

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCION DE TrpLE-PROINSULINA Y ACIDO ACETICO POR LAS CEPAS DE *E. coli* VH32GalP⁺/pWPIA Y W3110trp⁺/pWPIA.

Vanessa Hernández, Roberto Martínez, Ramón de Anda, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Tonatiuh Ramírez.
UNAM Apartado postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271. Fax 01777 3138811. tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *rendimiento específico, cultivo alimentado, tasa de dilución.*

Introducción. En fermentaciones de *E. coli* es común que se produzca ácido acético. Para evitar su acumulación se puede dosificar el sustrato o diseñar cepas que promueven el uso de transportadores de glucosa menos eficiente, que impidan el sobre flujo glucolítico y permitan la disponibilidad de precursores para la síntesis del producto recombinante. El objetivo del trabajo fue comparar la capacidad de producción de TrpLE-PI y ácido acético entre una cepa con el sistema de transporte PTS⁻Glucosa⁺ con la cepa parental en cultivos alimentados.

Metodología. Se utilizaron las cepas de *E. coli* W3110trp⁺/pWPIA y VH32GalP⁺/pWPIA (PTS⁻Glu⁺) que codifican para la proteína TrpLE-proinsulina. La alimentación de glucosa en los cultivos alimentados se estableció de acuerdo a un patrón de flujo exponencial manteniendo una tasa de dilución de 0.2h⁻¹ y 0.6h⁻¹. Se utilizaron fermentadores NBS Bioflo 110 de 7L, relación de inóculo de 10%, 37°C, pH 7.4 y 20% OD. Los niveles de proteína TrpLE-proinsulina se determinaron a través de SDS-PAGE cuantificada utilizando el software NIH-Image 1.61/fat.

Resultados y discusión. Los resultados mostraron que para la cepa VH32GalP⁺, a pesar de no haber una diferencia entre la cantidad de acetato producido entre los cultivos a tasa de dilución de 0.2 y 0.6h⁻¹, sí hubo diferencia en la cantidad de glucosa consumida por unidad de volumen, observándose los mayores consumos a 0.2h⁻¹. A pesar de la baja concentración de acetato producido a 0.6h⁻¹ por VH32GalP⁺, no hubo un aumento en el crecimiento y al parecer, más del 80% de base consumida por VH32GalP⁺ fue utilizada para neutralizar otros ácidos orgánicos producidos. En relación al nivel de expresión de proteína recombinante y cantidad de proteína por unidad de biomasa, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre cepas. Ver tabla I.

Los cultivos realizados a alta densidad celular y alta tasa de dilución propiciaron la la producción de ácidos orgánicos. En VH32GalP⁺ se observaron densidades celulares moderadamente altas y niveles de acetato por debajo de 3g/L, a pesar de la acumulación de glucosa. Se observó también que la producción de acetato al parecer está asociada a la acumulación de glucosa. En contraste, los resultados de la cepa W3110trp⁺ mostraron que a 20g/L de extracto de levadura la producción de acetato incrementó a lo largo de la fermentación, dependiendo del consumo de glucosa y no de su acumulación. Lo anterior se establece al observarse producción de ácido acético aún a nula concentración de glucosa residual.

La velocidad de producción de ácido acético difiere considerablemente para ambas cepas. Mientras que W3110trp⁺ excretó concentraciones elevadas de acetato, VH32GalP⁺ produjo menos de 5g/L de acetato. Las cinéticas mostraron que el crecimiento de VH32GalP⁺ se limitó por el agotamiento de la fuente de nitrógeno, mientras que la concentración de biomasa en W3110trp⁺ aparentemente alcanzó un límite independientemente de la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo.

Tabla I. *Parámetros cinéticos para los cultivos lote y lote alimentado de las cepas VH32GalP⁺/pWPIA y W3110trp⁺/pWPIA.*

Tasa de dilución (h ⁻¹)	VH32GalP ⁺ /pWPIA			W3110trp ⁺ /pWPIA		
	0.6	0.2	lote	0.6	0.2	lote
μ (h ⁻¹)	0.2	0.13	0.6	0.2	0.13	0.6
G/V	42.8	68.1	30.8	61.1	77.2	35.6
Xm (g/L)	11.2	14.2	11.0	10.3	14.5	10.5
Pt (g/L)	2.9	3.1	3.08	2.77	2.86	2.4
PR (%)	9.6	11.9	9.9	12.3	11.4	15.0
PI (g/L)	0.3	0.3	0.3	0.37	0.33	0.39
A (g/L)	1.9	1.5	0.4	10.01	1.62	7.27
Yx/s	0.26	0.21	0.36	0.17	0.19	0.3
Yp/s	0.07	0.04	0.1	0.05	0.04	0.07
Yp/x	0.27	0.22	0.28	0.27	0.19	0.23
qs	0.73	0.63	1.79	1.58	0.68	2.02
qp	0.05	0.03	0.18	0.08	0.03	0.14

Conclusiones. La cepa VH32GalP⁺/pWPIA regula adecuadamente los flujos glicolíticos para mantener sus requerimientos energéticos y anabólicos. La alteración del sistema PTS resultó en un incremento de más del 30% en biomasa y una reducción de 3 veces el consumo de base utilizado para la neutralización de los ácidos orgánicos producidos. No se encontró diferencia significativa en el porcentaje de expresión de la proteína de interés, evaluado como la cantidad de proteína recombinante por unidad de proteína total. Estos resultados indican que el alterar el sistema de transporte de glucosa favoreció la productividad volumétrica del producto recombinante.

Agradecimiento. Proyecto CONACYT NC-230.

Bibliografía.

1. Neeleman, R., Van Boxtel, (2001). Estimation of specific growth rate from cell density measurements. *Biopro. Biosystems Eng.* vol (24):179-185.