



## RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE EN CULTIVOS CON ALTAS CONCENTRACIONES DE CO<sub>2</sub> DISUELTO.

Antonino Báez, Noemí Flores, Francisco Bolívar, Octavio Tonatiuh Ramírez. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. CP. 62210, Cuernavaca Morelos. Fax: 01 (777) 3138811. tonatiuh@ibt.unam.mx.  
Palabras clave: respuesta transcripcional, CO<sub>2</sub>, *E. coli* recombinante.

**Introducción.** Concentraciones de dióxido de carbono disuelto (dCO<sub>2</sub>) de alrededor de 300 - 400 mg/L disminuyen la velocidad de crecimiento de cepas silvestres de *E. coli* y promueven la acumulación de acetato (1,2). Los cultivos de alta densidad celular utilizados en la industria para la producción de proteína heteróloga pueden alcanzar concentraciones de dCO<sub>2</sub> inhibitorias que afecten la producción de proteína recombinante. Conocer la respuesta transcripcional de genes que responden a estímulos de CO<sub>2</sub> es fundamental en el desarrollo de cepas tolerantes a altas concentraciones de este gas.

El objetivo de nuestro trabajo es determinar el efecto del dCO<sub>2</sub> sobre los niveles relativos de transcripción de ciertos genes de enzimas que participan en metabolismo central y homeostasis de pH, y cómo se relacionan con parámetros cinéticos y estequiométricos importantes para los cultivos.

**Metodología.** Se realizaron cultivos en lote *E. coli* recombinante W3110 productora de la proteína verde fluorescente (GFP) inducida por IPTG desde la inoculación a 37°C, pH de 7, y 20 % de oxígeno disuelto respecto a la saturación del aire en un biorreactor de 1.5 L. El dCO<sub>2</sub> fue medido continuamente por un electrodo esterilizable (Cole Parmer) y controlado a un valor constante. El crecimiento se siguió por densidad óptica a 600 nm, la producción GFP por fluorescencia en un espectrofluorímetro LS 55 PerkinElmer, la concentración de glucosa y ácidos orgánicos por HPLC. El análisis transcripcional se realizó por la técnica de RT-PCR y las muestras se tomaron en la fase exponencial del cultivo.

**Resultados y discusión.** El crecimiento disminuyó hasta un 42 % y la acumulación de acetato en el medio de cultivo aumentó al doble al incrementar el dCO<sub>2</sub> a 320 mg/L, lo cual confirma los efectos negativos que el dióxido de carbono tiene sobre *E. coli* recombinante, aún a dCO<sub>2</sub> menores que las mencionadas en la literatura (1,2). Los rendimientos globales indican que una mayor cantidad de carbono proveniente de glucosa fue desperdiciada como acetato (figura 1). La producción de proteína recombinante tuvo un retraso, el cual fue mas evidente al aumentar dCO<sub>2</sub> (datos no mostrados).

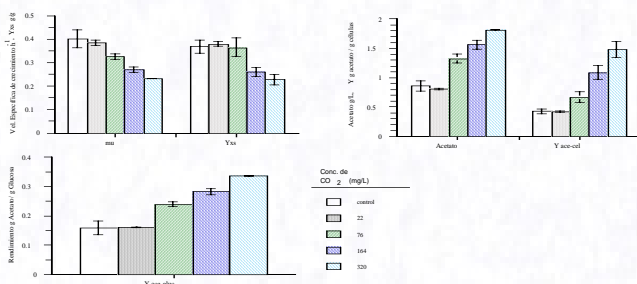


Figura 1. Comparación de la velocidad específica de crecimiento y rendimientos globales en función del dCO<sub>2</sub>.

Los niveles de transcripción de algunos genes que codifican para enzimas involucradas en los posibles mecanismos de inhibición del crecimiento y estimulación de la excreción de subproductos se presentan en la figura 2. Algunos autores han reportado un incremento en los rendimientos Y<sub>xs</sub> y se especula que se deba a un efecto del dCO<sub>2</sub> sobre las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc) y carboxinasa (pckA).

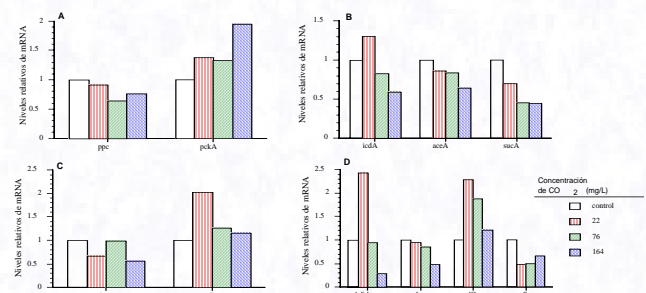


Figura 2. Efecto del dCO<sub>2</sub> sobre niveles de mRNA de enzimas que participan en: (A) vías anapleróticas; (B) TCA y ciclo del glioxilato; (C) producción de acetato; (D) resistencia a condiciones ácidas y estrés general.

Los niveles de expresión de los genes que codifican para enzimas que producen acetato (ackA, poxB) no muestran una tendencia clara como lo presenta el metabolito, probablemente por que el impacto del CO<sub>2</sub> sea a nivel de actividad y no de transcripción. También se ha especulado que el CO<sub>2</sub> puede afectar otras dos enzimas responsables de las descarboxilaciones de TCA (icdA, sucA), aunque no encontramos diferencias considerables en los niveles de transcripción de estas. Se sabe que la arginina descarboxilasa (adiA) secuestra protones del citosol para contender con la disminución del pH intracelular. En nuestro estudio se observó un aumento de la transcripción de adiA para la condición de 22 mg/L y no así para las demás condiciones.

**Conclusiones.** La acumulación de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo tiene efectos adversos en el crecimiento y la producción de proteína recombinante. Sin embargo elucidar un mecanismo de inhibición aún es una tarea difícil. Nuestros resultados muestran que el impacto del dCO<sub>2</sub>, por lo menos parcialmente, ocurre a nivel de actividad enzimática.

**Agradecimiento.** CONACyT 46408-Z

### Bibliografía.

- Dixon, N.M., Kell D.B. (1989). The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms. *J App Bacteriol.* 67: 109-136.
- Castan, A., Nasman, A. Enfors, S. (2002). Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 847-854