



EFFECTO DE LAS ESTRATEGIAS DE TERMOINDUCCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN *Escherichia coli*.

Elizabeth Carrasco, Octavio Tonatiuh Ramírez, Instituto de Biotecnología, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, UNAM, Cuernavaca, Morelos C. P. 62210, carrasco@ibt.unam.mx

Palabras clave: cultivo continuo, oscilaciones, preproinsulina humana.

Introducción. El sistema termo-inducible es muy utilizado para la producción de proteína recombinante (PR) en *Escherichia coli*, ya que a 30 °C el promotor se encuentra reprimido y esto permite al cultivo alcanzar altas concentraciones celulares antes de inducir la síntesis de la PR a 42 °C (1). Se ha demostrado que, mediante la inducción por oscilaciones de temperatura, se obtienen mayores rendimientos de PR, que cuando se utiliza el cambio de temperatura escalonado (2). Con base en esta información se diseñó un quimiostato de dos compartimentos. En el cual, mediante la inducción intermitente del cultivo, fue posible alcanzar un estado estacionario respecto a concentraciones de biomasa, sustrato y preproinsulina humana (PPIH) (3). Sin embargo, las variables estudiadas de dicho sistema fueron limitadas. En este trabajo, se evaluó el efecto la velocidad de recirculación entre los dos compartimentos y de la temperatura en cada compartimento sobre la concentración de biomasa, sustrato, PPIH y la estabilidad del plásmido recombinante.

Metodología. Se realizaron cultivos continuos de *E. coli* BL21 productora de PPIH transformada con el sistema λ PL/cl857 (ver fig. 1). Las temperaturas de crecimiento fueron 32 °C y 35 °C, las de inducción 40 °C y 42 °C y los flujos de recirculación 60 ml/min y 120 ml/min.

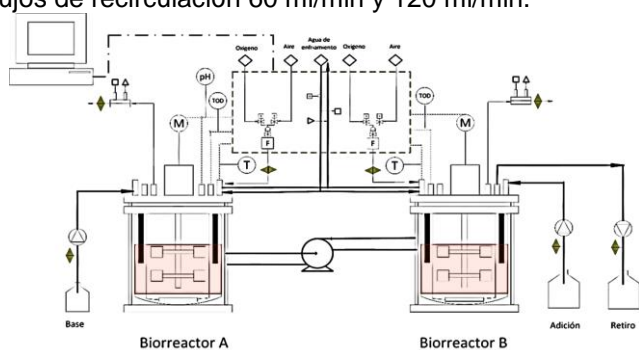


Fig. 1 Diagrama simplificado del sistema termo-inducido.

Resultados. La oscilación continua de temperatura (desde horas tempranas del cultivo) entre los dos compartimentos permitió alcanzar el estado estacionario respecto a concentraciones de biomasa y sustrato (Fig. 2A). Sin embargo, no fue así para la PPIH, la cual dejó de producirse tiempo antes del estado estacionario (Fig. 2B). Se alcanzó la mayor cantidad de proteína recombinante cuando (32-42) °C, $F_{rec}=120$ ml/min y la mayor cantidad de preproinsulina en cuerpos de inclusión cuando (32-42) °C, $F_{rec}=60$ ml/min (Fig. 2C). El plásmido resultó inestable (Fig. 2D) y además se observó la desaparición del

fragmento que codifica a la PPIH en cuatro de las cinco condiciones (Fig. 2E).

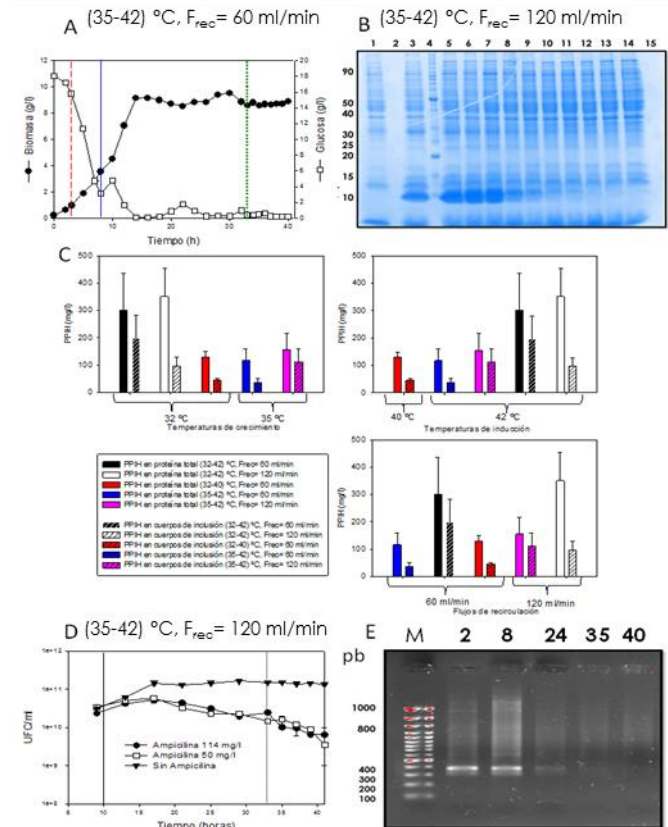


Fig 2. A) Cultivo continuo, B) CI purificados, C) Concentraciones máximas de PPIH, D) Conteo de células con el plásmido, E) Electroforesis del producto de PCR para amplificar el gen de la PPIH (35-42) °C, $F_{rec}=60$ ml/min.

Conclusiones. No se produjo PPIH al estado estacionario. Las posibles causas de este fenómeno son la inestabilidad segregacional del plásmido, pérdida del gen recombinante y degradación de la PPIH.

Agradecimiento. UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-203212-2 e IT-201214. E. Carrasco recibió beca del CONACyT.

Bibliografía.

- Caulcott, C. A. y Rodes, M. (1986) *Trends Biotechnol.* 4 (6), 142-146.
- Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolívar, F. y Ramírez, O.T. (2009). *Biotechnol. Bioeng.* 102(2), 468-482.
- Niño, O. L., Yépez, N. A. y Ramírez, O. T. (2013) Effect of specific growth rate on formation of inclusion bodies and recombinant protein. a novel thermoinduced continuous culture. *XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. SMBB. Cancún, México, 23 al 28 de junio, 2013. V-O15.