

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE PROCESO A NIVEL DE LABORATORIO, PARA LA
PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE ENZIMAS BETALACTAMASAS,
INDUCIBLES, UTILIZANDO COMO MICROORGANISMO PRODUCTOR
Bacillus cereus.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ANA CRISTINA GUADALUPE SÁNCHEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÌMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÈVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCÍA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

DIRECTORA GENERAL

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA: MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

COORDINADOR DE AREA: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMÉTICOS

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

DOCENTES ASESORES

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya.

Dr. David Francisco Torres.

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso que en su infinito amor me ha prestado de su conocimiento, fortaleza y voluntad para culminar este camino con éxito.

A mi madre, abuelos, hermanos, mi novio y demás familiares por su apoyo incondicional, oraciones, ánimos y buenos deseos en todo momento a lo largo de esta carrera.

Al comité de trabajo de graduación Directora General: Licda. Odette Rauda, Coordinadoras de áreas: Msc. Amy Elieth Moran Rodríguez, Msc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía, docentes asesores Dra. Tania Ethel Cuadra y Dr. David Francisco Torres por apoyo en la realización de este trabajo de graduación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD y su personal por haberme brindado los reactivos y los equipos necesarios para el desarrollo de la parte experimental de este trabajo de graduación.

A mis amigos y compañeros, por todos los momentos inolvidables que compartimos y por su apoyo incondicional en todas las situaciones que pasamos juntos.

A todos aquellos que pertenecen a la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador por su apoyo no solo en la realización de este trabajo de graduación si no por su ayuda desde el primer día en que llegue a esta Facultad.

Cristina Sánchez

DEDICATORIA

A “Dios” Porque Él es el principio de la sabiduría y a él debo todo lo que tengo y lo que soy.

A MI MADRE Y ABUELOS: Dora Alicia Sánchez quien ha sido padre, madre y guía, Ana Alicia Paz y José René Sánchez por el amor y cariño por brindarme su apoyo moral y espiritual.

A MI TÍO ABUELO: José Roberto Sánchez por su cariño y por llevarme a la escuela todos los días desde el kínder al bachillerato además de enseñarme las Tablas de multiplicar mientras íbamos de camino a la escuela.

A MI NOVIO: Carlos Alberto Ramírez Guardón por su amor y apoyo incondicional, por estudiar con migo y en especial por levantarme en aquellos momentos en que sentía ya no podía más.

MIS HERMANOS/AS: Alejandra Catalina Sánchez y Carlos René Portillo Sánchez, para quienes siempre tengo un lugar especial en mi corazón y porque este es el primero de tres triunfos que cosechara mi madre.

A MI FAMILIA: en especial a mis padrinos Cristina y Ramón Ramos gracias.

A MIS AMIGOS Y AMIGAS ESPECIALMENTE A: Jeannette Sagastizado, Wanda Galán, Liliana Landa verde, Sandra Ramírez, Johana Torres, Evelin Gracia, Luis Alonso Abrego, Beatriz Martínez y Aida Corleto no solo por su ayuda en la realización de este trabajo si no por todos los buenos momentos vividos durante estos nueve años.

A MIS AMIGOS DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA: Licda. Cecilia Monterrosa, Lic. Salvador Castillo, Lic. Moisés Guerra, Lic. Enrique posada, Lic. Roberto García y Don Víctor Sánchez gracias por su cariño.

Cristina Sánchez

ABREVIATURAS

μL: Micro litro

mL: Mililitro

L: Litro

g: Gramo

mg: Miligramo

mMol: Milimol

Cel: Células

h: Hora

UI: Unidades internacionales

U B-Lac: Unidades betalactamasa

ATCC: American Type Culture Collection

TSA: Trypticase soy agar

SSN: Solucion salina normal

UI: Unidades internacionales

Abs: Absorbancia

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	19
Capítulo II	
2.0 Objetivos	22
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Enzimas	24
3.1.1 Definición de enzima	24
3.2 Generalidades de las Betalactamasas	26
3.3 Definición de Betalactamasas.	29
3.4 Clasificación de las Betalactamasas	30
3.4.1 Clasificación de acuerdo a estructura molecular y secuencia de aminoácidos.	31
3.4.2 Clasificación de acuerdo a su sustrato.	31
3.4.3 Clasificación de acuerdo a su mecanismo de producción.	32

	Pág.
3.5 Aplicaciones de las Betalactamasas.	33
3.6 Parámetros del proceso de producción de Betalactamasas.	35
3.6.1 Microorganismos productores de Betalactamasas.	35
3.6.2 Medio de cultivo y sus sustratos.	38
3.6.3 Proceso de fermentación en medio aeróbico, efectos de la transferencia de oxígeno y agitación en el medio de cultivo, pH y temperatura.	43
3.7 Métodos de cuantificación de Betalactamasas.	45
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 Investigación bibliográfica	49
4.3 Parte experimental	50
4.4 Descripción del proceso	50
4.4.1 Etapa uno: producción de la enzima	50
4.4.2 Etapa dos: Controles en proceso.	53
4.4.2.1 Determinación de Ph	54
4.4.2.1.1 Procedimiento	54

	Pág.
4.4.2.2 Determinación de azúcares totales por método de DNS modificado	55
4.4.2.2.1 Procedimiento	55
4.4.2.3 Determinación de biomasa por cámara de Neubauer.	57
4.4.2.3.1 Procedimiento	57
4.4.2.4 Actividad betalactamasa	58
4.4.2.4.1 Procedimiento	59
4.4.2.5 Cálculos de cinética de producción de la enzima betalactamasa.	60
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	64
5.1 Variación de pH con respecto al tiempo.	64
5.2 Determinación de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).	66
5.3 Determinación de biomasa.	69
5.4 Actividad betalactamasa	70
5.5 Cálculos de cinética de producción de la enzima betalactamasa.	77
5.6 Protocolo de producción de enzimas Betalactamasas PEB-001.	82

	Pág.
5.7 Metodología de análisis para enzimas Betalactamasas AEB-001.	92
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	106
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	109
Bibliografía	112
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Medios de cultivo y reactivos
2. Tablas de resultados de la cuantificación espectrofotométrica de la actividad Betalactamasas
3. Fotografías de los experimentos.
4. Monografía del microorganismo.
5. Monografía de Penicilina G Benzatínica utilizada.

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		N° Pág.
1.	Tipos de enzimas	25
2.	Atributos de las Betalactamasas	34
3.	Antibióticos inductores de la síntesis de Betalactamasas y microorganismos productores	35
4.	Tipos de medio de cultivo	38
5.	Comparación de la composición química de diferentes medios de mantenimiento, para promover el crecimiento microorganismos productores de Betalactamasas.	41
6.	Comparación de la composición química de diferentes medios de pre cultivo para la producción de Betalactamasas	41
7.	Comparación de la composición química de diferentes Medios de cultivo utilizados en la producción de Betalactamasas.	42
8.	Fórmulas de cinética microbiana y cinética de producción	61

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		N° Pág.
1.	Unión enzima-sustrato	25
2.	Acción de la Penicilinasas sobre el anillo betalactámico	29
3.	Imagen tridimensional de una proteína (Enzima) Betalactamasa	30
4.	Diagrama de medición de pH	54
5.	Reacción del reactivo Acido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) con la glucosa	56
6.	Esquema de recuento de células	58
7.	Variación de pH con respecto al tiempo	66
8.	Curva de calibración de Glucosa	67
9.	Concentración de glucosa con respecto al tiempo	68
10.	Recuento Celular	70
11.	Curva de calibración de Penicilina G Benzatínica	71
12.	Gráficos de degradación de Penicilina G Benzatínica por la acción de la enzima betalactamasa en el medio de producción	74
13.	Comparación del comportamiento enzimático a diferentes tiempos de muestras y estándar	75
14.	Actividad betalactamasa con respecto al tiempo	76
15.	Parámetros cinéticos de la producción de Betalactamasas utilizando <i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	81

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		N° Pág.
1.	Cantidad de muestra de análisis a tomar para cada uno de los tiempos donde se realizara la toma de muestra.	53
2.	Soluciones estándar de glucosa para elaborar curva de calibración del método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) para determinación de azúcares totales.	55
3.	Soluciones stock para curva de calibración de Penicilina G Benzatínica.	60
4.	Valores de pH para cada una de las muestras.	65
5.	Resultados de absorbancia para la curva de calibración de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).	66
6.	Resultados de absorbancia para cada muestra sometida al análisis de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).	68
7.	Resultados obtenidos de recuento celular por cámara de Neubauer para cada muestra.	69
8.	Absorbancias obtenidas de las soluciones stock para la curva de calibración de Penicilina G Benzatínica	71
9.	Resumen de absorbancias obtenidas de la degradación de Penicilina G Benzatínica presente en las soluciones stock por la acción de las Betalactamasas presentes en las muestras.	72
10.	Valores obtenidos de actividad betalactamasa para cada muestra.	76

TABLA N°		N° Pág.
11.	Resumen de resultados de los diferentes parámetros medidos durante la producción de Betalactamasas, utilizando Bacillus cereus ATCC 13061.	77
12.	Resultados de los cálculos de cinética Microbiana y de cinética de producción para la obtención de enzimas Betalactamasas utilizando como microorganismo productor Bacillus cereus ATCC 13061.	78

RESUMEN.

El objetivo de la presente investigación fue proponer un proceso a nivel de laboratorio, de producción y cuantificación de enzimas Betalactamasas inducibles, utilizando como microorganismo productor *Bacillus cereus*. Esta investigación fue un primer paso importante para la implementación de un sistema estandarizado para producción y cuantificación de enzimas Penicilinasas a nivel de laboratorio; este estudio podrá ser utilizado como base para realizar investigaciones y obtener las enzimas Betalactamasas a escala semi-industrial para así a largo plazo tener la posibilidad de que la enzima se produzca en nuestro país.

El desarrollo experimental de esta investigación se realizó en dos etapas paralelas: la etapa uno, denominada producción de la enzima, donde se realizó la reanimación del microorganismo productor, aumento de biomasa y fermentación en medio líquido; la etapa dos, denominada controles en proceso, en la que se midieron los parámetros necesarios para la caracterización del proceso.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que es posible producir enzimas Betalactamasas inducibles (Penicilinasas) en un medio de cultivo líquido (cultivo en lote) que contenga: glucosa, extracto de levadura, fosfato de sodio dibásico y una solución de sales minerales, a una temperatura de incubación $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 144 horas. Utilizando *Bacillus cereus* ATCC 13061 como microorganismo productor y Penicilina G Benzatínica como agente inductor.

La mejor actividad betalactamasa de este ensayo se observó en la muestra de 48 horas, produciendo una actividad betalactamasa de 42.65 UB-Lac/ mL, corroborándose que *Bacillus cereus* ATCC 13061 es un buen productor de enzimas Betalactamasas inducibles en las condiciones ensayadas

Los parámetros cinéticos donde se observó la mayor producción de la enzima fueron aquellos donde la velocidad específica de consumo de sustrato es de $-2.07 \text{ E}^{-11} \text{ g de sustrato Hora}^{-1} \text{ Cel}^{-1}$, con una velocidad volumétrica de consumo de sustrato $-0.02 \text{ g de sustrato Hora}^{-1}$ y una velocidad específica de formación de producto $1.05 \text{ E}^{-10} \text{ U de producto Hora}^{-1} \text{ Cel}^{-1}$,

Las enzimas Penicilinasas inducibles producidas por *Bacillus cereus* ATCC 13061 bajo las condiciones establecidas en esta investigación son activas y capaces de llevar a cabo la reacción de degradación enzimática del anillo betalactámico al unirse con el sustrato antibiótico.

Al llevar este método a escala semi-industrial es recomendable establecer un método para la extracción y purificación de enzimas Betalactamasas, además de la realización de estudios de estabilidad a fin de elegir el mejor material de empaque primario para la enzima y establecer su periodo de vida útil.

Esta investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, durante el periodo comprendido entre el segundo semestre del año 2013 y el primer semestre del año 2014.

CAPÍTULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION.

Las Betalactamasas son proteínas que catalizan la hidrólisis del anillo Betalactámico en Penicilina y otros antibióticos estructuralmente relacionados, produciendo la ruptura del enlace amida del anillo betalactámico, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular del microorganismo patógeno.

Las Betalactamasas en las bacterias Gram (-) se encuentran alojadas en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. En cambio en bacterias Gram (+) al carecer de pared celular, estas enzimas son excretadas.

Entre las áreas más importantes donde se aplican y utilizan las Betalactamasas podemos mencionar la industria farmacéutica, laboratorios de control de calidad microbiológico de medicamentos, área médica y laboratorio clínico.

A pesar de sus usos en el país, actualmente no se han realizado investigaciones, cuyo fin sea la obtención y cuantificación de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas), por lo que su utilización se ve limitada, debido a su alto costo ocasionado por la necesidad de importar desde otros países la enzima.

Este trabajo de graduación tuvo como objetivo describir un proceso para la producción y cuantificación de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) utilizando *Bacillus cereus* ATCC 13061 como microorganismo productor, y un medio de cultivo líquido sintético utilizando el método de fermentación en lote en condiciones aerobias.

El desarrollo experimental de esta investigación comprendió dos etapas paralelas. la primera etapa denominada producción de la enzima, donde se realizaron todos los procedimientos microbiológicos relacionados con su obtención: reanimación del microorganismo productor, aumento de biomasa y producción en medio líquido; y la segunda etapa denominada controles en proceso, en la que se midieron los parámetros necesarios para la

caracterización del proceso (pH, determinación de Biomasa, determinación de azúcares totales y determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática Betalactamasa).

La toma de muestra para análisis se realizó cada 24 horas hasta un total de tiempo de 144 horas. El volumen final de las muestras tomadas no represento más del 10% de volumen final del cultivo y no se devolvió al fermentador el volumen de medio de producción que representa cada una de las muestras para análisis.

Esta investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, durante el periodo comprendido entre el segundo semestre del año 2013 y el primer semestre del año 2014.

Con todos los resultados obtenidos durante esta investigación se elaboró un protocolo de producción de enzimas Betalactamasas y su correspondiente técnica de análisis, con el fin de que este trabajo sea un primer paso para la implementación de un sistema de producción de enzimas Betalactamasas a nivel semi-industrial.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer un proceso a nivel de laboratorio, para la producción y cuantificación de enzimas Betalactamasas inducibles, utilizando como microorganismo productor *Bacillus cereus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Desarrollar un proceso de producción, para la biosíntesis de enzimas Betalactamasas utilizando como microorganismo productor. *Bacillus cereus* ATCC 13061 en un medio de cultivo líquido de composición definida.
- 2.2.2 Determinar la biomasa, consumo de nutrientes (azúcares totales) y pH durante el proceso, para obtención de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) en las condiciones de cultivo definidas
- 2.2.3 Cuantificar espectrofotométricamente la actividad enzimática de las Betalactamasas producidas por *Bacillus cereus* ATCC 13061 durante el proceso de fermentación en un medio líquido.
- 2.2.4 Determinar la cinética de producción de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) en las condiciones de cultivo definidas.
- 2.2.5 Elaborar un protocolo de operación estándar (PEO) para la producción de enzimas Betalactamasas inducibles.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO.

3.1 ENZIMAS.

3.1.1 DEFINICIÓN DE ENZIMA.

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas siempre que sea termodinámicamente posibles, una enzima hace que una reacción química energéticamente posible y que transcurra a una velocidad muy baja, transcurra a mayor velocidad. ⁽¹⁸⁾

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (energía libre de Gibbs de una reacción), de forma que se acelera sustancialmente la velocidad de reacción. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. ⁽¹⁸⁾

A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, por lo tanto no modifican el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso. ⁽¹⁸⁾

Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más rápido que la correspondiente reacción no catalizada. ⁽¹⁸⁾

Debido a que las enzimas suelen ser muy específicas tanto del tipo de reacción que catalizan como del sustrato involucrado, a causa de factores como: La forma, la carga y las características hidrofílicas/hidrofóbicas de las enzimas y los sustratos. La especificidad, es una medida de la eficiencia de una enzima, ya que la velocidad de la reacción se encuentra directamente relacionada con la frecuencia con la que se encuentran las moléculas de enzima y de sustrato (ver figura N° 1). ⁽¹⁸⁾

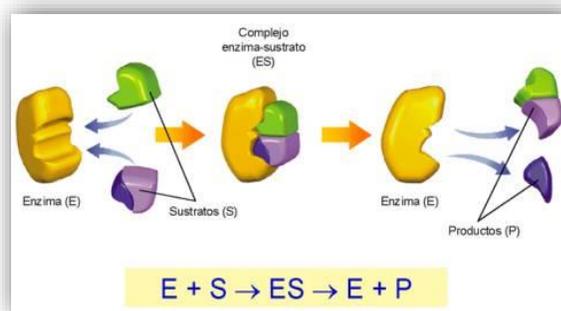


Figura N° 1. Unión enzima-sustrato

Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. ⁽¹⁸⁾

Las enzimas se encuentran cualquier organismo, sea planta, animal o microorganismo, y son fundamentales para su desarrollo. De las enzimas utilizadas a escala industrial, la mayoría se derivan de fuentes microbianas, estas enzimas generalmente se designan con el mismo nombre del organismo del cual se obtuvo, las enzimas a menudo poseen diferentes secuencias de aminoácidos y diferentes propiedades (anabólicas o catabólicas), por lo tanto difieren en su mecanismo de acción o actividades enzimáticas. Además a nivel industrial se producen moléculas sintéticas denominadas enzimas artificiales capaces de catalizar reacciones químicas como las enzimas clásicas producidas por organismos vivos. ^{(8), (18)}

Cuadro N°1: Tipos de enzimas. ⁽¹⁸⁾

Tipo de enzima	Mecanismo de acción
Óxido-reductasas	Estas enzimas están vinculadas con las reducciones y oxidaciones biológicas que intervienen en los procesos de fermentación y de respiración. Estas son esenciales en ciertas cadenas metabólicas como por ejemplo el rompimiento enzimático de la glucosa y en la producción de ATP.

Cuadro N°1: (Continuación) ⁽¹⁶⁾

Tipo de enzima	Mecanismo de acción
Transferasas	Estas enzimas son las encargadas de catalizar la transferencia de una porción de molécula a otra. Además, estas enzimas son las que actúan sobre distintos sustratos, transfiriendo grupos glucósido, sulfato, amina, aldehído, entre otros grupos.
Hidrolasas	Es una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace químico.
Isomerasas	Estas son las que actúan sobre ciertas sustancias a las que transforman en otras isómeras, lo que significa que tienen la misma fórmula empírica pero un desarrollo diferente.
Liasas	Estas enzimas son las que actúan sobre los enlaces entre los átomos de carbono, carbono y oxígeno, carbono y azufre o carbono y nitrógeno, escindiéndolos.
Ligasas	Estas enzimas permiten que dos moléculas se unan. Esto se da al mismo tiempo en que el ATP se degrada y libera energías que son las necesarias para que dichas moléculas puedan unirse.

3.2 GENERALIDADES DE LAS BETALACTAMASAS.

- HISTORIA.

Ehrlich había profetizado que las resistencias seguirían a los antibióticos como su sombra. Pues bien, esta sombra se identificó por primera vez en 1940. Uno de los principales problemas de la Penicilina, insalvable para Fleming y considerado la clave para el grupo de investigación de Oxford fue su inestabilidad. ⁽¹⁶⁾

Superado esta falta de estabilidad, en general se creía que su actividad antimicrobiana era constante sobre todas las cepas de la misma especie, pero pronto se observó que el patrón de sensibilidad era constante en unas especies, como *Streptococcus pyogenes* pero no así en otras, especialmente

gram negativos. Esto llevó a Abraham y Chain (del grupo de Oxford) a publicar en Nature, en 1940, un sencillo experimento que tendría gran trascendencia. Tomaron una suspensión de *B. coli* (ahora conocida como *E. coli*)⁽⁸⁾, que se había manifestado como resistente y otra sensible y la añadieron a 2 tubos de una solución de Penicilina. En el primero no quedó ni rastro de actividad penicilínica, mientras que en el segundo, además de aclararse la suspensión por destrucción bacteriana, siguió manteniendo una cierta actividad, debido a esto buscaron la causa del fenómeno del primer tubo encontrando una enzima que denominaron Penicilinasas.⁽¹⁶⁾

Este fenómeno lo observaron en diferentes cepas de la especie "*B. coli*"⁽⁸⁾, bacilo tífico, bacilo de "Flexner", bacilo "piocianico" y algunos cocos gram positivos. Posiblemente no fueron conscientes de que había echado un "jarro de agua fría" al pronóstico de muchos enfermos.⁽¹⁹⁾

Al empezar el tratamiento "in vivo" con Penicilina el grupo de investigación Oxford encontró un problema metodológico para valorar científicamente sus ensayos clínicos. El estudio de la erradicación microbiana se hizo cultivando muestras patológicas de los enfermos tratados (sangre, pus, orina, etc.) pero la presencia de Penicilina en estas muestras, suele provocar falsos positivos en los resultados. En estos inóculos no crecieron ni las bacterias sensibles ni las resistentes.⁽¹⁶⁾

Para dar una solución a esto Harper en 1943 aisló una cepa de "bacilo paracolon" productor de Penicilinasas, con la que preparó una suspensión que produjo un precipitado con acetona el cual se desecó con éter al vacío, el polvo obtenido de este proceso era estable y poseía una actividad neutralizante de 1 mg para 200 Unidades Oxford de Penicilina.⁽¹⁶⁾

Un año más tarde Duthie y Ungar por separado, obtienen la enzima utilizando *Bacillus subtilis* y Kirby en 1944 demuestra que es posible la producción de Penicilinasas en todas las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* Penicilina

resistente mejorando la técnica de Harper y el rendimiento en la producción de enzimas. ⁽¹⁶⁾

Curiosamente esta enzima se comercializó para neutralizar la Penicilina de hemocultivos de enfermos tratados con el antibiótico, esta práctica se realizó como un procedimiento de rutina hasta el siglo XX, tanto para betalactámicos como para otras familias de antibióticos. ⁽¹⁶⁾

Esta enzima también fue utilizada para el control de calidad, de la pureza de algunos preparados farmacéuticos, así como para estudios de valoración. ⁽¹⁶⁾

14 años después (1954) se encuentran los primeros fracasos terapéuticos con aislamientos de cepas productoras de "Penicilinasas". A partir de aquí se desencadenan rápidamente los acontecimientos. Cada vez aparecen más cepas productoras de enzimas inactivantes de Penicilina y no todas las enzimas son iguales, además muchas hidrolizan no solo el anillo de la Penicilina, sino también el de las Cefalosporinas y otros Betalactámicos. ⁽¹⁶⁾

- GENERALIDADES.

Las enzimas Betalactamasas se clasifican en función de la localización del gen codificador (cromosómica, extra cromosómica), el carácter inducible o constitutivo, perfil de sustrato y el punto isoelectrico. ⁽⁵⁾

Las Betalactamasas son enzimas que rompen el anillo betalactámico de los antibióticos como las Penicilinas y cefalosporinas, desactivando las propiedades antimicrobianas de esas moléculas (figura N° 2). Las Betalactamasas por lo general son producidas por bacterias Gram positivas en forma secretada. Por lo general, las cepas resistentes a la Penicilina se relacionan directamente con el porcentaje de cepas productoras de betalactamasa. ⁽²⁾

La integridad estructural del núcleo del ácido 6-aminopenicilánico es esencial para la actividad biológica de las Penicilinasas. Si las Betalactamasas

bacterianas rompen el anillo betalactámico, se produce ácido penicilóico que carecen de actividad antibacteriana. ^{(2), (18)}

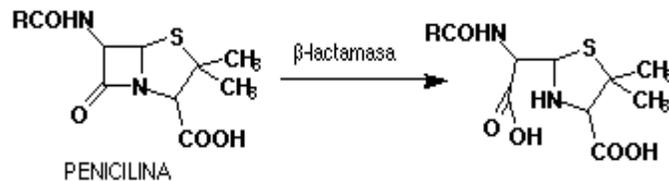


Figura N° 2: Acción de la Penicilinasa sobre el anillo betalactámico. ⁽⁹⁾

Se han descrito más de 200 Betalactamasas diferentes. Algunas son específicas para Penicilinas (es decir, Penicilinasas) o cefalosporinas (es decir, Cefalosporinasas), mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos betalactámicos. ^{(3), (5)}

3.3 DEFINICIÓN DE BETALACTAMASAS.

Las Betalactamasas (BL) son proteínas fijadoras (figura N° 3) de Penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular. Las Betalactamasas en las bacterias Gram (-) se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. En las bacterias Gram (+) que carecen de pared las BL son excretadas. ^{(2), (5)}

Aunque todas las Betalactamasas catalizan la misma reacción, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican en forma diversa, por ejemplo, a su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato. La localización del gen que codifica la betalactamasa es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma o estar codificada por plásmidos. Las Betalactamasas cromosómicas son universales en una bacteria específica

mientras que la presencia de ellas codificadas por plásmidos es variable y transferible entre las diversas especies bacterianas. ⁽²⁾

Las Betalactamasas utilizadas en laboratorios de control de calidad son enzimas producidas por varias bacterias, pero suele obtenerse a partir de filtrados de cultivo de una cepa de *Bacillus cereus*. Tiene la propiedad específica de inactivar las Penicilinas y las cefalosporinas rompiendo la unión entre el nitrógeno de la tiazolidina y el carbono del carbonilo adyacente. ⁽⁸⁾

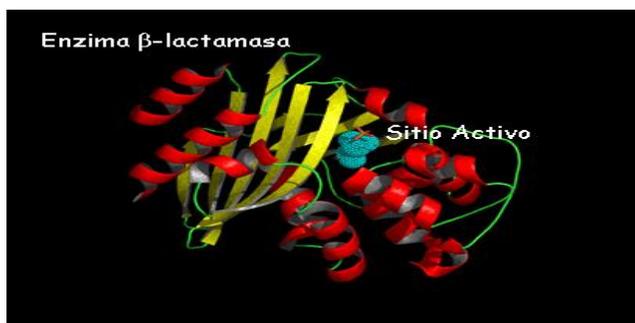


Figura N° 3: Imagen tridimensional de una proteína (Enzima) Betalactamasa. ⁽⁷⁾

Se presenta en forma de piezas o gránulos pequeños y fácilmente pulverizables de color marrón. Fácilmente soluble en agua, formando una solución ligeramente opalescente que es prácticamente neutra al papel tornasol. Precipita de sus soluciones acuosas con acetona, alcohol y dioxano, y se inactiva por el contacto con estos disolventes. Se inactiva rápidamente con acetato de etilo y se destruye de forma irreversible a una temperatura de aproximadamente 80°C. ⁽⁸⁾

3.4 CLASIFICACIÓN DE LAS BETALACTAMASAS. ^{(2), (5)}

Se han propuesto varios modelos de clasificación para las Betalactamasas de acuerdo con su espectro de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores, ubicación en genes (plásmido o cromosoma), y secuencia de genes o de proteínas. Existen dos sistemas principales de clasificación:

- La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de la betalactamasa y su secuencia de aminoácidos. ⁽²⁾
- La clasificación de Bush se basa en los substratos que la betalactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, y aztreonam u oxacilina. ⁽⁷⁾

Además las enzimas Betalactamasas se pueden clasificar dependiendo de su mecanismo de producción como: Inducibles (que necesitan un agente inductor en el medio para iniciar la producción de la enzima) o constitutivas (que son producidas naturalmente por el microorganismo es decir no necesitan un inductor). ⁽⁷⁾

3.4.1 CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A ESTRUCTURA MOLECULAR Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Esta clasificación introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados A hasta D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa (cuadro N° 2). Las Betalactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA. Ejemplos de Betalactamasas de amplio espectro incluyen las enzimas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que intervienen en la resistencia a la ampicilina y 1^{ra} generación de cefalosporinas en *Enterobacteriaceae*. ⁽³⁾

Las siglas TEM se derivan de las iniciales del primer paciente en quien fue aislada una *E. coli* productora de betalactamasa en 1965. La SHV es considerada un pariente lejano de la TEM, las siglas se derivan de la clasificación inicial como una “variedad sulfidriilo”. ⁽³⁾

3.4.2 CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A SU SUSTRATO. ^{(4), (5)}

Este modelo funcional de clasificación de las Betalactamasas, propuestos por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de

acuerdo a los substratos hidrolizados y perfiles de inhibición (cuadro N°2), muchas Betalactamasas se reúnen en subgrupos del Grupo 2 de Bush ⁽⁴⁾:

- **Grupo 1:** Cefalosporinasas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico. ⁽⁵⁾
- **Grupo 2:** Penicilinasas, Cefalosporinasas y Carbapeneasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de Betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los subgrupos también se definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producidas por las Penicilinasas del Grupo 2. ⁽⁵⁾
- **Grupo 3:** Metalo Betalactamasas que hidrolizan Penicilinas, cefalosporinas, y carbapenems que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los betalactámicos. ⁽⁵⁾
- **Grupo 4:** Penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico. ⁽⁵⁾

3.4.3 CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A SU MECANISMO DE PRODUCCIÓN.

- **Betalactamasas Inducibles.** ⁽⁷⁾

La producción de betalactamasa inducible se inicia o induce cuando las bacterias que poseen un gen de betalactamasa se expone a un agente betalactámico. La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de Betalactamasas. La producción de betalactamasa cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella. En el cuadro N° 3, se describen diferentes antibióticos inductores de la síntesis de Betalactamasas y los microorganismos capaces de realizar la síntesis de la enzima específica para cada antibiótico. ⁽⁷⁾

- Betalactamasas no inducibles o constitutivas. ⁽⁷⁾

Betalactamasas constitutivas son aquellas que la bacteria produce en forma continua sin necesidad de que el gen de betalactamasa se exponga a un agente betalactámico. Un ejemplo de esto lo constituye la producción de la enzima cromosómica SHV-1 de *K. pneumoniae* que interviene en la resistencia de este microorganismo a la Ampicilina y Ticarcilina. ^{(7), (19)}

3.5 APLICACIONES DE LAS BETALACTAMASAS

Las enzimas Betalactamasas poseen muchas aplicaciones a nivel de laboratorio de control de calidad y laboratorio clínico entre las cuales podemos enumerar:

- Control de calidad microbiológico (pruebas de esterilidad) de diferentes antibióticos utilizados en medicina. ⁽¹⁰⁾
- Destrucción de Penicilinas, cefalosporinas y antibióticos estrechamente relacionados, residuales en los fluidos corporales como sangre y orina; para la posterior realización de pruebas de laboratorio clínico ⁽¹¹⁾. Otras aplicaciones en esta área son la cuantificación de testosterona ⁽¹⁴⁾. La identificación de *Schistosoma japonicum* en infecciones ⁽¹²⁾ y otras pruebas que aún se encuentran en desarrollo. ⁽¹⁵⁾
- El tratamiento de reacciones de hipersensibilidad a antibióticos betalactámicos ⁽¹⁹⁾.
- Limpieza y descontaminación de áreas de producción y envasado de antibióticos Betalactámicos. ^{(11) (19)}
- Elemento constituyente en diferentes pruebas de ELISA. ^{(1), (12), (14), (21)}
- En alimentos se utiliza en la detección de antibióticos en leche ⁽³⁾ y en la detección de aflatoxinas por método de ELISA. ⁽²¹⁾

Cuadro N° 2: Atributos de las Betalactamasas y su clasificación en base a los sistemas propuestos por Bush, Jacoby- Medeiros y Ambler. (3) (5)

Grupo Funcional de Bush, Jacoby-Medeiros		Tipo Molecular de Ambler	Atributos de las Betalactamasas en el grupo funcional
Grupo	Subgrupo		
1		C	AmpC Betalactamasas en bacteria gram-negativa. Los genes a menudo son cromosómicos pero pueden ser plásmidos codificados. Confiere resistencia a todos los tipos de betalactámicos, excepto los carbapenems (a menos que se combinen con cambios en porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría de enzimas del Grupo 2 son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario).
	2 ^a	A	Incluyen Penicilinas estafilococica y enterococica. Confiere alta resistencia a las Penicilinas.
	2b	A	Betalactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 y SHV-1, primordialmente de bacterias Gram negativas.
	2be	A	Las Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) Confiere resistencia a las Penicilinas, oxyiminocefalosporinas y monobactamicos.
	2br	A	Betalactamasas tipo TEM (IRT) y una tipo SHV que son resistentes a los inhibidores.
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina-(oxacilina) inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico.
	2e	A	Cefalosporinasas. Y grupo 2f. Enzimas que hidrolizan los carbapenems con serina en la zona activa.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo Betalactamasas que Confiere resistencia a los carbapenems y todos los tipos de betalactámicos excepto los monobactames. No inhibidas por el ácido clavulánico.
4		—	Penicilinasas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico

Cuadro N° 3: Antibióticos inductores de la síntesis de Betalactamasas y microorganismos productores. ⁽¹⁵⁾

Antibiótico	Betalactamasa					
	Grupo 1 (AmpC)					Grupo 2be
	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Campilobacter freundii</i>	<i>Serratia spp.</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Amino Penicilinas	+++	++	+++	+++	+++	+++
Ácido clavulánico	+++	+++	+++	+++	+++	-
Ureido Penicilinas	+	+	+	+	+	+
Carboxi Penicilinas	+	+	+	+	+	+
Cef 1 ^a / 2 ^a gen.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cef 3 ^a gen.	+	+	+	+	+	+
Cefoxitina	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Carbapenems	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Efecto inductor: elevado, +++; moderado, ++; débil, +; nulo, -.

3.6 PARÁMETROS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS. ^{(7), (8)}

Los parámetros de producción de Betalactamasas son muy importantes, porque dependiendo de estos el sistema muestra diversos efectos influyendo en la formación del metabolito, su actividad y la cantidad producida. Los factores que se deben tomar en cuenta para la producción de enzimas Betalactamasas son los siguientes:

- Microorganismo productor.
- Medio de cultivo (medio de mantenimiento, medio de pre producción y medio de producción).
- Presencia o ausencia de agentes inductores (Ej. Penicilina G).
- Condiciones fisicoquímicas (pH, agitación, transferencia de oxígeno y temperatura).

3.6.1 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE BETALACTAMASAS.

En la naturaleza, las Betalactamasas han nacido de la necesidad de los microorganismos de defenderse de los diferentes agentes bactericidas o

bacteriostático a los cuales se enfrentan, sin embargo no todos los géneros de microorganismos presentan viabilidad como productores de esta enzima a nivel industrial, ya sea por bajos porcentajes de rendimiento en el bioproceso, por la patogenicidad del microorganismo o por los altos costos de purificación de enzima obtenida. ^{(7),(8)}

El género *Bacillus* ha sido la especie más estudiada a nivel internacional para la producción de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) por lo cual a continuación se describen algunos de los microorganismos pertenecientes a este género, los cuales son considerados a nivel industrial como los más importantes en los bioprocesos de obtención de Betalactamasas, ya sea por su alto porcentaje de rendimiento en la producción, baja patogenicidad o fácil purificación de la enzima obtenida ^{(7) (8)}.

- *Bacillus licheniformis*.

Bacillus licheniformis, es un microorganismo productor de Betalactamasas constitutivas, se utiliza liofilizado, se almacena y mantiene a una temperatura de -20 ° C. Es Gram positivo, mesófilo, cuya temperatura óptima de crecimiento es de alrededor de 30°C, aunque puede sobrevivir a temperaturas mucho más altas. ⁽⁷⁾

La temperatura óptima para la secreción de enzima es 37 °C. Puede existir en forma de esporas resistiendo ambientes hostiles, o en estado vegetativo cuando las condiciones son buenas. Este microorganismo es seleccionado por demostrar un alto rendimiento en la producción de Betalactamasas, y por no ser patógeno para el ser humano, lo cual disminuye la probabilidad de que se produzcan endotoxinas bacterianas, aumentando la viabilidad en su uso y disminuyendo sus costos en un posible proceso de purificación. Este microorganismo es utilizado como microorganismo tipo cuando se desea comparar la eficacia de la biosíntesis de Betalactamasas con otra especie del genero *Bacillus* ⁽⁷⁾. *Bacillus licheniformis* 749, *Bacillus licheniformis* ATCC 25972,

Bacillus licheniformis NRRL 978, *Bacillus licheniformis* NRRL 243 son microorganismos certificados para la producción de Betalactamasas. ⁽⁸⁾

- *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus es una bacteria en forma de bastón alargado, Gram positivo que es móvil por medio de flagelos peritricos. Las células son de 1,0-1,2 µm de diámetro x 3,0-5,0 µm de largo. *B. cereus* es capaz de utilizar glucosa, fructosa y trehalosa pero no las pentosas ni muchos azúcares alcoholes. La mayoría de las cepas hidrolizan activamente el almidón, la caseína y la gelatina. Las cepas de *B. cereus* son usualmente resistentes a los antibióticos betalactámicos incluidas las cefalosporinas de tercera generación. La explicación se halla en que esta bacteria produce tres tipos diferentes de Betalactamasas, la betalactamasa I o tipo A, es una Penicilinas extracelular con una serina en el sitio activo, betalactamasa II o tipo C, que se activa con la unión de los iones zinc y cobalto: la III es una lipoproteína de clase A unida a membrana que tiene además una forma secretada. ⁽¹⁶⁾

Las Betalactamasas utilizadas en laboratorios de control de calidad, son usualmente obtenidas a partir de filtrados de cultivos de una cepa de *Bacillus cereus* y son usadas para inactivar las Penicilinas y las cefalosporinas rompiendo la unión entre el nitrógeno de la tiazolidina y el carbono del carbonilo adyacente. ⁽¹⁰⁾

Las colonias típicas de *B. cereus* son cremadas, filamentosas de aproximadamente 5 mm de diámetro a las 24 horas de incubación, y tienen un color turquesa en el medio de cultivo Peacock blue, rodeado por un precipitado de hidrólisis de yema de huevo. A las 48 horas de incubación presentan el color con centro grisáceo. El crecimiento y la multiplicación de las células vegetativas ocurren típicamente dentro del rango de temperaturas de 10-48 °C, mientras que el óptimo se encuentra entre 28-35 °C. Sin embargo, se han identificado variantes psicrótróficas de *B. cereus* en leche cruda y pasteurizada capaces de

crecer e iniciar la descomposición a temperaturas tan bajas como 5 °C. El pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4.3 y 9.3. El rango mínimo de actividad del agua para el crecimiento vegetativo es de 0.912 – 0.950. Su tiempo de generación en medio artificial a 30 °C es de 18-27 min. Cuando carecen de nutrientes esporulan, lo cual le permite sobrevivir largos períodos de carencia nutricional. Las esporas resisten una serie de factores ambientales como altas temperaturas ($D_{100}^{\circ\text{C}}$ en leche descremada hasta 3 min, $D_{121}^{\circ\text{C}}$ en aceite vegetal hasta 30 min, $D_{95}^{\circ\text{C}}$ en agua destilada de 1.5-36 min), radiaciones y reactivos químicos, *Bacillus cereus* ATCC 13061 es un microorganismo certificado para la producción de Betalactamasas (Anexo N° 4).

(16), (22), (23)

3.6.2 MEDIO DE CULTIVO Y SUS SUSTRATOS.

- Medio de cultivo.⁽⁹⁾

Para cada microorganismo a ser cultivado para cualquier propósito es necesario proveer el ambiente bioquímico y biofísico apropiado. El ambiente bioquímico (nutricional) se hace disponible como medio de cultivo, y dependiendo de las necesidades especiales de cada bacteria particular se ha desarrollado una gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y utilidades. ⁽⁹⁾

Cuadro N° 4: Tipos de medio de cultivo. ^{(9), (17)}

Tipo de medio de cultivo	Definición
Medios naturales o complejos	Constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal, las que son usualmente complementadas por la adición de minerales y otras sustancias. En ellos no se conocen todos los componentes, ni las cantidades exactas presentes de cada uno de ellos.
Medios definidos o sintéticos	Son los medios que tienen una composición química cuantitativamente definida.

Cuadro N° 4:(Continuación). ⁽⁹⁾⁻⁽¹⁷⁾

Tipo de medio de cultivo	Definición
Medios de enriquecimiento	Medios con un nutriente simple que presentan sustancias enriquecedoras que mejoran el desarrollo de los microorganismos, permiten el cultivo y crecimiento de una amplia gama de microorganismos. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, Hemoglobina, Factor X, Factor V, glutamina, u otros factores accesorios para el crecimiento de las bacterias.
Medios Selectivos	(Pueden ser de moderada o de alta selectividad) permiten el aislamiento y crecimiento del microorganismo o grupo de microorganismos de interés, para lo cual se manipulan factores ya sean de tipo nutricional o de tipo ambiental. Algunos medios son selectivos porque contienen un producto químico, que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos pero no de otros.
Medios transporte y mantenimiento	Se utilizan en la toma, transporte y conservación de muestras biológicas. Son medios que inhiben las reacciones enzimáticas autodestructivas dentro de las células evitando los efectos destructivos de la oxidación.
Medio de mantenimiento	Medios con un nutriente simple que presentan sustancias enriquecedoras que mejoran el desarrollo de los microorganismos
Medio de pre cultivo	Medio similar al medio de producción con nutrientes destinados a desarrollo del microorganismo productor, cuyo fin principal es aumentar la biomasa y adaptarlo al medio de producción.
Medio de producción	Son los medios que tienen una composición química definida, cuyos nutrientes están destinados a promover al microorganismo producir a una sustancia específica, como por ejemplo; ácidos, alcoholes, enzimas, etc.

- **Constituyentes o sustratos de un medio de cultivo.**

Sustrato es una sustancia que engloba todos los requerimientos nutricionales y físicos de la célula y naturalmente, dependen de la especie de microorganismos en particular ⁽¹⁰⁾. Los constituyentes más utilizados en la composición de los medios de cultivo son:

- El agar, se presenta en gránulos y polvos, la concentración en la que se encuentra en los medios de cultivo, dependerá del uso que quiera darse al medio el agar le brinda las características físicas a los medios de cultivo sólido. ⁽¹⁷⁾
- Peptona, es un producto de composición variable, obtenido generalmente de la hidrólisis ácida o enzimática de las proteínas vegetales o animales. Extracto de carne, contiene bases orgánicas solubles, productos de degradación de las proteínas, vitaminas y minerales. ⁽¹⁷⁾
- Extracto de levadura, se consigue a partir de levadura de pan o de cerveza y es una fuente de aminoácidos y vitaminas del complejo B. ⁽¹⁷⁾

- **Medios de cultivo necesarios para la producción de Betalactamasas inducibles.**

Debido a la naturaleza de las Betalactamasas las cuales pueden ser constitutivas o inducibles, dependiendo del mecanismo de biosíntesis utilizado por el microorganismo utilizado en la producción; puede ser o no necesaria la adición de Penicilina G, debido a que algunos microorganismos necesitan la presencia de esta sustancia en el medio de cultivo para iniciar su producción. Las concentraciones reportadas en la bibliografía para la producción de Betalactamasas oscila entre 0,5, 1,0, 2,0 y hasta 50 UI/mL de Penicilina G. Además de todos los sustratos necesarios para el desarrollo óptimo del microorganismo, como lo son fuentes de carbono, nitrógeno y diferentes sales minerales. ⁽⁷⁾

Durante la producción de Betalactamasas es necesario el desarrollo óptimo del microorganismo por lo que se utilizan diferentes medios de cultivo destinados a mejorar la producción de la enzima para lo cual el proceso inicia con el medio de mantenimiento del microorganismo (Cuadro N° 5), el cual se traslada posteriormente a un medio de pre cultivo (Cuadro N° 6), con el fin de aumentar la biomasa (Cuadro N° 7) y finalmente se adiciona al medio de producción, cuyos nutrientes están destinados a promover la producción de la enzima, dependiendo de la composición de este medio las unidades de enzima betalactamasa, puede aumentar o disminuir. ^{(7), (8), (16)}

Cuadro N° 5: Comparación de la composición química de diferentes medios de mantenimiento, para promover el crecimiento microorganismos productores de Betalactamasas. ^{(7), (8), (16)}

Medio de cultivo	Tripticasa de soya agar (Celik y Calik 2004)	Medio de mantenimiento (Celik 2003)	Agar nutritivo (M.R Pollok 1956)
Constituyentes (g/L)			
Tripticasa de soya		5.0	
Peptona de carne	5.0	5.0	5.0
MnSO ₄ .2H ₂ O		0.01	
Agar	15.0	15.0	12,0
Peptona de caseína	15.0		
Cloruro de sodio	5.0		
D – Glucosa			
Fosfato de potasio di hidratado			
Extracto de carne			3.0

Cuadro N° 6: Comparación de la composición química de diferentes medios de pre cultivo para la producción de Betalactamasas.

^{(7), (8), (16)}

Medio de cultivo	Medio de mantenimiento (Celik 2003)	Caldo nutritivo (M.R Pollok 1956)	Caldo de Tripticasa de soya (Celik y Calik 2004)
Constituyentes (g/L)			
Tripticasa de soya	15.0		
Peptona de carne	5.0	5.0	3.0
Na ₂ HPO ₄	0.25		
CaCl ₂	0.10		
Peptona de caseína			17.0
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.01		
Extracto de carne		3,0	
Cloruro de sodio			5.0

Cuadro N° 6: (Continuación).

Medio de cultivo	Medio de mantenimiento (Celik 2003)	Caldo nutritivo (M.R Pollok 1956)	Caldo de Tripticasa de soya (Celik y Calik 2004)
Constituyentes (g/L)			
D – Glucosa			2.5
Fosfato de potasio di hidratado			2.5

Cuadro N° 7: Comparación de la composición química de diferentes Medios de cultivo utilizados en la producción de Betalactamasas. (7), (8), (16), (17)

Medio de cultivo	M1: Eda Celik 2003	Bactocasitone	Medio de Producción: Eda Celik 2004	M2: Eda Celik 2003
Constituyente (g/L)				
Glucosa	10		10.0	
NH ₄ CL	5			5
Extracto de Levadura (g/L)	2		8	2
Casaminoácido		20		
Na ₂ HPO ₄			1.18	
KH ₂ PO ₄		6.5		
Sln. FeSO ₄		1mL (1mg/mL)		
MgSO ₄ .7H ₂ O		0.4		
Solución de sales			20,0 mL	
Solución de sales (g/L), Eda Celik 2004				
MgSO ₄ .7H ₂ O			0.25	
FeSO ₄ .7H ₂ O			0.001	
ZnSO ₄ .7H ₂ O			0.001	
CuSO ₄ .5H ₂ O			0.001	
MnSO ₄ .H ₂ O			0.0075	
UI de Betalactamasas obtenidas	55 UI/mL	ID	270 µg / mL	35 UI/mL

3.6.3 PROCESO DE FERMENTACIÓN EN MEDIO AERÓBICO, EFECTOS DE A TRANSFERENCIA DE OXÍGENO Y AGITACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO, PH Y TEMPERATURA. ⁽⁷⁾

- Transferencia de oxígeno y agitación.

Durante el de una fermentación aeróbica una inadecuada transferencia de oxígeno puede afectar la célula microbiana y en consecuencia afectar a la formación del producto, por influir en las rutas metabólicas. ⁽⁸⁾

La tasa de transferencia de oxígeno puede ajustarse ya sea cambiando la tasa de entrada de aire o velocidad de agitación. La agitación del caldo de fermentación también afecta a otros factores tales como el aseguramiento de un suministro adecuado de nutrientes a las células, la transferencia de calor eficiente, medición precisa de metabolitos específicos en el fluido de cultivo y eficiente dispersión de soluciones adicionales. Sin embargo, la excesiva agitación de un caldo de fermentación puede causar cizallamiento y dañar las células, además de generar aumento de la temperatura y la formación de espuma. Por lo cual para la producción de Betalactamasas se recomienda un cultivo estático (libre de agitación) y en un medio ambiente aeróbico. ^{(7), (8)}

- pH.

Como las fases de un bioproceso son dinámicas y son la consecuencia del funcionamiento de los parámetros del proceso y del entorno con el microorganismo, la influencia de la operación del biorreactor sobre el pH es un parámetro realmente importante y necesita aclaración con el fin de desarrollar una estrategia de operación adecuada. ⁽⁷⁾

Las células microbianas tienen una notable capacidad de mantener el pH intracelular a un nivel constante a costa de grandes variaciones en el pH del medio extracelular, pero sólo a expensas de un aumento significativo en el

mantenimiento de la energía libre de Gibbs tiene que ser usado para mantener el gradiente de protones a través de la membrana de la célula. ⁽⁷⁾

En la mayoría de los procesos de fermentación para la obtención de enzimas Betalactamasas, el pH puede variar sustancialmente. A menudo, la naturaleza de la fuente de nitrógeno puede ser importante. Por otra parte, el pH puede cambiar, debido a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular o la producción de bases en el medio de cultivo. ⁽⁷⁾

No obstante, algunos procesos requieren condiciones controladas de pH, mientras que otros pueden requerir operaciones no controladas de pH, con el fin de aumentar el rendimiento del producto y la selectividad. En el caso de la producción de Betalactamasas, se ha demostrado que el control del pH del medio usando un buffer o un sistema activo de control del pH no es adecuado debido a que se disminuye la producción de la enzima. ⁽⁸⁾

En algunos estudios se especifica que la actividad betalactamasa de las células, ha demostrado ser constante e independiente del pH, aunque regularmente el intervalo de pH del cultivo oscila entre 5.5 a 7.5, donde se ha observado una adecuada producción de Betalactamasas, por lo cual es recomendable llevar a cabo la fermentación a pH libre. ^{(7), (8)}

- Temperatura.

La temperatura es uno de los parámetros más importantes del proceso por lo cual el sistema debe mantenerse constante en su valor óptimo durante todo el proceso. ⁽⁷⁾

Cualquier variación de este parámetro puede afectar tanto a la tasa de crecimiento y la de formación de producto. Sin embargo la temperatura óptima para el crecimiento y formación de producto pueden ser diferentes. Cuando la temperatura aumenta por encima de la temperatura óptima de crecimiento, los requisitos de mantenimiento para el aumento de las células pueden verse afectados por la temperatura. La bibliografía reporta que para la mayoría de

cepas de bacilos productores de Betalactamasas la temperatura óptima del proceso de producción es de 37°C. Sin embargo esto dependerá de la cepa utilizada. ⁽⁷⁾

3.7 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BETALACTAMASAS.

Existen diferentes métodos para la cuantificación o medición de la actividad de las enzimas Betalactamasas. ⁽⁷⁾

- Método manométrico o acidimétrico.

El método acidimétrico que detecta ácido penicilóico después de la hidrólisis de la Penicilina y su presencia se pone de manifiesto mediante un indicador de pH. Puede realizarse en medio líquido o empleando discos o tiras de papel, generalmente comerciales. En el primer caso se emplean tubos estériles o placas de micro titulación con 0,1 mL de una solución de Penicilina G (1 millón de U/mL) pH 8,5 y rojo de fenol (0,5%). Esta solución puede prepararse añadiendo 2 mL de rojo fenol 5%, 16.6 mL de agua destilada y 1,2 g de Penicilina G (1 vial de 20 millones de U). ⁽²³⁾

El pH se ajusta con hidróxido de sodio 1N. Los tubos una vez preparados pueden conservarse a -20°C durante 6 meses. El cambio de color violeta de esta solución al amarillo antes de 15 minutos, después hacer una suspensión con 4-5 colonias de un cultivo puro de una bacteria, indicará la producción de Betalactamasa. La ausencia de cambio de color durante estos 15 minutos se considerará como negativo para la producción de esta enzima. Los cambios de color a partir de los 15 minutos pueden ser inespecíficos o producidos por el propio deterioro del reactivo. No obstante, algunas cepas de estafilococos, generalmente sin inducción previa, pueden requerir más de 15 minutos para demostrar su capacidad de producción de betalactamasa. No debe añadirse cultivos líquidos sobre la solución de Penicilina puesto que puede modificarse el pH y variar el resultado de la prueba. ^{(19), (23)}

Los sistemas ácido métricos comerciales suelen utilizar discos o tiras de papel impregnados con una solución alcalina (1,25 mmol/litro NaOH) de Penicilina G (125 µg/mL) y 0,1% de azul de bromocresol. Una vez desecadas pueden conservarse a 4°C hasta 6 meses. Antes de utilizarse deben rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada, pudiendo para ello colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de Petri. La aparición de un color amarillo antes de 5 minutos después de colocar 2-3 colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos o tiras rehidratados indicará la presencia de Betalactamasas. Al igual que en el caso anterior. Este método se utiliza principalmente para la identificación de microorganismos productores de Betalactamasas. ⁽¹⁹⁾

- **Ensayo yodométrico.** ⁽¹⁰⁾

El ensayo yodométrico consiste en la retro valoración del ácido penicilóico, cuando la Penicilina entra en contacto con la enzima betalactamasa, se produce el rompimiento hidrolítico del anillo Betalactámico, produciéndose ácido penicilóico, el cual reacciona en medio ácido con una solución de yodato-yoduro formando el ion iodo III, el cual se une a los dobles enlaces presentes en el ácido penicilóico. Sin embargo en ion iodo III no se une con la Penicilina. ⁽¹⁰⁾

Se deja el analito en reposo durante 15 min y se valora con una solución de tiosulfato de sodio 0.01 N, utilizando almidón como indicador formándose el complejo yodo- ácido penicilóico-almidón, al observar el viraje de color de azul intenso a incoloro se ha llegado al punto final de la valoración. ⁽¹⁰⁾

- **Ensayo espectrofotométrico.** ^{(7), (8)}

El ensayo espectrofotométrico es una técnica rápida y ampliamente utilizada, en la determinación de la actividad de la enzima en soluciones con diferentes concentraciones de sustrato sin perder precisión y sensibilidad. Entre los estudios que utilizan el ensayo espectrofotométrico, se pueden mencionar una gran variedad de sustratos (Bencilpenicilina, que es el más ampliamente utilizado, nitrocefina o cefalotina), en diferentes concentraciones utilizando

como diluyente soluciones amortiguadoras (potasio o fosfato de sodio), a una longitud de onda de 232 nm y temperaturas entre 25 o 30 °C. ⁽⁷⁾

En este ensayo se elabora una curva de calibración para la cuantificación de Penicilina G utilizando como diluyente solución buffer fosfato pH=7.0, T=37°C, $\lambda=232\text{nm}$ con un tiempo de reacción de 1 minuto. ⁽⁸⁾

La unidad de actividad betalactamasa se define como: la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 μmol de Penicilina G Benzatínica a 37 °C y pH 7,0 en un minuto. ⁽⁷⁾

El producto de la reacción de hidrólisis, es el ácido penicilóico. En este sistema medimos la absorbancia de la Penicilina G Benzatínica que no ha sido hidrolizada, las lecturas se realizan a una longitud de onda de 232 nm, se mide la disminución de la absorbancia en diferentes soluciones sustrato de concentración conocida por acción de la enzima. ^{(8) (10)}

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La presente investigación es de carácter bibliográfico, prospectivo y experimental.

- **Bibliográfico:** Porque se realizó una investigación previa a nivel nacional e internacional, sobre procesos de producción y cuantificación de enzimas Betalactamasas.
- **Prospectivo:** porque este trabajo podrá ser utilizado como base para la realización de futuras investigaciones sobre el proceso de obtención y cuantificación de la actividad enzimática de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) inducibles, además de ser un primer paso para la implementación de un sistema de producción de enzimas Betalactamasas a nivel industrial.
- **Experimental:** Porque se midieron experimentalmente los parámetros de pH, crecimiento microbiano, azúcares totales y actividad betalactamasa, producida en medio líquido a las condiciones ensayadas. Con los datos obtenidos en este proceso se procedió a la caracterización y verificación del desarrollo de la fermentación en medio líquido para la producción de enzimas Betalactamasas.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

La investigación bibliográfica previa se realizó en las bibliotecas de:

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas (UCA).
- Universidad Dr. José Matías Delgado (UJMD).
- Internet

4.3 PARTE EXPERIMENTAL.

El desarrollo experimental se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones para la Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador. La parte experimental se realizó en dos etapas paralelas, la etapa uno fue denominada PRODUCCION DE LA ENZIMA, donde se desarrollaron todos los procedimientos microbiológicos relacionados con a la obtención de la enzima betalactamasa (reanimación del microorganismos, aumento de biomasa, fermentación).

La etapa dos fue denominada CONTROLES EN PROCESO, en la que se midieron los parámetros descritos a continuación:

- Determinación pH
- Cuantificación de biomasa por cámara de Neubauer
- Cuantificación de azúcares totales por el método de DNS modificado
- Actividad betalactamasa

Todo esto se realizó en tres fermentaciones, con un volumen final de 1 Litro, con un sistema de cultivo en lote en condiciones aeróbicas, utilizando al microorganismo *Bacillus cereus* ATCC 13061 como microorganismo productor y Penicilina G Benzatínica como agente inductor de la producción de enzimas Betalactamasas.

4.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO. (7), (8), (10)

Los medios de cultivo y reactivos utilizados durante el desarrollo de esta investigación se encuentran descritos en el anexo N° 1.

4.4.1 Etapa uno: producción de la enzima:

Esta etapa se desarrollara en cinco pasos:

PASO 1: Reconstitución y pre cultivo del microorganismo

PASO 2: Preparación del inculo

PASO 3: Siembra de microorganismo en el medio de pre-producción

PASO 4: Siembra de microorganismo productor en medio de producción

PASO 5: Toma de muestra para análisis.

Paso 1: Reconstitución y pre-cultivo del microorganismo.

Se abrió cuidadosamente el criovial que contenía al *Bacillus cereus* ATCC 13061, con micropipeta se agregó un volumen 500 μ L (0.5 mL) de caldo nutritivo utilizando una punta estéril, luego se homogenizó el contenido del criovial mezclando suavemente por inversión, evitando la formación de espuma y se colocó en una incubadora durante 30 minutos a una temperatura de 30 °C \pm 0.5 °C para la adaptación del microorganismo al medio de cultivo.

Posteriormente en un medio de enriquecimiento TSA, contenido en tres tubos de ensayo con el medio inclinado, se sembró el microorganismo por método de estrías, utilizando un asa redonda y se incubó a una temperatura de a 30 °C \pm 0.5 °C durante 48 h. El microorganismo *B. cereus* presenta colonias, cremadas, filamentosas de aproximadamente 5 mm de diámetro a las 24 horas de incubación (ver anexo 4).

- Paso 2: Preparación del inóculo.

Se preparó una suspensión del microorganismo, a partir de los tres tubos con enriquecimiento Medio TSA sembrados en el PASO 1, las colonias obtenidas fueron arrastradas con 15 mL solución salina normal (SSN) con ayuda de perlas de ebullición estériles, luego de verter el contenido de los tres tubos en un erlenmeyer de 25 mL estéril se ajustó la turbidez del inóculo con SSN al 1.0 \pm 0.5 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, realizando diluciones con SSN.

Después de ajustado el inóculo se dejó reposar por 15 minutos y sembró en el medio de pre-producción (Caldo nutritivo).

- **Paso 3: Siembra del microorganismo en el medio de preproducción.**

Se agregó una alícuota de 5.0 mL (la cual representa el 10 % del vol. final del medio de pre-producción) de la solución estandarizada en el PASO 2 a cada uno de 2 erlenmeyer, que previamente contenían 45 mL de caldo nutritivo y se incubaron a temperatura ambiente en condiciones aeróbicas, durante 48 h a una agitación de 200 rpm utilizando un agitador oscilatorio (shaker).

- **Paso 4: Siembra de microorganismo productor en medio de producción.**

Al final del tiempo de incubación del medio de pre-producción, se combinó el contenido de los dos erlenmeyer y se inocularon en un erlenmeyer que contiene 0.9 L del medio de producción para obtener un volumen final de 1.0 L de medio de cultivo. Posterior a esto se le agregó al medio de producción el equivalente a 50000 UI de Penicilina G Benzatínica para obtener una concentración final en el fermentador de 50 UI/mL de Penicilina G Benzatínica, esto con el objeto de inducir la producción de Penicilinasas.

Luego se incubó el biorreactor a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 144 horas y se tomaron muestras de acuerdo a lo indicado en la Tabla N° 4. Se tomaron 2 muestras de 10 mL cada una, de donde se utilizan 5.0 mL para realizar cuantificación de biomasa por cámara de Neubauer. El resto de las muestras se almacenaron a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente realizar los análisis fisicoquímicos correspondientes:

- Cambio de pH.
- Consumo de nutrientes (determinación de azúcares totales).
- Cinética de crecimiento (determinación de biomasa).
- Actividad enzimática (por método espectrofotométrico).

Las tomas de muestras de análisis fueron realizadas cada 24 h durante 144 h y el volumen final de las alícuotas tomadas para el análisis representa el 10% de volumen final del cultivo. No se devolvió al fermentador (Erlenmeyer de 1.0 L) el

volumen de medio de producción equivalente a las muestras para análisis tomadas (cultivo en lote).

Las muestras fueron tomadas con pipetas de 10.0 mL y colocadas en contenedores adecuados, previamente esterilizados (Tabla N° 1).

Tabla N° 1: Cantidad de muestra de análisis a tomar para cada uno de los tiempos donde se realizará la toma de muestra.

Recolección de Blancos (inicio del proceso)	Código de la muestra	*Alícuotas y volumen (mL) de muestra tomar
Blanco 1 (Medio antes de la inoculación de microorganismo y sin Penicilina)	MB	50
Blanco 2 (Medio antes de la inoculación de microorganismo y con Penicilina)	MBP	50
Tiempo al cual se recolecto la muestra (h)	Código de la muestra	*Alícuotas y volumen (mL) de muestra tomar
0	M1-1	10
0	M1-2	10
24	M2-1	10
24	M2-2	10
48	M3-1	10
48	M3-2	10
72	M4-1	10
72	M4-2	10
96	M5-1	10
96	M5-2	10
144	M6-1	10
144	M6-2	10

4.4.2 Etapa dos: Controles en proceso.

A continuación se detallan cada una de las pruebas realizadas a las muestras obtenidas de las fermentaciones.

4.4.2.1 Determinación de pH.

La variación de pH es uno de los parámetros físicos más importantes del proceso. Bibliográficamente se detalla que el bioproceso depende directamente del pH. En algunos estudios se menciona que al mantener el pH en límites estrictos con ayuda de una solución buffer se disminuye la producción de la enzima, generándose un ambiente demasiado hostil para las células microbianas, lo que causa que estas deban luchar para mantener su pH intracelular afectando las condiciones operacionales del intercambio de oxígeno intracelular y evitando al bioproceso desarrollarse adecuadamente. ^{(7), (8), (10)}

En el diseño de este proceso, decidió dejarse la fermentación a pH libre, con el objetivo de determinar su influencia sobre el proceso de producción. Se monitoreó la variación de este parámetro físico en cada una de las muestras recolectadas de la fermentación. ^{(7), (8), (10)}

4.4.2.1.1 Procedimiento.

Colocar 5.0 mL de muestra en un Erlenmeyer de 20 mL y agregar 5.0 mL de agua libre de CO₂ (Solución al 50% v/v); medir el pH con la ayuda de un potenciómetro, Realizar dos veces por cada muestra y reportar el pH promedio.

Con los datos obtenidos se construyó un gráfico de variación de pH con respecto al tiempo.



Figura N° 4: Diagrama de medición de pH

4.4.2.2 Determinación de azúcares totales por método de DNS modificado ⁽⁷⁾:

Se determinó la concentración de azúcares totales en cada una de las muestras recolectadas de la fermentación con el propósito de medir el consumo de nutrientes durante el desarrollo del proceso (consumo de Glucosa con respecto al tiempo) y así determinar su relación con la producción de la enzima y la cinética de crecimiento del microorganismo.

4.4.2.2.1 Procedimiento.

- Preparación de curva de calibración:

Preparar una solución de glucosa de una concentración de 1 g/L, a partir de la cual se realizó una curva de calibración de glucosa de acuerdo a lo especificado en la Tabla N° 2.

Se coloca 1.0 mL de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla N° 2, en un tubo de ensayo limpio y seco; a cada uno de ellos se les adiciona 1.0 mL de Acido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) y se agito con ayuda de un agitador vortex por 1 minuto. Las soluciones contenidas en los tubos se llevaron a ebullición en un baño maría durante 5 minutos, las soluciones se enfriaron inmediatamente en baño de hielo y se agregaron 8.0 mL de agua destilada a cada tubo. Cada solución se agito en vortex por 1 minuto y se leyeron las absorbancias de cada una de las soluciones a una longitud de onda de 575 nm usando agua como blanco y con los datos obtenidos se realizó un gráfico de absorbancia contra concentración.

Tabla N° 2: Soluciones estándar de glucosa para elaborar curva de calibración del método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) para determinación de azucares totales. ⁽⁷⁾

Tubo	Volumen (mL) de solución estándar de glucosa (1g/L)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)
0	0.0	1.0	0.0

Tabla N° 2: (Continuación).

Tubo	Volumen (mL) de solución estándar de glucosa (1g/L)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

- Tratamiento de las muestras:

Se colocan alícuotas de 1.0 mL de muestra en un tubo de ensayo limpio y seco al cual se le adiciono 1.0 mL de reactivo DNS (anexo N° 1) y se agito ayuda de un agitador vortex por 1 minuto. Las muestras contenidas en los tubos se llevaron a ebullición en un baño maría durante 5 minutos donde se observó el vire de color de amarillo a rojo, después de esto las muestras se enfriaron inmediatamente en baño de hielo y se agregaron 8.0 mL de agua destilada a cada tubo; cada muestra se agito en vortex por 1 minuto y se leyeron las absorbancias de cada una de las soluciones a una longitud de onda de 575 nm utilizando agua como blanco. Utilizando estos valores (absorbancias de las muestras) y la ecuación de la curva de calibración previamente elaborada. Se obtuvieron las concentración de azúcares totales en cada tiempo de muestreo y se graficaron estos datos.

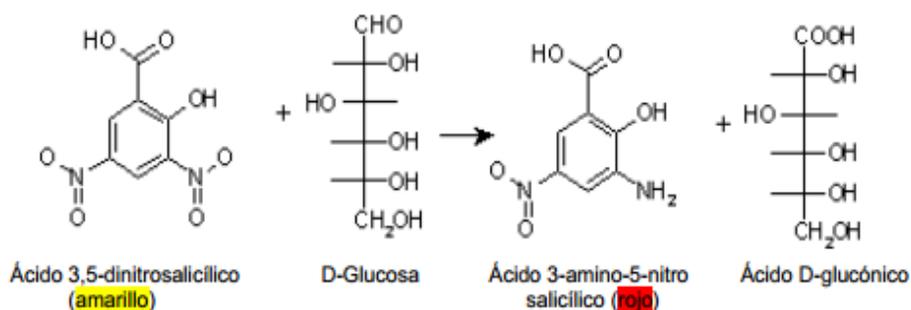


Figura N° 5: Reacción del reactivo Acido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) con la glucosa.⁽⁷⁾

4.4.2.3 Determinación de biomasa por cámara de Neubauer. ⁽⁴⁾

El crecimiento microbiano es el resultado de un gran número de reacciones químicas que ocurren dentro de las células individuales, consiste en el transporte de sustratos en la célula, seguido por la conversión de los sustratos intracelulares en biomasa y productos metabólicos que posteriormente son excretados en el medio extracelular.

Con el fin de determinar la cantidad de microorganismo presente durante el desarrollo del bioproceso se realizó el recuento microbiano o determinación de biomasa por cámara de Neubauer, con los datos obtenidos de la cantidad biomasa se elaboró una curva de cantidad de biomasa con respecto al tiempo

4.4.2.3.1 Procedimiento.

Preparar diluciones seriadas 1 en 10 de la muestra obtenidas durante el desarrollo del proceso desde 10^{-1} hasta 10^{-4} utilizando como diluyente SSN y elegir la dilución más apta para realizar el recuento, de la dilución escogida tomar 10 μ L con una micropipeta y colocar un cubre objetos sobre la cámara de Neubauer, la cual se coloca en posición horizontal sobre la mesa, luego con la punta de la micro pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer se deja que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad, después de esto colocar la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio, y enfocar el microscopio hasta que pueden observar adecuadamente las células y se realiza el recuento de células en el primer cuadro.

Se anota en una hoja de resultados la cantidad de células contadas en el primer cuadro y se repite el proceso para los 4 cuadros restantes, anotando el resultado de cada uno de ellos. Contando en el campo central cinco cuadros (Superior derecho, superior izquierdo, medio, inferior derecho, inferior izquierdo)

evitando contar aquellas células que se salen de los límites de dichos cuadros de acuerdo a la figura N° 6.

- Fórmula para determinar el número de células:

$$\text{Concentración (cel / mL)} = \frac{\text{Número de células} \times 250000}{\text{Número de cuadros (5 cuadros)}} \times \text{Dilución}$$

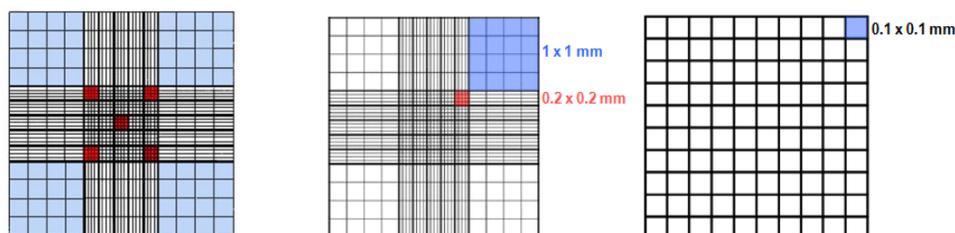


Figura N° 6: Esquema de recuento de células.

4.4.2.4 Actividad betalactamasa. ^{(7), (8)}

Las Betalactamasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo de betalactámico en antibióticos betalactámicos, tanto en las Penicilinas como en las cefalosporinas.

Los productos de esta reacción de hidrólisis, son biomoléculas con efecto antibiótico inactivo, por lo que para los microorganismos la síntesis de Betalactamasas, es el mayor mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos.

Con el objetivo de verificar que durante el proceso de fermentación efectivamente se produjeron enzimas Betalactamasas inducibles (Penicilinasas), se desarrolló un método espectrofotométrico de cuantificación de la actividad betalactamasa en base a los estudios realizados por método propuesto por Celik (2003) utilizando como modelo matemático el propuesto en el apartado 81 de la Farmacopea de los Estados Unidos (regresión lineal manual para la determinación de concentración de antibiótico en muestras sub modelo 2).

Este análisis se basa en la degradación de la Penicilina G Benzatínica (soluciones de concentración conocida) a ácido Penicilóico por acción de la enzima betalactamasa, en el medio de producción después de un tiempo de reacción de 60 segundos (1 minuto) a pH 7.

La actividad betalactamasa es expresada en unidades betalactamasa por mililitro (U B-Lac/mL).

4.4.2.4.1 Procedimiento.

- Elaboración de curva de calibración:

Elaborar soluciones stock de Penicilina G Benzatínica de acuerdo de acuerdo a lo detallado en la Tabla N° 3, utilizando buffer fosfato pH 7 como diluyente (anexo N°1).

Se midió la absorbancia de cada una de las soluciones a 232 nm usando como blanco buffer fosfato pH 7. Con estos datos se construye un gráfico de absorbancia contra concentración la cual se utiliza como curva de calibración de Penicilina G Benzatínica (anexo N° 1).

- Tratamiento de las muestras

Se colocan en 6 tubos de ensayo 9.0 mL de c/u de las soluciones sustrato (soluciones stock elaboradas para la curva de calibración), luego se añaden 1.0 mL de muestra a cada tubo (esto para cada tiempo de muestreo) y se agita la muestra con ayuda de un agitador vortex durante 1 minuto, inmediatamente después del minuto se procede a leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 232 nm usando como blanco una solución 1 en 10 de medio de cultivo sin Penicilina y buffer fosfato pH 7.

Con los datos obtenidos se elaboraron gráficos de absorbancia contra concentración y por análisis de razón de pendientes se determinó la actividad betalactamasa para cada una de las muestras y se construyó la curva de actividad betalactamasa con respecto al tiempo.

Tabla N° 3: Soluciones stock para curva de calibración de Penicilina G Benzatínica.

Concentración	Alícuota (mL)	Vol. Final (mL)	UI/mL	Mol/mL	mMol/mL	Mg**/mL
Código de la Sln.						
Vial*	NA	NA	400,000	0.0003396	0.3396	333.3333
Sln. Madre	2.5	200.0	5000	0.0000042	0.0042	4.1667
1.	20.0	100.0	1000	0.0000008	0.0008	0.8333
2.	16.0	100.0	800	0.0000007	0.0006	0.6666
3.	12.0	100.0	600	0.0000005	0.0005	0.5000
4.	10.0	100.0	500	0.0000004	0.0004	0.4166
5.	8.0	100.0	400	0.0000003	0.0003	0.3333
6.	6.0	100	300	0.0000002	0.00025	0.2500

*Cada vial de Penicilina G Benzatínica Unicil® Rotula 1,200,000 UI/ 3 mL

**1595 UI/mg (400.000 UI =250 mg)

4.4.2.5 Cálculos de cinética de producción de la enzima betalactamasa.

Con los datos obtenidos de las mediciones de pH, azúcares totales, cantidad de biomasa y actividad enzimática betalactamasa se realizaron los cálculos de cinética microbiana utilizando diferentes fórmulas matemáticas (cuadro N°8), a fin de caracterizar adecuadamente el proceso, los valores obtenidos corresponden a la fase de la fermentación en que el microorganismo presenta un crecimiento exponencial (y se complementan con la determinación de azúcares totales y actividad betalactamasa). Posteriormente se construyó un gráfico comparativo de cada uno de los parámetros medidos durante en este trabajo (pH, biomasa, azúcares totales y actividad enzimática) con respecto al tiempo.

Cuadro N° 8: Formulas de cinética microbiana y cinética de producción. (7)

a. Velocidad específica de crecimiento microbiano:	$\mu = \frac{\text{Ln}X - \text{Ln}X_0}{t - t_0}$	<p>X= densidad celular en cel/mL</p> <p>t = tiempo en horas o minutos</p> <p>El subíndice cero indica un tiempo inicial y las otras dimensiones corresponden a un tiempo seleccionado (cualquiera, siempre y cuando este en fase de crecimiento exponencial). Las unidades de esta velocidad son: h-1 ó min-1.</p>
b. Velocidad volumétrica de producción de biomasa (o de generación de células microbianas):	$V = \frac{X - X_0}{t - t_0}$	<p>X= densidad celular en cel/mL</p> <p>t = tiempo en horas o minutos</p> <p>El subíndice cero indica un tiempo inicial y las otras dimensiones corresponden a un tiempo seleccionado (cualquiera, siempre y cuando este en fase de crecimiento exponencial).</p>
c. Número de generaciones (o número de duplicaciones):	$n = \frac{\text{Ln}X - \text{Ln}X_0}{\text{Ln}2}$	<p>X= densidad celular en cel/mL</p> <p>El subíndice cero indica la biomasa inicial y las otras dimensiones corresponden a la cantidad de biomasa en un tiempo seleccionado.</p>
d. Velocidad específica de consumo de sustrato:	$q_s = -\frac{S - S_0}{t - t_0} \times \frac{1}{X}$	<p>Dónde:</p> <p>S: concentración del sustrato analizado en g/L</p> <p>X: concentración de biomasa en el tiempo final seleccionado</p> <p>t = tiempo en horas o minutos</p>
e. Velocidad volumétrica de consumo de sustrato:	$Q_s = -\frac{S - S_0}{t - t_0}$ $= \frac{g_{\text{sustratoconsumido}}}{L \times h}$	<p>S: concentración del sustrato analizado en g/L</p> <p>t = tiempo en horas o minutos</p>
f. Velocidad específica de formación de producto:	$q_p = \frac{P - P_0}{t - t_0} \times \frac{1}{X}$ $= \frac{g_{\text{productoformado}}}{L \times g_{\text{biomasa}} \times h}$	<p>Donde P: es la concentración del producto analizado en UI/mL</p> <p>X: concentración de biomasa en el tiempo final seleccionado</p> <p>t = tiempo en horas o minutos</p>

Cuadro N° 8: (Continuación). (7)

g. Rendimiento de biomasa:	$Y_{X/S} = -\frac{X - X_0}{S - S_0}$ $= \frac{Cel / mL_{biomasa}}{g_{sustratoconsumido}}$	<p>S: concentración del sustrato analizado en g/L</p> <p>X: concentración de biomasa en el tiempo final seleccionado</p>
h. Rendimiento de Producto:	$Y_{P/S} = -\frac{P - P_0}{S - S_0}$ $= \frac{g_{producto}}{g_{sustratoconsumido}}$	<p>P: concentración del producto analizado en UI/mL</p> <p>S: concentración del sustrato analizado en g/L</p>

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se logró establecer un sistema para la producción de enzimas betalactamasa utilizando a *Bacillus cereus* ATCC 13061 como productor, en un medio líquido químicamente definido (Anexo 1) de 1L de volumen, al que se le adicionó Penicilina G Benzatínica.

Con la presente investigación fue posible medir la producción de las enzimas Betalactamasas, determinando la actividad enzimática betalactamasa a través de métodos espectrofotométricos basados en la degradación del sustrato por acción de la enzima; además de esto se estudiaron las variaciones de diferentes parámetros fisicoquímicos del proceso importantes para su caracterización en las condiciones de cultivo propuestas.

Los parámetros que se midieron en esta investigación fueron los siguientes:

- pH
- Número de células (cantidad de biomasa)
- Azúcares totales

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros estudiados

5.1 Variación de pH con respecto al tiempo.

Se presentan los resultados obtenidos de pH para cada una de las muestras de acuerdo al procedimiento detallado en la sección 4.4.2.1,1 (ver Tabla N° 4).

Los valores obtenidos de las tres fermentaciones realizadas, se promediaron y con estos valores se construyó un gráfico de variación de pH con respecto al tiempo (figura N° 7).

En la figura N° 7 podemos observar que la tendencia en las variaciones de los valores de pH al inicio del cultivo tienden a la baja, debido probablemente a la formación de ácidos orgánicos provenientes de: la degradación de azúcares, la acción de las enzimas Betalactamasas sobre la Penicilina G Benzatínica

(degradación de la Penicilina ácido penicilínico) y los grupos ácido de los aminoácidos que conforman la proteína enzimática.

Se observa que en el sistema de fermentación establecido, inició a un pH promedio aproximado de 7.2, el cual cambia de las 0 a las 48 h disminuyendo y llegando a un valor promedio de pH de 5.70 el cual se comporta de forma aproximadamente constante el resto del tiempo de cultivo.

Globalmente, se observa que los valores de pH del sistema oscilaron en un rango que va desde aproximadamente 4.7 hasta 7.4 (este rango puede servir como parámetro en futuros estudios sobre el proceso). Comparado con otros estudios acerca de la producción de Betalactamasas donde los bioprocesos oscilan entre valores de 5.5 hasta 7.5 (Hemelia et. al. 1992, Sargent et. al. 1968)⁽⁸⁾, tenemos que el sistema estudiado en esta investigación se comporta de manera similar, tomando en cuenta que los medios de producción bajo las cuales se desarrollaron estos bioprocesos, fueron completamente diferentes al utilizado en este experimento.

Por lo que podemos decir que al establecer un sistema de fermentación en medio líquido a pH libre este tiende a disminuir, como resultado de las sustancias excretadas al medio provenientes del microorganismo productor o de las reacciones químicas in situ generadas por dichas sustancias.

Tabla N° 4 : Valores de pH para cada una de las muestras.

Tiempo (h)	F ₁ R ₁	F ₁ R ₂	F ₂ R ₁	F ₂ R ₂	F ₃ R ₁	F ₃ R ₂	Promedio	Desviación estándar
0	6.96	6.96	7.00	7.31	6.98	7.26	6.96	0.1304
24	5.10	5.11	5.13	6.14	5.10	5.92	5.41	1.1533
48	5.37	5.38	5.39	5.60	5.38	5.70	5.47	0.1024
72	5.60	5.60	5.62	5.99	5.58	5.81	5.70	0.1370
96	5.10	5.11	5.00	5.80	5.01	6.29	5.38	1.4369
144	-----	-----	4.73	5.39	4.70	5.91	5.18	1.0098

F= Fermentación, R=Replica; 1,2 ó 3 = Correlativo de fermentación ó replica

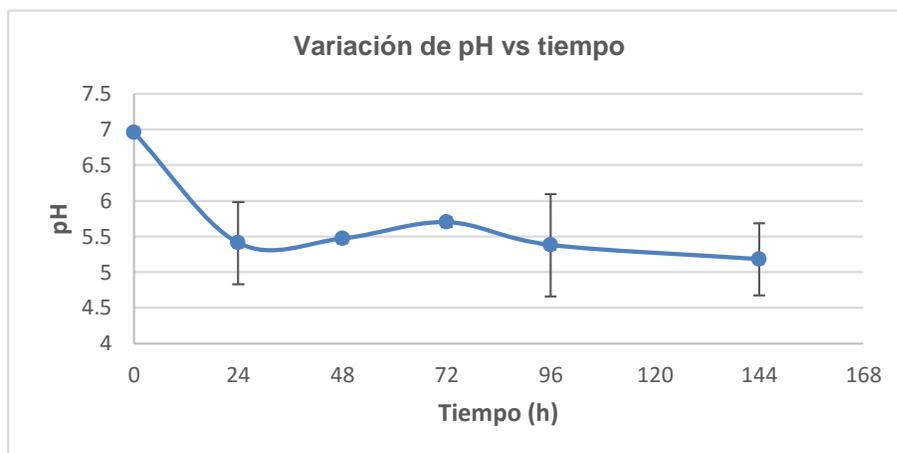


Figura N° 7: Variación de pH con respecto al tiempo

5.2 Determinación de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).

De acuerdo a la metodología especificada en la sección 4.4.2.2.1 se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa, elaborada por duplicado, los resultados se encuentran especificados en la Tabla N° 5 y el valor promedio graficado en la figura N° 8.

Tabla N° 5: Resultados de absorbancia para la curva de calibración de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).

Tubo	solución estándar de glucosa (1g/L)(mL)	agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)	Absorbancia de Sln. Estándar		Abs. Promedio	Desviación estándar
				R1	R2		
0	0.0	1.0	0.0	0.002	0.000	0.001	0.000002
1	0.2	0.8	0.2	0.022	0.011	0.016	0.000060
2	0.4	0.6	0.4	0.041	0.027	0.034	0.000098
3	0.6	0.4	0.6	0.062	0.040	0.051	0.000242
4	0.8	0.2	0.8	0.082	0.068	0.075	0.000098
5	1.0	0.0	1.0	0.104	0.087	0.095	0.000144

R= Replica, 1 ó 2= Correlativo de Replica

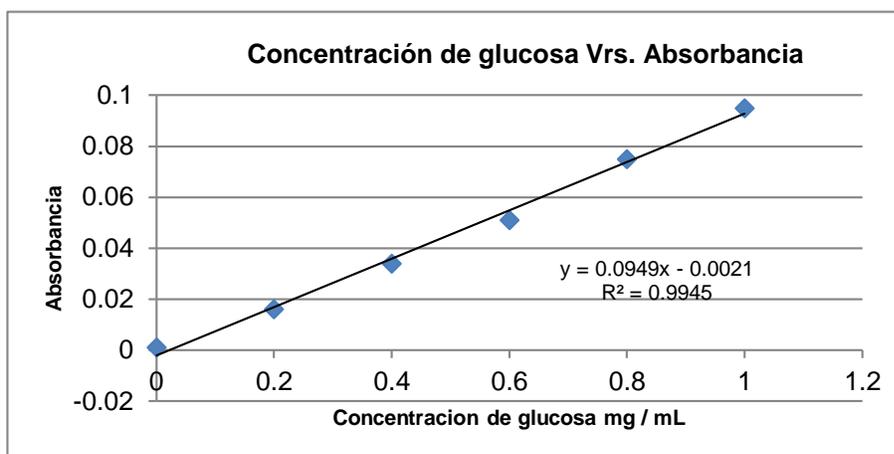


Figura N°8: Curva de calibración de Glucosa.

La curva de concentraciones de glucosa muestra un comportamiento lineal, con un valor de coeficiente de regresión lineal de 0.9945.

Usando la formula obtenida (ver figura N° 8):

$$Y = 0.0949x - 0.0021$$

Despejando X:

$$X = \frac{Y + 0.0021}{0.0949}$$

Sustituyendo el valor de Y por las absorbancias de las muestras (ver Tabla N°6) permite encontrar la concentración en mg/mL de glucosa en la muestra.

Con los resultados obtenidos se construye la figura N° 9 en la cual podemos ver que a medida se desarrolla la fermentación la concentración de glucosa disminuye con respecto al tiempo, obteniéndose una concentración final de glucosa de 1.16016 mg/mL de glucosa (1.16016 g/L) tomando en cuenta que el medio inicialmente contiene 10 g/L de glucosa, tenemos que la cantidad de glucosa consumida por el microorganismo hasta la 144 h representa el 88.98% de glucosa colocada en el medio de cultivo.

Con lo anteriormente descrito, se puede decir que el microorganismo *Bacillus cereus* fue capaz de consumir la glucosa en el medio de producción y utilizarla como fuente de carbono para su desarrollo y para la producción de enzimas Betalactamasas. Por lo tanto la composición del medio ensayado, es apta para el crecimiento de *Bacillus cereus* y la producción de enzimas Betalactamasas.

Tabla N° 6: Resultados de absorbancia para cada muestra sometida al análisis de azúcares totales por ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).

Tiempo (h)	Absorbancia de las muestras						Desviación estándar	Concentración (mg/mL)
	F ₁ R ₁	F ₂ R ₁	F ₂ R ₂	F ₃ R ₁	F ₃ R ₂	Abs. Promedio		
0	0.729	0.832	0.446	0.744	0.486	0.647	0.1166	4.72181
24	0.509	0.651	0.295	0.610	0.241	0.461	0.1365	4.87987
48	0.394	0.439	0.250	0.398	0.214	0.339	0.0400	3.59431
72	0.145	0.127	0.189	0.109	0.177	0.149	0.0044	1.59220
96	0.088	0.100	0.083	0.097	0.167	0.107	0.0046	1.14963
144	-	0.032	0.158	0.022	0.221	0.108	0.0284	1.16016

F= Fermentación, R=Replica; 1,2 ó 3 = Correlativo de fermentación ó replica

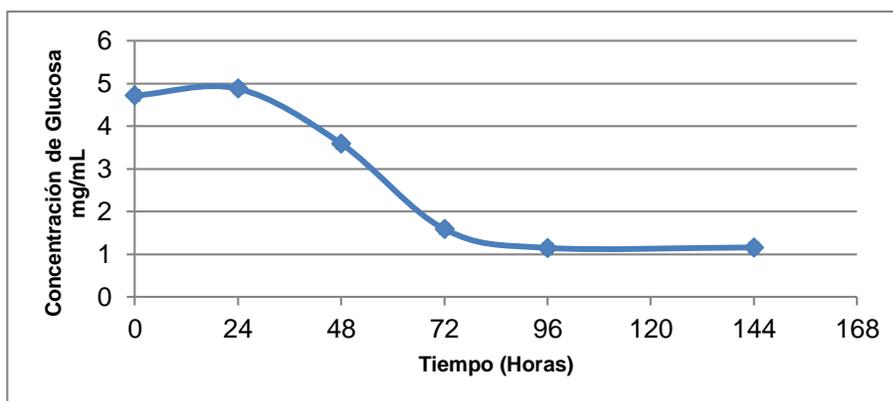


Figura N° 9: Concentración de glucosa (mg / mL) con respecto al tiempo (h)

5.3 Determinación de biomasa.

Para la determinación de biomasa (cantidad de microorganismo presente durante la fermentación) se utilizó el método de recuento celular por cámara de Neubauer, descrito en la sección 4.4.2.3.1 Los datos obtenidos (ver Tabla N°7) para cada una de las fermentaciones (esta medición se realizó una vez para cada muestra de las diferentes fermentaciones) se promediaron y se utilizaron para construir un gráfico de variación del número de células con respecto al tiempo.

Como se puede observar en la figura N°10, de las 0 h a las 48 h no se observa variación significativa en el número de células (fase Lag), sin embargo de las 48 h a las 72 h se observa inicio de crecimiento exponencial del microorganismo, el cual baja levemente a las 96 h, para finalmente ver que de las 96 h a las 144 h aumenta considerablemente el número de células estableciéndose en ese intervalo el crecimiento exponencial. Lo que significa que el microorganismo es capaz de reproducirse adecuadamente en el medio de cultivo propuesto y utilizando como fuente de carbono glucosa

Tabla N° 7: Resultados obtenidos de recuento celular por cámara de Neubauer para cada muestra.

Tiempo (h)	Número de Células			Dilución	N° de células Promedio	Desviación estándar
	F1	F2	F3			
0	5.46 E+08	6.76 E+08	6.80 E+08	1:10	6.13 E+08	1.16E+16
24	1.60 E+09	2.20 E+09	2.12 E+09	1:100	1.86 E+09	2.12E+17
48	1.09 E+09	1.23 E+09	1.17 E+09	1:100	1.13 E+09	9.87E+15
72	1.24 E+11	1.43 E+11	1.37 E+11	1:1000	1.31 E+11	1.81E+20
96	5.79 E+10	6.03 E+11	5.93 E+11	1:10000	5.79 E+10	1.95E+23
144	-	1.35 E+12	9.16 E+11	1:10000	9.16 E+11	9.42E+22

F= Fermentación 1,2 ó 3= Correlativo de la fermentación

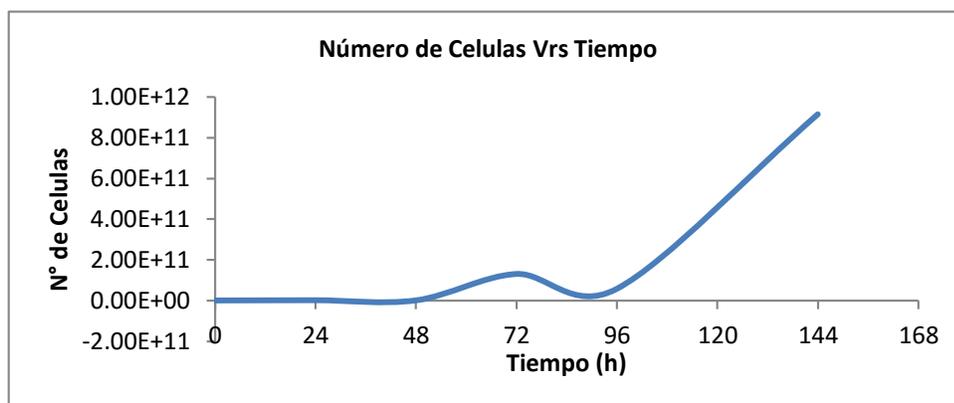


Figura N° 10: Recuento Celular

5.4 Actividad Betalactamasa.

Uno de los puntos centrales de este trabajo era el desarrollo de una técnica de cuantificación de la actividad betalactamasa por método espectrofotométrico.

Para cuantificar la actividad betalactamasa se midió la disminución del sustrato antibiótico (Penicilina G Benzatínica) por acción de la enzima en el medio de cultivo, los parámetros bajo los cuales se realizó la determinación de la actividad enzimática fueron los siguientes:

- Temperatura: Ambiente
- Tiempo de reacción: 1 minuto
- Diluyente: Buffer fosfato pH:7
- Longitud de onda: 232 nm
- Blanco: Solucion1 en 10 de medio de medio de cultivo sin Penicilina en buffer fosfato pH 7.

Siguiendo estos parámetros y la metodología detallada en la sección 4.4.2.4.1 se obtuvieron los datos para cada una de las soluciones estándar a concentraciones desde 300 hasta 1000 UI/mL, datos presentados en la Tabla N° 8 para la curva de calibración de Penicilina G Benzatínica.

Con los valores promedio de estas curvas se construyó un gráfico de concentración contra absorbancia (ver figura N°11).

Tabla N° 8: Absorbancias obtenidas de las soluciones stock para la curva de calibración de Penicilina G Benzatínica

Concentración		Correlativo de curva de calibración/ Absorbancia de las soluciones estándar						Promedio	Desviación estándar
UI/mL	Mol/mL	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
1000	0.0000008	1.045	1.430	1.360	1.176	1.240	1.182	1.2388	0.095977
800	0.0000007	0.953	1.217	1.088	0.960	1.075	1.028	1.0535	0.047878
600	0.0000005	0.890	0.870	0.881	0.900	-	0.829	0.8740	0.003022
500	0.0000004	0.571	0.840	0.765	0.844	0.696	0.753	0.7448	0.051967
400	0.0000003	0.556	0.714	0.620	0.690	0.555	0.449	0.5973	0.048215
300	0.00000025	0.464	-	0.490	-	0.490	0.523	0.4917	0.001753

R= Replica 1, 2, 3, 4,5 o 6 = Correlativo de replica

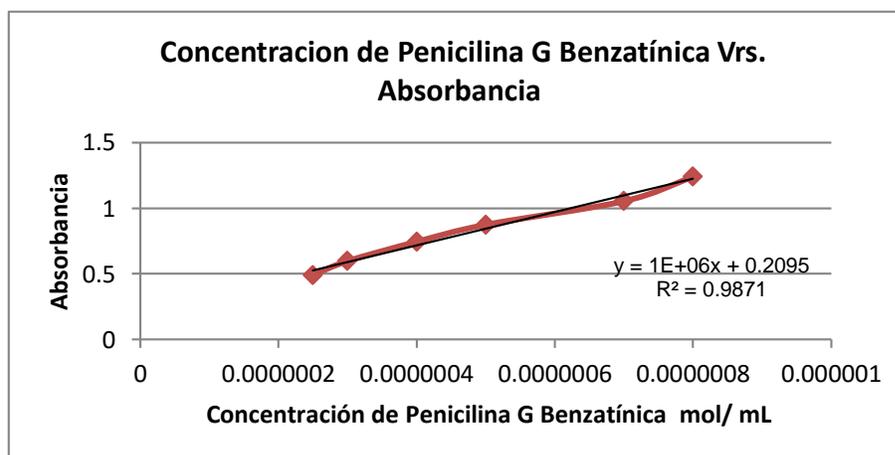


Figura N°11: Curva de calibración de Penicilina G Benzatínica

La curva de concentraciones de estándares de Penicilina G Benzatínica muestra un comportamiento lineal, con un valor de coeficiente de regresión lineal de 0.9871.

De igual forma siguiendo la metodología detallada en la sección 4.4.2.4.1 se obtuvieron los datos promedio de absorbancia para cada una de las

fermentaciones, presentados en la Tabla N° 9, para la degradación de Penicilina G Benzatínica por la acción de las Betalactamasas presentes en las muestras (para ver datos crudos ver anexo N° 3).

Tabla N° 9: Resumen de absorbancias obtenidas de la degradación de Penicilina G Benzatínica presente en las soluciones stock por la acción de las Betalactamasas presentes en las muestras.

Concentración		Absorbancia de sln. Estándar	Absorbancia de soluciones muestras correspondientes a cada tiempo de muestreo (h)						Desviación Estándar de las muestras
UI/mL	Mol/mL		0	24	48	72	96	144	
1000	0.0000008	1.2388	0.858	0.714	0.878	0.729	0.636	1.031	0.101789
800	0.0000007	1.0535	0.763	0.624	0.797	0.616	0.531	0.915	0.100643
600	0.0000005	0.8740	0.670	0.521	0.632	0.508	0.461	0.735	0.057287
500	0.0000004	0.7448	0.613	0.503	0.535	0.510	0.472	0.736	0.047890
400	0.0000003	0.5973	0.513	0.463	0.485	0.444	0.326	0.621	0.046165
300	0.00000025	0.4917	0.348	0.455	0.430	0.353	0.257	0.554	0.053002

Con los datos obtenidos se construyeron gráficos para cada una de las muestras a diferentes tiempos, comparándolas con la curva de calibración de los estándares o soluciones stock (ver figura N° 12), donde se aprecia que la enzima producida por *Bacillus cereus* ATCC 10061 es capaz de degradar la Penicilina presente en las soluciones stock generando la disminución en los valores de absorbancia en todos los tiempos de muestreo comparados con el estándar, corroborando que las Penicilinasas inducibles producidas bajo las condiciones establecidas en esta investigación son activas y capaces de llevar a cabo la reacción de degradación enzimática del anillo betalactámico al unirse con el sustrato antibiótico. Además de los gráficos individuales también se construyó de un consolidado donde se comparan todas las muestras entre si y el estándar (figura N° 13), donde se observa que la enzima presente en cada

muestra es capaz de disminuir el valor de la absorbancia de las soluciones stock.

Con los valores de las pendientes (Mol / mL) de los gráficos expresados en la figura N° 14, se procedió a realizar el cálculo para la determinación de la actividad betalactamasa de la siguiente manera ^{(7), (8), (10)}:

Pasó 1 Diferencia de pendientes (m):

$$Dm = m_{st} - m_{mx}$$

m está dada en concentración de Penicilina G Benzatínica Mol/mL

Pasó 2 Razón de pendientes:

$$Rm = (m_{mx} / Dm) \times \text{Factor de dilución}$$

$$= \text{Actividad betalactamasa en mol/mL}$$

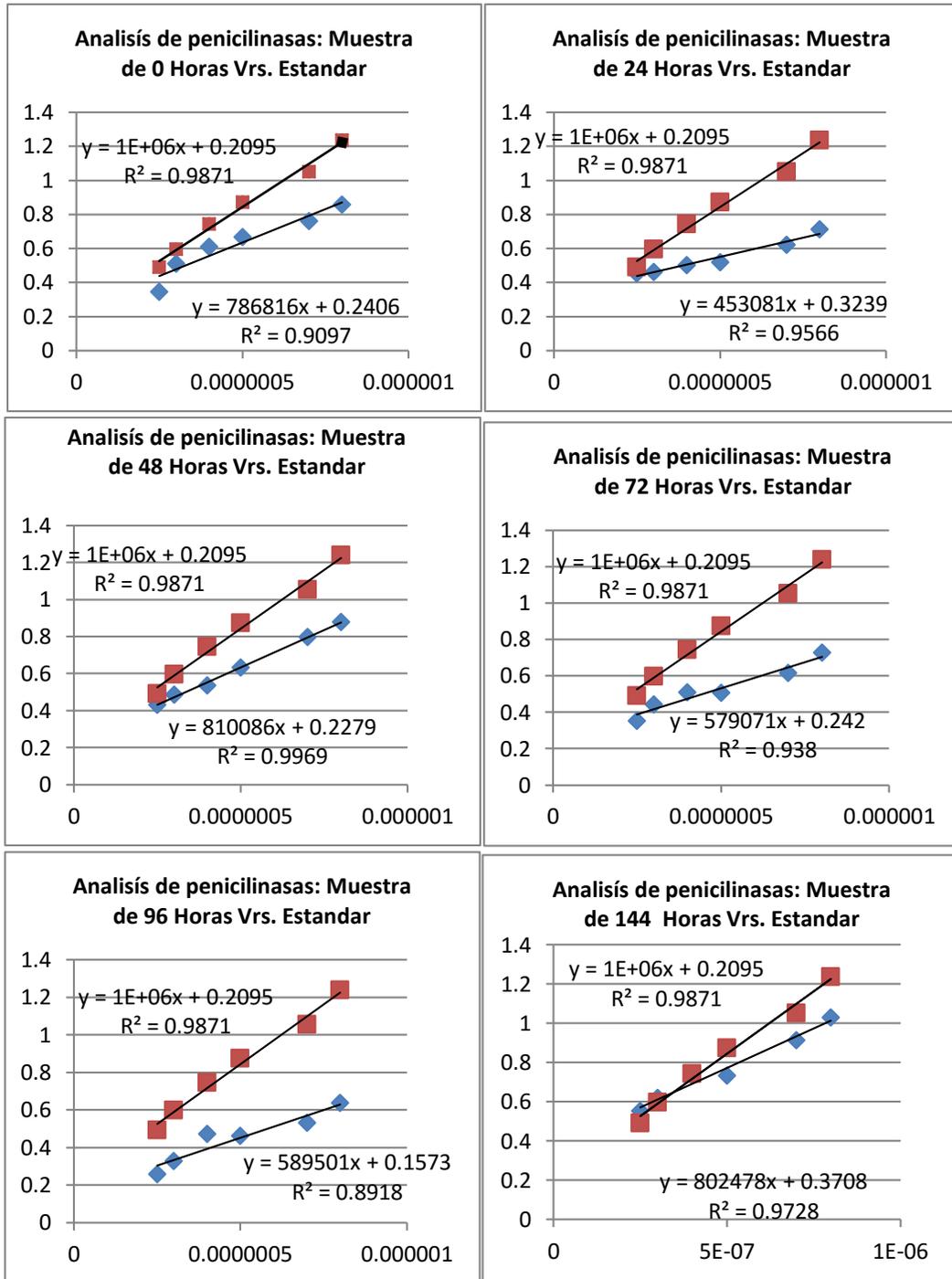
Pasó 3 conversiones:

Tomando como base que 1 U B-lac es la cantidad de enzima capaz de reducir 1 mol de Penicilina G Benzatínica tenemos:

Rm	1 U B-lac
	1 mol de Penicilina G Benzatínica

$$= \text{Actividad betalactamasa en U B-Lac/mL}$$

Al realizar los cálculos de actividad betalactamasa para cada una de las muestras en los diferentes tiempos de muestreo se construyó la Tabla N° 10 y la figura N°14 que muestra la variación de la actividad betalactamasa con respecto al tiempo.



Eje x: Absorbancia **Eje Y:** Concentración en mol/mL

Cuadro rojo: Curva de estándar



Rombo Azul: Curva de Muestra



Figura N° 12: Gráficos de degradación de Penicilina G Benzatínica por la acción de la enzima betalactamasa en el medio de producción.

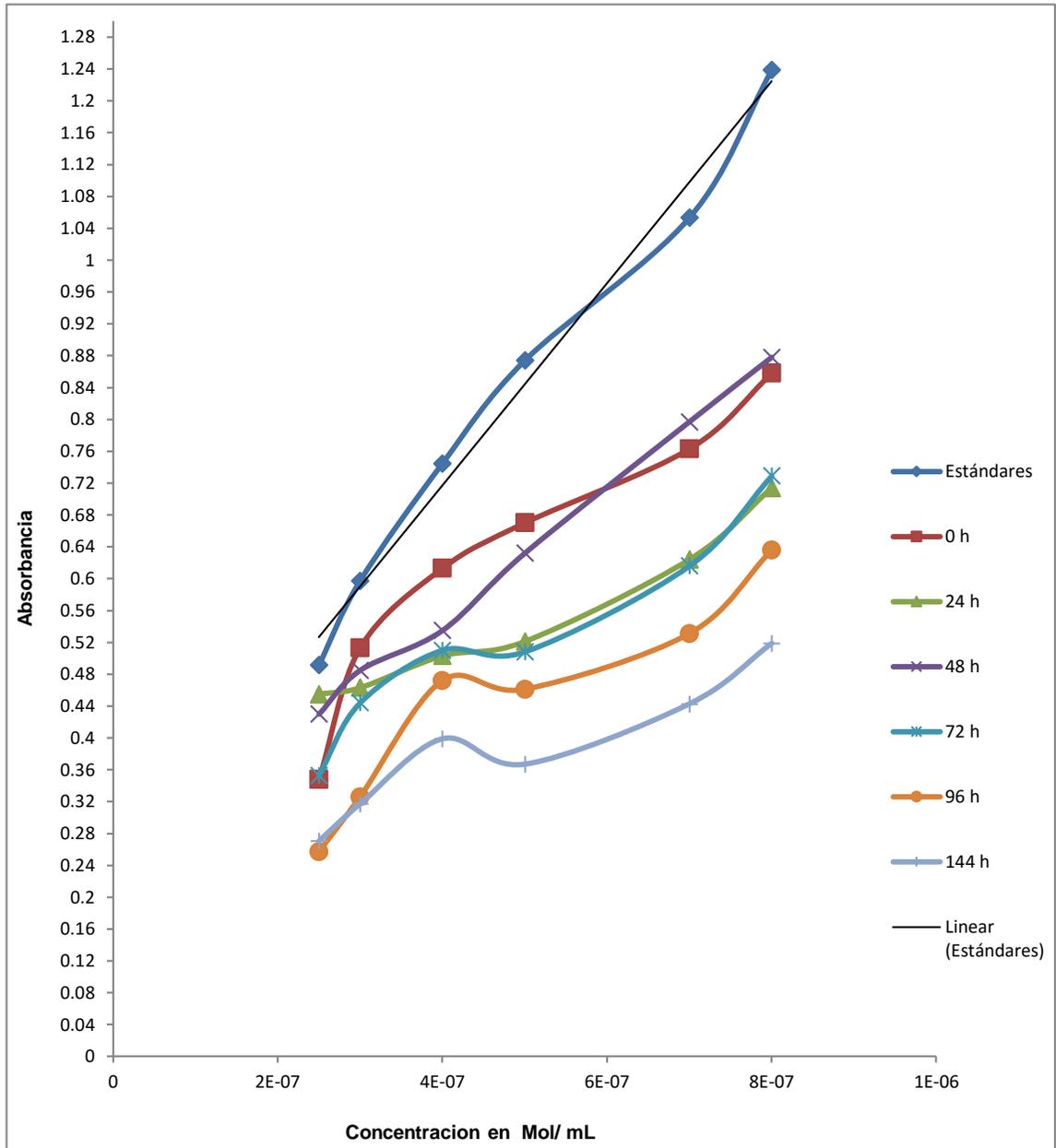


Figura N°13: Comparación del comportamiento enzimático a diferentes tiempos de muestras y estándar.

Tabla N°10: Valores obtenidos de actividad betalactamasa para cada muestra

Tiempo (h)	Pendiente del estándar (m_{st})	Pendiente de la muestra (m_{mx})	Factor de dilución	Actividad betalactamasa
0	1000000	786816	10	36.90784 U B-Lac /mL
24	1000000	453081	10	8.284243 U B-Lac /mL
48	1000000	810086	10	42.65541 U B-Lac /mL
72	1000000	579071	10	13.75698 U B-Lac /mL
96	1000000	589501	10	14.36060 U B-Lac /mL
144	1000000	802478	10	40.62727 U B-Lac /mL

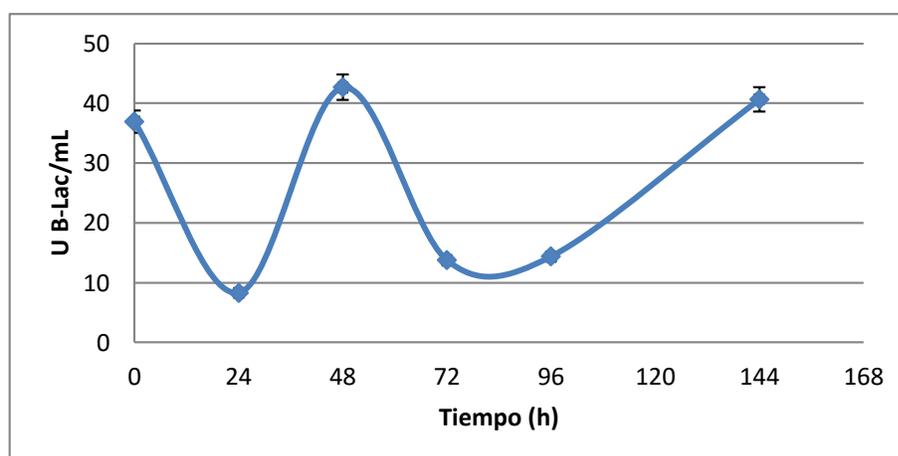


Figura N° 14: Actividad betalactamasa con respecto al tiempo

De acuerdo a los datos obtenidos, la mayor actividad betalactamasa se da a las 48 horas obteniéndose un valor de 42.65541 U B-Lac /mL, utilizando *B. cereus* como microorganismo productor. Mientras los datos reportados, para un medio de cultivo de composición química similar, pero utilizando *Bacillus licheniformis*, se obtuvo una actividad betalactamasa máxima de 55.00 U B-Lac/mL un valor ligeramente superior al obtenido en este trabajo. ⁽⁹⁾

Tomando en cuenta todos los valores de actividad betalactamasa obtenidos el valor promedio de este parámetro es de 26.09 U B-Lac/mL para todo el proceso, con todo esto podemos decir que el sistema desarrollado en esta investigación es adecuado para la producción de enzimas Betalactamasas (Penicilinasas) inducibles.

5.5 Cálculos de cinética de producción de la enzima betalactamasa.

Con los datos obtenidos de biomasa, azúcares totales y actividad betalactamasa mostrados en la Tabla N°14, se utilizaron las fórmulas del cuadro N° 8 para definir los parámetros de cinética microbiana que caracterizan al proceso (Tabla N° 11).

Tabla N° 11: Resumen de resultados de los diferentes parámetros medidos durante la producción de Betalactamasas, utilizando *Bacillus cereus* ATCC 13061.

Tiempo (h)	Biomasa (N° de Células)	Azúcares Totales (glucosa mg/mL)	pH	Actividad betalactamasa U B-Lac /mL
0	6.13E+08	4.72181	6.96	36.90784
24	1.86E+09	4.87987	5.41	8.284243
48	1.13E+09	3.59431	5.47	42.65541
72	1.31E+11	1.59220	5.70	13.75698
96	5.79E+10	1.14963	5.38	14.36060
144	9.16E+11	1.16016	5.18	40.62727

De acuerdo a lo expresado en la Tabla N°15 tenemos: que el experimento posee una velocidad específica de crecimiento microbiano $0.40 \text{ Cel Hora}^{-1}$, velocidad volumétrica de producción de biomasa $3.81 \text{E}^{+10} \text{ Cel Hora}^{-1}$ y número de generaciones 2.60E^{+20} . Lo cual indica un crecimiento lento como lo confirma la figura N°10. El punto de mayor eficiencia de producción de Betalactamasas en el proceso es de 48 horas, bajo las condiciones ensayadas, y se consigue con los siguientes parámetros: Velocidad específica de consumo de sustrato -2.07

E^{-11} g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$, velocidad volumétrica de consumo de sustrato -0.02 g de sustrato Hora^{-1} , velocidad específica de formación de producto $1.05 E^{-10}$ U de producto $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$, donde el signo negativo del número principal indica el descenso del parámetro estudiado y el positivo indica aumento.

Por lo tanto tenemos que el sistema de fermentación establecido para la producción de enzimas Betalactamasas, la velocidad específica de crecimiento microbiano es de 0.4089 h^{-1} ($24,534 \text{ min}^{-1}$) utilizando *Bacillus cereus*, mientras que otros estudios, expresan que utilizando *Bacillus licheniformis* como microorganismo productor se obtiene una velocidad específica de crecimiento microbiano de 3.333 h^{-1} (200 min^{-1}), por lo tanto: *Bacillus cereus* muestra un crecimiento más lento en la fase exponencial comparado con *Bacillus licheniformes* en un medio de composición química similar al utilizado en este estudio. ⁽⁹⁾

Tabla N° 12: Resultados de los cálculos de cinética Microbiana y de cinética de producción para la obtención de enzimas Betalactamasas utilizando como microorganismo productor *Bacillus cereus* ATCC 13061.

Cálculos para fase de crecimiento microbiano		
A. Velocidad específica de crecimiento microbiano		0.4089 Cel Hora^{-1}
B. Velocidad volumétrica de producción de biomasa (o de generación de células microbianas)		38.141 Cel Hora^{-1}
C. Número de generaciones (o número de duplicaciones)		2.60392 $E+20$
Cálculos de eficiencia del proceso		
D. Velocidad específica de consumo de sustrato	24	3.54077E-12 g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$
	48	-2.07872E-11 g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$
	72	-3.31808E-13 g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$
	96	-6.42663E-13 g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$
	144	-2.70018E-14 g de sustrato $\text{Hora}^{-1} \text{Cel}^{-1}$
E. Velocidad volumétrica de consumo de sustrato:	24	0.0065 g de sustrato Hora^{-1}
	48	-0.0234 g de sustrato Hora^{-1}
	72	-0.0434 g de sustrato Hora^{-1}
	96	-0.0372 g de sustrato Hora^{-1}
	144	-0.0247 g de sustrato Hora^{-1}

Tabla N° 12: (Continuación).

Cálculos para fase de crecimiento microbiano		
F. Velocidad específica de formación de producto	24	-6.412E-10 U de producto Hora ⁻¹ Cel ⁻¹
	48	1.059E-10 U de producto Hora ⁻¹ Cel ⁻¹
	72	-2.455E-12 U de producto Hora ⁻¹ Cel ⁻¹
	96	-4.056E-12 U de producto Hora ⁻¹ Cel ⁻¹
	144	2.8198E-14 U de producto Hora ⁻¹ Cel ⁻¹
G. Rendimiento de biomasa	24	7889409085 Cel ⁻¹ g de sustrato
	48	-458536585 Cel ⁻¹ g de sustrato
	72	-4.1660E+10 Cel ⁻¹ g de sustrato
	96	-1.6040E+10 Cel ⁻¹ g de sustrato
	144	-2.5700E+11 Cel ⁻¹ g de sustrato
H. Rendimiento de Producto	24	-181.093 U de producto g de sustrato
	48	-5.0976 U de producto g de sustrato
	72	7.3973 U de producto g de sustrato
	96	6.3118 U de producto g de sustrato
	144	-1.0443 U de producto g de sustrato

De acuerdo a lo observado en la figura N° 15 donde comparamos todos los parámetros medidos durante el desarrollo experimental de este trabajo, podemos decir que durante el proceso a medida disminuía la concentración de glucosa, aumentaba la biomasa y disminuía el pH.

Además es importante destacar que los parámetros físicos y químicos medidos a fin de caracterizar este sistema están estrechamente relacionados, por lo que se pueden mencionar los siguientes puntos importantes:

- Los parámetros de pH y concentración de glucosa se encuentran claramente relacionados, tomando en cuenta que a medida disminuía la concentración de glucosa disminuyó el valor del pH, debido probablemente a que se generaron ácidos orgánicos producidos cuando la glucosa es transformada dentro del microorganismo en medio aeróbico; por otra parte el pH del medio puede verse afectado por la cantidad de grupos ácidos de los aminoácidos que conforman las Betalactamasas, junto con la producción de ácido penicilóico de la

degradación de la Penicilina G Benzatínica, por acción de la enzima producida.

- El rango de pH en el que se desarrolla el sistema establecido en esta fermentación (desde 4.7 hasta 7.4) no afecta el adecuado desarrollo del microorganismo *Bacillus cereus* ya que su pH óptimo de crecimiento de va desde 4.5 hasta 9.3 por lo que el sistema no se ve afectado al dejar el pH libre.
- A pesar de la significativa disminución en la concentración de glucosa, entre las 24 h y 72 h, fue hasta las 120 h de iniciado el proceso que la densidad celular aumentó considerablemente. Durante el experimento se observó que la enzima se produjo en tiempos previos al crecimiento microbiano (entre las 24h y 72h), lo que sugiere que el crecimiento en media semilla, dio lugar a una biomasa en estado de producción y no a una biomasa fresca (lista para crecer) lista para producir enzimas.
- Comparando con otros estudios (Çelik 2003) tenemos que a una concentración de glucosa de 10.0 g/mL se obtiene una producción cuyo valor de actividad enzimática fue de 55 U B-Lac a un tiempo máximo de producción de 35 horas utilizando *Bacillus licheniformis* como microorganismo productor. Mientras que bajo las mismas condiciones iniciales de concentración de glucosa (10 g/L) pero utilizando *Bacillus cereus* como microorganismo productor se obtiene una producción cuya actividad enzimática de 42.65 U B-Lac mL a un tiempo máximo de producción de 48 h.

Con toda la información recolectada y de acuerdo los resultados obtenidos durante el desarrollo en esta investigación, se determinó que el proceso es apto y eficaz para la producción de enzimas Betalactamasas, utilizando como microorganismo productos *Bacillus cereus* ATCC 13061, Penicilina G Benzatínica como agente inductor en el medio propuesto y bajo las condiciones expuestas en este trabajo.

Con base en esto se elaboró un protocolo de producción de enzimas Betalactamasas PEB-001, En un medio de composición química similar en este estudio a fin de en el futuro poder reproducir este ensayo y su correspondiente metodología de análisis para enzimas Betalactamasas AEB-001.

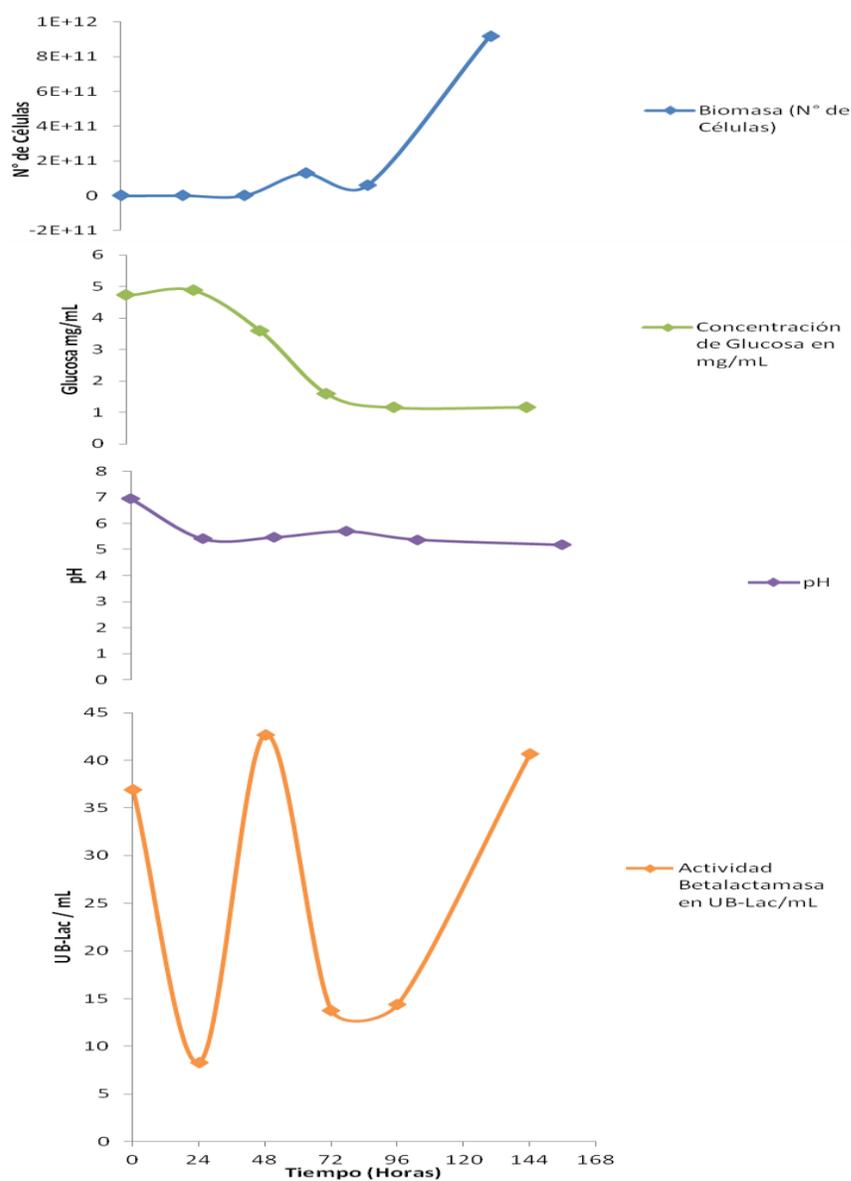


Figura N° 15: Parámetros cinéticos de la producción de Betalactamasas utilizando *Bacillus cereus* ATCC 13061.

5.6 Protocolo de producción de enzimas Betalactamasas PEB-001.

 <p>Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	<p>Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno</p>				
	<p>Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.</p>			<p>Página 82 de 10 Código: PEB-001</p>	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Clasificación:	Procedimiento General		
Autor(es):	Ana Cristina Guadalupe Sánchez		
Alcance:	Producción de Enzimas Betalactamasas inducibles,		
Fecha de Validez:	Sustituye a:	Observar también:	
Elaborado por:		Revisado por:	
Firma:		Firma:	
Nombre:	Ana Cristina G. Sánchez	Nombre:	Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya
Fecha:		Fecha:	
Firma:		Firma:	
		Revisado por:	
		Firma:	
		Nombre:	Dr. David Francisco Torres
		Fecha:	
		Firma:	

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 2 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

1. OBJETIVO

Definir los pasos a seguir en el proceso de producción, para la biosíntesis de enzimas (Penicilinas) utilizando como microorganismo productor. *Bacillus cereus* ATCC 13061 en un medio de cultivo líquido de composición definida.

2. DEFINICIONES

- 1 **Enzima:** Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posible
- 2 **Betalactamasa:** Las Betalactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias y es responsable por la resistencia que éstas exhiben ante la acción de antibióticos betalactámicos como las Penicilinas, las cefalosporinas. Esta enzima tiene la capacidad de inactivar el anillo betalactámico responsable de la actividad antibiótica de las moléculas antes mencionadas.
- 3 **Biosíntesis:** Proceso celular mediante el cual los organismos vivos elaboran sustancias químicas complejas a partir de otras más sencillas, con el consecuente gasto de energía metabólica.
- 4 **Proceso:** Conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que al interactuar juntas en los elementos de entrada y los convierten en resultados.

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 3 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

3. MATERIALES Y EQUIPO

Erlenmeyer de 125 mL
 Erlenmeyer de 1000 mL
 Tubos de ensayo
 Vasos de precipitado de 50 mL
 Vasos de precipitado de 250 mL
 Vasos de precipitado de 1000 mL
 Probeta de 100 mL
 Probeta de 500 mL
 Probeta de 1000 mL
 Pipeta de Mohr de 5 mL
 Micropipeta
 Puntas para Micropipeta
 Gradilla para tubos de ensayo
 Incubadora
 Agitador oscilatorio Shaker
 Termómetro

4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- **SSN** (Solución Salina Normal).
- **Medio de mantenimiento:** Tripticasa de soya agar (TSA)

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 4 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

- **Medio de pre cultivo (Medio semilla):** Caldo nutritivo
- **Medio de producción:**

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Glucosa	10.00
Extracto de Levadura	8.00
Na ₂ HPO ₄	1.18
Solución de sales	20.00 mL
Agua C.S.P.	1000 mL

Esterilizar a 121 °C y 115 L de presión durante 15 min. pH después de esterilizar debe ser aproximadamente 7.0 ± 0.2 a temperatura ambiente.

Composición de la solución de sales:

Componente	Concentración g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2500
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0010
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0010
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0075
Agua C.S.P.	1000 mL

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 5 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

La solución de sales debe esterilizarse por separado y añadirse al medio de producción antes de la inoculación del microorganismo, Esterilizar a 121 °C y 115 L

de presión durante 15 min. Se debe de adicionar 50 UI de Penicilina G / mL (50000 Penicilina G / L) en el medio de producción previo a la inoculación del microorganismo.

5. **MICROORGANISMO:** *Bacillus cereus* ATCC 13061.

6. DESARROLLO

Reconstitución y pre-cultivo del microorganismo:

1. Abrir cuidadosamente el criovial (Ver Anexo 2) que contiene al microorganismo *Bacillus cereus* ATCC 13061
2. Con una micropipeta agregar un volumen 500 µL (0.5 mL) de caldo nutritivo utilizando una punta estéril. homogenizar el contenido del criovial mezclando suavemente por inversión, evitando la formación de espuma
3. Colocar el medio inoculado en una incubadora durante 30 minutos a una temperatura de 30 °C ± 0.5 °C para la adaptación de el microorganismo al medio de cultivo.

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno			
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.			
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde: 06- 2015

4. Transferir al medio indicado TSA (Trypticasa soja agar), contenido en tres tubos de ensayo con el medio inclinado, sembrando el microorganismo por método de estrías, utilizando un asa redonda y incubar a una temperatura de a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h
5. Luego de ser incubado bajo las condiciones antes mencionadas, el microorganismo *B. cereus* presenta colonias típicas, cremadas, filamentosas
 1. de aproximadamente 5 mm de diámetro a las 24 horas de incubación (Ver Anexo 2).

Preparación del inóculo:

1. Preparar una suspensión del microorganismo, a partir de los tres tubos con medio enriquecimiento Medio TSA (Trypticasa soja agar) inclinado, obtenidos en el proceso anterior.
2. Suspender las colonias obtenidas utilizando 15 mL solución salina normal (SSN) con ayuda de perlas de ebullición estériles, luego verter el contenido de los tres tubos en un erlenmeyer de 25 mL estéril.
3. Ajustar la turbidez del inóculo con solución salina normal al 1.0 ± 0.5 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, realizando diluciones con SSN.

 <p>Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 7 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

- Después de ajustado el inculo sembrar en el medio de pre-producción (Caldo nutritivo).

Siembra del microorganismo en el medio de preproducción.

- Tomar una alícuota de 5.0 mL (El cual representa el 10 % del vol. final del medio de pre-producción) de la solución estandarizada del microorganismo. Para cada uno de 2 erlenmeyer, que previamente contenían 45 mL de caldo nutritivo cada uno
- Incubar a temperatura ambiente en condiciones aeróbicas, durante 48 h a una agitación de 200 rpm utilizando un agitador oscilatorio (Shaker).

Siembra de microorganismo productor en medio de producción

- Al finalizar el tiempo de incubación del microorganismo en el medio de pre-producción, se combina el contenido de los dos erlenmeyer (50 mL cada uno) y se transfiere a un erlenmeyer con 0.9 L del medio de producción para obtener un vol finar de 1.0 L de medio de cultivo.
- Agregar al medio de producción una cantidad en mL equivalente a 50000 UI de Penicilina G Benzatínica para obtener una concentración final en el fermentador de 50 UI/mL de Penicilina G Benzatínica, esto con el objeto de inducir la producción de Penicilinasas.

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 8 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

3. Incubar el biorreactor a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 144 horas y se tomaran muestras de acuerdo a lo especificado en el Anexo 1 de toma de muestra para análisis,
4. De una de las muestras (para cada tiempo) tomar 5.0 mL para realizar cuantificación biomasa por cámara de Neubauer. Almacenar el resto de la muestra a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente realizar los análisis fisicoquímicos correspondientes (Ver procedimiento de análisis de Enzimas Betalactamasas AEB 001):
 - pH.
 - Determinación de Azúcares totales.
 - Determinación de Biomasa.
 - Actividad enzimática (Por método espectrofotométrico).

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.			Página 9 de 10 Código: PEB-001	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

ANEXOS

Anexo 1

Toma de Alícuota para Análisis

Tabla N° 1: Cantidad a recolectar de blanco.

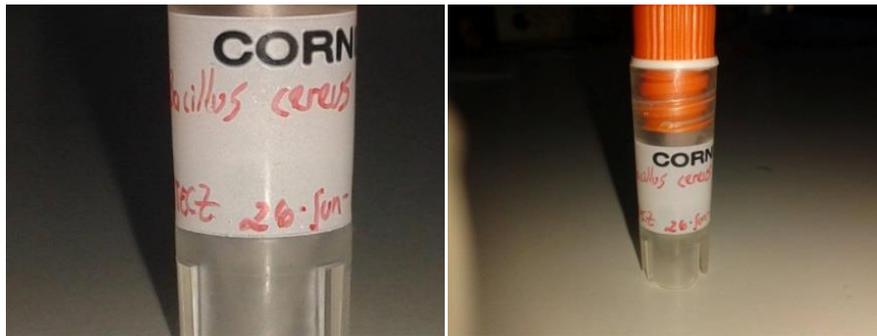
Recolección de Blancos (Al inicio del Proceso)	Código de la muestra	*Alícuotas y volumen (mL) de muestra tomar
Blanco (Medio antes de la inoculación de microorganismo y sin Penicilina)	MB	50
Blanco (Medio antes de la inoculación de microorganismo y con Penicilina)	MBP	50

Tabla N° 2: Cantidad de muestra de análisis a tomar para cada uno de los tiempos donde se realizara la toma de muestra.

Tiempo al cual se recolectara la muestra (h)	Código de la muestra	*Alícuotas y volumen (mL) de muestra tomar
0	M1-1	10
0	M1-2	10
24	M2-1	10
24	M2-2	10
48	M3-1	10
48	M3-2	10
72	M4-1	10
72	M4-2	10
96	M5-1	10
96	M5-2	10
144	M6-1	10
144	M6-2	10

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Protocolo de Producción de Enzimas Betalactamasas.				Página 10 de 10 Código: PEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Anexo 2

Criovial conteniendo *B. cereus*

Morfología macroscópica del Microorganismo en tubos con medio TSA inclinado.



5.7 Metodología de análisis para enzimas Betalactamasas AEB-001.

 <p>Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	<p>Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno</p>				
	<p>Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.</p>			<p>Página 1 de 13 Código: AEB-001</p>	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Clasificación:	Procedimiento General		
Autor(es):	Ana Cristina Guadalupe Sánchez		
Alcance:	Análisis físico químico de Enzimas Betalactamasas inducibles,		
Fecha de Validez:	Sustituye a:		Observar también:
Elaborado por:		Revisado por:	
Firma:		Firma:	
Nombre:	Licda. Ana Cristina G. Sánchez	Nombre:	Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya
Fecha:		Fecha:	
Firma:		Firma:	
		Revisado por:	
		Firma:	
		Nombre:	Dr. David Francisco Torres
		Fecha:	
		Firma:	

 <p>Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	<p>Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno</p>				
	<p>Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.</p>				<p>Página 2 de 13 Código: AEB-001</p>
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

1. OBJETIVO

Definir los pasos a seguir para el análisis físico químico (pH, Biomasa, Azúcares totales y Actividad Betalactamasas) obtenidas en un medio de cultivo líquido de composición definida desarrollado de acuerdo al protocolo PEB-001.

2. MATERIALES Y EQUIPO

Erlenmeyer de 20 mL

Tubos de ensayo

Vasos de precipitado de 50 mL

Vasos de precipitado de 250 mL

Probeta de 10 mL

Probeta de 25 mL

Probeta de 100 mL

Pipeta Volumétrica de 1 mL

Pipeta Volumétrica de 2 mL

Pipeta Volumétrica de 4mL

Pipeta Volumétrica de 5 mL

Pipeta Volumétrica de 6m

Pipeta Volumétrica de 10 mL

Pipeta Volumétrica de 20 mL

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.			Página 3 de 13 Código: AEB-001	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Balón volumétrico de 100 mL

Balón volumétrico de 200 mL

Pipeta Mhor de 5 mL

Jeringas de 3 mL

Jeringas de 5 mL

Baño de María

Micropipeta

Puntas para Micropipeta

Gradilla para tubos de ensayo

Espectrofotómetro UV/ Visible

Potenciómetro

Cámara de Neubauer

Cubre objetos

Microscopio

Hot Plate

3. REACTIVOS

- Fosfato dibásico de potasio
- Fosfato monobásico de potasio
- Agua Libre de CO₂
- Ácido Fosfórico concentrado

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.			Página 4 de 13 Código: AEB-001	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

- Hidróxido de Sodio 0.1N.
- Acido 3,5-Dinitrosalicílico
- Hidróxido de sodio (Perlas)
- Sulfito de Sodio Anhidro
- Aceite de inmersión
- Glucosa
- Penicilina G Benzatínica

4. Desarrollo

4.1 Determinación de pH

1. Calibrar el potenciómetro de acuerdo a las especificaciones del equipo a utilizar
2. Colocar 5.0 mL de muestra en un Erlenmeyer de 20 mL y agregar 5.0 mL de agua libre de CO₂ (Solución al 50% v/v)
3. Medir el pH con la ayuda de un potenciómetro previamente calibrado, Realizar dos veces por cada muestra y reportar el pH promedio.

4.2 Determinación de azúcares totales por método de DNS modificado

1 Curva de calibración de glucosa

 <p>Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	<p>Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno</p>				
	<p>Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.</p>			<p>Página 5 de 13 Código: AEB-001</p>	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

- Preparación de solución de glucosa de 1 g/L:

Pesar 100 mg de glucosa y transferirlos a un balón volumétrico de 100 mL.

Disolver y llevar a volumen con agua destilada.

Utilizando la solución de glucosa realizar una curva de calibración de glucosa de acuerdo a lo especificado en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1: Soluciones estándar de glucosa para elaborar curva de calibración del método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) para determinación de azúcares totales.

Tubo	Volumen (mL) de solución estándar de glucosa (1g/L)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

1. Posteriormente se colocar 1 mL de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla, en un tubo de ensayo limpio y seco

 <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR CENTRO AMÉRICA HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i></p>	<p>Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno</p>				
	<p>Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.</p>				<p>Página 6 de 13 Código: AEB-001</p>
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

2. A cada uno de los tubos se les adicionar 1.0 mL de Reactivo de DNS y se agitan con ayuda de un agitador Vortex por 1 minuto
3. Llevar a ebullición las soluciones contenidas en los tubos en un baño maría durante 5 minutos,
4. Luego enfriar inmediatamente en baño de hielo y agregar 8.0 mL de agua destilada a cada tubo.
5. Agitaren cada tubo con ayuda de un agitador Vortex por 1 minuto y se leer inmediatamente las Absorbancias de cada una de las soluciones a una longitud de onda de 575 nm usando agua como blanco.

2 Tratamiento de las muestras:

1. Colocar 1.0 mL de muestra en un tubo de ensayo limpio y seco
2. Adicionar 1.0 mL de reactivo DNS y agitar con ayuda de un agitador Vortex por 1 minuto.
3. Llevar a ebullición las muestras contenidas en los tubos se en un baño maría durante 5 minutos.
4. Observar el vire de color de amarillo a rojo.
5. Enfriar las muestras contenidas en los tubos inmediatamente en baño de hielo y se agrega 8.0 mL de agua destilada a cada tubo.

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.			Página 7 de 13 Código: AEB-001	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

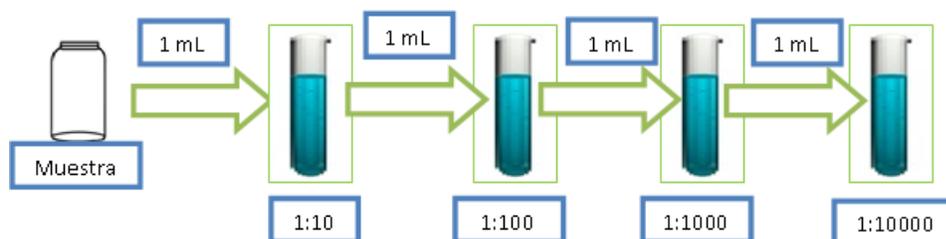
6. Agitar cada una de las muestras con ayuda de un agitador Vortex por 1 minuto.
7. Leer inmediatamente Absorbancias de cada una de las soluciones a una longitud de onda de 575 nm utilizando agua como blanco.

4.2.3 preparación de reactivo de DNS:

1. Pesar: Acido 3,5-Dinitrosalicílico 10.00 g, Hidróxido de sodio (Perlas) 10.00 g, Sulfito de Sodio Anhidro 0.50 g, transferirlos a un balón volumétrico de 1000 mL.
2. Disolver y llevar a volumen con agua.
3. Realizar los cálculos adecuados para verificar el consumo de nutrientes con respecto al tiempo.

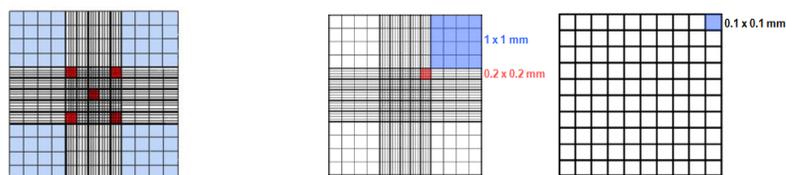
4.3 Determinación de Biomasa por cámara de Neubauer:

1. Preparar diluciones seriadas 1 en 10 de la muestra obtenidas durante el desarrollo del proceso de acuerdo al siguiente diagrama:



 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.			Página 8 de 13 Código: AEB-001	
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

2. Elegir la dilución más apta para realizar el recuento (10^6 ó 10^7 UFC/mL) y tomar 10 μ L de la mezcla con una micropipeta.
3. Luego se colocar un cubre objetos sobre la cámara de Neubauer, la cual se coloca en posición horizontal sobre la mesa, luego con la punta de la
4. micro pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer se deja que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
5. Después de esto colocar la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio, y enfocar el microscopio hasta que pueden observar adecuadamente las células y se realiza el recuento de células en el primer cuadro.
6. Se anota en una hoja de resultados la cantidad de células contadas en el primer cuadro y se repite el proceso para los 4 cuadros restantes, anotando el resultado de cada uno de ellos. contando en el campo central cinco cuadros (Superior derecho, superior izquierdo, medio, inferior
7. derecho, inferior izquierdo) evitando contar aquellas células que se salen de los límites de dichos cuadros de acuerdo a la siguiente figura.



 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.				Página 9 de 13 Código: AEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Fórmula para determinar el número de células:

$$\text{Concentración (cel / mL)} = \frac{\text{Número de células} \times 250000}{\text{Número de cuadros (5 cuadros)}} \times \text{Dilución}$$

Realizar los cálculos adecuados para verificar el crecimiento celular con respecto al tiempo.

4.4 Determinación de la actividad Betalactamasa.

4.4.1 Metodología para la elaboración de curva de calibración de glucosa

1. Reconstituir el vial que contiene 1, 200,000 unidades internacionales de Penicilina G Benzatínica (Unicil® 1, 200,000 UI/3 mL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Elaborar las soluciones stock de Penicilina G Benzatínica de acuerdo a la Tabla N°2, utilizando buffer fosfato pH 7 como diluyente.
3. Medir la absorbancia de cada una de las soluciones a 232 nm usando como blanco buffer fosfato pH 7.

4.4.2 Metodología para análisis de muestras (Ver Anexo 2).

1. Colocar en 6 tubos de ensayo 9.0 mL de c/u de las soluciones sustrato (soluciones stock elaboradas para la curva de calibración).

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.				Página 10 de 13 Código: AEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

2. Luego añadir 1.0 mL de muestra a cada tubo (esto para cada tiempo de muestreo).
3. Agitar la muestra con ayuda de un agitador Vortex durante 1 minuto, inmediatamente después del minuto se procede a leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 232 nm usando como blanco una solución 1 en 10 de medio de cultivo sin Penicilina y buffer fosfato pH 7.

Realizar los cálculos adecuados para verificar la actividad Betalactamasa con respecto al tiempo.

Tabla N° 2. Soluciones stock para curva de calibración de Penicilina G Benzatínica.

Concentración	Alícuota mL	Vol. Final mL	UI/mL	Mol/mL	mMol/mL	Mg**/ML
Código de la Sln.						
Vial*	NA	NA	400,000	0.0003396	0.3396	333.3333
Sln. Madre	2.5	200.0	5000	0.0000042	0.0042	4.1667
1.	20.0	100.0	1000	0.0000008	0.0008	0.8333
2.	16.0	100.0	800	0.0000007	0.0006	0.6666
3.	12.0	100.0	600	0.0000005	0.0005	0.5000
4.	10.0	100.0	500	0.0000004	0.0004	0.4166
5.	8.0	100.0	400	0.0000003	0.0003	0.3333
6.	6.0	100.0	300	0.0000002	0.00025	0.2500

*Cada vial de Penicilina G Benzatínica Unicil® Rotula 1,200,000 UI/ 3 mL

** Ver anexo 1.

4.4.3 Calculo de la actividad betalactamasa

Pasó 1 Elaborar gráficos de absorbancia versus concentración en mMol/mL.

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno				
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.				Página 11 de 13 Código: AEB-001
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1	Vigente desde:	06- 2015

Pasó 2 Con la pendiente obtenida de la ecuación punto pendiente de cada una de las gráficas realizar la diferencia de pendientes (m) entre la pendiente de la muestra y la pendiente de la curva de calibración:

$$Dm = m_{st} - m_{mx}$$

m está dada en concentración de Penicilina G Mol/mL

Pasó 3 Realizar un cálculo de razón de pendientes:

$$Rm = (m_{mx} / Dm) \times \text{Factor de dilución}$$

$$= \text{Actividad Betalactamasa en mol/mL}$$

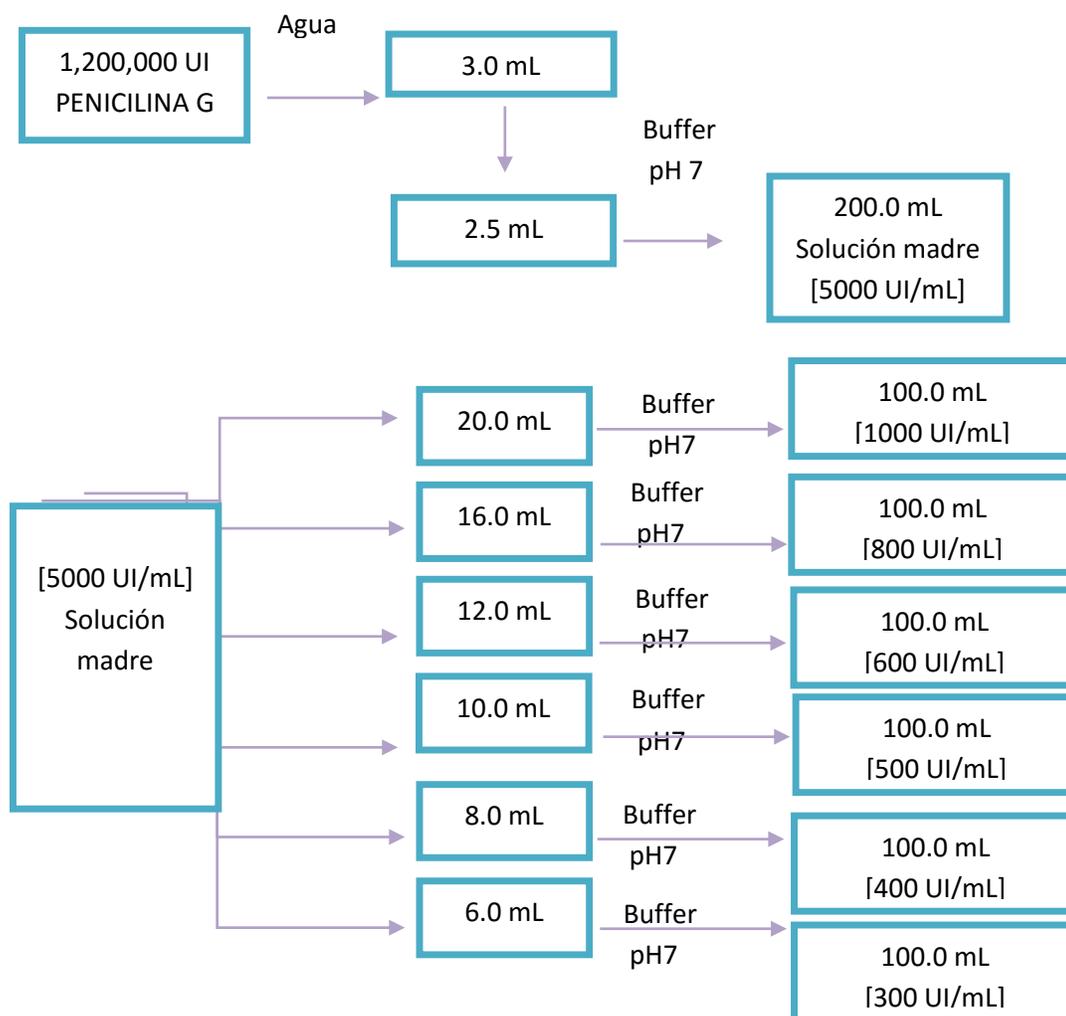
Pasó 3 Realizar conversiones:

Rm	1 U B-lac
	1 mol de Penicilina G Benzatínica
	= Actividad Betalactamasa en U B-Lac/mL

 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno		
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.		
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1 Vigente desde: 06- 2015

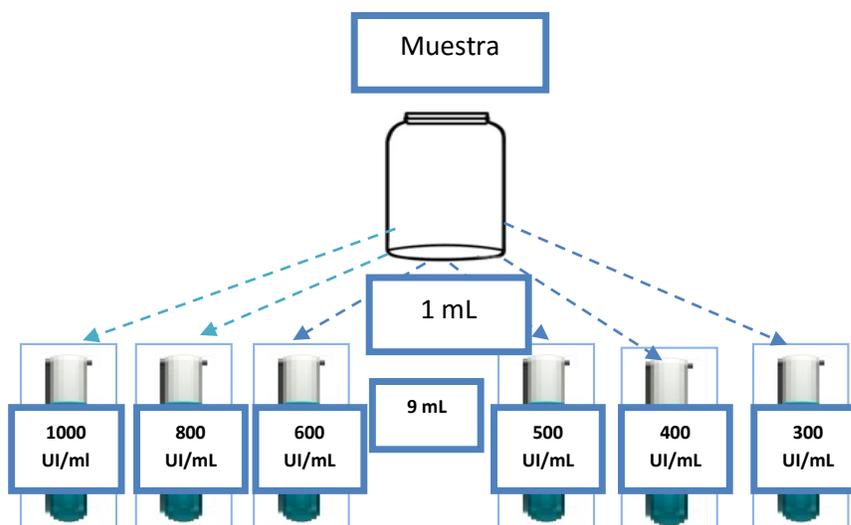
Anexo 1

Curva de calibración de Penicilina G Benzatínica:



 Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i>	Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental Procedimiento Interno		
	Técnica de análisis de Enzimas Betalactamasas.		
Elaborado	Ana Sánchez	Edición	1 Vigente desde: 06- 2015

Anexo 2
Esquema de preparación de muestras para análisis y determinación de actividad betalactamasa.



En c/u de los tubos de ensayo se encuentra una de las soluciones sustrato (soluciones stock elaboradas para la curva de calibración) con su concentración expresada en UI/mL.

Agitar con ayuda de un agitador Vortex por 1 min.

Leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 232 nm usando como blanco una solución 1 en 10 de medio de cultivo sin Penicilina y buffer fosfato pH 7.



CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

1. Utilizando *Bacillus cereus* ATCC 13061 como microorganismo productor y penicilina G Benzatínica como inductor, es posible producir Betalactamasas, en un medio que contiene: glucosa, extracto de levadura, fosfato de sodio dibásico y sales minerales, a 30 °C durante 144 horas.
2. El cultivo establecido para la producción de Betalactamasas, mostró que la disminución significativa del pH, como resultado de las sustancias excretadas provenientes del metabolismo del microorganismo productor además de las reacciones químicas in-situ, por lo tanto: *Bacillus cereus* es capaz de consumir la glucosa en el medio de producción y utilizarla como fuente de carbono para su desarrollo y para la producción de enzimas Betalactamasas.
3. La disminución de pH en el proceso de producción de las Betalactamasas, no afecta el adecuado desarrollo del microorganismo *Bacillus cereus*.
4. Es posible medir espectrofotométricamente la actividad enzimática de las enzimas Betalactamasas producidas, bajo los siguientes parámetros: 30° C, tiempo de reacción 1 minuto, diluyente buffer fosfato pH 7.0, longitud de onda 232 nm.
5. La mejor actividad betalactamasa de este ensayo se observó en la muestra de 48 horas, con un valor de 42.65 UB-Lac/mL. Esto se consigue con un valor de velocidad específica de consumo de sustrato de $-2.07 \text{ E-11 g de sustrato Hora-1 Cel-1}$, con una velocidad volumétrica de consumo de sustrato $-0.02 \text{ g de sustrato Hora-1}$ y una velocidad

específica de formación de producto $1.05 \text{ E} \cdot 10^{-10} \text{ U de producto} \cdot \text{Hora}^{-1} \cdot \text{Cel}^{-1}$.

6. Bajo las condiciones ensayadas las enzimas Penicilinasas producidas por *Bacillus cereus* ATCC 10061, son activas y capaces de llevar a cabo la reacción de degradación enzimática del anillo betalactámico al unirse en con el sustrato antibiótico (Penicilina G Benzatínica).

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES.

1. En futuras investigaciones al realizar los controles en proceso para el sistema de producción de enzimas Betalactamasas se recomienda descongelar las muestras pasando del congelador al frigorífico, para no dañar las enzimas presentes en las muestras de análisis por shock térmico,
2. En futuros trabajos de graduación realizar un estudio de estabilidad térmica a fin de definir las mejores condiciones de almacenamiento para las Betalactamasas producidas.
3. Que se realice en futuras investigaciones, paralelamente al método de cuantificación de biomasa por cámara de Neubauer, otro método de cuantificación como el recuento por placa vertida o la determinación de biomasa por peso seco, a fin de comprobar si el método aplicado en este trabajo es apto para medir la biomasa.
4. En investigaciones dirigidas a optimizar el método de producción de Betalactamasas propuesto en este trabajo, extender el tiempo final de la fermentación hasta un tiempo máximo de 216 horas (9 días), para poder observar el comportamiento final del sistema y saber en qué punto del estudio, el microorganismo deja de producir betalactamasa al agotarse la Penicilina en el medio de cultivo.
5. Realizar experimentos con diferentes concentraciones de glucosa ó de Penicilina, a fin de mejorar el medio de cultivo y aumentar la producción de la enzima y optimizar así el método propuesto en este trabajo.
6. En experimentos futuros escalar el sistema de fermentación a un volumen de al menos 10 litros para cada lote piloto, siendo este un volumen representativo para poder definir completamente el comportamiento del sistema y posteriormente llevarlo a escala semi-industrial.

7. Desarrollar una técnica adecuada para la extracción y purificación de las enzimas Betalactamasas producidas en medio líquido, para complementar el trabajo realizado en esta investigación.
8. Realizar un estudio de la variación de la actividad betalactamasa en muestras frescas y en muestras congeladas.
9. Llevar acabo un estudio de estabilidad acelerada de acuerdo al RTCA 11.01.04:09 utilizando diferentes tipos de envase primario para las enzimas Betalactamasas, a fin de elegir el tipo de envase adecuado para prevenir su degradación por almacenamiento inadecuado y establecer el tiempo de vida útil de la enzima.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abolade, S.; Thottappilly, G.; Comparative studies on alkaline phosphatase (ALP), alkaline phosphatase amplification (AMP) horseradish peroxidase (HRP), penicillinase (PNC) and avidin – biotin penicillinase amplification ELISA in detection of maize streak virus (MSV) in maize plants and *Cicadulinambila* (leafhoppers) insect vector. Acad Jour 2007, ISSN 1992-2248.
2. Abraham, E.; Chain, E.; An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin, Nat.1940; 146.
3. Ambler, RP.; The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond Biol.* 1980; 289:321-31.
4. Bastidas, O.; Nota técnica: Conteo celular con Hematocitómetro y uso elemental del Hematocitómetro, (Neubauer Chamber Cell Counting), Disponible en: <http://www.celeromics.com>
5. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A.; A functional classification scheme for Betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents, *Chemother.*1995; 39: 1211-33.
6. Cabello Velasco. Manual De Laboratorio De Microbiología Industrial 1^{ra}. Edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, 1989.
7. Çelik, E.; Çalık, P.; Bioprocess Parameters and Oxygen Transfer Characteristics in Betalactamase Production by Bacillus Species, Middle East Technical University, Ankara, 2004. 06531.
8. Çelik, Eda.; Bioprocess design parameters for Betalactamase production by bacillus species, Middle East Technical University, Ankara; 2003.
9. Cultimed, Manual básico de microbiología, I.CT. S.L. Instrumental científico técnico, 2004.
10. Farmacopea de Los Estados Unidos de América, décimo tercera edición y formulario nacional 25 Estados Unidos de América, 2007, Tomo 1-3.

11. García, R.; Cantón, R.; García, M.L.; Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Procedimientos de Microbiología clínica, recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica, 2001.
12. Graham, F.M.; Premier, R.R.; Garcia, E.G.; Hurrell, J.G.; Chandler, H.M.; Cruise, K.M.; Tapales, F.P.; Antibody-Based Competitive Elisa In *Schistosoma Japonicum Infection* Laboratory of Immunoparasitology, *Amer soc trop med Hyg.*1983
13. Huet, A.; Fodey, T.; Haughey, S.; Weigel, S.; Elliott, C.; Delahaut, P.; Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in food. *Tren Anal Chem.* 2010: 29, 11.
14. Karam, A.; Rasaei, M.T.; Development of a simple and sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), for clinical measurement of testosterone using penicillinase as label. *Med Journ Islamic Republic of Iran.* 1985; 8.
15. Khatkhatay, M.I.; Desai, M.P.; Sankolli, G.M.; Pardhe, D.K.; Joshi, U.M.; Stability Studies of the Components of a Prototype Penicillinase (Betalactamase) Linked Elisa Kit, *Jour Clin Lab Anal.*1993; 7:95-99.
16. M. R. Pollock, The Cell - bound Penicillinase of *Bacillus cereus* National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, N.W. 7, 1956.
17. Microbiology Manual, MERCK décimo segunda edición.
18. Nelson, L.; Cox, M.; Lehninger Principios de Bioquímica, Capítulo 8. Enzimas, Barcelona. Editorial Omega, 2005, 4° Edición.
19. Prieto J, Curiosidades en la historia de los antimicrobianos, se identifica la sombra de los antibióticos, Sociedad española de quimioterapia. Disponible en: <http://www.seq.es/curiosidades-en-la-historia-de-los-antimicrobianos/510-se-identifica-la-sombra-de-los-antibioticos>

20. Sawai, T.; Takahashi, I.; Yamagishi, S.; Iodometric Assay, Method for Beta-Lactamase with Various Beta-Lactam Antibiotics as Substrates, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, 1977.
21. Thirumala-Devi, K.D.V.R.; Reddy. Application of ELISA for cost-effective analysis of aflatoxins in foods and feeds, Department of Plant Pathology, Ohio Agricultural Research and Development Center (OARDC), 1680 USA. 2004.
22. β -Lactamase 426205, *Bacillus cereus* 569/H9, Calbiochen, Merck Millipore, customer.service@merckgroup.com, consultado 18 julio 2013.
23. β -Lactamase and Penicillinase for inactivation of all classes of β -Lactam antibiotics; cephalosporins up to 5th generation, carbapenems and penicillins. Critical Raw Materials. Disponible en: <http://www.sekisuidiagnostics.com>

Glosario.

- **Enzima:** Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles. ⁽⁸⁾
- **Betalactamasa:** Las Betalactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias y son responsables de la resistencia que éstas exhiben ante la acción de antibióticos betalactámicos como las Penicilinas, las cefalosporinas. Esta enzima tiene la capacidad de inactivar el anillo betalactámico responsable de la actividad antibiótica de las moléculas antes mencionadas. ⁽⁸⁾
- **Biosíntesis:** Proceso celular mediante el cual los organismos vivos elaboran sustancias químicas complejas a partir de otras más sencillas, con el consecuente gasto de energía metabólica. ⁽⁸⁾
- **Proceso:** Conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que al interactuar juntas en los elementos de entrada y los convierten en resultados. ⁽⁷⁾
- **Biorreactor:** Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. ⁽²⁾
- **Cultivo en lote:** Es el crecimiento de microorganismos en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento. Se realiza sin intercambio de materia con los alrededores. ^{(2) (8)}
- **Fase de crecimiento exponencial:** Es un período caracterizado por la duplicación celular. El número de nuevas células bacterianas que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población inicial. Si el

crecimiento no se limita, la duplicación continuará a un ritmo constante, por lo tanto el número de células de la población se duplica con cada período de tiempo. ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾

- **Fase de crecimiento Lag:** Es el período durante el cual las células bacterianas se adaptan a las condiciones de crecimiento. Es el período en el que las células individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante la fase de adaptación (Lag) del ciclo de crecimiento, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas. ⁽⁸⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1.
Medios de cultivo y reactivos

Medio de mantenimiento:

Tabla N° 13: Tripticasa de soya agar (TSA)

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Peptona de carne	5.00
Agar	15.00
Peptona de caseína	15.00
Cloruro de sodio	5.00
Agua C.S.P.	1000 ml

Esterilizar por autoclave este medio antes de usar (15 min a 121 ° C). pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C. Después de la preparación de este medio es claro y de color marrón amarillento.

- Medio de pre cultivo (Medio semilla):

Tabla N° 14: Caldo nutritivo

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Peptona de carne	5.00
Extracto de carne	3,00
Agua C.S.P.	1000 mL

Esterilizar por autoclave este medio antes de usar (15 min a 121 ° C). pH final: $7,1 \pm 0,2$, a 25 °C. Después de la preparación de este medio es claro y de color marrón ligeramente amarillento.

- Medio de producción:

Tabla N° 15: Medio de producción

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Glucosa	10.00
Extracto de Levadura	8.00
Na ₂ HPO ₄	1.18
Solución de sales	20.00 mL
Agua C.S.P.	1000 mL

Esterilizar por autoclave a 121 °C y 115 L de presión durante 15 min. pH después de esterilizar debe ser aproximadamente 7.0 ± 0.2 a temperatura ambiente.

Composición de la solución de sales:

Tabla N° 16: Solución de sales

Componente	Concentración g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2500
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0010
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0010
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0075
Agua C.S.P.	1000 mL

La solución de sales debe esterilizarse por separado y añadirse al medio de producción antes de la inoculación del microorganismo, Esterilizar a 121 °C y 115 L de presión durante 15 min. Se debe de adicionar 50 UI de Penicilina G / mL (50000 Penicilina G / L) en el medio de producción previo a la inoculación del microorganismo.

- Solución Amortiguadora de fosfato pH 7:

Tabla N° 17: Solución Amortiguadora de fosfato
pH 7

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Fosfato dibásico de potasio	13.60 g
Fosfato monobásico de potasio	4.00 g
Agua Libre de CO ₂ C.S.P.	1000 mL

Ajustar a pH: 7.00 ± 0.10 utilizando ácido fosfórico concentrado o hidróxido de Sodio 0.1N.

Solución Salina Normal 0.9% (SSN):

Tabla N° 18: Solución Salina Normal 0.9%

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Cloruro de Sodio	9.00
Agua C.S.P.	1000 mL

Esterilizar a 121 °C y 115 L de presión durante 15 min

- Reactivo de DNS:

Tabla N° 19: Reactivo de DNS

Constituyentes	Cantidad (g/L)
Acido 3,5-Dinitrosalicilico	10.00
Hidróxido de sodio (Perlas)	10.00
Sulfito de Sodio Anhidro	0.50
Agua C.S.P.	1000 mL

ANEXO N° 2

Tablas de resultados de la cuantificación espectrofotométrica de la actividad betalactamasa

Tabla N° 20: Resultados de la cuantificación espectrofotométrica de la actividad betalactamasa para cada una de las muestras.

Fermentación 1															
Concentración		A B S	Tiempo (h)												
UI/mL	Mol/mL		0		24		48		72		96		144		Desviación Estándar
1000	0.00000080		1.014	0.715	0.880	0.680	0.512	-	0.1488448						
800	0.00000070		0.884	0.620	0.800	0.575	0.477	-	0.1114628						
600	0.00000050		0.806	0.501	0.572	0.500	0.375	-	0.1015428						
500	0.00000040		0.800	0.458	0.470	0.484	0.364	-	0.1102608						
400	0.00000030		0.675	0.426	0.422	0.395	0.245	-	0.0955212						
300	0.00000025		0.425	0.316	0.378	0.234	0.158	-	0.0464608						
Fermentación 2															
Concentración		A B S	Tiempo (h)												
UI/mL	Mol/mL		0		24		48		72		96		144		Desviación Estándar
1000	0.0000008		0.902	0.728	0.706	0.707	0.899	0.853	0.700	0.736	0.520	0.8	1.259	0.805	0.3488663
800	0.0000007		0.886	0.504	0.605	0.666	0.800	0.777	0.580	0.603	0.480	0.69	1.040	0.853	0.3098520
600	0.0000005		0.844	0.356	0.498	0.480	0.600	0.656	0.505	0.551	0.383	0.564	0.878	0.736	0.3007529
500	0.0000004		0.827	0.262	0.445	0.415	0.478	0.645	0.490	0.507	0.368	0.669	0.759	0.673	0.3143557
400	0.0000003		0.699	0.222	0.422	0.365	0.415	0.478	0.399	0.470	0.250	0.485	0.611	0.573	0.2092689
300	0.00000025		0.465	0.117	0.320	0.579	0.380	0.418	0.228	0.580	0.155	0.445	0.485	0.561	0.2802849

ABS: Absorbancia de la muestra

Tabla N° 20: (Continuación)

Fermentación 2 Promedio															
Concentración		A B S	Tiempo (h)											Desviación Estándar	
Ul/mL	Mol/mL		0	24		48		72		96		144			
1000	0.0000008		0.815	0.706		0.876		0.718		0.660		1.032		0.09497683	
800	0.0000007		0.695	0.635		0.788		0.591		0.585		0.946		0.09734933	
600	0.0000005		0.600	0.489		0.628		0.528		0.473		0.807		0.07632950	
500	0.0000004		0.544	0.430		0.561		0.498		0.518		0.716		0.04565950	
400	0.0000003		0.460	0.393		0.446		0.434		0.367		0.592		0.03066333	
300	0.00000025		0.291	0.449		0.399		0.404		0.300		0.523		0.03923533	
Fermentación 3															
Concentración		A B S	Tiempo (h)											Desviación Estándar	
Ul/mL	Mol/mL		0	24		48		72		96		144			
1000	0.0000008		0.910	0.580	0.710	0.736	0.895	0.865	0.740	0.843	0.519	0.954	1.231	0.830	0.37695225
800	0.0000007		0.891	0.530	0.603	0.631	0.801	0.805	0.584	0.781	0.485	0.582	1.003	0.765	0.27666692
600	0.0000005		0.848	0.362	0.500	0.648	0.600	0.796	0.501	0.495	0.380	0.692	0.870	0.458	0.33941367
500	0.0000004		0.820	0.170	0.450	0.795	0.478	0.673	0.494	0.606	0.366	0.705	0.754	0.761	0.43936267
400	0.0000003		0.686	0.123	0.429	0.715	0.415	0.764	0.402	0.607	0.247	0.485	0.608	0.693	0.43658900
300	0.00000025		0.468	0.193	0.324	0.877	0.380	0.647	0.232	0.612	0.160	0.47	0.483	0.687	0.52233892

ABS: Absorbancia de la muestra

Tabla N° 20: (Continuación)

Fermentación 3 Promedio									
Concentración		A B S	Tiempo (h)						Desviación Estándar
UI/mL	Mol/mL		0	24	48	72	96	144	
1000	0.0000008		0.745	0.723	0.880	0.791	0.736	1.030	0.07059350
800	0.0000007		0.710	0.617	0.803	0.682	0.533	0.884	0.07952683
600	0.0000005		0.605	0.574	0.698	0.498	0.536	0.664	0.02879683
500	0.0000004		0.495	0.622	0.575	0.550	0.535	0.757	0.04278200
400	0.0000003		0.404	0.572	0.589	0.504	0.366	0.650	0.06158883
300	0.00000025		0.330	0.600	0.513	0.422	0.315	0.585	0.07739883

ABS: Absorbancia de la muestra

ANEXO N° 3

Fotografías de los experimentos

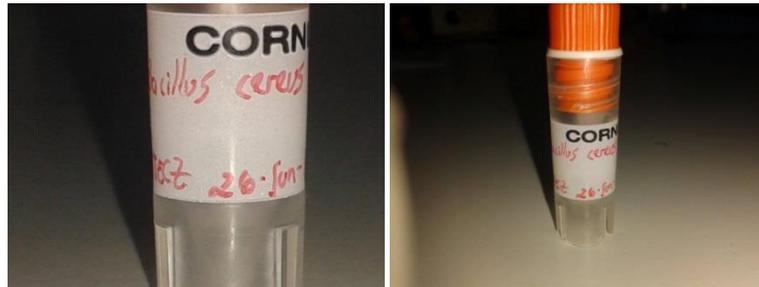


Figura N° 16: Criovial de *Bacillus cereus* ATCC 13061

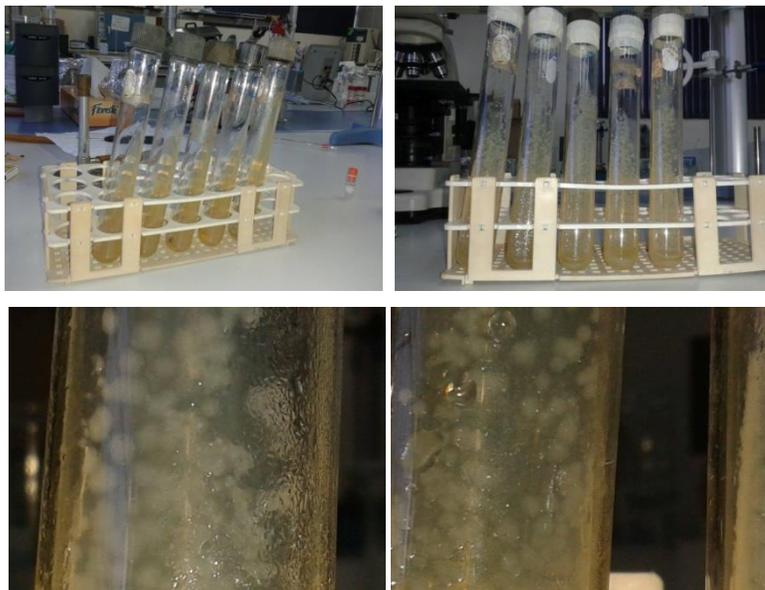


Figura N° 17: Colonias de *Bacillus cereus* ATCC 13061 en TSA



Figura N° 18: *Bacillus cereus* ATCC 13061 en caldo nutritivo.



Figura N° 19: Muestra en agitador Shaker



Figura N° 20: Medio de producción previo a la fermentación.



Figura N° 21: Muestras para análisis de fermentación dos y tres.



A)



B)

A) y B) Figura N° 22: Análisis de Azúcares totales por DNS



C)



D)

C) y D) Figura N° 23: Vial de Penicilina G Benzatínica utilizada.



Figura N° 24: Potenciómetro utilizado para la determinación de pH.



Figura N° 25: Espectrofotómetro y celdas utilizadas en la determinación de azúcares totales y actividad betalactamasa.

ANEXO N° 4

Monografía del microorganismo.



Product Sheet

***Bacillus cereus* (ATCC® 13061™)**

Please read this **FIRST**



Storage Temp.
**Frozen: -80°C or
colder**
**Freeze-Dried: 2°C
to 8°C**
**Live Culture: See
Propagation
Section**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Bacillus cereus* (ATCC® 13061™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Designation: PCI 246 [ATCC 10876a, ATCC 13640, IFO 13494, NCTC 9946, NRRL B-3537]
Deposited Name: *Bacillus cereus* Frankland and Frankland
Product Description: Produces penicillinase

Propagation

Medium
ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

Growth Conditions
Temperature: 30°C
Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a second tube of broth, a slant, and/or plate.
5. Incubate all tubes and plate at 30°C for 24 to 48 hours.

Notes

In broth, growth is turbid with a flocculent to viscid sediment. Vegetative cells are motile, Gram-positive rods. Many oval spores are formed.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org



Product Sheet

***Bacillus cereus* (ATCC®
13061™)**

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/19]

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

 Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Bacillus cereus* (ATCC® 13061™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

ANEXO N° 5

Monografía de Penicilina G Benzatínica utilizada



Unipharm

Unicil® L-A 1, 200,000

Polvo estéril y solución para uso parenteral

INFORMACION FARMACOLÓGICA

NOMBRE COMERCIAL: Unicil L-A® 1,200 000 Polvo estéril y solución para uso parenteral

NOMBRE GENÉRICO: Penicilina G Benzatínica.

FORMULA CUANTITATIVA:

Cada frasco ampolla contiene:

Penicilina G Benzatínica eq. A Penicilina G1, 200,000 U.I.

Cada ampolla contiene:

Agua estéril para inyección..... 3 mL

CLASIFICACION FARMACOLOGICA: Penicilina Natural.

ACCIONES TERAPEUTICAS:

La Penicilina G ejerce una acción bactericida contra microorganismos sensibles durante el período de multiplicación activa. Actúa inhibiendo la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular. No es activa contra bacterias productoras de Penicilinas, que incluyen muchas cepas de estafilococos.

Los siguientes datos *in vitro* están disponibles, pero su significancia clínica es desconocida. La Penicilina G ejerce gran actividad *in vitro* contra algunas cepas de estafilococos (excepto aquellas que producen Penicilinas), estreptococos (grupos A, C, G, H, L y M) y neumococos. Otros organismos sensibles son: *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, especies de Clostridia *Actinomyces bovis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Leptospira* y *Treponema pallidum* (extremadamente sensible).

FARMACOCINÉTICA:

La Penicilina G Benzatínica es absorbida muy lentamente desde el sitio de la inyección intramuscular y convertida por hidrólisis a Penicilina G. Esta combinación de hidrólisis y absorción lenta resulta en niveles séricos mucho más bajos, pero mucho más prolongados, que otras penicilinas.

La administración intramuscular de 1, 200,000 unidades de Penicilina G Benzatínica en adultos, resulta en niveles sanguíneos de 0.03 a 0.05 unidades por mL, los cuales son mantenidos por 14 días. Concentraciones sanguíneas de 0.003 unidades por mL aún pueden ser detectables 4 semanas después de la administración de 1, 200,000 unidades. Aproximadamente el 60% de la Penicilina G se une a las proteínas del plasma. Con una función renal normal es excretada rápidamente por secreción tubular. En neonatos, infantes e individuos con función renal dañada, la excreción es mas lenta.

INDICACIONES Y USO:

La Penicilina G Benzatínica, administrada intramuscularmente, está indicada en el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos sensibles a la Penicilina G, que son susceptibles a niveles séricos bajos y muy prolongados, común a esta particular forma de dosificación. La terapia debe ser guiada por estudios bacteriológicos (incluyendo pruebas de sensibilidad) y por respuesta clínica. Las siguientes infecciones generalmente responderán a dosis adecuadas de Penicilina G Benzatínica:

*Infecciones medias a moderadas del tracto respiratorio superior debido a estreptococos susceptibles.

*Infecciones venéreas: sífilis (primaria, secundaria y latente), sífilis tardía (terciaria y neurosífilis), y sífilis congénita.

En la siguiente condición médica, la penicilina G Benzatínica está indicada como profiláctico para: profilaxis primaria de la fiebre reumática (tratamiento de las estreptocócicas) y en la profilaxis secundaria (prevención de nuevos ataques de fiebre reumática, cardiopatías y glomerulonefritis aguda).

CONTRAINDICACIONES Y ADVERTENCIAS:

La Penicilina G Benzatínica está contraindicada en casos de hipersensibilidad a cualquier penicilina. No inyectar dentro o cerca de una arteria o nervio, ya que puede resultar en un daño neurovascular severo, sobre todo en infantes y niños pequeños.

PRECAUCIONES:

Este producto deberá usarse con precaución en individuos con historia de alergias y/o asma.

Debe tenerse cuidado para evitar la administración intravenosa o intrarterial, o la inyección cerca o dentro de los nervios periféricos principales o vasos sanguíneos.

En infecciones estreptocócicas la terapia debe ser suficiente para eliminar la bacteria; de otro modo pueden producirse las secuelas de esta enfermedad. Deberán hacerse cultivos al completar el tratamiento para determinar si el estreptococo ha sido erradicado.

El uso prolongado de antibióticos puede promover el crecimiento de organismos no susceptibles, incluyendo hongos, por lo que puede producirse una superinfección.

REACCIONES ADVERSAS:

Las reacciones de hipersensibilidad reportadas son erupciones cutáneas (de maculopápulas a dermatitis exfoliativa), urticaria, edema laríngeo, y anafilaxia. Algunas veces únicamente se observa fiebre y eosinofilia. Anemia hemolítica, leucopenia, trombocitopenia, neuropatía y nefropatía, son reacciones poco frecuentes y generalmente se asocia con dosis altas de penicilina parenteral.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS:

Vía de Administración: **Inyección** intramuscular profunda en el cuadrante superior externo del glúteo. En infantes y niños pequeños puede ser preferible en la región medio lateral del muslo.

Dosis:

**Infecciones estreptocócicas del Tracto Respiratorio Superior:*

Adultos: Dosis única de 1, 200,000 unidades.

Niños de 8 a 12 años: Dosis única de 900,000 unidades.

Para Infantes y Niños (menos de 60 libras): Dosis única de 300,000 a 600,000 unidades.

**Infecciones Venéreas, como la sífilis:*

Primaria, secundaria y latente: 2, 400,000 unidades, en dosis única.

Tardía (terciaria y neurosífilis): 2, 400,000, cada 7 días por 3 dosis.

Congénita: menores de 2 años 50,000 UI/kg. De 2 a 12 años ajustar la dosis en base a la de adultos.

**Profiláctico en Fiebre Reumática y Glomerulonefritis:*

Consecutiva a un ataque agudo: para niños y adultos 1, 200,000 UI una vez al mes ó 600,000 UI cada 2 semanas.

PRESENTACIÓN:

Farmacia: Caja con 1 frasco vial con polvo estéril + 1 ampolla con agua estéril para inyección de 3 mL.

Hospitalaria: Caja con 50 frascos viales con polvo estéril.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 1era. edición en español. 2003 pp. 264-267

PDR Generics. First Edition. Medical Economics Co., New Jersey, 1995. Pp. 2175-2177.

USP DI. 23rd. Edition. 2003 Volumen I pp. 2155-2160, 2170-2173