

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE UNA CEPA CON MUTACIONES EN LAS RUTAS DE FERMENTACIÓN ÁCIDO MIXTA SOMETIDA A GRADIENTES DE OXÍGENO DISUELTO

Ramsés García, Álvaro Lara, Tonatiuh Ramírez, Norma Valdez-Cruz
 Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca Morelos, 62250, México Tel. (55)66227617 Fax (52) (777) 3138811, e-mail: adri@ibt.unam.mx

Palabras clave: escalamiento descendente, gradientes de oxígeno disuelto, aerobiosis y anaerobiosis.

Introducción. La heterogeneidad en la concentración de O₂ disuelto en reactores operados a gran escala es causada por un mezclado deficiente y ocasiona distintos efectos fisiológicos en los microorganismos (1). *E. coli* responde a periodos de anaerobiosis durante su transitar por regiones no aireadas, utilizando las rutas de fermentación ácido-mixta que originan la acumulación de ácidos orgánicos. Una de las estrategias para contender con la formación de subproductos y mejorar la producción de proteína recombinante es la modificación o eliminación de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en la producción de ácidos orgánicos. La cepa mutada de *E. coli* (denominada VAL24), expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y tiene eliminados los genes *ldhA* y *pflB* e interrumpido el gen *poxB* que codifican para las enzimas que generan lactato, formato y acetato, respectivamente (2).

En este trabajo se presentan resultados de la evaluación del desempeño de la cepa VAL24 cultivada bajo gradientes de O₂, simulados en un sistema de escalamiento descendente de dos reactores de 1 L de tanque agitado interconectados y con distintos tiempos de circulación (t_c).

Metodología. Los t_c evaluados fueron de 50s, 100s y 150s. El desempeño de VAL24 se comparó con la cepa parental W3110. Se determinó: crecimiento de biomasa por espectrofotometría, consumo de glucosa y acumulación de metabolitos extracelulares (acetato, lactato, formato y etanol) por HPLC. La expresión de proteína recombinante se evaluó por fluorescencia y por densitometría con geles de poli(acrilamida) desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio como marcador.

Resultados y discusión. Los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en los cultivos de las cepas VAL24 y W3110 se resumen en la Tabla 1. Se observó una disminución en la velocidad específica de crecimiento (μ) en las dos cepas al ser expuestas a la anaerobiosis intermitente, sin embargo, el efecto negativo en el crecimiento fue mayor en VAL24 que en W3110. La cepa parental acumuló mayor cantidad de ácidos orgánicos, lo que se tradujo como un desperdicio de

carbono de 32, 53 y 55% para los t_c de 50, 100 y 150s, mientras que VAL24 desperdició 30, 39 y 25% del carbono en los respectivos t_c. La viabilidad de la población de VAL24 disminuyó a 60, 50 y 40% de células viables para los t_c de 50, 100 y 150s, respectivamente. En contraste, W3110 no mostró una reducción significativa en la viabilidad excepto en el t_c de 150s donde presentó 70% de células viables al final de la cinética (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación del desempeño para las cepas.

cepa	t _c (s)	X _{max} (g/L)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	q _s (g/g*h)	% Cel. viables
VAL24	0	2,1	0,45	0,36	1,23	87
	50	1,8	0,39	0,33	1,19	64
	100	1,2	0,13	0,21	0,64	50
	150	0,7	0,10	0,11	0,03	40
W3110	0	2,0	0,40	0,34	1,19	80
	50	1,7	0,35	0,32	1,11	80
	100	1,1	0,29	0,16	1,78	82
	150	1,2	0,28	0,20	1,43	70

La proteína recombinante producida (Figura 1) en la cepa VAL24 fue mayor en todos los t_c con respecto a W3110.

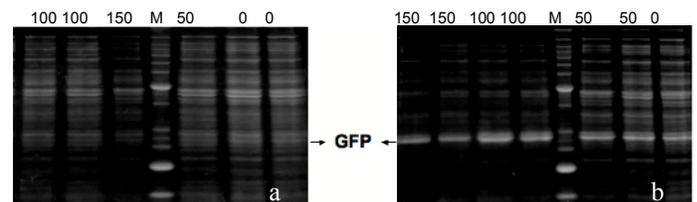


Figura 1.- Comparación de GFP producida para tiempos finales de W3110 (a) y VAL24 (b) en geles de SDS-PAGE para los distintos t_c.

Conclusiones. Los parámetros cinéticos y estequiométricos disminuyeron conforme aumentó el t_c. El desperdicio de carbono para la generación de ácidos orgánicos fue menor en VAL24 con respecto a la cepa parental. Las concentraciones de proteína recombinante fueron mayores en VAL24 a las alcanzadas por la cepa W3110 para todos los t_c.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo de DGAPA-IN223308 y CONACYT Fondo de salud 44126.

Bibliografía.

- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der LR, Luyben K, Vrabel P, Manelius. (2001). Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol*. 85:175-185.
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT. (2006). Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*. 94, 1164-1175.