

EFFECTO DEL pH ALCALINO SOBRE LA AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRODUCIDAS EN *Escherichia coli*

Norma A. Valdez-Cruz^{1*}, Carlos Calcines-Cruz¹, Alejandro Olvera², Alejandro Alagón², Mauricio A. Trujillo-Roldán¹.
¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX C.P. 04510; ² Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México. adrivaldez1@gmail.com

Palabras clave: Cuerpos de Inclusión, agregación, *E. coli*.

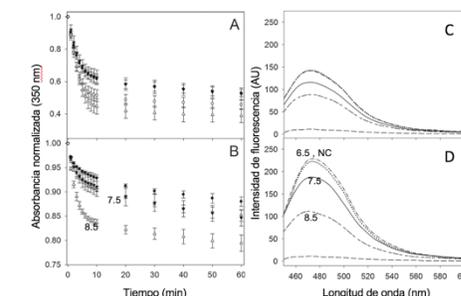
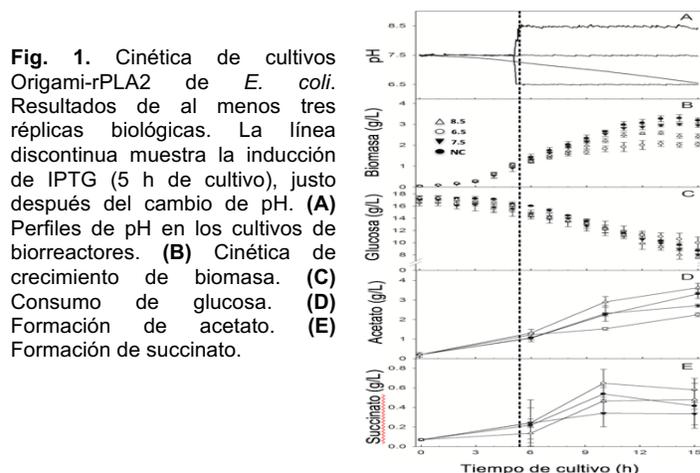
Introducción. La agregación de proteínas recombinantes (PR) en cuerpos de inclusión (CI) es el principal inconveniente de la expresión heteróloga en *E. coli*. Los CI son agregados dinámicos que contienen una gran proporción de PR [1]. Sin embargo, en bioprocesos industriales los CI suelen ser la materia prima para comenzar la purificación. De hecho, la recuperación de PR en un estado nativo y soluble a partir de los CI depende de sus características [2]. Por lo tanto, el análisis estructural de los CI se ha convertido en un importante campo de estudio. El objetivo de nuestro proyecto es el estudio del efecto de la variación en el pH sobre la arquitectura de CI formados por una Fosfolipasa A2 recombinante (rPLA2) del veneno de la serpiente *Micrurus laticollaris*.

Metodología. La rPLA2 fue expresada en *E. coli* Origami (DE3) [3]. Los cultivos fueron realizados en biorreactores de 1.2 L, usando medio mínimo, 37°C y 30% de oxígeno disuelto. La producción de rPLA2 fue evaluada bajo 4 estrategias de pH: cambio de pH de 7.5 a 6.5 u 8.5, sin control (NC) y pH constante. La concentración de glucosa y lactato se cuantificaron en un analizador bioquímico YSI2900. Los ácidos orgánicos se cuantificaron por HPLC [3]. Los CI fueron obtenidos mediante ruptura celular, centrifugación, y lavados con detergentes [8]. Los CI fueron visualizados por microscopía de transmisión electrónica. Las proteínas de los CI fueron separadas por SDS-PAGE y 2D. Para definir las características estructurales de los CI se evaluó la resistencia a la degradación por proteinasa-K o solubilización con agentes caotrópicos y las estructuras amiloides por su unión a Tioflavina-T (Th-T). La estructura secundaria de los CI fue analizada por FTIR [3].

Resultados. Los cultivos a pH sin control y 7.5 lograron una biomasa máxima (X_{max}) de ~3 g/L después de 11 h, mientras que a pH 6.5, solo alcanzaron el 66% de X_{max} (Tabla 1). A pH 8.5, el pH básico favoreció la salida de acetato de las células. A pH 8.5, el rendimiento total de proteína y la productividad de rPLA2 en forma insoluble fue 20% mayor (Tabla 1). A pH 8.5 los CI formados fueron más susceptibles a la degradación proteolítica por Proteinasa-K, unieron menos Th-T (Fig. 2). Además, se solubilizan más fácilmente en agentes caotrópicos.

Tabla 1. Parámetros estequiométricos y cinéticos de crecimiento y producción de rPLA2 producida en *E. coli* OrigamiTM.

Estrategia pH	Biomasa μ (h ⁻¹) máxima (g)	Y_{XIS} (g/g)	Y_{PTX} (g/g)	rPLA2/PT (%)	[rPLA2] (g/L)	$Y_{rPLA2IX}$ (g/g)
pH NC	0.589±0.030	3.30±0.16	0.38±0.02	0.344±0.016	34±3	0.37±0.06
pH 6.5	0.588±0.034	2.24±0.19	0.34±0.03	0.353±0.003	38±2	0.30±0.04
pH 7.5	0.572±0.035	3.00±0.07	0.30±0.01	0.381±0.033	35±3	0.37±0.05
pH 8.5	0.595±0.007	2.57±0.05	0.27±0.02	0.465±0.048	46±4	0.52±0.06



Conclusiones. Los cultivos a pH 6.5 y 8.5 mostraron los valores más bajos de X_{max} , lo que refleja un ambiente estresante. Sin embargo, el pH 8.5 favoreció la secreción de acetato evitando la inhibición de la síntesis de proteínas, favoreciendo la acumulación de rPLA2. Además, los CI formados a pH 8.5 presentaron una conformación más relajada con menor contenido de estructuras amiloides. Esta información mejorará la recuperación de proteínas y el uso de CI en bioprocesos.

Agradecimientos. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795).

Bibliografía.

- Singh A, et al. (2015) *Microb. Cell Fact.* 14:41.
- de Marco A, et al. (2019) *FEMS Microbiol Rev.* 43(1):53-72.
- Calcines-Cruz C, et al. (2018) *Int J Biol Macromol.* 108:826-836.