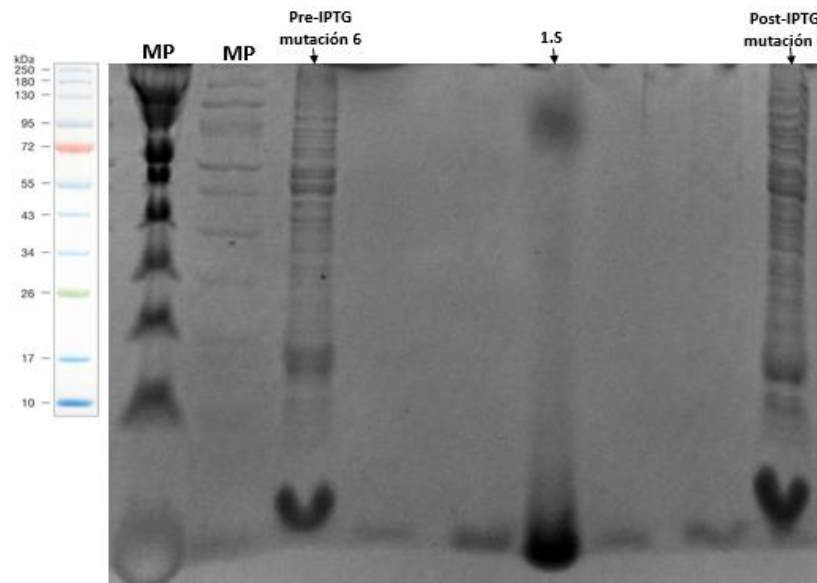
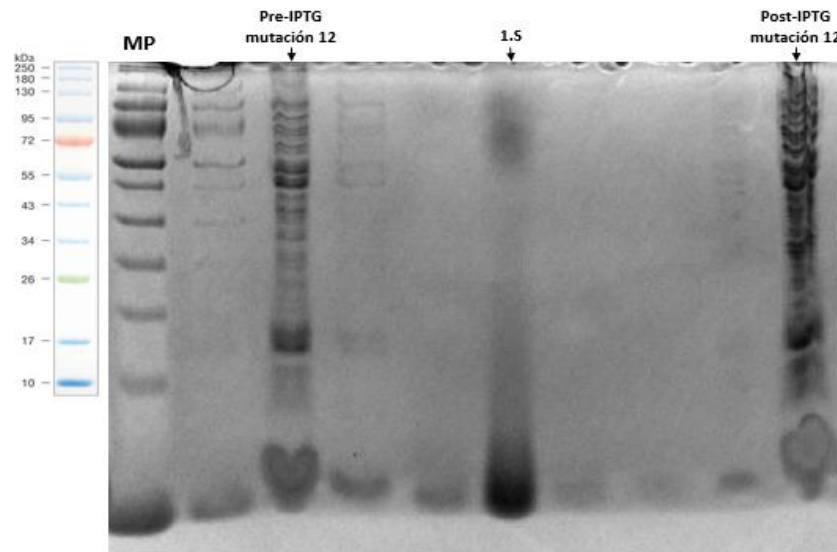


Figura 12.

Resultados gel tricina-SDS-PAGE para la verificación de la expresión de la proteína con buffer de sonicación y lisozima para la mutación 12. Concentración de IPTG 0,5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 muestra pre-IPTG, carril 6 (1.s) primer sobrenadante y carril 10 muestra post-IPTG.



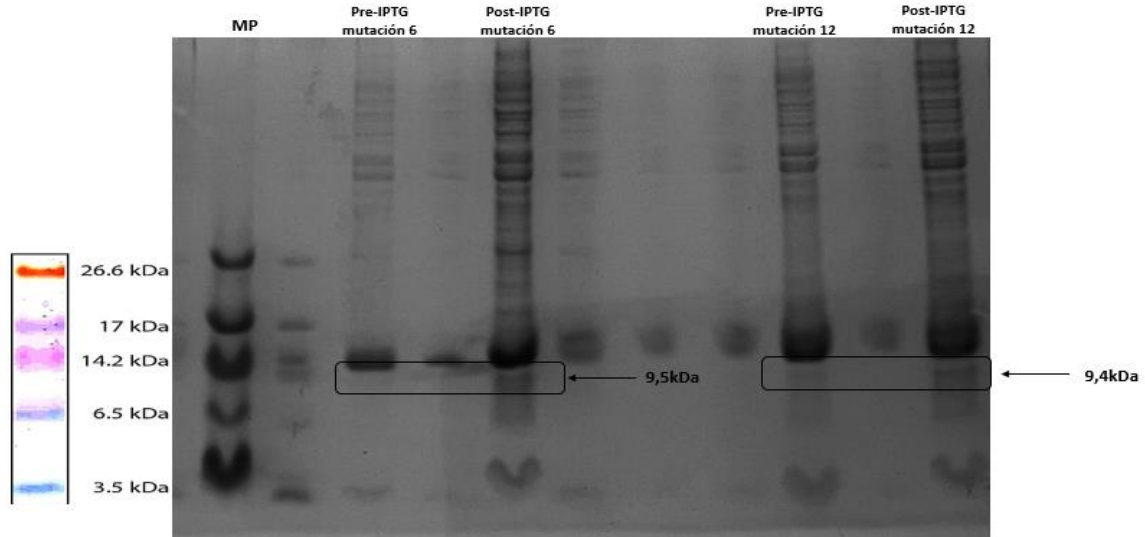
Al no encontrarse diferencia entre la muestra pre-IPTG y post-IPTG se realizó un nuevo cultivo con las dos mutaciones, con la finalidad de aumentar la concentración de IPTG de 0.5mM a 1mM. Se dejaron en incubación los erlenmeyer y 14 horas después se midió su absorbancia dando 1.698 para la mutación 6 y 1.728 para la mutación 12, con este cultivo se inocularon los nuevos erlenmeyer que empezaron con una densidad óptica de 0.2. Hora y media después la absorbancia de los dos cultivos fue medida, dando 0.622 para la mutación 6 y 0.671 para la mutación 12, se sacaron los controles negativos de cada mutación y se indujeron los dos cultivos con 1mM de IPTG, 5 horas después la muestra se centrifugó y fue sonicada. Se prepararon las muestras para correr el gel, obteniendo una diferencia entre las bandas pre-IPTG y post-IPTG para la mutación 6. Por otro lado, la mutación 12 no tuvo una diferencia notoria, esto se puede observar en la figura 13, en donde las mutaciones se encuentran dentro del rectángulo. Adicionalmente se observan otras bandas debido a que las muestras no han pasado por el proceso de purificación.

Figura 13.

Resultados gel tricina-SDS-PAGE para la verificación de la expresión de la proteína con buffer de sonicación y lisozima. Concentración de IPTG 1mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 muestra pre-



IPTG mutación 6, carril 5 muestra post-IPTG mutación 6, carril 9 muestra pre-IPTG mutación 12 y carril 11 muestra post-IPTG mutación 12.



5.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) de las mutaciones marcadas con histidina.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la expresión de la proteína se realizó la purificación de las mutaciones. Se utilizó una concentración del buffer de lavado de 20mM de imidazol. En la figura 14 se puede observar que la proteína de interés al parecer no quedó ligada a la resina y salió con las proteínas no ligadas (señalada con la flecha). En la elución 2 no se observa la proteína de interés, por otro lado, se marcaron otras bandas diferentes a esta, esto también indica que la purificación tuvo problemas ya que se ligaron otras proteínas a la resina. Por otra parte, en la figura 15 no se observa la presencia de la proteína de interés ni en las proteínas no ligadas, ni en el lavado y tampoco en las eluciones. La selección del sistema óptico para la expresión, depende de varios factores como las propiedades de la proteína de interés, las características de la bacteria, el origen biológico y los niveles de expresión (González & Fillat, 2018), como se mencionó en la sección 6.2 si la concentración de este es muy alta puede tener efectos tóxicos. En estudios donde indujeron



la proteína *OmpA* utilizando 2mM de IPTG, este no tuvo efectos tóxicos en la célula (Carrero Pinto, 2011). Se decidió hacer un nuevo cultivo y aumentar la concentración de IPTG a 1.5mM para ambas mutaciones, con el fin de mejorar la expresión y poder evidenciar las mutaciones en el gel. En este caso la célula no tuvo problemas con esta concentración de IPTG, ya que creció de la misma manera.

Figura 14.

Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 6. Concentración de IPTG 1.0mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 proteínas no ligadas, carril 4 lavado 20mM de imidazol, carril 8 elución 2, carril 9 elución 4, carril 11 elución 6, carril 13 elución 8, carril 14 elución 10.

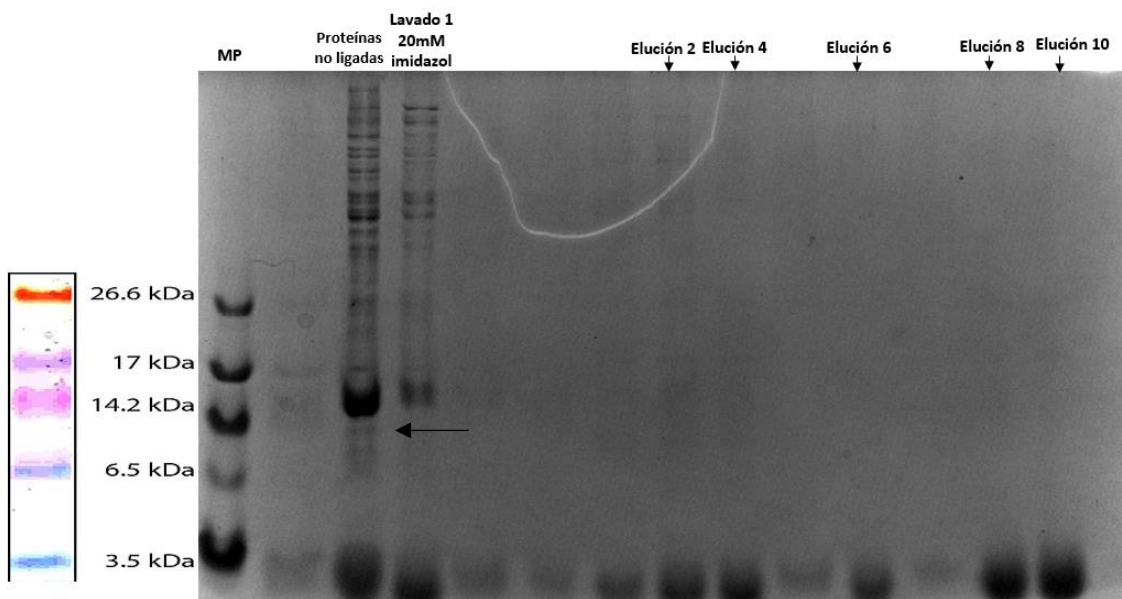


Figura 15.

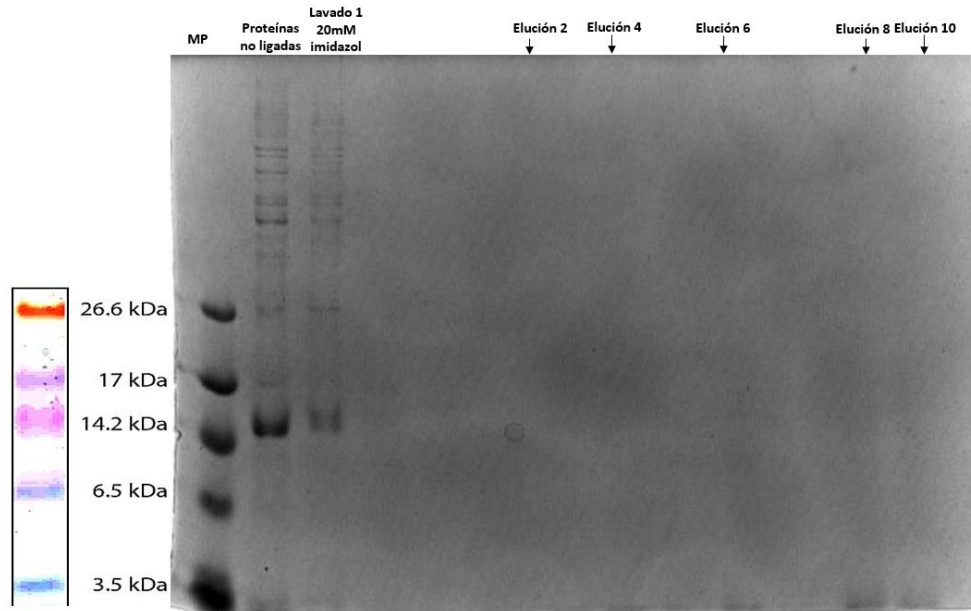
Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 12. Concentración de IPTG 1.0mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 2 proteínas no ligadas,



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria *Escherichia coli*

Liseth Daniela Villamizar Gomez

carril 3 lavado 20mM de imidazol, carril 7 elución 2, carril 9 elución 4, carril 11 elución 6, carril 13 elución 8, carril 14 elución 10.

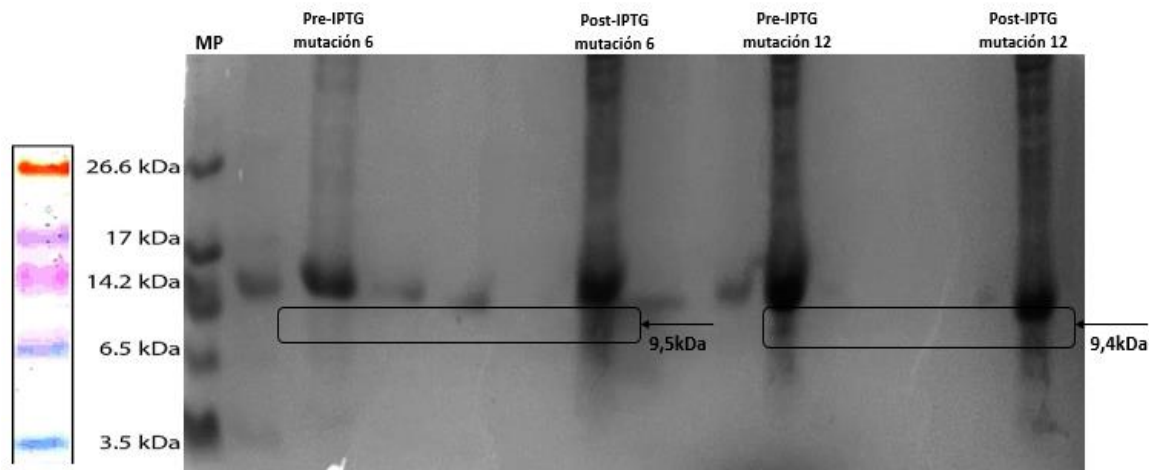


Se realizó el mismo procedimiento de la sección 6.2. La absorbancia de los cultivos *overnight* dio 1.027 para la mutación 6 y 1.079 para la mutación 12, estos valores fueron bajos en comparación con los obtenidos en los cultivos anteriores, esto se deben a que las cajas de agar en donde estaban los cultivos ya llevaban 27 días en almacenamiento. Las placas de agar tienen una vida útil entre 30 a 90 días, es por esto que la eficiencia y el crecimiento de la bacteria se ven afectados (v Rogers, 2015). Se inocularon los erlenmeyer y dos horas después la absorbancia de los dos cultivos fue medida, dando 0.621 para la mutación 6 y 0.650 para la mutación 12, se sacaron los controles negativos de cada mutación y se indujeron los dos cultivos con 1.5mM de IPTG, 5 horas después se centrifugó y la muestra fue sonicada. Con la electroforesis se pudo observar diferencia entre el control negativo y el cultivo con inducción de la mutación 6, con la mutación 12 se siguió obteniendo lo mismo, no se observa diferencia entre las dos muestras, esto se puede observar en la figura 16.

Figura 16.



Resultados gel tricina-SDS-PAGE para la verificación de la expresión de la proteína con buffer de sonicación y lisozima. Concentración de IPTG 1.5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, Carril 3 muestra pre-IPTG mutación 6, carril 7 muestra post-IPTG mutación 6, carril 10 muestra pre-IPTG mutación 12 y carril 15 muestra post-IPTG mutación 12.



La concentración de imidazol se disminuyó a 10mM y la concentración del NaCl en el buffer de lavado se aumentó a 1M, con el objetivo de poder establecer los parámetros de purificación apropiados, debido a que con la purificación anterior no se obtuvieron las proteínas de interés. Una alta concentración de imidazol en el buffer de lavado puede disminuir la unión de las proteínas marcadas con histidina (Soltaninasab et al., 2022), por otro lado, si esta concentración es baja ayudara a minimizar la unión inespecífica de proteínas que contienen residuos de colas de histidina (Alfred Nobel, 2000), es decir, algunas proteínas pueden tener de dos a tres colas de histidina. Es importante optimizar la concentración de imidazol para reducir la unión de proteínas de no interés y una unión más fuerte de la proteína objetivo (Soltaninasab et al., 2022). Lo mismo pasa con la concentración de NaCl, este aumenta la fuerza iónica de los buffers de purificación, ayudando a eliminar impurezas de las resinas Ni-NTA (Li et al., 2001), adicionalmente las interacciones electrostáticas de proteínas no específicas disminuye con fuerzas iónicas altas entre 0,1 a 1M de NaCl (Yap et al., 2010). En la purificación de la mutación 6, en la



elución 2 se observan que hay muchas bandas aparte de la esperada (figura 17), esto también pasó con las eluciones de la mutación 12 (figura 18), en donde en todas las eluciones se pueden observar más bandas, sin embargo, con los resultados obtenidos se demostró que una menor concentración de imidazol y mayor concentración de NaCl aumenta la cantidad de proteína que se une a la resina IMAC. Una posible causa de que se estén observando otras bandas aparte de la esperada, es la formación de cuerpos de inclusión al momento de la inducción, esto quiere decir que la proteína no tuvo un buen plegamiento y se forman agregados insolubles en el citoplasma de *E. coli*. La proteína cuando se encuentra dentro de los cuerpos de inclusión existe en diferentes conformaciones como desestructurada, parcialmente plegada, condiciones nativas o similares a las nativas y también láminas β cruzadas (Solov'eva et al., 2022). Los cuerpos de inclusión se producen a temperaturas de cultivo óptimas y elevadas (Singh et al., 2020), aunque en algunos estudios los cuerpos de inclusión se han producido por debajo de los 37 °C en donde tienen un mayor contenido de proteína en conformación similar a la nativa, indicando que el impacto de la temperatura en la formación de cuerpos de inclusión varía dependiendo de la proteína (Solov'eva et al., 2022). En este caso hubo formación de cuerpos de inclusión al momento de la inducción con la temperatura de 37 °C. Otra posible causa de error por la cual se pueden estar observando otras bandas, se debe a las columnas usadas, ya que estas tienen un volumen muy grande para la cantidad de resina que se utiliza, por lo cual cuando se agregaron los buffers de unión, lavado y elución, la resina se movía quedando desnivelada, esto se puede observar en anexos figura 2, no es recomendable que esto suceda debido a que puede ocasionar que las proteínas de interés, no logren unirse.

Figura 17.

Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC (Ni^{2+}) en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 6. Concentración de IPTG 1.5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 proteínas no



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

ligadas, carril 5 lavado 10mM de imidazol, carril 7 elución 2, carril 9 elución 4, carril 11 elución 6, carril 13 elución 8, carril 15 elución 10.

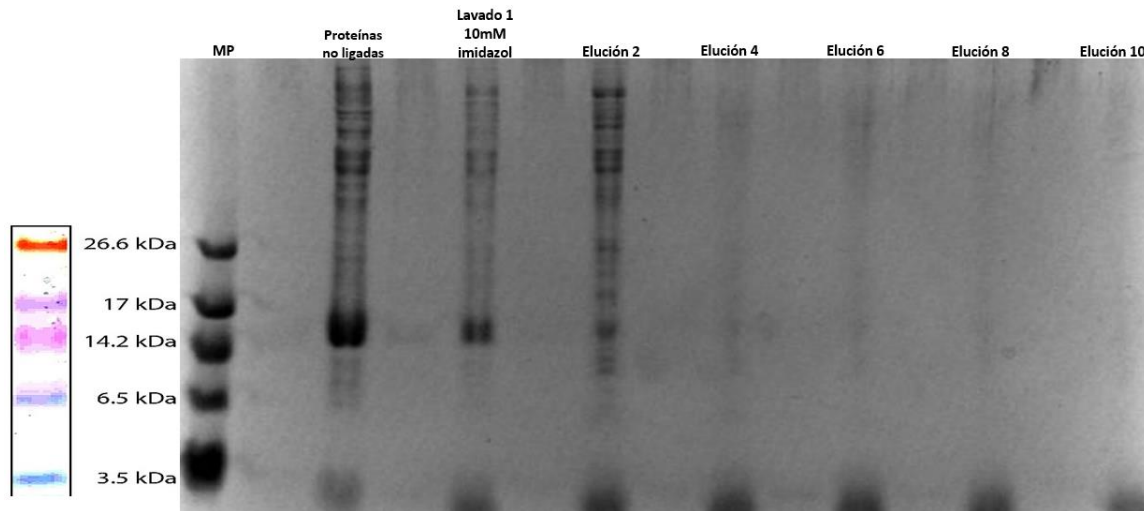
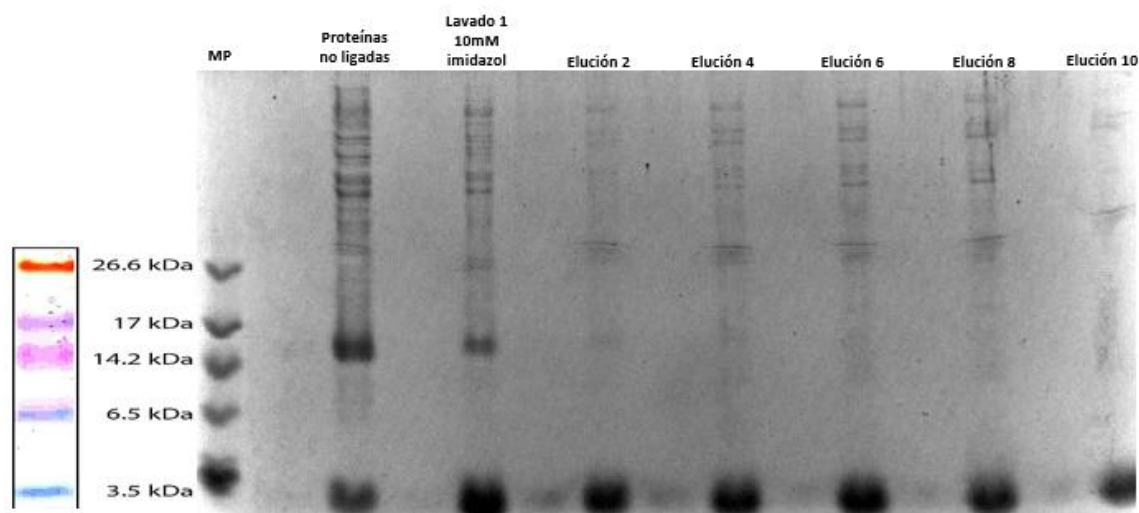


Figura 18.

Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC (Ni^{2+}) en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 12. Concentración de IPTG 1.5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 2 proteínas no ligadas, carril 3 lavado 10mM de imidazol, carril 7 elución 2, carril 9 elución 4, carril 11 elución 6, carril 13 elución 8, carril 14 elución 10.





Para corroborar los resultados de la purificación con níquel se realizó la purificación con columnas de cobalto. El metal Co es otra de las opciones para la purificación de proteínas, el cobalto es un metal selectivo con el cual se puede obtener más cantidad de proteína purificada en comparación con el níquel, con este se obtiene un mejor rendimiento, el cobalto y el níquel son los metales más usados para la purificación de proteínas (Lingg et al., 2020). En la figura 19 se puede observar que en el primer lavado salió una gran cantidad de proteínas no ligadas en comparación con el lavado 2 y 3, por otro lado, en la elución 1 se obtuvo la proteína de interés, esta se encuentra entre las bandas de marcador de peso 6.5 y 14.2kDa, la proteína esperada pesa 9.5 kDa (señalada con la flecha) y también se obtuvieron otras bandas debido al plegamiento de la proteína (cuerpos de inclusión) , esto mismo ocurrió con la purificación de la mutación 12, en donde se obtuvieron más bandas aparte de la objetivo (señalada con la flecha), esta tiene un peso de 9.4kDa (ver figura 20). Debido a que se obtuvieron otras bandas aparte de la esperada se mandó a realizar un western blot para corroborar los datos obtenidos con las dos purificaciones. En este ensayo la muestra se desnaturaliza y se separa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, luego las proteínas se transfieren a una membrana en donde por medio de un inmunoensayo se identifican las proteínas de interés (Booth et al., 2022), en este caso se utiliza un anticuerpo que reconoce la histidina, este ensayo se realizó en un laboratorio externo a la universidad de los Andes (VECOL S.A), obteniendo que hay formación de cuerpos de inclusión, esto se puede observar en la figura 21. Esto no significa que las mutaciones no estén purificadas, si no que hay un mal plegamiento en la estructura de estas, es decir, en el gel se observan partes de las mutaciones que no lograron tener un buen plegamiento.

Figura 19.

Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC (Co²⁺) en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 6. Concentración de IPTG 1.5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 2 (P.N) proteínas



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

no ligadas, carril 3 (L.1) lavado 1, carril 4 (L.2) lavado 2, carril 5 (L.3) lavado 3, carril 8 elución 1, carril 10 elución 2, carril 12 elución 3, carril 14 elución 4.

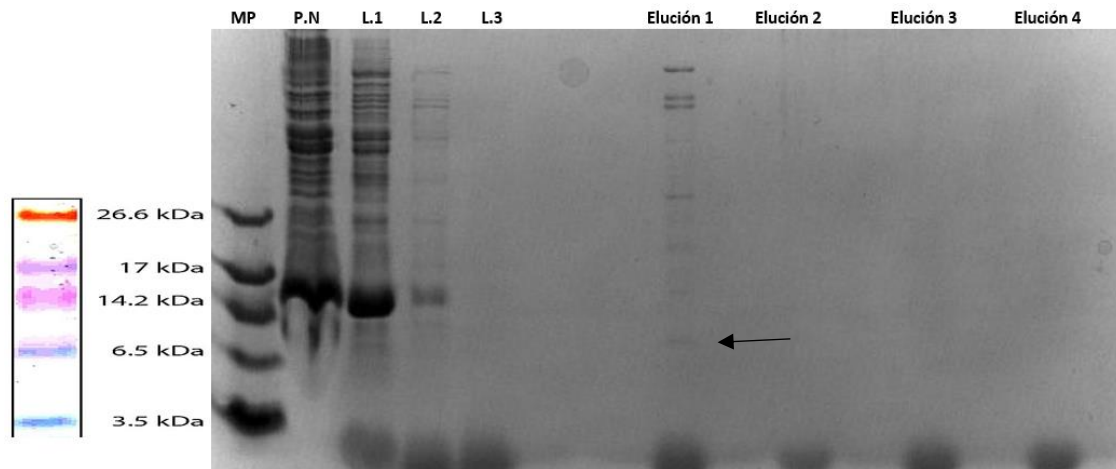


Figura 20.

Resultados de la purificación mediante cromatografía por afinidad IMAC (Co^{2+}) en gel tricina-SDS-PAGE de la mutación 12. Concentración de IPTG 1.5mM. Carril 1 (MP) marcador de peso, carril 3 (P.N) proteínas no ligadas, carril 4 (L.1) lavado 1, carril 5 (L.2) lavado 2, carril 6 (L.3) lavado 3, carril 9 elución 1, carril 10 elución 2, carril 12 elución 3, carril 14 elución 4

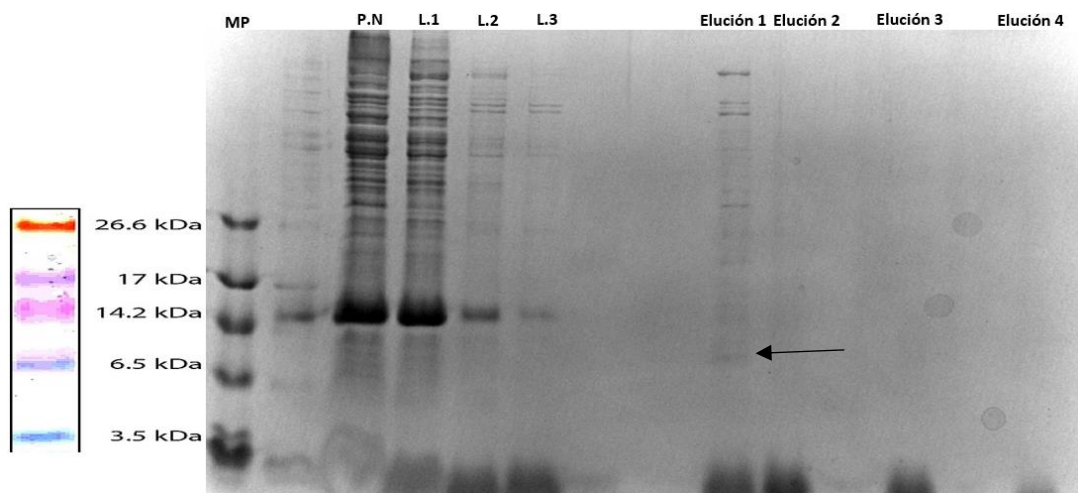
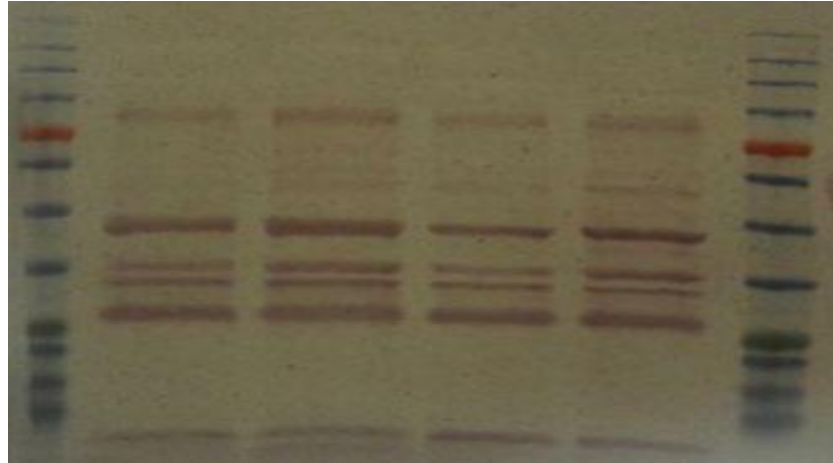


Figura 21.



Resultados obtenidos con western blot de las mutaciones 6 y 12. Carril 1-6 marcador de peso, carril 2-3 muestra purificada de la mutación 6 y carril 4-5 muestra purificada mutación 12.



5.4. Cuantificación de la tensión interfacial y estabilidad de la emulsión dodecano-agua.

Los biosurfactantes poseen una propiedad para disminuir la tensión en superficies, disminuyendo las interacciones intermoleculares entre dos moléculas en un líquido, estos muestran diferentes propiedades como capacidad de lubricación, emulsificación, dispersión de fase, etc (Abbot et al., 2022). Para probar la tensión interfacial en la interfaz dodecano/agua se cuantificaron las muestras obtenidas en la purificación. Con los resultados obtenidos de la purificación con cobalto se decidió utilizar la elución 1 y el lavado 2 de ambas proteínas. Estas dos muestras se cuantificaron y se preparó una dilución con la elución 1 para tener 0.034% w/v de biosurfactante (ver tabla 1 y 2), con el fin de observar como la tensión variaba a diferentes concentraciones. Para las pruebas de tensión se utilizaron la dilución, la elución 1 y el lavado 2.

Tabla 1.

Concentración de las muestras de la mutación 6.

Muestra	Concentración (mg/mL)
---------	-----------------------



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

Lavado 2	0.801
Elución 1	0.588
Dilución 0.034%	0.34

Tabla 2.

Concentración de las muestras de la mutación 12.

Muestra	Concentración (mg/mL)
Lavado 2	0.524
Elución 1	0.451
Dilución 0.034%	0.34

Las imágenes en forma de gota se obtuvieron por medio del tensiómetro y la tensión mediante el método de gota pendiente. Lo primero que se realizó fue calibrar la cámara del equipo para garantizar la precisión de los datos, esto se calibró por medio de un balín, en donde el ángulo de este con respecto a la superficie debe dar 143,18° (Operation manual, 2020). La tensión medida entre el dodecano y el agua alcanzó un valor de 57.4 dyn/cm, se consideró la precisión de los resultados debido a que el error fue menor al 10%, este fue del 9.35%. El valor reportado en la literatura para el sistema dodecano-agua es de 52.8 dyn/cm (Bertin et al., 2021).

Se decidió medir la tensión con el buffer de elución y dodecano, para observar si esta solución de sales afectaba de alguna manera la disminución de la tensión interfacial, ya que la elución 1 y el lavado 2 son una mezcla de proteínas en solución de sales, por otro lado, se realizó un control positivo agregando el mismo porcentaje en peso de tween 20 a agua (surfactante derivado del petróleo), con el



fin de verificar si es más efectivo el uso de biosurfactantes. Los resultados de la tensión interfacial para cada concentración de proteína en el sistema dodecano-agua se encuentran en la tabla 3 junto con los resultados del buffer de elución-dodecano y el control positivo. La menor tensión interfacial se alcanzó con el lavado 2 para ambas mutaciones, siendo 9.10 dyn/cm para la mutación 6 y 14.15 dyn/cm para la mutación 12. Algunos estudios han demostrado que la tensión interfacial se puede ver influenciada por los componentes de una solución binaria (sales), la mayor parte del tiempo esto aumenta la tensión interfacial, llenando el vacío existente entre el agua y disolventes moleculares (Amirchand & Singh, 2022), en nuestro caso el buffer de elución disminuyó la tensión, este no fue significativo. El control positivo dio 22.00 dyn/cm, con esto se confirma que las mutaciones son más efectivas en la disminución de la tensión interfacial en el sistema dodecano-agua comparada con el surfactante derivado del petróleo.

Tabla 3.

Resultados de la tensión interfacial en el sistema dodecano-agua con diferentes concentraciones de proteína, M6= mutación 6, M12= mutación 12.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Tensión interfacial (dyn/cm o mN/m)
Buffer de elución		44.72
Lavado 2 M6	0.801	9.10
Elución 1 M6	0.588	15.86
Dilución 0.034% M6	0.34	17.06
Lavado 2 M12	0.524	14.15
Elución 1 M12	0.451	17.57
Dilución 0.034% M12	0.34	25.1
Control positivo	0.34	22.00

Las mezclas que se utilizaron para la medición de la estabilidad fueron los lavados de cada mutación, ya que con estas se obtuvo el menor valor de tensión interfacial. La emulsión se preparó con



12.75mL de fase continua y 2.5mL de fase dispersa. Se agregaron 15mL de la emulsión en un vial el cual se introdujo en el turbiscan y se inició la lectura, el índice de estabilidad del turbiscan (TSI) es aplicado para estudiar la estabilidad de las emulsiones, este monitorea la cinética de desestabilización en función del tiempo, aquí se mide la retrodispersión y la transmitancia de la luz infrarroja en diferentes longitudes de onda, en donde la estabilidad del sistema se evalúa a partir del escaneo (Luo et al., 2017), el valor de referencia del TSI para una emulsión estable es de 1.1.

En la figura 22 y 23 se muestra el TSI para las dos mutaciones, en un rango de media hora la emulsión más estable fue la que tenía la mutación 6, esta fue estable durante 10 minutos teniendo un valor de TSI menor al 1.1 y el valor más alto fue 3, por otro lado, la emulsión que tenía la mutación 12 fue estable durante 5 minutos y el valor más alto fue de 6, entre más alto sea el TSI más inestable será la emulsión, con esto se puede decir que la emulsión más inestable entre estas dos fue la que contenía la mutación 12.

Figura 22

Cinética de desestabilización de la mutación 6 (lavado 2) en la emulsión dodecano-agua (O/W).

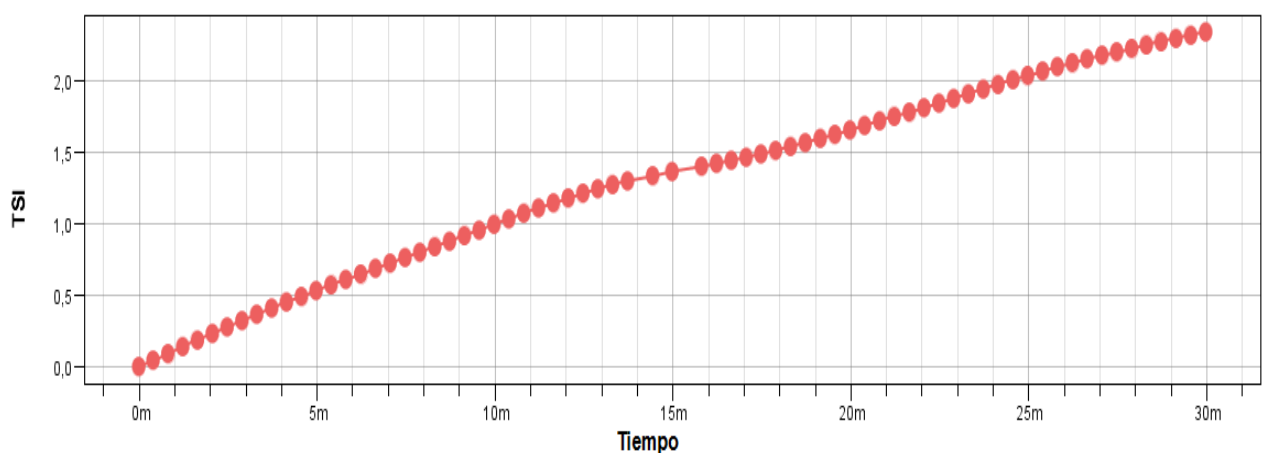
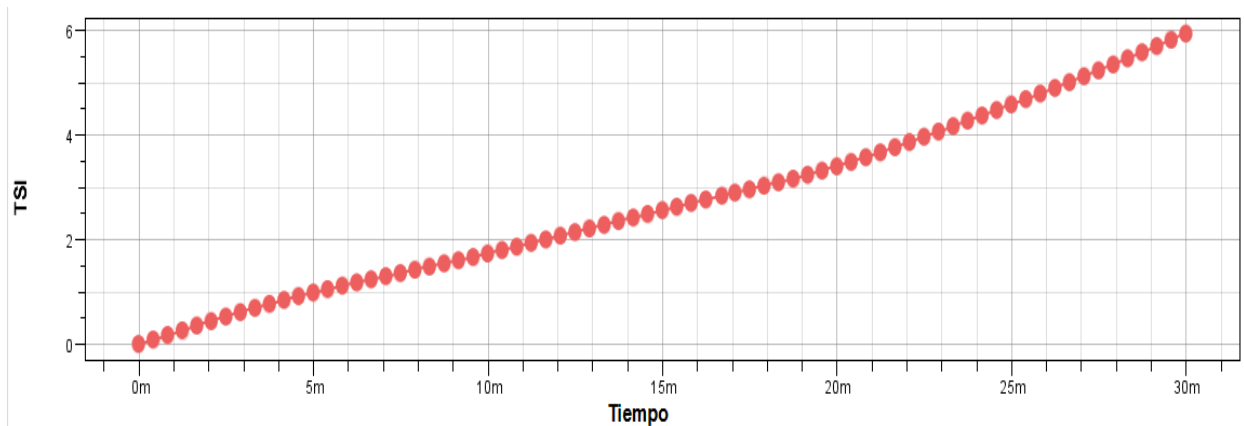


Figura 23



Cinética de desestabilización de la mutación 12 (lavado 2) en la emulsión dodecano-agua (O/W).



Los valores de TSI se usan para comparar fácilmente la estabilidad de las emulsiones resumiendo todas las variaciones de luz retrodifusa en momentos específicos, donde se produce un número que refleja el grado de desestabilización, es por esto que se hace importante analizar los espectros de luz retrodifusa “backscattering” (Tirpanci et al., 2022), ya que estos me permiten obtener información más detallada de la estabilidad de las muestras. Se obtuvieron las figuras 24 y 25 en donde si el “backscattering” varía de forma similar en todo el volumen, este indica que es una mezcla homogénea. Si la intensidad de la luz aumenta en la parte superior y disminuye en la parte inferior, es indicativo de desestabilización por cremado; por otro lado, si disminuye en la parte superior y aumenta en la parte inferior está sucediendo sedimentación y si disminuye la intensidad de la luz en la zona central es indicativo de coalescencia (Medina León, 2020). Como se observa en la figura 24 la muestra presenta una buena estabilidad, ya que el perfil de *backscattering* se encuentra muy cercano a cero y los valores entre una medición y otra a lo largo del tiempo no presentan variaciones significativas. Sin embargo, a una altura de 18mm se observa una disminución en el porcentaje de *backscattering*, en donde la emulsión se desestabilizó y se presentó un fenómeno de sedimentación seguido por cremación. En la figura 25 se observa que se presenta el fenómeno de sedimentación, alrededor de 3mm de altura se observa una disminución en el perfil de *backscattering*, sin embargo, se recupera la linealidad hasta 20mm en donde sucede la mayor



caída, esto se debe a que en esa región de la celda hay una menor densidad de partículas, ocasionando una menor detección de los rayos de luz, en 23mm sucede cremación y luego vuelve a suceder sedimentación, en general la emulsión con mayor estabilidad la presentó la que tenía la mutación 6 confirmando los resultados obtenidos con el TSI.

Figura 24

Análisis de migración en el turbiscan, variación de luz retrodifusa “backscattering” BS y transmitancia T en distintos tiempos en función de la altura de las emulsiones con el lavado de la mutación 6.

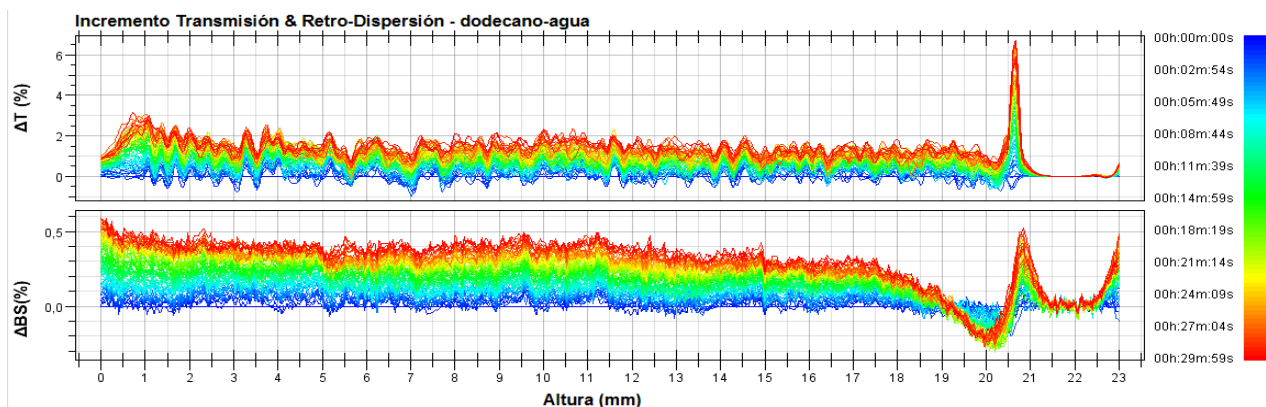
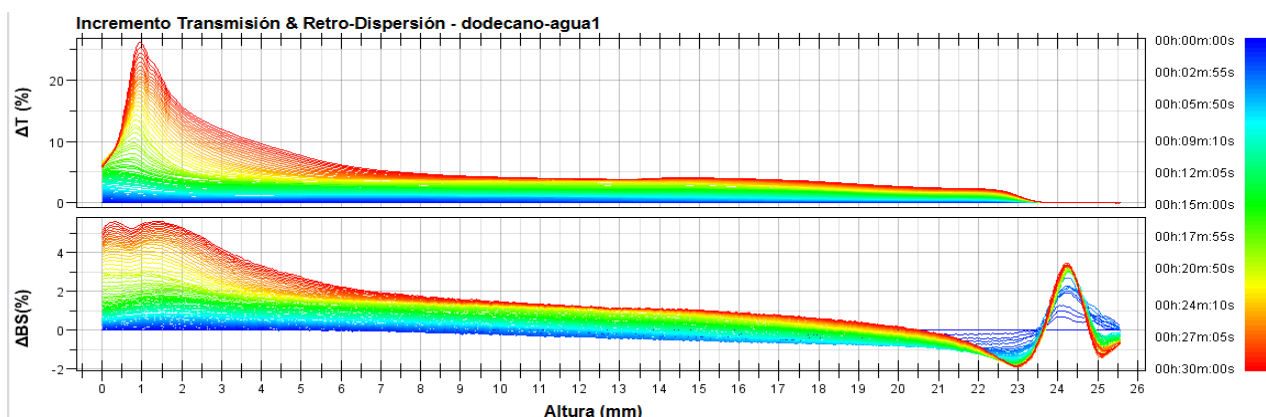


Figura 25

Análisis de migración en el turbiscan, variación de luz retrodifusa “backscattering” BS y transmitancia T en distintos tiempos en función de la altura de las emulsiones con el lavado de la mutación 12.





6 CONCLUSIONES

La selección del sistema de expresión depende de las propiedades biológicas y características del huésped en donde se encuentre la proteína. La expresión se realizó mediante isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en donde se fue aumentando su concentración con el fin de obtener la mejor expresión del promotor lac. A una concentración de 1.5mM de IPTG se logró la mejor expresión y sobreexpresión de las mutaciones presentes en *E. coli BL21*, en comparación con la inducción a 0.5mM y 1mM.

Para obtener las mutaciones con una pureza elevada se estudiaron los efectos de la concentración de imidazol y NaCl en el tampón de lavado mediante el método de purificación IMAC (Ni^{2+}), utilizando 20mM de imidazol y 300mM de NaCl no se obtuvieron proteínas en las eluciones. Las concentraciones bajas de imidazol ayudan a minimizar la unión inespecífica de proteínas con residuos de colas de histidina y con concentraciones altas de NaCl se aumentan las fuerzas iónicas ayudando a eliminar impurezas de la resina, se varió la concentración a 10mM de imidazol y 1M de NaCl, en donde se obtuvo unos mejores resultados, aumentando la cantidad de proteína etiquetada que se unió a la resina, en este caso si se evidenció proteína en el gel de tricina-SDS-PAGE, adicionalmente se obtuvieron otras bandas aparte de la esperada. Se realizó de nuevo la purificación con (Co^{2+}) para verificar si los resultados obtenidos con níquel eran correctos, con Co^{2+} se obtuvo una mejor purificación, pero se siguieron obteniendo otras bandas en el gel aparte de las esperadas. Se mandó a realizar un western blot, que es una técnica más precisa, obteniendo que hubo formación de cuerpos de inclusión al momento de la inducción.

Con el lavado 2 de ambas mutaciones se obtuvo una disminución de la tensión de 9.10 dyn/cm para la mutación 6 y 15.15 dyn/cm para la mutación 12, a diferencia del tween 20 que tuvo una



disminución de la tensión interfacial de 22.00 dyn/cm mediante el método de gota pendiente. Para la estabilidad de las emulsiones se estudió el efecto que tenían ambos lavados en la emulsión dodecano-agua, obteniendo que la emulsión más estable se logró con el lavado 2 de la mutación 6 en comparación con la emulsión preparada con la mutación 12.

En conclusión, se demostró que es posible la creación y obtención de biosurfactantes ecológicamente aceptables que tienen un mayor efecto en la disminución de la tensión interfacial comparándolo con un surfactante convencional como lo es el tween 20.

7 RECOMENDACIONES

Aunque la disminución de la tensión no fue significativa con el buffer de elución, estas sales tienen un efecto, por lo que se propone para próximas investigaciones realizar una diálisis o una liofilización para obtener las mutaciones sin presencia de sales, con el fin de poder cuantificar como estas se ven afectadas por el buffer de elución y las sales que este contiene.

En próximas investigaciones, realizar análisis de seguimiento de viscosidad con el tiempo, tamaño de gota por medio de un microscopio de imagen y medición del potencial z, para corroborar los datos obtenidos con el turbiscan y determinar qué factores afectan a la desestabilización de la emulsión.

Para futuras investigaciones en las cuales se quiera utilizar estas mutaciones y que puedan competir con los surfactantes convencionales, se deben llevar a cabo investigaciones a mayor escala, con mayor rapidez y que optimicen el proceso para hacer la producción de estas mutaciones económica.



8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot, V., Paliwal, D., Sharma, A., & Sharma, P. (2022). A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10149>
- Aguilera-Segura, S. M., Núñez Vélez, V., Achenie, L., Álvarez Solano, O., Torres, R., & González Barrios, A. F. (2016). Peptides design based on transmembrane *Escherichia coli*'s OmpA protein through molecular dynamics simulations in water–dodecane interfaces. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 68, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.07.006>
- Alejandra, M., Martínez, T., Andrés González Barrios, A. :, & Químico, I. (2014). *Exploración de la proteína transmembranal OmpA en la recuperación mejorada de hidrocarburos presentes en sistemas porosos Proyecto de Grado para optar por el título de Ingeniero Químico*.
- Alfonso, N., & Santos, C. (2016). *Evaluación de la efectividad de la proteína OmpA de Escherichia coli K12 W3110/pCA24N ompA + como biosurfactante para la reducción de viscosidad de crudos*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/18820?show=full>
- Alfred Nobel. (2000). *Profinity™ IMAC Resins Instruction Manual*. <https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001677B.PDF>
- Amirchand, K. D., & Singh, V. (2022). Density, speed of sound, and surface tension of binary aqueous solutions containing ammonium based protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 354. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118845>
- Andersen, K. K., & Otzen, D. E. (2014). Folding of outer membrane protein A in the anionic biosurfactant rhamnolipid. *FEBS Letters*, 588(10), 1955–1960. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.004>
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 87, Issue 2, pp. 427–444). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- Bernabeu Zornoza, A. M. (2015). *Expresión y purificación de una proteína que funciona como un canal iónico de potasio (KcsA)* [Universidad Miguel Hernandez]. <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3442/1/Bernabeu%20Zornoza%2C%20Adela%20Maria%20TFGBiotec%202014-15.pdf>
- Bertin, M., Gomes Rodrigues, D., Pierlot, C., Albert-Mercier, C., Davy, C., Lambertin, D., & Nardello-Rataj, V. (2021). Influence of cetyltrimethylammonium bromide and hydroxide ions on the interfacial tension and stability of emulsions of dodecane in aqueous silicate solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 628. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127306>



- BIO-RAD Labs. (n.d.). *Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell Instruction Manual*. Retrieved October 4, 2022, from <https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>
- Booth, P. P. M., Lamb, D. T., Anderson, J. P., Furtaw, M. D., & Kennedy, R. T. (2022). Capillary electrophoresis Western blot using inkjet transfer to membrane. *Journal of Chromatography A*, 1679. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463389>
- Cardona Jaramillo, J. E. C., Achenie, L. E., Álvarez, O. A., Carrillo Bautista, M. P., & González Barrios, A. F. (2020). The multiscale approach to the design of bio-based emulsions. In *Current Opinion in Chemical Engineering* (Vol. 27, pp. 65–71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.11.008>
- Carrero Pinto, D. M. (2011). *Análisis de la estabilidad de una emulsión aceite/agua (n-dodecano/agua) usando la proteína OmpA de*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/14801/u471859.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Diana M. Mate. (2019). *Evolución dirigida de enzimas: una revolución en Química*.
- Erich, M.-M., Daniel, R.-A. F., & Leonardo, A.-M. (2016). *Emulsificación de petróleo crudo para su transporte por oleoductos Crude Oil Emulsification for Pipeline Transportation*. 3, 395–403. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432016000300395&lang=es
- Esfandiarian, A., Maghsoudian, A., Davarpanah, A., Tamsilian, Y., & Kord, S. (2022). Developing a novel procedure in utilizing pendant drop method for determination of ultra-low interfacial tension and surface tension in near-miscibility conditions. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 215. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2022.110607>
- Farias, C. B. B., Almeida, F. C. G., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., Soares da Silva, R. de C. F., Luna, J. M., Santos, V. A., Converti, A., Banat, I. M., & Sarubbo, L. A. (2021). Production of green surfactants: Market prospects. In *Electronic Journal of Biotechnology* (Vol. 51, pp. 28–39). Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>
- Fioravante, I. F., & Bueno, S. M. A. (2022). Performance of polyacrylamide-alginate-based cryogel for IgG purification from bovine serum by IMAC. *Process Biochemistry*, 118, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.034>
- G-Biosciences. (n.d.). *Cobalt Chelating Resin Spin Columns, A Co-IDA IMAC resin for 6X-His Tagged Protein Purification (Cat. # 786-454, 786-455, 786-456)*. Retrieved October 17, 2022, from https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/protocol/Cobalt_Chelating_Resin_Spin_Columns.pdf
- González, A., & Fillat, M. F. (2018). *ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN Escherichia coli**. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>



- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, 869, 81–91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8
- Jiang, S., Liu, S., Zhao, C., & Wu, C. (2016). Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. In *Int. J. Electrochem. Sci* (Vol. 11). www.electrochemsci.org
- Jose, D., Muenmuang, C., Kitiborwornkul, N., Yasurin, P., Asavasanti, S., Tantayotai, P., & Sriariyanun, M. (2022). Effect of surfactants and Co-surfactants in formulation of noni fruit extract in virgin coconut oil-based emulsion. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(10), 100729. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100729>
- Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H. N. P., Jamal, A., Aftab, M. N., Mainali, B., & Choi, Y. (2022). Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 306). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>
- Khani, M. H., & Bagheri, M. (2020). Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression. *Protein Expression and Purification*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105593>
- Lee, J., Wi, G., & Choi, M.-J. (2022). The rheological properties and stability of gelled emulsions applying to κ -carrageenan and methyl cellulose as an animal fat replacement. *Food Hydrocolloids*, 136, 108243. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108243>
- Li, Y., Agrawal, A., Sakon, J., & Beitle, R. R. (2001). Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 909). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01100-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01100-6)
- Linda Mgbechidinma, C., Donald Akan, O., Zhang, C., Huang, M., Linus, N., Zhu, H., & Monilola Wakil, S. (2022). Integration of Green Economy Concepts for Sustainable Biosurfactant Production - A Review. *Bioresource Technology*, 128021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128021>
- Lingg, N., Öhlknecht, C., Fischer, A., Mozgovicz, M., Scharl, T., Oostenbrink, C., & Jungbauer, A. (2020). Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions. *Journal of Chromatography A*, 1633. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461649>
- Luo, M., Qi, X., Ren, T., Huang, Y., Keller, A. A., Wang, H., Wu, B., Jin, H., & Li, F. (2017). Heteroaggregation of CeO₂ and TiO₂ engineered nanoparticles in the aqueous phase: Application of turbiscan stability index and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectra. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 533, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.014>



- Lustman, Raiger. L. Nancy. J. L. (2009). *Los biosurfactantes y la industria petrolera*.
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar
- Madankar CS, M. A. (2022). Review on classification, physicochemical properties and applications of microbial surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*.
- Martín, E. M., Piedra Díaz, M., Acosta Martínez, L., & Rives Sanz, R. (2016). Factores que influyen en la estabilidad de emulsiones de petróleo crudo y aceite de transmisión con soluciones de tensoactivo. In *Revista Cubana de Ingeniería: Vol. VII* (Issue 1).
- MEDINA LEÓN, C. A. (2020). *turbiscan*. 1–151.
<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7941/1/6162959-2020-1-IQ.pdf>
- Mendoza Ospina, J. E., Andrea, P., Chavarro, M., Ángel, M., Niño, F., & González Barrios, A. (2020). *Computational physicochemical analysis and production of OmpA's mutants with functional potential in drug delivery*.
<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/49325/u833242.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ng, Y. J., Lim, H. R., Khoo, K. S., Chew, K. W., Chan, D. J. C., Bilal, M., Munawaroh, H. S. H., & Show, P. L. (2022). Recent advances of biosurfactant for waste and pollution bioremediation: Substitutions of petroleum-based surfactants. *Environmental Research*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113126>
- Operation manual. (2020). *ThetaLite Optical Tensiometer*.
https://www.umu.se/contentassets/9f8c0a0dda844a09b42336a77868b84e/user-manual_theta-oneattension.pdf
- Othmani, A., Magdouli, S., Senthil Kumar, P., Kapoor, A., Chellam, P. V., & Gökküş, Ö. (2022). Agricultural waste materials for adsorptive removal of phenols, chromium (VI) and cadmium (II) from wastewater: A review. *Environmental Research*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111916>
- Patil, S. (2010). *Imidazole and its biological activities: A review Related papers*.
https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/54515119/imidazole-and-its-biological-activities-a-review-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1665254546&Signature=EQPJEAoxhdQmXMYTUYWEEdLDEKGuVG5tultfkAXtlvGsEYzIXxj5XZqEnJRessPTKBF5PmSTsxZxuDgPg9PZPROAREOIWFjiFE73UFUa0Q6UOL9lW~ii702sag2yNNdbwJNKU3Jzvw~yseHFV~s3SHLQPu00fbUzDny6wQBbojf5ucfOAZGcbb3JlcKq1NVYyN8iqjFyk8Uk6PGwDENOspMBiLHNF0ScLovghzBP8j7rwAi650UMxWobte937PQjFZunfdUU6beNBclLu4U5IQ9-XYwbVJfIC3xsawAlaP-5eBu0AOILZNbFSw5xZOFOgkVbj4kKtrynJ-WR-IATQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- Sarubbo, L. A., Silva, M. da G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, Properties, Applications,



- Trends, and General Perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
- Segura, S. M. A., Macías, A. P., Pinto, D. C., Vargas, W. L., Vives-Florez, M. J., Barrera, H. E. C., Álvarez, O. A., & Barrios, A. F. G. (2014). *Escherichia coli* OmpA as biosurfactant for cosmetic industry: Stability analysis and experimental validation based on Molecular simulations. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, 232, 265–271. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01568-2_38
- Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A., & Panda, A. K. (2020). Structure-Function Relationship of Inclusion Bodies of a Multimeric Protein. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00876>
- Solov'eva, T. F., Bakholdina, S. I., Khomenko, V. A., Sidorin, E. v., Kim, N. Y., Novikova, O. D., Shnyrov, V. L., Stenkova, A. M., Ereemeev, V. I., Bystritskaya, E. P., & Isaeva, M. P. (2022). Expression of membrane beta-barrel protein in *E. coli* at low temperatures: Structure of *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin inclusion bodies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1864(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183971>
- 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>
- Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 227–258. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.025>
- Tirpanci, B., Ozel, B., Oztop, M. H., & Alpas, H. (2022). Stability of acidified milk drinks: Comparison of high hydrostatic pressure (HHP) and thermal treatments. *International Dairy Journal*, 105512. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105512>
- Tuttle, A. R., Trahan, N. D., & Son, M. S. (2021). Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>
- v Rogers, J. (2015). Shelf-Life Assessment of Agar Plates Vacuum-Sealed in Nylon/Polyethylene Packaging Flushed with Nitrogen. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 2(7). <https://doi.org/10.15406/jmen.2015.02.00075>
- Vaz, D. A., Gudiña, E. J., Alameda, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89(1), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.009>
- Yap, W. B., Tey, B. T., Alitheen, N. B. M., & Tan, W. S. (2010). Purification of His-tagged hepatitis B core antigen from unclarified bacterial homogenate using immobilized metal affinity-expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(21), 3473–3480. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.012>



Yea, D., Jo, S., & Lim, J. (2019). Synthesis of Eco-friendly Nano-Structured Biosurfactants from Vegetable Oil Sources and Characterization of Their Interfacial Properties for Cosmetic Applications. *MRS Advances*, 4(7), 377–384. <https://doi.org/10.1557/adv.2018.619>

Zhao, Y., Zhu, J., Wang, S., Chang, Y., & Liu, W. (2022). A new molecular thermodynamic model of liquid-liquid interfacial tension. *Fluid Phase Equilibria*, 113593. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2022.113593>

ANEXOS

Tabla 1.

Resultados obtenidos para armar la curva de crecimiento de la mutación 6.

Hora	Blanco/cultivo	Medición
0	0/0	9:04
1	0/0.031	10:06
2	0/0.031	11:06
3	0/0.545	12:06
4	0/1.023	1:08
5	0/1.221	2:08
6	0/1.294	3:08
7	0/1.372	4:08
8	0/1.402	5:06

Tabla 2.

Resultados obtenidos para armar la curva de crecimiento de la mutación 12.

Hora	Blanco/cultivo	Medición
0	0/0	9:04
1	0/0.031	10:06
2	0/0.031	11:06
3	0/0.545	12:06
4	0/1.023	1:08
5	0/1.221	2:08
6	0/1.294	3:08
7	0/1.372	4:08
8	0/1.402	5:06

Figura 1.



Actividad interfacial en el sistema dodecano-agua de las mutaciones 6 y 12 de la proteína transmembranal a (OmpA) provenientes de la bacteria Escherichia coli

Liseth Daniela Villamizar Gomez

Montaje de la columna de cobalto por gravedad.



Figura 2.

Montaje de la columna de afinidad con níquel, dentro de los rectángulos se muestra el desnivel de la resina.

