



GRADIENTES DE OXÍGENO DISUELTO EN BIORREACTORES: RESPUESTAS METABÓLICAS Y TRANSCRIPCIONALES DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE Y DISEÑO DE CEPAS CON UN MEJOR DESEMPEÑO ANTE OSCILACIONES AMBIENTALES

Alvaro R. Lara, Lidia Leal, Consuelo Vázquez, Noemí Flores, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Agustín López-Munguía, Octavio Tonatiuh Ramírez.

Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. Apdo. Postal 510-3
Fax (777) 3138811, Tel. (777) 3291617. e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: Escalamiento descendente, análisis transcripcional, ingeniería metabólica.

Introducción. Un problema común en los cultivos de gran escala son los gradientes espaciales de oxígeno disuelto (TOD), originados cuando las constantes de tiempo de mezclado y consumo de oxígeno son del mismo orden de magnitud (Palomares y Ramírez, 2000). Bajo dichas condiciones, las células están expuestas a oscilaciones ambientales que pueden afectar su metabolismo y fisiología, generando efectos adversos en los cultivos industriales. Sin embargo, la información acerca del efecto que dichos gradientes pueden provocar en cultivos de *E. coli* recombinante es muy escasa.

El objetivo del presente trabajo fue, mediante un enfoque de escalamiento descendente, analizar las respuestas metabólicas y transcripcionales de *E. coli* recombinante ante oscilaciones de TOD. En conjunto, los datos obtenidos permitieron establecer estrategias para crear cepas modificadas de *E. coli* capaces de contender mejor con los gradientes de TOD.

Metodología. *E. coli* W3110 expresando la proteína verde fluorescente (GFP) fue cultivada en un sistema de escalamiento descendente compuesto de dos biorreactores agitados interconectados, uno de los cuales se mantuvo bajo condiciones aerobias (TOD 10%), y el otro bajo condiciones anaerobias (TOD 0%) (Sandoval-Basurto et al., 2005). Así, las células fueron sometidas a cambios cíclicos de TOD a lo largo del cultivo, permaneciendo en promedio 17s en condiciones aerobias y 33s bajo condiciones anaerobias simulando un tiempo de circulación de 50s, típico de biorreactores de gran escala. El desempeño de estos cultivos se comparó con el de cultivos completamente aerobios (TOD 10%), analizando la producción de metabolitos de fermentación, proteína recombinante y parámetros cinéticos. Se determinó el nivel de expresión de 21 genes selectos cuya expresión está relacionada con la disponibilidad de oxígeno, empleando la técnica de PCR cuantitativa. Se construyeron cepas doble (pfl⁻, ldh⁻) y triples mutantes (pfl⁻, ldh⁻, poxB::cat) de *E. coli* y se cultivaron bajo condiciones oscilantes y constantes de TOD. Se analizaron sus perfiles de fermentación y desempeño cinético, y se compararon con los de la cepa nativa.

Resultados y discusión. Los niveles de transcripción, normalizados respecto al cultivo completamente aerobio, de los genes de fermentación ácido-mixta (*ldhA*, *poxB*, *frdD*, *ackA*, *adhE*, *pflD*, y *fdhF*), se incrementaron entre 1.5 y 6 veces en los cultivos a TOD oscilante. Los niveles de transcripción de *fumB* se incrementaron, mientras que los de

sucA y *sucB* disminuyeron, lo que sugiere que el ciclo de Krebs funcionó como dos ramas separadas. Los niveles de transcripción revelaron que el citocromo bd, de alta afinidad al oxígeno, pero baja eficiencia energética fue preferido sobre el citocromo bO₃ en cultivos bajo TOD oscilante. Factores post-transcripcionales limitaron la producción de GFP en cultivos a TOD oscilante, lo cual se infiere de un similar nivel de expresión de *gfp*, pero una concentración de GFP 19% menor en los cultivos a TOD oscilante. Los gradientes de TOD afectaron también la expresión de genes de la rama del glioxilato (*aceA*), de reguladores globales de metabolismo aerobio/anaerobio (*fnr*, *arcA*, and *arcB*), y otros genes relevantes (*luxS*, *sodA*, *fumA*, and *sdhB*). Los cambios transcripcionales explican las alteraciones observadas en los parámetros estequiométricos y cinéticos. Se observaron diferencias en los niveles de transcripción entre los compartimentos del sistema de escalamiento descendente, indicando una alta velocidad de respuesta de *E. coli* a condiciones intermitentes de TOD. Las cepas mutantes mostraron un mejor desempeño en cultivos bajo TOD oscilante, aumentado la velocidad de crecimiento, rendimientos y productividad de la cepa nativa bajo estas condiciones, a la vez que disminuyendo la producción de ácidos orgánicos (acético, láctico y fórmico).

Conclusiones. Este es el primer estudio de escalamiento descendente que presenta en conjunto, datos de fenómenos moleculares (transcripción) e información macroscópica (parámetros cinéticos, estequiométricos, etc.) y además, estrategias de ingeniería metabólica para contender con el problema de fluctuaciones ambientales, lo que refleja la potencialidad del escalamiento descendente y la aplicación de herramientas de fisiología cuantitativa moderna para afrontar problemas de complejidad real.

Agradecimiento. Se agradece el financiamiento de CONACYT (proyectos NC-230 y 43243), DGAPA (proyectos IN2204032, IN218902, IX244404) y apoyo económico del premio SMBB-HyClone-Uniparts 2003.

Bibliografía.

- 1 Palomares LA, Ramírez OT. (2000). Bioreactor Scale-down.. En: *Encyclopaedia of Cell Technology*. Spier RD (ed). John Wiley & Sons, EUA. 174-183.
2. Sandoval-Basurto E, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. 2005. *Biotechnol Bioeng*. 89, 453-463.