



DISEÑO DE UN CULTIVO CONTINUO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE BAJO UN SISTEMA DE INDUCCIÓN TÉRMICA

Oriana L. Niño Trejos, Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

¹Departamento de medicina molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.

Fax: (777) 3138811, Correo Electrónico: olinot@ibt.unam.mx

Palabras clave: cultivo continuo, inducción térmica, proteína recombinante.

Introducción. La creciente demanda de proteínas recombinantes para uso farmacéutico ha llevado a profundizar en el estudio de diferentes estrategias para mejorar la producción de las mismas, uno de estos aspectos son los métodos de inducción. La inducción térmica ha despertado gran interés debido a las múltiples ventajas que presenta con respecto a los demás métodos de inducción. Sin embargo este tipo de cultivos se realizan en modo lote debido, entre otros factores, a la sobrecarga metabólica a la que es expuesta la célula, lo que conlleva a una disminución en la velocidad de crecimiento. No obstante, investigaciones recientes empleando nuevas estrategias de inducción por temperatura realizadas en cultivos en lote alimentado han mostrado que las células pueden continuar creciendo aún después de la etapa de inducción si son sometidos a periodos de “recuperación” a bajas temperaturas (30 °C) [3]. Teniendo en cuenta estos resultados se propone diseñar un sistema de producción continuo de proteína recombinante inducible por temperatura, que permita evaluar el efecto de la velocidad de crecimiento sobre la producción de proteína recombinante.

Metodología. Se empleó la cepa bacteriana BL21 (B F-dcm ompT hsdS (r_B m_B) gal: Strategene Cat:200133) transformada con un plásmido de alto número de copias que contiene la secuencia de codones que codifican para el gen de la pre-proinsulina humana (HPPI) bajo el control del sistema λ_{PL}-cI857. Se usó un medio de cultivo químicamente definido con glucosa como fuente de carbono y ampicilina como presión de selección. El sistema de cultivo consistió en dos biorreactores interconectados, en uno de los cuales se mantuvo una temperatura de 42 °C y un volumen de operación de 0,5 L, mientras en el otro se mantuvo una temperatura de 35 °C y un volumen de operación de 0,7 L. Ambos reactores se mantuvieron en condiciones completamente aerobias y pH de 6.8. La concentración de biomasa se determinó mediante peso seco. La cuantificación de proteína se realizó por densitometría. La cuantificación de glucosa residual se llevó a cabo con un analizador bioquímico YSI. La concentración de ácidos orgánicos se realizó mediante HPLC.

Resultados. En la figura 1 se muestra la cinética obtenida en un esquema de inducción por oscilaciones de temperatura entre 35°C y 42°C, en un sistema de cultivo de dos compartimentos. Se observa que el cultivo

llega a un estado estacionario después de 90 horas de cultivo. Se evaluaron dos diferentes velocidades de crecimiento: 0,06 h⁻¹ (0,3 μ_{max}) y 0,16 h⁻¹ (0,7 μ_{max}). Se observó que a bajas velocidades de crecimiento, el porcentaje de proteína recombinante en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) es del 20%, mientras que a altas velocidades de crecimiento disminuye a 9%.

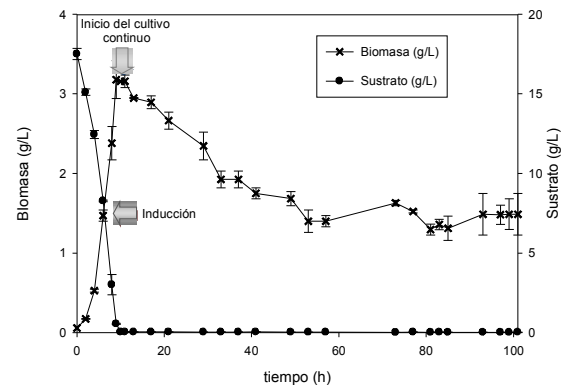


Fig. 1. Cinética de un cultivo inducido por oscilaciones de temperatura.

Conclusiones. Empleando una estrategia de inducción térmica por oscilaciones en la temperatura es posible realizar cultivos continuos, los cuales se emplearon como herramienta de estudio. El empleo de un sistema continuo termoinducido por oscilaciones de temperatura permitió determinar que la velocidad de crecimiento tiene un efecto relevante sobre la composición de proteína recombinante.

Agradecimiento. Dr. Nestor Pérez, Probiomed S.A. de C.V.

Bibliografía.

1. Makrides, Strategies for achieving high-level expression of genes in E. coli. microbiological review, 1996. **60**(3): p. 512-538.
2. Valdez-Cruz, N.A., et al., Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. Microbial Cell Factories, 2010. **9**(18).
3. Caspeta, L. Escalamiento descendente del proceso de producción de proteína heteróloga por termo-inducción de cultivos de alta densidad celular de Escherichia coli. Tesis (Doctorado en ciencias). Cuernavaca, México. Instituto de biotecnología. Universidad Autónoma de México. 2009