



EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE *ESCHERICHIA COLI* ROSETTA 2 TRANSFORMADA CON EL GEN *podC* DE PEROXIDASA DE NABO

Ivanna Olivares-Marín, Blanca García-Almendárez, Carlos Regalado. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, 76010, regcarlos@gmail.com; vannyolimar@hotmail.com.

Palabras clave: peroxidasa PodC, *E. coli* Rosetta 2, parámetros cinéticos

Introducción. La peroxidasa de nabo PodC tiene diversas aplicaciones biotecnológicas como la remoción de compuestos fenólicos de agua contaminada (1), mas su producción a partir de tejidos vegetales no es económicamente viable. Sin embargo, el gen *podC* fue anteriormente clonado en la cepa *E.coli* Rosetta 2 (DE3) (2), lo cual ha permitido su producción en cultivo sumergido. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes condiciones de crecimiento sobre las variables cinéticas de la cepa productora de la enzima recombinante PodC, lo cual podría permitir mejorar el rendimiento de su proceso de producción.

Metodología. Se determinó el efecto de la construcción pET28b::*podC* en la cepa Rosetta 2 y el efecto de la inducción con 2% (v/v) de lactosa a la mitad de la fase exponencial en medio Luria-Bertani (LB) sobre el tiempo de duplicación (T_d) y constante de velocidad específica (K). Se prepararon pre-inóculos a partir de un stock de la cepa parental o la cepa transformante; inoculando el medio fresco para alcanzar A_{600} de 0.01, incubando a 37 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras cada hora hasta las 12 h. El efecto de la glucosa (0.05% y 0.5% v/v) y $MgSO_4$ (1 mM y 2 mM) sobre el crecimiento de la cepa transformante fue estudiado mediante un diseño factorial 2^2 , las variables respuesta fueron K y T_d . Los datos obtenidos fueron analizados con los programas GraphPad Prism y JMP (v.8).

Resultados. La cinética de crecimiento de la cepa parental y la transformante (Fig. 1) muestran un crecimiento diaúxico, donde se observan dos fases exponenciales separadas por una fase de desaceleración, debido al consumo subsecuente de un nutriente diferente al inicialmente (3). Este comportamiento podría asociarse al consumo inicial de los nutrientes del medio LB y subsecuentemente consumo de algún producto del metabolismo bacteriano, pudiendo ser el acetato (4). Se observó que la construcción pET28b::*podC* tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *E. coli* Rosetta2, ya que el T_d de la cepa transformante (1.29 ± 0.02 h) fue mayor al de la cepa parental (1.10 ± 0.01 h), además de un menor valor de K (0.54 ± 0.01 h⁻¹ vs 0.63 ± 0.01 h⁻¹, respectivamente). La inducción con lactosa provocó un efecto negativo sobre los parámetros cinéticos K y T_d durante la segunda fase de crecimiento. El análisis estadístico mostró que la

glucosa y su interacción con el $MgSO_4$ afectaron significativamente el crecimiento. El mejor tratamiento se obtuvo con 0.5% (v/v) de glucosa y 1 mM de $MgSO_4$ ($K = 0.72 \pm 0.04$ h⁻¹ y $T_d = 0.95 \pm 0.03$ h). Estos resultados podrían mejorar el rendimiento volumétrico de la enzima PodC en el proceso de escalamiento de la fermentación.

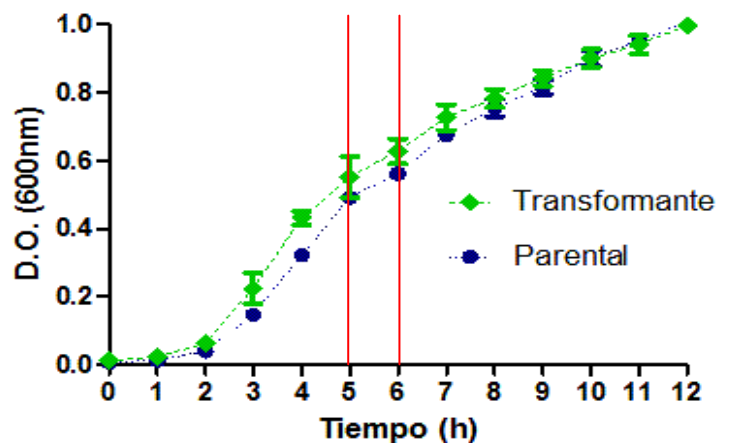


Figura 1. Cinética de crecimiento de las cepas parental y transformante en medio LB. Se observa que tiene un crecimiento con dos fases exponenciales. Las líneas rojas muestran el final de la primera fase y el inicio de la segunda. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes por duplicado.

Conclusiones. Se observó un comportamiento diaúxico entre la cepa parental y transformante. La suplementación del medio LB con 0.5% (v/v) de glucosa y 1 mM de $MgSO_4$ aumenta la K y disminuye el T_d de la cepa transformante productora de la enzima recombinante PodC, en comparación con los valores obtenidos en el medio LB sin suplementar.

Agradecimiento. Al CONACYT por beca de MC a IOM.

Bibliografía.

- Duarte-Vázquez, M.A., Ortega-Tovar, M.A., García-Almendárez, B.E. y Regalado, C. (2002). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78:42-47.
- Pliago-Arriaga, R., Regalado, C., Amaro-Reyes, A. y García-Almendárez, B.E. (2013). *Rev. Mex. Ing. Quim.* 12(3): 177-183.
- Mostovenko, E., Deelder, A.M. y Palmbla, M. (2011). *BMC Microbiol.* 11:126.
- Castañero-Cerezo, S., Bernal, V., Röhrig, Termeer, S. y Cánovas, M. (2014). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s00253-014-6280-8.