



CULTIVO, EN ALTAS CONCENTRACIONES INICIALES DE SUSTRATO, DE *Escherichia coli* MODIFICADA EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA: UNA ALTERNATIVA AL LOTE ALIMENTADO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Alvaro R. Lara R., Luis Caspeta, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Octavio T. Ramírez.
Instituto de Biotecnología, UNAM. AP 510-30. Cuernavaca, Morelos. Tel 777 3291617, fax 777 3138811
tonatiuh@ibt.uam.mx

Palabras clave: Alta densidad celular, producción aerobia de acetato, proteína recombinante.

Introducción. Los cultivos a alta densidad celular son la opción preferida para bioprocesos industriales, debido a su alta productividad. En cultivos aerobios de *E. coli*, la producción de acetato originado del sobreflujo metabólico es un problema recurrente debido a sus efectos negativos en el desempeño del proceso. Esto puede evitarse controlando la concentración de sustrato y la velocidad de crecimiento en valores bajos mediante cultivos alimentados. Sin embargo, ello resulta en tiempos de cultivo largos y gradientes de concentración en reactores de gran escala, debido al mezclado ineficiente, lo que afecta la fisiología de *E. coli*. La modificación del sistema de transporte de glucosa en *E. coli* ha demostrado ser un enfoque efectivo para reducir el sobreflujo metabólico y con ello aumentar la productividad de los cultivos y las concentraciones de sustrato que pueden emplearse, evitando la necesidad de suministro continuo de sustrato. En este trabajo, se empleó una cepa de *E. coli* modificada en el sistema de transporte de glucosa para ser cultivada a concentraciones de glucosa de hasta 100 g/L. Con ello, se han logrado alcanzar concentraciones celulares >50 g/L y concentraciones de proteína recombinante > 8g/L, a la vez que una baja producción de acetato.

Metodología. Se realizaron cultivos aerobios de *E. coli* expresando proteína verde fluorescente (GFP) como modelo. La cepa PTS⁻ GalP⁺ (denominada VH32) y su cepa parental, W3110 fueron cultivadas a concentraciones iniciales de glucosa de 30, 50 y 100 g/L en un medio semidefinido. En la cepa VH32, la glucosa es internalizada a través de la permeasa de galactosa, que es controlada por el promotor híbrido *trc* directamente en el cromosoma. Este diseño reduce de manera importante el sobreflujo metabólico y con ello la producción aerobia de acetato. La concentración de glucosa y acetato se midió por HPLC, la concentración de GFP por densitometría en geles SDS-PAGE.

Resultados y discusión. La velocidad de crecimiento de ambas cepas se redujo hasta en 23% en cultivos a 100 g/L de glucosa, comparados con cultivos a 30 g/L de glucosa. Este puede ser un efecto combinado de una alta osmolaridad (1.6 Osm/kg) y el efecto inhibitorio que altas concentraciones de glucosa por sí mismas provocan. La producción de acetato (fig. 1) fue 62 veces mayor en cultivos de W3110 a altas concentraciones de glucosa, que en cultivos de VH32. Como consecuencia del evidente redireccionamiento de los flujos de carbono, la producción de GFP y biomasa fueron mayores en 200 y 53%, respectivamente, en cultivos a 100 g/L de glucosa de VH32, comparados con los de W3110.

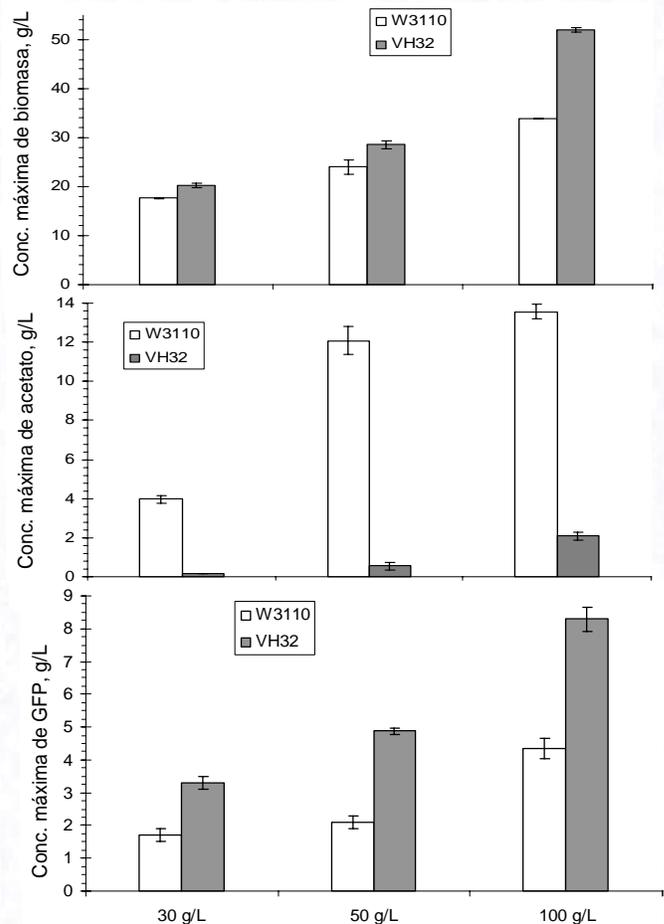


Fig. 1. Comparación de parámetros relevantes en los cultivos de las cepas W3110 y VH32 a diferentes concentraciones de glucosa.

Conclusiones. Fue posible lograr altas densidades celulares en cultivos por lote de VH32 a concentraciones iniciales de glucosa tan altas como 100 g/L. La concentración de biomasa (52 g/L) y proteína recombinante (8.2 g/L) son las mayores reportadas para un cultivo por lote, mientras que la concentración de acetato fue sólo de 2 g/L. Se presentará además, una comparación exhaustiva del desempeño de dichos cultivos de VH32 con cultivos alimentados de W3110 para evaluar el potencial de esta nueva estrategia de proceso. Los resultados aquí mostrados representan un nuevo paradigma para abordar por biología molecular problemas clásicos de bioproceso.

Agradecimiento. Proyecto financiado por CONACyT Proyecto 46408-Z.