

SOBRE-EXPRESION DE PENICILINO ACILASA REGULADA POR EL PROMOTOR DE *LacZ* MEDIANTE INDUCCION ENDOGENA EN CULTIVOS DE *E. coli* JM101/pPA102.

Graciela B. Breceda Díaz de León, Beatriz A. García Coronado y Antonio De León Rodríguez.
Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y Antonio García Cubas S/N, C.P. 38010 Celaya, Gto.
Tel: 01(4)6117575 ext 325. Fax: 01(4)6117979. E-mail: aleonr@itc.mx

Penicilino acilasa, galactosa, inducción.

Introducción. El promotor de *lacZ* es uno de los promotores más utilizados en las técnicas de ingeniería genética para sobre-expresar proteínas de interés biotecnológico, siendo el β -isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG) el inductor utilizado en estas construcciones. Sin embargo, este compuesto es muy costoso para ser utilizado en procesos de gran escala, lo que afectaría drásticamente los costos de producción. En este trabajo se demostró la sobre-expresión de la penicilino acilasa (PA, E.C.3.5.1.11) regulada por el promotor de *LacZ* en una cepa de *E. coli*, mediante el uso de la galactosa como fuente de carbono. Posiblemente la inducción endógena se realizó por algún intermediario del metabolismo de la galactosa (como el Gal-1@, UDP-gal).

Metodología. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 500 mL a 200 rpm y 29°C. El medio de cultivo consistió en medio mínimo y como fuente de carbono se utilizó por separado glucosa (C-1), lactosa (C-2) o galactosa (C-3) a una concentración de 5 g/L. Como control positivo se utilizó medio con glucosa e IPTG a 25 μ M (C-4). La biomasa se midió a 620 nm en un espectrofotómetro (Jenway) y se correlacionó con una curva estándar de peso seco. La actividad enzimática se determinó por el método del PDAB. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de sustrato por minuto a 37°C.

Resultados y discusión. En la figura 1 se muestran las cinéticas de crecimiento y de actividad enzimática de la PA para los cultivos con diferentes fuentes de carbono. En la figura 1a, se observa que los cultivos C-1 y C-4 presentaron un comportamiento similar teniendo una velocidad específica de crecimiento de 0.28h^{-1} , y una concentración celular máxima de 1 g/L en ambos casos. En el cultivo (C-2) solo se presentó un ligero crecimiento celular (0.15 a 0.26 g/L) originado por la glucosa proveniente del pre-inóculo. La ausencia de crecimiento se debe a que la cepa de *E. coli* JM101 tiene un fenotipo *Lac*⁻. En el cultivo C-3 se observó el comportamiento diauxico típico debido a la presencia de dos fuentes de carbono (glucosa y galactosa). La velocidad específica de crecimiento para cada etapa fue de 0.25 y 0.23 h^{-1} , respectivamente. En la Fig. 1b, se muestra que en los cultivos C-1 y C-2 no se detectó actividad enzimática de PA. En el cultivo C-4 (control positivo) se obtuvo un aumento en la actividad enzimática de 0 a 0.12 U/mL, mientras que en el cultivo C-3, se logró un aumento de 0 hasta 0.25 U/mL en la fase exponencial y de 0.25 hasta 0.44

U/mL en la fase estacionaria, etapa en la cual se completa el procesamiento postraduccional del precursor de la penicilino acilasa (De León *et.al.* 1996).

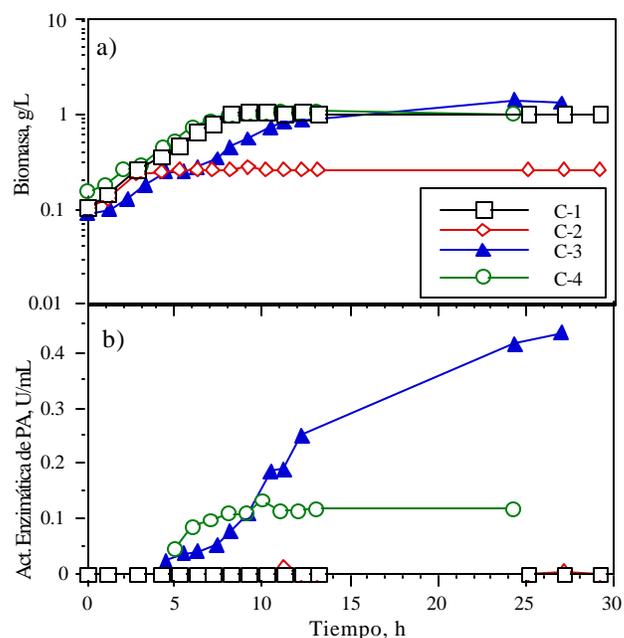


Fig. 1. Cinética de crecimiento y producción de penicilino acilasa de *E. coli* JM101/pPA102 en diferentes medios de cultivo.

Conclusiones. En este trabajo se demostró que es posible la inducción y la sobre-expresión de genes regulados por el promotor de *LacZ* en cepas de *E. coli* JM101, mediante el uso de galactosa como fuente de carbono. Posiblemente algún galactósido generado durante la degradación de la galactosa, fue capaz de actuar de manera muy eficiente como un homólogo de la alolactosa que es el inductor natural del promotor *lacZ*. Este trabajo puede ser de interés para la implementación de bioprocesos con microorganismos recombinantes en gran escala.

Agradecimientos. Al Financiamiento de CONACyT 32908-N y CONCYTEG 0009/076-3. G. B. Breceda agradece al CoSNET la beca No.2001432AI. La cepa fue donada por el Dr. F. Bolívar.

Bibliografía.

I.- De León, A., Galindo, E., and Ramírez, O.T. "A postfermentative stage improves penicillin acylase production by a recombinant *E. coli*". (1996). *Bio technol. Lett.* 18 (8): 927-932.