



ANÁLISIS DE RÉGIMEN Y ESCALAMIENTO DESCENDENTE DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD DE *Escherichia coli* TERMO-INDUCIDA

Luis Caspeta y Octavio Tonatiuh Ramírez.

Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos. tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: proteína recombinante, termoinducción, escalamiento descendente

Introducción. Aspectos inherentes al diseño de biorreactores, así como limitaciones operativas relacionadas a los subprocesos de transferencia de calor, ocasionan que la tasa de incremento de temperatura en fermentadores de gran escala sea substancialmente menor que en sistemas de nivel laboratorio. Este fenómeno puede afectar el escalamiento ascendente de cultivos de *E. coli* recombinante en donde la proteína heteróloga es termoinducida, ya que diferencias en el aumento de la temperatura pueden tener efectos diferentes sobre las respuestas de choque térmico y astringente en relación a la sobre expresión del producto de interés. Con el análisis comparativo entre las velocidades de transferencia de calor de biorreactores de varias escalas y de las respuestas celulares, representadas por sus tiempos característicos, se concluyó que las primeras eran los subprocesos limitantes. De tal forma que en este trabajo se realizó un estudio de escalamiento descendente en donde se evaluó el efecto de la tasa de aumento de temperatura sobre la expresión de preproinsulina recombinante con el fin de simular a nivel laboratorio las condiciones que se presentan en gran escala.

Materiales y Métodos. Los tiempos característicos se calcularon de acuerdo a la bibliografía citada¹, tomando datos cinéticos correspondientes a la acumulación y desaparición de proteínas características de las respuestas de choque térmico y astringente². Se realizaron cultivos alimentados para obtener alta concentración celular (55 g/L) de *E. coli* productora de preproinsulina mediante termoinducción. Los cultivos se iniciaron a 30 °C hasta alcanzar la alta densidad y después la temperatura se incrementó a 42 °C siguiendo tasas de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, para simular escenarios de calentamiento típicos de reactores de 0.01, 5, 20 y 100 m³.

Resultados y discusión. Entre mas pequeños sean los valores de los tiempos característicos, mayores son las velocidades de los subprocesos. En la Figura 1 se observa que los menores tiempos característicos corresponden a los subprocesos de transferencia de calor en biorreactores de 0.01 y 0.1 m³, por lo que a estas escalas los subprocesos celulares no afectarían el desempeño del proceso. Para el caso de reactores mayores a 1 m³ los tiempos característicos de transferencia de calor pueden ser menores o iguales a los de las respuestas celulares, por lo que los primeros limitan el proceso. En otras palabras, es posible que las respuestas celulares se expresen antes de inducir la síntesis de preproinsulina. Para estudiar su efecto sobre la expresión de preproinsulina, los tiempos característicos de transferencia de calor de biorreactores de 0.1, 5, 20 y 100 m³ se reprodujeron en biorreactores de laboratorio. La mayor

concentración de preproinsulina se obtuvo cuando se calentó a la tasa correspondiente a un biorreactor de 100 m³ (Figura 2), mientras que no se observó diferencia significativa en la producción de preproinsulina a tasas que simulan procesos en biorreactores menores a 20 m³. Esto se debió a que la acumulación de proteína insoluble fue mayor en la primera condición, aún cuando el porcentaje de preproinsulina en la fracción insoluble fue semejante a las otras condiciones.

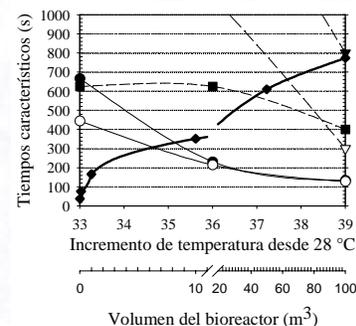


Fig. 1 Tiempos característicos de los niveles de síntesis de proteínas de las respuestas celulares (Choque térmico: síntesis de GroEL (●) y DnaK (○), y respuesta estricta: degradación de PheRS (■), EF-G (▼) y RNAP-β (▽) vs. Aumento de temperatura; y de transferencia de calor vs. Volumen del biorreactor (◆).

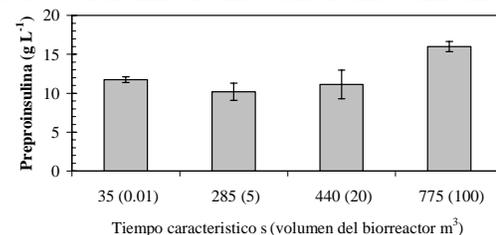


Fig. 2 Valores máximos de concentración de preproinsulina humana producida en el sistema de escalamiento descendente.

Conclusiones. El calentamiento a tasas mayores a las que se pueden alcanzar en biorreactores menores o iguales a 20 m³ no tiene efecto sobre la concentración máxima de preproinsulina, mientras que el calentamiento lento como ocurriría en biorreactores de 100 m³ la favorece. Estos resultados son útiles para el desarrollo de estrategias más racionales de escalamiento ascendente de los procesos de producción de proteína recombinante termoinducida.

Bibliografía

1. Palomares LA., Ramírez OT. 2000. Bioreactor scale-down. En: *Encyclopedia of cell technology*. Spier RE. Ed. New York, John Wiley & Sons. 174-183.
2. Lemaux, PG, Herendeen, SL, Bloch, PL, Neidhardt, FC. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell*. 13: 427-434.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo de CONACYT, proyecto 46408-Z y de Probiomed S. A. de C. V.