



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



SOBREEXPRESIÓN DE LA GLOBULINA DE AMARANTO (AMARANTINA) CON PROPIEDADES NUTRACEÚTICAS EN DOS CEPAS DE *Escherichia coli*.

Hypatia Arano-Varela^a, Jorge Domínguez-Domínguez^b, Octavio Paredes-López^a

^a Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 629, 36821 Irapuato, Gto, México, e-mail: oparedes@ira.cinvestav.mx ^b Centro de Investigación en Matemáticas, Callejón Jalisco s/n, Mineral de Valenciana, 36240 Guanajuato, Gto., México.

Palabras clave: Escherichia coli, sobreexpresión de proteínas, propiedades nutraceuticas.

Introducción. La amarantina es la proteína de reserva mayoritaria del amaranto. Es una globulina 11S que contiene dos subunidades unidas por un enlace disulfuro, la básica y la ácida. Se modificó la subunidad ácida de la amarantina insertando en la región hipervariable III el péptido antihipertensivo VY (4) y en el extremo carboxilo terminal de la secuencia se insertó el péptido con propiedades antihipertensivas IPP. Se obtuvieron cuatro versiones de la proteína, de las cuales la más exitosa resultó ser la que contenía ambas modificaciones además de un epítipo de seis histidinas justo antes del péptido IPP (1, 2).

El objetivo de este trabajo consistió en encontrar las condiciones más adecuadas a nivel matraz y fermentador para la sobreexpresión de la proteína de interés en dos cepas de *Escherichia coli*.

Metodología. En este trabajo, para establecer las mejores condiciones de expresión de esta proteína recombinante, se seleccionaron las cepas Origami (DE3) y Rosetta (DE3) de *Escherichia coli* como sistemas de expresión. Cuatro factores de expresión fueron probados y comparados a nivel matríz: concentración del inductor (IPTG), tiempo de acumulación de la subunidad ácida modificada, concentración del inóculo y medio de cultivo. Una vez que se determinó la mejor cepa para sobreproducir la proteína a nivel fermentador (5 L), se evaluaron tres factores: temperatura, velocidad de agitación y flujo de aire, utilizando un diseño central $2^3 + 2$ compuesto por 10 ensayos. Se determinaron los rendimientos de cada uno de los ensayos 4 h después de la inducción (se encuentra la mayor acumulación de la proteína de interés). Los datos fueron sometidos a la metodología de superficies de respuesta para determinar cuáles o qué combinación de los factores evaluados ejercieron algún efecto sobre la producción de la proteína (3).

Resultados. Los resultados mostraron que una concentración del agente inductor (IPTG) de 0.3 mM es la mejor para la expresión en ambas cepas. Se encontró además, que para las cepas probadas el mejor tiempo de inducción fue después de 3 h. Los resultados sobre la

concentración del inóculo mostraron que 2.5% de inóculo es el mejor porcentaje para ambas cepas. En cuanto al efecto de los cinco medios de cultivo evaluados (LB, LB+sales, 2TY, 2YT-sales y Terrific), el medio de cultivo Terrific resultó ser el mejor para la expresión de la proteína en las cepas evaluadas. Comparando los rendimientos de producción, los resultados mostraron que Rosetta produce 3.5 veces más proteína que la cepa Origami. Además, los resultados de los análisis de inmunodetección confirman que la cepa Rosetta es el mejor sistema de expresión de la subunidad ácida modificada de la amarantina. Con base en los resultados obtenidos a nivel fermentador, se generó un modelo matemático, el cual demostró ser adecuado para la prueba de *F* con un nivel de significancia del 5%. De acuerdo con el modelo, la temperatura no ejerce ningún efecto sobre la producción de la proteína, siempre y cuando los valores de la velocidad de agitación y el flujo de aire sean mantenidos en los valores correspondientes a los puntos centrales. Los niveles óptimos de los factores evaluados fueron: temperatura= 28-33 °C, velocidad de agitación= 300 rpm, y flujo de aire= 0.1 vvm (3).

Conclusiones. Pruebas extras demostraron que el modelo puede explicar de manera satisfactoria los efectos de los factores evaluados (temperatura, velocidad de agitación y flujo de aire) sobre la producción de la subunidad ácida modificada de la amarantina en un fermentador por lote de 5 L.

Agradecimiento. Este proyecto fue parcialmente apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México). Se agradece el apoyo técnico de las doctoras Silvia Luna del CIBA-IPN, Claudia Castro del CIDIIR-IPN.

Bibliografía.

- 1 Luna-Suárez S. (2008) Introducción de péptidos bioactivos de interés nutraceutico en una globulina de amaranto. Tesis de doctorado, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.
- 2 Luna-Suárez S., y col. (2010) *J Biotechnol* 148 (2): 240-247.
- 3 Arano-Varela H. (2010) sobreexpresión de la globulina de amaranto (amarantina) con propiedades nutraceuticas en dos cepas de *escherichia coli*. Tesis de maestría, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.