

ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE INSULINA HUMANA RECOMBINANTE.

Vanessa Hernández, Claudia Ferreira, Edith López, Juan M. Salazar, Bernardo Urióstegui, Alfonso Gómez, Ramón de Anda, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, O. Tonatiuh Ramírez. UNAM Apartado postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271. Fax 017 3138811. Probiomed S. A. de C. V. tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *preproinsulina, cuerpos de inclusión, escalamiento.*

Introducción. El escalamiento es una actividad de importancia fundamental para convertir el conocimiento generado en instituciones a través de la investigación en una realidad práctica con valor comercial. La optimización del proceso de fermentación permite mejorar la eficiencia y los rendimientos en la producción a gran escala de insulina e cultivos de *E. coli* recombinante. El escalamiento de bioprocesos presenta desafíos en el control de las condiciones de fermentación, tales como velocidad específica de crecimiento, estabilidad de cepas y expresión de proteínas recombinantes.

Metodología. Se utilizó la cepa de *E. coli* W3110 con el plásmido TrpLE-Met-Proinsulina. Se realizaron fermentaciones de lote alimentado de 10L, 25L y 100L de volumen de trabajo. Los parámetros controlados durante la fermentación fueron OD, pH, temperatura y la velocidad específica de crecimiento (μ). Se determinó densidad óptica (absorbancia), peso húmedo y seco, concentración de glucosa (método enzimático), concentración de triptofano (espectrofluorimetría), proteína total (Bradford) y proteína TrpLE-Met-Proinsulina (SDS-PAGE). Se recuperaron los cuerpos de inclusión incubando con lisozima, homogeneizando y centrifugando las células.

Resultados y discusión. Se realizaron un total de 49 fermentaciones. Se determinaron las condiciones óptimas para las etapas de crecimiento celular y expresión de proteína recombinante. La velocidad específica de crecimiento se controló mediante la adición exponencialmente ascendente de glucosa en un valor de $0.2h^{-1}$. Tal estrategia se escaló a un volumen de fermentación de 100L. La concentración de biomasa final y el % de proteína recombinante en relación a proteína total se mantuvieron constantes en las 3 escalas de 23g/l y 28%, respectivamente. Al pasar de 10 a 100L la concentración de proteína total y TrpLE-Met-Proinsulina aumentó en un 100% (figura 1) y la productividad (mgproInsulina/lh) y el rendimiento de proInsulina sobre biomasa (mg/g) mejoraron en un 50%, así como la cantidad de cuerpos de inclusión obtenidos aumentó en un 40%. Finalmente, el proceso de centrifugación se escaló de una operación discontinua en equipo de laboratorio a un proceso continuo a nivel planta piloto.

Conclusiones. Se realizaron estudios de escalamiento ascendente en las etapas de fermentación y recuperación de cuerpos de inclusión.

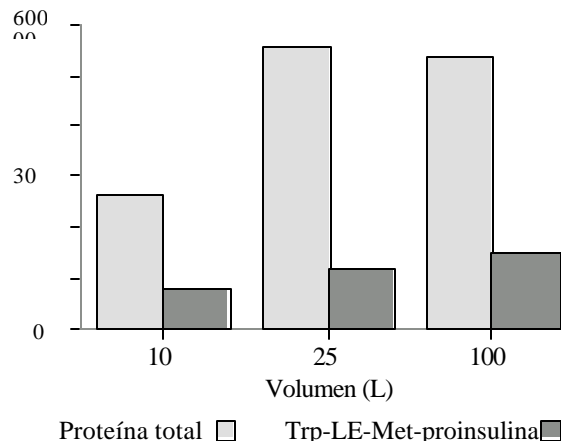


Fig.1. Expresión de proteína total y Trp-LE-Met-proinsulina en los diferentes volúmenes de fermentación. Eje Y representa unidades relativas.

Se definieron las condiciones óptimas de fermentación, incluyendo la estrategia de adición de inductor (triptofano), velocidad de crecimiento y política de adición de fuente de carbono. Mediante tal estrategia se logró alcanzar niveles de cuerpos de inclusión del orden de 14g peso-húmedo por litro de cosecha, mejorándose así la productividad del proceso. En la obtención de los cuerpos de inclusión se redujo el tiempo de operación de 24 a 12h y se estandarizaron las condiciones de operación a nivel planta piloto. Se estandarizaron y documentaron las metodologías para la medición de triptofano, proteína total y cuantificación de preproinsulina. Se simuló, con el programa Bio-pro, la planta de producción del proceso de obtención de insulina, obteniéndose los balances de materia y energía.

Agradecimiento. Al personal de la Planta Piloto del IBT y a Probiomed S. A. de C. V. por el apoyo brindado para la realización de este proyecto. Se agradece apoyo económico proporcionado por CONACYT NC-230

Bibliografía.

- Gosset, G., de Anda, R., Cruz, N., Martínez, A., Quintero, R., Bolívar, F. (1993). Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli* trp⁻ strain. *App. Microbiol Biotechnol.* vol (39):541-546.
- Petrides, D., Sapidou, E., Calandranis, J. (1995). Computer-Aided Process Analysis and Economic Evaluation for Biosynthetic Human Insulin Production-a case study. *Biotech. and Bioeng.* vol (48):529-541.