INVESTIGACIÓN

Optimización de la inducción y escalado del proceso fermentativo de la proteína p-41 expresada en Escherichia coli

✉ Ramón E Narciandi, José Motolongo, Luis Pérez, Raúl Díaz

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
E mail: emilio.narciandi@cigb.edu.cu

RESUMEN

La región representativa de la proteína transmembránica gp-41 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue expresada en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano. Al analizar la influencia de las condiciones de inducción sobre la producción de la proteína p-41, se observó que el nivel de expresión es independiente de la concentración del inductor, lo cual se evidenció a partir de 20 μg/mL de ácido 3-β indolacrílico. Además, se manifestó un efecto marcado en cuanto a la concentración del represor triptófano sobre el nivel de expresión y la producción de la proteína p-41. Finalmente, se estableció la producción de la proteína p-41 por derepresión del sistema de expresión, al añadir 10 μg/mL de triptófano en el medio de cultivo. El proceso fermentativo desarrollado se escaló a 200 L, y se obtuvieron altos niveles de expresión (25%) y de producción (321 mg/L) de la proteína recombinante p-41.

Palabras clave: p-41 (VIH), triptófano, ácido 3-β indolacrílico, escalado

Biotecnología Aplicada 2005;22:285-290

ABSTRACT

Optimization of the process of induction and scale up of the fermentative process of the p-41 protein expressed in *Escherichia coli*. A representative region of the transmembrane gp-41 protein of the human immunodeficiency virus (HIV) was expressed in *Escherichia coli* under the control of the tryptophan promoter. When analyzing the influence of the induction conditions on the production of the protein, the expression level was independent of the inducer concentrations when more than 20 μg/mL of 3-β indoleacrylic acid was used. Moreover, a remarkable effect of the tryptophan repressor concentration was observed on the expression level and the production of the p-41 protein. Finally, it was established to perform the production of the p-41 protein by derepression of the expression system, by adding 10 μg/mL of tryptophan to the culture medium. The fermentative process developed was scaled-up to 200 L, and high levels of expression (25%) and production (321 mg/L) of the p-41 recombinant protein were obtained.

Key words: p-41 (HIV), tryptophan, 3-β indoleacrylic acid, scaled-up

*I*ntroducción

El retrovirus nombrado virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es la causa del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En los primeros años, los sistemas de diagnóstico utilizaban antígenos virales que se obtenían a partir de la purificación de extractos de células infectadas con el VIH. Este método no garantizaba la representatividad de cada proteína que compone el virus, lo cual disminuye la sensibilidad y la especificidad del análisis. El conocimiento de la estructura genómica del VIH posibilitó el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico que utilizan antígenos recombinantes, lo cual garantiza la representatividad de los antígenos deseados. Esto condujo al desarrollo de pruebas serológicas más sensibles y específicas que las pruebas basadas en lisados virales.

Esencialmente todas las proteínas estructurales de estos virus son antigénicas en la evolución de la infección humana. Sin embargo, desde el punto de vista del diagnóstico, los mayores esfuerzos se han concentrado en la clonación o síntesis de regiones de la proteína gp-41, cuya región N-terminal es altamente conservada e inmunogénica. Se realizó la clonación y expresión en la *Escherichia coli*, de una región representativa del gen que codifica para la proteína gp-41 del VIH-1 bajo el control del promotor triptófano, con el objetivo de incluirla en sistemas de diagnóstico junto a otros antígenos recombinantes de los genes *gag* y *env* del VIH-1 y VIH-2, respectivamente.

Una de las etapas más importantes que se debe tener en cuenta durante el desarrollo de procesos para la obtención de proteínas recombinantes, es reproducir a escala productiva y de forma eficiente, los resultados logrados en zaranda. Sin embargo, en la literatura casi no existen reportes en los que se expongan las correlaciones para el escalado de productos recombinantes.

El presente estudio describe el desarrollo del proceso fermentativo para la producción de la proteína p-41 del VIH-1 expresada en la *Escherichia coli*. Se evaluó la influencia de las condiciones de inducción en la producción de esta proteína y se establecieron las condiciones de cultivo a nivel de laboratorio. Finalmente, se realizó el escalado del proceso fermentativo a nivel de 200 L de cultivo.

*M*ateriales y métodos

Cepa de bacteria y plasmidio

La cepa hospedera de la *E. coli* utilizada fue la W 3110 [1]. Para la clonación y expresión de un fragmento de la

1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); 1989.

✉ Autor de correspondencia

proteína transmembránica gp-41, se sintetizó un oligo de 269 bases y su complementario, correspondiente a 83 aminoácidos de la proteína perteneciente a la envoltura del VIH-1. Este gen, que contiene el epítopo inmunodominante de la gp-41, se fusionó al gen que codifica para un péptido estabilizador, constituido por los primeros 58 aminoácidos pertenecientes al fragmento N-terminal de la proteína interleuquina-2 humana. El gen resultante se clonó bajo el control del promotor triptófano de *E. coli* y, como señal de terminación de la transcripción, se empleó la del fago T4, lo cual dio lugar al plasmidio recombinante (pHIVTA-1) [2]. La proteína de fusión expresada con un peso molecular de 16.6 kDa será denominada, en lo adelante, p-41.

Preparación del inóculo

Las diferentes células de *E. coli* transformadas, pertenecientes al Banco de Células de Trabajo (0.1 mL), se cultivaron en zaranda (G-25 New Brunswick Scientific Co. Inc. EE.UU.) durante 8 horas a 37 ºCen 5 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicillina y 100 µg/mL de triptófano. Las células se colectaron al inicio de la fase logarítmica del crecimiento y se transfirieron a 100 mL del medio M9 [3] suplementado con 1% de hidrolizado ácido de caseína (Oxoid, Inglaterra), 2% de glucosa (BDH, Inglaterra), 50 µg/mL de ampicillina y 100 µg/mL de triptófano. El cultivo en zaranda se mantuvo durante 8 horas a 37 ºC y 250 rpm. Este se utilizó como inóculo para los experimentos siguientes. En todos los casos la densidad óptica (D.O.) inicial de los cultivos se ajustó entre 0.05 y 0.1 unidades de D.O., a una longitud de onda de 530 nm.

Metodología para el estudio de la influencia de la concentración del inductor ácido 3-β indolacrílico

Para los cultivos en zaranda se utilizaron erlenmeyers de 250 mL que contenían 50 mL del medio M9 suplementado con 1% de hidrolizado ácido de caseína, 0.5% de glucosa, 0.1% de extracto de levaduras, 50 µg/mL de ampicillina (medio de producción) y 20 µg/mL de triptófano. Después de 1 hora de cultivo, se realizó la inducción del sistema de expresión del promotor triptófano con la adición de diferentes concentraciones del inductor ácido 3-β indolacrílico (0, 20, 40 y 60 µg/mL). Las condiciones de crecimiento fueron 37 ºC de temperatura y 250 rpm de agitación. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 12 horas. Para la cinética de fermentación se tomaron muestras de cultivo cada 4 horas.

Metodología para el estudio de la influencia de la concentración del represor triptófano

Para los cultivos en zaranda se utilizaron erlenmeyers de 250 mL que contenían 50 mL del medio de producción, suplementado con diferentes concentraciones iniciales de triptófano (0, 10, 20, 40, 60 y 100 µg/mL) sin la adición del ácido 3-β indolacrílico como inductor. La activación del promotor triptófano se realizó mediante el consumo de la concentración inicial del triptófano del medio de cultivo. Las condiciones de crecimiento fueron 37 ºC de temperatura y 250 rpm de agitación. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 12 horas. Para la cinética de fermentación se tomaron muestras de cultivo cada 4 horas.

Evaluación del proceso fermentativo de la proteína p-41 a nivel de 50 L de cultivo

El escalado del proceso fermentativo de la proteína p-41 a nivel de 50 L de cultivo se realizó por el método de ensayo y error teniendo en cuenta la experiencia desarrollada en trabajos anteriores [4, 5]. Las células preparadas como inóculo se transfirieron a un fermentador de 7 L (5 L de volumen efectivo) y se cultivaron a una temperatura de 37 ºC, pH 7.0, 1 vvm de aeración y 350 rpm de agitación durante 8 horas. Posteriormente, todo el cultivo se transfirió como inóculo a un fermentador de 70 L que contenía 50 L del medio de producción. Las condiciones de fermentación fueron: 37 ºC de temperatura, pH 7.0, 1 vvm de aeración y 350 rpm de agitación. La activación del promotor triptófano se realizó mediante el con-sumo de la concentración inicial de triptófano utilizada en el medio de cultivo (10 µg/mL de triptófano). El cultivo se mantuvo en estas condicio-nes durante 12 horas. Para la cinética de fermentación se tomaron muestras de cultivo cada 4 horas.

Escalado del proceso fermentativo de la proteína p-41 a nivel de 200 L de cultivo

Para el escalado del proceso productivo de la proteína p-41 a nivel de 200 L se desarrolló una correlación entre el coeficiente de transferencia de oxígeno y las variables de operación del sistema, tomando como base las condiciones desarrolladas a nivel de 50 L de cultivo, y como punto de partida, la ecuación de Wang y col. [6]. Utilizando la correlación desarrollada y conociendo los parámetros de fermentación de 50 L, se determinaron los parámetros correspondientes a 200 L: 0.75 vvm de aeración y 240 rpm de agitación. A continuación se realizó el proceso fermentativo con vistas a validar la efectividad de las relaciones utilizadas.

Las células preparadas como inóculo se transfirieron a un fermentador de 7 L (5 L de volumen efectivo) y se cultivaron a 37 ºC, con un pH 7.0, 1 vvm de aeración y 350 rpm de agitación durante 8 horas. Seguidamente se transfirieron a un fermentador de 300 L (B.E. Marubishi, Japón) que contenía 200 L del medio de producción. La activación del promotor triptófano se realizó mediante el agotamiento de la concentración inicial de triptófano utilizada en el medio de cultivo (10 µg/mL). Las condiciones de crecimiento fueron 37 ºC de temperatura y pH 7.0. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 12 horas. Para la cinética de fermentación se tomaron muestras de cultivo cada 4 horas.

Métodos analíticos

Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular se determinó mediante turbidimetría. La D.O. del cultivo se determinó a una longitud de onda de 530 nm con ayuda de un fotocolorímetro (EDMA, Japón).

Estimación del nivel de expresión

El nivel de expresión de la proteína recombinante presente en los extractos de células completas se estimó

2. Novoa LI, Machado JA, Fernández JR, Benitez JV, Narciandi RE, Rodríguez JL, Estrada MP, *et al*. Method for the expression of heterologous proteins produced in fused form in *E. coli*, use thereof, expression vectors and recombinant strains. European Patent Application 1994, no. 90202108.8.

3. Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) 1972.p.431-32.

4. Narciandi RE, Rodríguez L, Rodríguez E, Díaz R, Delgado J, Herrera L. High level production of recombinant Invertase in Hansenula polymorpha. Biotechnology Letters 1995;17:949-52.

5. Narciandi RE. High-Level Production of p36 from HIV-2 in Fed Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. J Ferment Bioeng 1996;81:360-62.

6. Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunill P, Humphrey AE, Lilly MD. Fermentation and Enzyme technology, John Wiley and Sons (USA) 1979, Chapters 9 and 10.

7. Sumner JV, Somers GF. In: Laboratory of Biological Chemistry, 2nd ed. Academic Press. Inc (NY) 1949.p.38-9.

a partir de las electroforesis en gel de poliacrilamida mediante densitometría, con el empleo de un densitómetro Laser (Pharmacia, Suecia).

Determinación de la concentración de glucosa

La concentración de glucosa se determinó mediante el método del ácido dinitro-salicílico [7].

Procesamiento estadístico de los datos

Los valores reportados se corresponden con las medias de al menos 3 procesos productivos independientes, y en cada determinación se realizaron 3 replicas independientes.

Resultados

Influencia de la concentración del inductor en la producción de la proteína p-41

Inicialmente se desarrolló un proceso fermentativo para la producción de la proteína p-41, con el empleo del ácido 3-β indolacrílico a una concentración de 20 μg/mL como inductor, proceso más utilizado en la literatura para la obtención de proteínas recombinantes expresadas bajo el control del promotor triptófano [8]. El empleo de este inductor es muy restringido cuando se pretende producir a escala piloto o a escala industrial, por ser un reactivo caro. En este trabajo se estudió el efecto de la concentración del inductor en la producción de la proteína p-41, con vistas a disminuir o eliminar su utilización durante el proceso fermentativo.

Los cultivos se realizaron a nivel de zaranda con un medio de producción suplementado con 20 μg/mL de triptófano. Después de 1 hora de cultivo, se realizó la inducción del sistema de expresión del promotor triptófano, adicionando diferentes concentraciones del inductor ácido 3-β indolacrílico (0, 20, 40 y 60 μg/mL).

Cuando el proceso se realizó en ausencia del inductor, la expresión de la proteína recombinante detectada fue mínima, ya que una concentración de 20 μg/mL de triptófano resultó ser suficiente para reprimir casi totalmente el promotor triptófano. Al utilizar concentraciones mayores de 20 μg/mL de ácido 3-β indolacrílico, el nivel de expresión se mantuvo constante al 20% (Figura 1). Un comportamiento similar se observó al analizar el efecto de la concentración del ácido 3-β indolacrílico sobre la producción volumétrica y la productividad del proceso. En todos los casos, el crecimiento celular se mantuvo aproximadamente constante.

Los resultados anteriores indican que para eliminar el agente inductor del proceso fermentativo es necesario evaluar la influencia de la concentración del represor triptófano en la producción de la proteína p-41.

Influencia de la concentración de triptófano en la producción de la proteína p-41

Los cultivos se realizaron en zaranda con el medio de producción suplementado con diferentes concentraciones iniciales de triptófano (0, 10, 20, 40, 60 y 100 μg/mL) sin el empleo del ácido 3-β indolacrílico como inductor. La activación del promotor triptófano se realizó mediante el consumo de la concentración inicial del triptófano utilizado en el medio de cultivo.

En la figura 2 se observa que en ausencia del represor en el medio de cultivo o a bajas concentraciones de este (entre 0 y 10 μg/mL), se obtiene una expresión elevada (entre 23 y 24%). Las concentraciones mayores de 10 μg/mL de triptófano disminuyeron drásticamente el nivel de expresión y, por tanto, la producción de la proteína recombinante; sin embargo, el crecimiento celular no se afectó. Por los resultados se determinó realizar la inducción del sistema de expresión por derepresión, utilizando 10 μg/mL de triptófano en el medio de cultivo en ausencia del ácido 3-β indolacrílico.

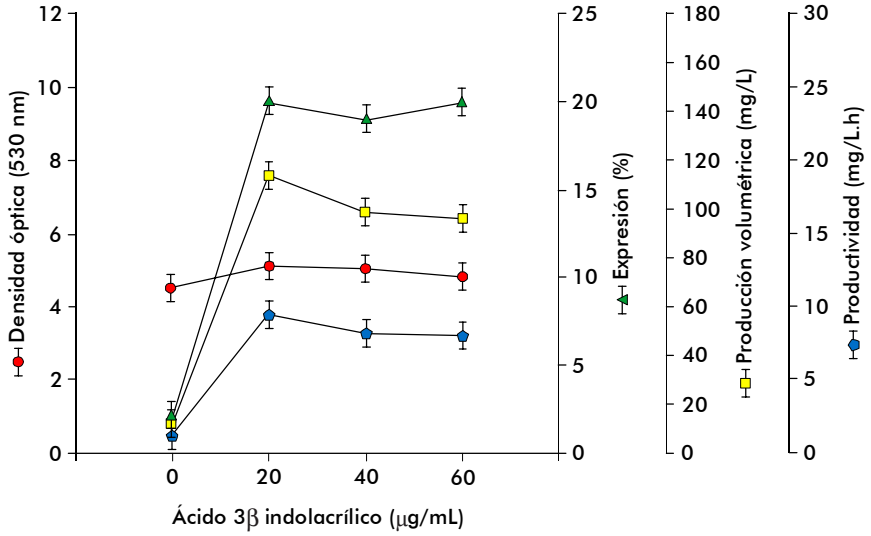

Figura 1. Influencia de la concentración del inductor ácido 3-β indolacrílico en la producción de la proteína p-41. Los cultivos se realizaron a nivel de zaranda utilizando erlenmeyers de 100 mL conteniendo el medio de cultivo de producción suplementado con 20 μg/mL de triptofano. Después de 1 hora de cultivo se realizó la inducción del sistema de expresión del promotor triptofano adicionando diferentes concentraciones del inductor (0, 20, 40 y 60 μg/mL de ácido 3-β indolacrílico). Las condiciones de crecimiento utilizadas fueron 37 °C de temperatura y 250 rpm de agitación. Los resultados graficados corresponden a las 12 horas de fermentación.

8. Narciandi RE, García J, Motolongo J, Machado JA, Benítez JV, Novoa LI, Herrera L. Production, isolation and semi-purification of the transmembranic gp-41 protein synthesized in *Escherichia coli*. Biotecnol Aplic 1993;10:36-40.

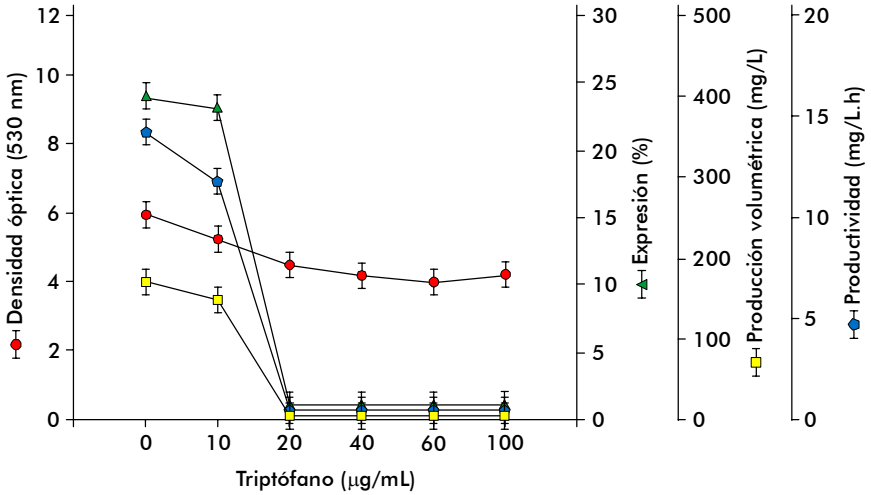

Figura 2. Influencia de la concentración del represor triptofano en la producción de la proteína p-41. Los cultivos se realizaron a nivel de zaranda utilizando erlenmeyers de 100 mL conteniendo el medio de cultivo de producción suplementado con diferentes concentraciones iniciales de triptofano (0, 10, 20, 40, 60 y 100 μg/mL) sin la utilización de ácido 3-β indolacrílico como inductor. La derepresión del promotor triptofano se realizó mediante el consumo de la concentración inicial de triptofano utilizada en el medio de cultivo. Las condiciones de crecimiento utilizadas fueron 37 °C de temperatura y 250 rpm de agitación. Los resultados graficados corresponden a las 12 horas de fermentación.

Evaluación del proceso productivo de la proteína p-41 a nivel de 50 L de cultivo

El proceso de fermentación de la proteína p-41 establecido en zaranda se evaluó a nivel de 50 L de cultivo. La figura 3A muestra un cultivo típico en el que el crecimiento celular se incrementa en función del tiempo de cultivo hasta obtener valores de D.O. de 11 a las 12 horas, con una velocidad de crecimiento en la fase logarítmica de 1.01 h^{-1}. Sin embargo, el nivel de expresión de la proteína p-41 se incrementó linealmente en función del tiempo de cultivo, y se obtuvo el 25% a las 12 horas.

Al analizar la producción volumétrica y la productividad del proceso fermentativo (Figura 3B), se observó que ambos parámetros se incrementaron en función del tiempo de cultivo hasta obtener valores de 207.5 mg/L y 17.29 mg/L.h al final del proceso, respectivamente. Además, en estas condiciones de producción, el rendimiento biomasa/glucosa y el rendimiento producto/glucosa obtenidos se incrementaron hasta 0.67 y 0.041, respectivamente.

Escalado del proceso productivo de la proteína p-41 con 200 L

Para realizar el escalado del proceso productivo a nivel de 200 L, se desarrolló una correlación entre el coeficiente de transferencia de oxígeno y las variables de operación del sistema. Se tomaron como base las condiciones desarrolladas con 50 L de cultivo.

Se utilizó como punto de partida la ecuación de Wang y col. [6]:

$$kla / H = (\alpha + \beta\, Ni)\,(Pg / V)^{0.77}\,(Vs)^{0.67}$$

kla: coeficiente de transferencia de oxígeno.

H: constante de Henry (depende del medio de cultivo. Se asume que el fluido es newtoniano).

α y β: constantes (dependen del número y tipo de impelente).

Pg: potencia consumida por el sistema gaseado.

V: volumen del tanque.

Vs: velocidad superficial del aire.

Ni: número de impelentes.

Es conocido que:

$$Pg\ \alpha\ (P^2\, N\, Di^3 / Q^{0.56})^{0.45}$$

y por tanto:

$$P = Np\, N^3\, Di^5\, \rho / gc$$

Considerando el régimen turbulento, la similitud geométrica y utilizando el mismo medio de cultivo en el escalado, entonces:

$$P\ \alpha\ N^3\, Di^5$$

Además:

$$Di\ \alpha\ Dt\ ;\ A\ \alpha\ Di^2\ ;\ Hi\ \alpha\ Di\ ;\ V\ \alpha\ Di^3$$

donde:

Di: diámetro del impelente.
Dt: diámetro del tanque.
Hi: altura del impelente.

Para fermentadores con igual número de impelentes y el mismo medio de cultivo:

$$kla\ \alpha\ (Pg / V)^{0.77}\,(Vs)^{0.67}$$

Sustituyendo (2, 4, 5 en 6):

$$kla\ \alpha\ N^{2.43}\, Q^{0.48}\, V^{0.28}$$

donde:

N: rpm.
Q: flujo de aire.
V: volumen útil.

Para realizar el escalado considerando kla constante:

$$(kla)_1 / (kla)_2 = (N_1 / N_2)^{2.43}\,(Q_1 / Q_2)^{0.48}\,(V_1 / V_2)^{0.28}$$

Para realizar un escalado de 50 L hasta 200 L

$V_2 = 4\ V_1$ $\qquad$ $(kla)_1 = (kla)_2$

$$1 = (N_1 / N_2)^{2.43}\,(Q_1 / Q_2)^{0.48}\,(V_1 / V_2)^{0.28}$$

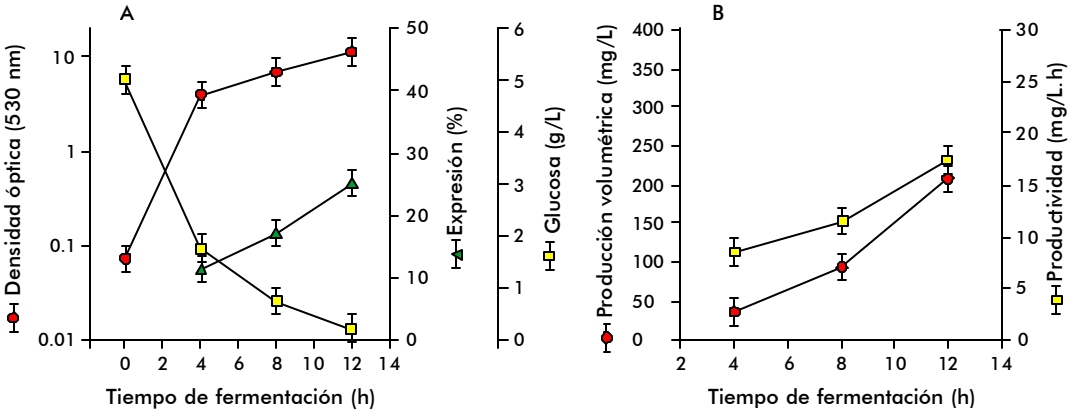

Figura 3. Evaluación del proceso productivo a nivel de 50 L de cultivo. El cultivo se desarrolló en un fermentador de 70 L conteniendo 50 L de medio de producción. Las condiciones de fermentación fueron: 37 °C, pH 7, 1 vvm y 350 rpm. La derepresión del promotor se realizó mediante el consumo de la concentración inicial de triptofano utilizada en el medio de cultivo (10 µg/mL). El cultivo fue mantenido en estas condiciones durante 12 horas. La cinética de fermentación se realizó tomando muestras cada 4 horas de cultivo. A) Perfiles característicos del proceso fermentativo, B) Producción de la proteína recombinante p-41.

$$1 = (N_1 / N_2)^{2.43} (Q_1 / Q_2)^{0.48} (1 / 4)^{0.28}$$
$$1 = 0.678 (N_1 / N_2)^{2.43} (Q_1 / Q_2)^{0.48}$$

se obtiene:

$$N_2 = 0.65\ N_1 (vvm_1 / vvm_2)^{0.20} = 0.852\ N_1 (Q_1 / Q_2)^{0.20}$$

Utilizando la relación finalmente obtenida y conociendo los parámetros de fermentación con 50 L, se determinaron los parámetros correspondientes a 200 L (aeración 0.75 vvm y 240 rpm de agitación). A continuación, se realizó el proceso fermentativo con vistas a validar la efectividad de las relaciones empleadas.

La figura 4A muestra un cultivo típico en un volumen de 200 L. Los perfiles correspondientes al crecimiento celular, el consumo de glucosa y la expresión de la proteína p-41 fueron muy similares a los obtenidos para 50 L. La velocidad de crecimiento específica fue μ=0.97 h^{-1}, mientras que el nivel de saturación de oxígeno disuelto disminuyó hasta el 85%.

Al analizar la producción volumétrica, así como la productividad del proceso fermentativo (Figura 4B), se observó que ambos parámetros se incrementaron en función del tiempo de cultivo hasta obtener valores de 321 mg/L y 26.83 mg/L.h, respectivamente. Estos valores son 1.55 veces superiores a los niveles alcanzados en la escala de 50 L de cultivo. De la misma forma se logró un incremento en el rendimiento biomasa/glucosa y el rendimiento producto/glucosa hasta valores de 0.72 y 0.064, respectivamente, al ser comparados con los valores reportados en la escala anterior.

Discusión

Los promotores regulados han sido los más comúnmente empleados para permitir el control de la expresión de los genes clonados mediante la manipulación de parámetros medio ambientales. En la literatura especializada se han descrito diferentes vías para inducir la expresión de proteínas heterólogas clonadas bajo el control del promotor triptófano [8-11]. El método más utilizado involucra agentes competitivos análogos al triptófano, tales como el ácido 3-β indolacrílico y el ácido indolyl-3-propiónico [12, 13].

Como se ha reportado en la literatura, el comportamiento de la expresión de proteínas recombinantes, expresadas bajo el control del promotor triptófano, depende de factores como la composición del medio de cultivo, las condiciones del cultivo y, fundamentalmente, las condiciones de inducción [6, 12, 14, 15].

Al analizar la influencia de la concentración del inductor sobre la producción de la proteína p-41, se observó que el nivel de expresión es independiente de la concentración del inductor (Figura 1). Este comportamiento no se corresponde con lo reportado en la literatura, en la que se plantea que a concentraciones mayores de 25 µg/mL se reducen drásticamente la productividad y la expresión de las proteínas recombinantes [16]. Esto evidencia que otros factores pueden estar influyendo en el proceso, como: las características particulares de la proteína clonada, la cepa hospedera utilizada y las condiciones del cultivo [15].

Cuando el cultivo se realizó en ausencia del inductor, se observó que el nivel de expresión decreció drásticamente, debido a que la concentración inicial de 20 µg/mL de triptófano en el medio de cultivo reprimió totalmente la expresión de la proteína, lo que coincide con lo reportado por otros autores [12, 15].

Los resultados de este estudio evidencian que al utilizar bajas concentraciones del represor triptófano, o en ausencia de este, se obtienen altos valores de expresión y productividad (Figura 2) en comparación con los obtenidos al inducir con ácido 3-β indolacrílico. Este resultado permite eliminar el inductor del proceso fermentativo, el cual eleva el costo del proceso a escalas mayores. Estos resultados se corresponden con los reportados por diferentes autores que plantean que las proteínas recombinantes pueden ser expresadas por derepresión del sistema de expresión una vez que las células agotan el triptófano añadido en el medio de cultivo [10-12, 15].

Al utilizar altas concentraciones de triptófano, no se observó la expresión de la proteína (Figura 2). Esto se debe a que cuando el aminoácido triptófano se encuentra en exceso, se activa el complejo triptófano-proteína represora, lo cual impide que la polimerasa del ARN se

9. Yanofsky C. Advancing our knowledge in Biochemistry, Genetics, and Microbiology through studies on tryptophan metabolism. Annual Review of Biochemistry 2001;70:1-37.

10. Yanofsky C. Using studies on Tryptophan Metabolism to Answer Basic Biological Questions. The Journal of Biological Chemistry 2003;278:10859-78.

11. Yanofsky C. The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating trp operon expression in *E. coli* versus *B.subtilis*. Trends in Genetics 2004;20: 367-74.

12. Shimizu N, Fukuzono S, Harada Y, Fujimori K, Gotoh K, Yamazaki Y. Mass Production of Human Epidermal Growth Factor Using Fed-Batch Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng 1991;38:37-42.

13. Pulliam TR, Winston S, Bentley WE. Tryptophan regulated expression and aqueous two-phase separation of recombinant HIV-fusion peptides. Enzyme and Microbial Technology 1997;20:46-51.

14. Narciandi RE, Delgado A. Production of the recombinant p36 protein from HIV-2 in *Escherichia coli* using the trp promoter. Biotechnol Lett 1992;14:1103 08.

15. Bass SH, Yansura DG. Application of the *E.coli* trp promoter. Mol Biotechnol 2000;16:253-60.

16. Shimizu N, Fukuzono S, Nishimura N, Odawara Y, Fujikawa K. Cultivation of *Escherichia coli* harbouring hybrid plasmids. J Ferment Technol 1987;65:7-10.

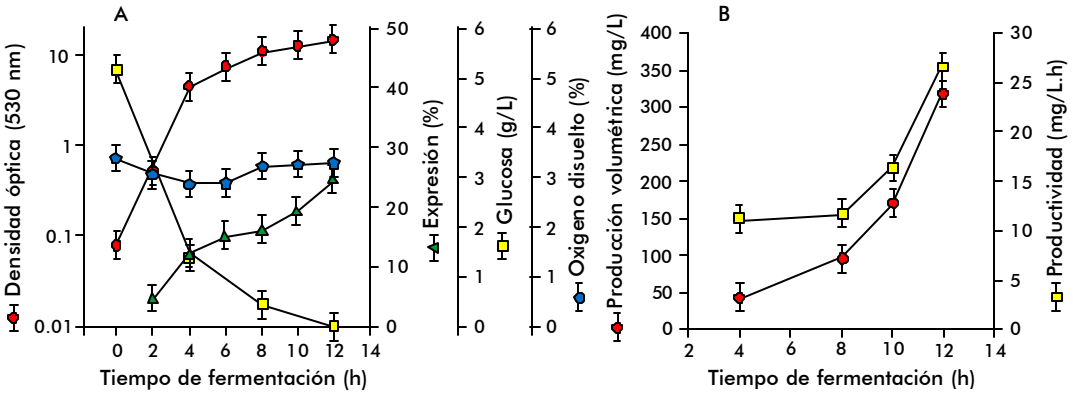

Figura 4. Escalado del proceso productivo a nivel de 200 L de cultivo. El cultivo se desarrolló en un fermentador de 300 L conteniendo 200 L de medio de producción. Las condiciones de fermentación fueron: 37 °C, pH 7, 0.75 vvm y 240 rpm. La derepresión del promotor triptofano se realizó mediante el consumo de la concentración inicial de triptofano utilizada en el medio de cultivo (10 µg/mL). El cultivo fue mantenido en estas condiciones durante 12 horas. La cinética de fermentación se realizó tomando muestras cada 4 horas de cultivo.
A) Perfiles característicos del proceso fermentativo, B) Producción de la proteína recombinante p-41.

una al promotor *trp* y, por tanto, se detiene la síntesis del gen de interés [10-12]. Finalmente, se estableció la producción de la proteína p-41 por derepresión del sistema de expresión, al añadir 10 µg/mL de triptófano en el medio de cultivo.

Los niveles de expresión obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados anteriormente al expresar diferentes fragmentos correspondientes a la proteína gp-41 del VIH-1 con fines diagnósticos [17-19].

Los resultados del estudio coinciden con lo reportado en la literatura, en la cual se evidencia que la expresión de proteínas recombinantes depende de diferentes factores, de los cuales, la influencia de la composición del medio de cultivo desempeña una función fundamental [20, 21].

Al realizar la evaluación del proceso productivo de la proteína p-41 a 50 L de cultivo, se observó un incremento del crecimiento celular en 2.4 veces con respecto al valor obtenido en zaranda. Sin embargo, el nivel de expresión fue muy similar al obtenido anteriormente a esa misma escala (Figura 3A). La producción volumétrica y la productividad del proceso fermentativo (Figura 3B) se incrementaron 1.4 veces y 1.1 veces, respectivamente, en comparación con los valores obtenidos en zaranda. Este comportamiento podría explicarse por las mejores condiciones de aeración y de agitación en la escala de 50 L, que benefician significativamente el crecimiento celular, así como la producción de las proteínas recombinantes [22].

Utilizando la correlación desarrollada entre el coeficiente de transferencia de oxígeno y las variables de operación del sistema, se realizó el escalado del proceso productivo de 50 L hasta 200 L de cultivo. En ambas escalas, los perfiles correspondientes a los diferentes parámetros determinados fueron similares (Figura 4). Sin embargo, en la escala de 200 L se obtiene siempre un incremento significativo de hasta 1.55 veces en los valores finales. Este comportamiento se explica por el incremento en 1.66 veces del nivel de producción de las proteínas totales, al tiempo que se logró el mismo nivel de expresión final de la proteína p-41. Los resultados se deben al mejoramiento de las condiciones de cultivo logradas en 200 L, en las que el nivel de estabilidad plasmídica fue mayor que el 95%, con un nivel de saturación de oxígeno disuelto por encima del 85% durante la fase de crecimiento exponencial. Estos valores son superiores a los reportados como limitantes para el crecimiento y la expresión de genes heterólogos [23].

Al realizar el escalado del proceso, se observó que el comportamiento de los parámetros analizados no se diferenciaban del de los parámetros obtenidos en 50 L. Los resultados del proceso en 200 L fueron, incluso, más favorables, por lo que el escalado del proceso fermentativo fue efectivo. La metodología desarrollada puede utilizarse en el escalado de otras proteínas recombinantes que sean expresadas en la *E. coli* bajo diferentes promotores y especialmente bajo el control del promotor triptófano.

Recibido en marzo de 2005. Aprobado en junio de 2005.

17. Soutschek E, Hoflacher B, Motz M. Purification of a recombinantly produced transmembrane protein (gp-41) of HIV-1. J Chrom 1990;521:267-77.

18. Wilson KM, Gerometta M, Rylatt DB, Bundesen PG, McPhee DA, Hillyard CJ, Kemp BE. Rapid whole blood assay for HIV-1 seropositivity using an fab-peptide conjugate. J Immunol Method 1991;138: 111-19.

19. Coia G, Hudson PJ, Lilley GG. Construction of recombinant extended single-chain antibody peptide conjugates for use in the diagnosis of HIV-1 and HIV-2. J Immunol Method 1996;192:13-23.

20. Yadwad VB, Wilson S, Ward OP. Production of human epidermal growth factor by an ampicillin resistant recombinant *Escherichia coli* strain. Biotechnol Lett 1994;16:885-90.

21. Kleman GL, Strohl WR. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. Curr Opin Biotechnol 1994;5:180-6.

22. Li X, Robbins JW, Taylor KB. Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. J Ind Microbiol 1992;9:1-10.

23. Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Ross A, Deckwer WD. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. J Biotechnol 1991;20:17-28.