

# INGENIERIA CELULAR DEL METABOLISMO CENTRAL EN *E.coli* Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA HIBRIDA TrpLE-PROINSULINA HUMANA

Moreno L., Gosset G. y Bolívar F. Departamento de Microbiología molecular. Instituto de Biotecnología UNAM. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca Morelos. Tel. 56227601, FAX (7) 3172388. [lauris@ibt.unam.mx](mailto:lauris@ibt.unam.mx)

Palabras clave: *pts*, *gogat*, proteínas heterólogas

**Introducción.** Uno de los problemas principales asociados a los procesos de fermentación de alta densidad celular empleados en producción, es la síntesis y acumulación de ácido acético en el medio de cultivo. En un estudio reciente se observó que cepas de *E. coli* con el sistema de fosfotransferencia inactivado ( $PTS^-$ ) pero capaces de crecer rápidamente en glucosa ( $Glc^+$ ), presentan una tasa específica de producción de ácido acético menor a una cepa silvestre (1). Por otro lado, alteraciones en el metabolismo de nitrógeno en *E. coli*, íntimamente ligado al metabolismo de carbono, pudiera tener un efecto importante sobre la capacidad biosintética de la bacteria. La enzima glutamato sintasa (GOGAT) participa en la asimilación de amonio dependiente de energía, en una reacción cíclica que involucra a la enzima glutamina sintetasa (GS). *E. coli* posee una vía alternativa para la asimilación de amonio no dependiente de ATP a través de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Tanto GOGAT-GS como GDH, pueden catalizar la asimilación de amonio bajo condiciones de crecimiento en un medio rico en energía y nitrógeno (2). Al reemplazar a la enzima GOGAT nativa por la enzima GDH de *E. coli* en el organismo *Methylophilus methylotrophus*, se logró incrementar la conversión de la fuente de carbono (metanol) en biomasa en un 4-7% (3).

Con base en lo anterior, nos interesa determinar si es posible incrementar la productividad de la proteína híbrida TrpLEPI en una cepa de producción con el fenotipo  $PTS^- Glc^+$  y GOGAT.

**Metodología.** Inactivar los sistemas  $PTS^-$  y GOGAT en la cepa W3110 de *E. coli*. Transformar las cepas mutantes con el plásmido pTrcPI el cual tiene la región codificante del híbrido TrpLE-PI bajo el promotor *Trc*. Realizar cultivos en matraz, verificando la presencia de la proteína heteróloga por geles de poliacrilamida y determinando el porcentaje que representa de las proteínas totales.

**Resultados y Discusión.** En los sitios *NcoI* y *SmaI* del vector pTrc99A se clonó la región que codifica para la proteína heteróloga TrpLE-PI (pTrcPI). La cepa WGM, con el fenotipo GOGAT, se obtuvo al insertar un cassette de resistencia a cloramfenicol en la región *gltB*, la cual codifica para la subunidad mayor de GOGAT. El fenotipo  $PTS^-$  se confirmó al deletar el operón *ptsH-I-crr* insertando un cassette de resistencia a kanamicina (VH32). Al transformar la cepa VH32 con el plásmido pvGlcGalP54, que contiene los genes *glk* y *galP*, le confiere el fenotipo  $Glc^+$ . La cepa WHM32 ( $PTS^-$ , GOGAT $^-$ ) se construyó por transducción del fenotipo

GOGAT a la cepa VH32. La cepa W3110 se transformó con el plásmido pTrcPI y se realizó la inducción de *Trc* mediante

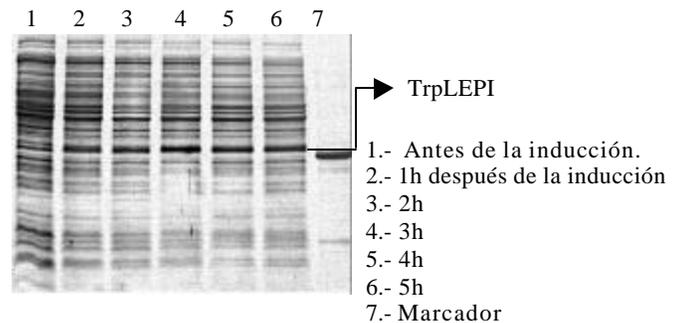


Fig. 1.- Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida al 15% correspondiente a la cepa W3110/pTrcPI.

la adición de isopropil  $\beta$ -D tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. Los cultivos se realizaron en medio mínimo M9, en un matraz de 250ml, el volumen del cultivo fue de 50ml,  $37^{\circ}C$ , 300rpm. La adición de IPTG se realizó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0.4 (Fig. 1). Se determinó el porcentaje de la proteína TrpLE-PI por medio de la densidad óptica. La proteína heteróloga representó el 5%  $\pm$  0.7% de las proteínas totales. Con base en estos datos se transformará el vector pTrcPI en las cepas WGM, VH32/pvGlcGalP54, WH32/pvGlcGalP54 y se determinará si el porcentaje obtenido en la cepa silvestre cambia en los diferentes fondos genéticos antes mencionados.

**Conclusiones.** Se han obtenido cepas con los fondos genéticos GOGAT $^-$ ,  $PTS^- Glc^+$  y GOGAT $^-$   $PTS^- Glc^+$ . Se realizó la inducción de la expresión de la proteína TrpLE-PI en la cepa W3110 en donde la proteína heteróloga representó el 5% de las proteínas totales.

**Agradecimientos.** A Verónica Hernández por la aportación de la cepa VH32 y el vector pvGlcGalP54. El presente trabajo es financiado por CONACyT y PROBIOMED. Así como por la beca 144898 de CONACyT.

## Bibliografía.

- 1.- Sigüenza R., Flores N., Hernández G., Martínez A., Bolívar F. y Valle F. 1999. Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15:587-592.
- 2.- Postma PW. 1987. Ammonia Assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-

alanine. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Neidhart FC (ed.) American Society for microbiology, Washingtton D.C. 391-407.

3.- Windas JD, Worsey MJ, Piolo EM, Pioli D, Barth PT, Atherton KT, Dart CE, Burom D, Powell K y PJ Senior. 1980. Improved conversion of methanol to single-cell protein by *Methylophilus methylotrophus*. *Nature* 287:396-401.