

ESTUDIOS EN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO EN UNA FUSION TRANSCRIPCIONAL *cry1Ac'-lacZ* DE *B. thuringiensis* HD73

Ulises Gaona Ramírez, Octavio Gómez Guzmán y Mayra de la Torre Martínez; Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN; Av. IPN 2508, Sn. Pedro Zacatenco, 07360, México, D.F., Fax. 5747-3313, rgaona@mail.cinvestav.mx.

Palabras clave: *B. thuringiensis*, Lote alimentado, fusión transcripcional.

Introducción. La expresión de los genes *cry1A* en *Bacillus thuringiensis* dependen de los factores σ^K y σ^E que se activan durante la esporulación. Dependiendo de las condiciones de cultivo, la esporulación puede iniciarse de manera sincrónica o asincrónica y además la cuantificación de las proteínas Cry1A antes de la liberación de las esporas, requiere la ruptura de las células. Por lo que un gen reportero es útil para seguir y cuantificar la expresión del gen (1). En este estudio se utilizó una cepa de Bt HD 73 *cry(-)B*, *spo(-)* transformada con el plásmido pHT1KAc(2), que tiene una fusión transcripcional *cry1Ac'-lacZ*. Con esta construcción se evaluaron, en cultivos por lote alimentado (CLA), los efectos del patrón de alimentación sobre la esporulación, la concentración celular y la expresión del gen medida indirectamente como actividad de β -gal. Además, se hizo un estudio similar con la cepa silvestre.

Metodología. Se realizaron fermentaciones en reactores Applikon siguiendo dos estrategias de alimentación: intermitente adicionando pulsos de 300 y 400 mL cuando la concentración de glucosa residual fue cercana a 5g/L y a flujo constante alimentando 1000 mL de medio fresco durante 12 a partir de las 3 h del inicio de la fermentación. Las células y esporas se determinaron mediante cuenta total en una cámara de Neubauer, la glucosa por medio de un analizador bioquímico (YSI 2600), la concentración de proteína Cry1Ac por SDS-PAGE y la actividad de β -galactosidasa de acuerdo a Sambbrook (3).

Resultados y discusión. La cantidad de biomasa sintetizada en un volumen final de 2 L de caldo de fermentación fue de 85 g cuando se utilizó la alimentación a flujo constante y de 105 g cuando se alimentó intermitentemente (Tabla 1). La eficiencia de esporulación fue de 5 y 20 % respectivamente, mientras que las actividades específicas máximas de β -gal fueron 3000 UI/mL y 2530 UI/mL. Estos niveles de actividad son entre 8 y 7 veces mayores que los obtenidos en cultivos por lote. En los cultivos con alimentación constante (CLAc) e intermitente (CLAi) la actividad de β -gal se detectó 14 horas y 17 h después del inicio de la fermentación, mientras que en el cultivo en lote la actividad se detectó desde las 7 h, esta diferencia es una evidencia de que la alimentación retrasó el inicio de la esporulación. Por otro lado, con la cepa silvestre en CLAi intermitente se obtuvieron 58 g de biomasa con una eficiencia de esporulación de 75% y la concentración de proteína Cry al

final de la fermentación fue 3.7 veces mayor que en cultivo por lote (CL).

Resultados de los CLA y CL usando la cepa silvestre y la construcción					
	construcción			silvestre	
	CL	CLAi	CLAc	CL	CLAi
Biomasa g/L	14.5 (1x)	106 (7.3x)	85 (5.8x)	9.2 (1x)	58 (6x)
% esp.	61	20	5	78	75
Activ. de β -gal UI/mL	1160	1150	1615		
Actv. β -gal UI/10 ¹⁰ cel.	348 (1x)	2530 (7.3x)	3000 (8.6x)		
Cry g/L	-	-	-	0.3(1x)	1.1 (3.7x)

Conclusiones. El comportamiento de la actividad de β -galactosidasa (UI/mL) demostró que los incrementos de esta en CLA no corresponden en magnitud a los incrementos de la concentración de proteína Cry en la cepa silvestre, sin embargo, si se observas un aumento al comparar la producción de proteína Cry del CLA contra CL. La eficiencia de esporulación fue baja en los CLA con la construcción, pero en la cepa silvestre no hubo diferencia entre ambos sistemas de cultivo, las cinéticas en lote alimentado sugieren que hubo una desincronización de esporulación. Por último, se concluye que la alimentación a velocidad constante presentó las mejores características para la producción de proteína Cry ya que en esta alimentación la actividad de β -galactosidasa fue la mayor.

Agradecimientos. CONACyT, proyecto Z-001. U. Gaona fue becario No. 155165

Bibliografía.

- 1.-Lopez y López E. y de la Torre M. 2001 Fusiones LacZ-promotor Cry1A para estudiar el efecto de las condiciones de proceso sobre expresión de los genes *cry1A*, en el IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Veracruz, México.
- 2.- Agaise, H. And Lereclus D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *J. Bacteriol.* 177:6027-6032.
3. Sambbrook J. 1989. Molecular cloning. En: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 306-309.