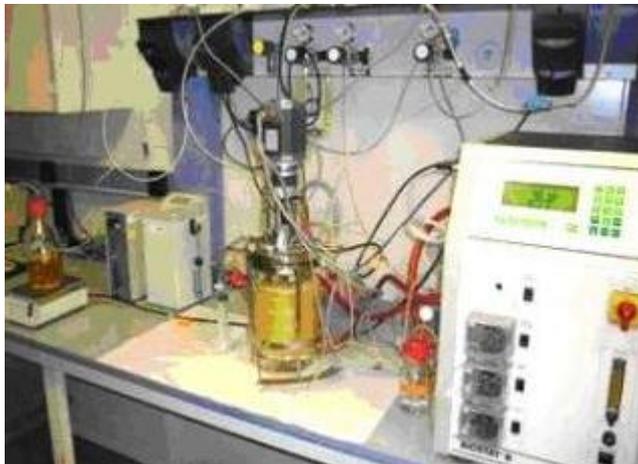


## Nuevo método para medir un inductor de proteínas recombinantes

05/2012 - **Química.** El IPTG es un azúcar sintético análogo de la lactosa que se utiliza para la inducción de la producción de proteínas en la bacteria *Escherichia coli*. En la presente tesis doctoral se ha desarrollado por primera vez un método analítico para medir el IPTG en el medio de cultivo y dentro de las células que ha permitido estudiar el comportamiento de inducción en cultivos de alta densidad celular así como optimizar su dosis para obtener la máxima cantidad de producto.



Sistema experimental utilizado en este trabajo. Cultivo alimentado en biorreactor de tanque agitado.

El operón *lac* es un grupo de tres genes que regulan el transporte y el metabolismo de la lactosa que utiliza la bacteria *E. coli* como fuente de carbono. Este sistema de regulación génica se utiliza como modelo didáctico en varios Grados de las Ciencias Experimentales (biología, biotecnología, microbiología, ...). Aunque se lleva estudiando el operón *lac* durante décadas, este sigue siendo uno de los paradigmas de la regulación génica. Los avances en biotecnología han permitido desarrollar factorías celulares para la producción de proteínas utilizando sistemas de expresión derivados del operón *lac*. Una de las estrategias operacionales empleadas más comúnmente es el cultivo alimentado en un biorreactor de tanque agitado (ver fotografía) donde se puede obtener hasta 100 gramos de peso seco celular por cada litro de cultivo.

Antes de esta tesis no se disponía de ninguna herramienta analítica que pudiera cuantificar el IPTG, el cual se emplea como inductor de proteínas recombinantes (fármacos, productos alimenticios, cosméticos, ...). Nuestro grupo de investigación ha podido desarrollar un método rápido y muy fiable sin apenas manipulación de las muestras mediante HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) para poder medir este inductor. Este método ha sido validado bajo las guías de la FDA (Food and Drug Administration).

El análisis de la IPTG nos ha permitido estudiar cuáles son los patrones de distribución tanto en el medio de cultivo como dentro de las células y hemos observado diferentes comportamientos en función de la concentración inicial de IPTG utilizada. Hemos podido comprobar de forma experimental que nuestro sistema de expresión derivado del operón *lac* se comporta de manera biestable ya que coexisten dos fenómenos de transporte del inductor: la difusión y el transporte activo mediante la proteína transmembrana *lac*-permeasa la que está codificada por uno de los tres genes que forman el operón *lac*. Otra posible explicación, es la coexistencia de células inducidas y otras no inducidas en el rango biestable.

Hemos observado que la *lac*-permeasa tiene un papel poco importante en concentraciones de inductor dentro del biorreactor por debajo de un umbral (40 micras IPTG) y esto coincide con valores intermedios de actividad de la proteína recombinante, mientras que por encima de este valor, la *lac*-permeasa tiene un rol importante transportando el inductor a través de la membrana celular coincidiendo con valores máximos de la proteína. En ausencia de esta proteína transportadora se puede asumir que el IPTG entra dentro de la célula por difusión. Esta elucidación ha sido uno de los temas de controversia ampliamente discutidos en la literatura.

En concreto, la proteína recombinante producida es una aldolasa que se utiliza como biocatalizadores para sintetizar compuestos que tienen potencial aplicación en la industria farmacéutica. Desde el punto de vista de producción, hemos podido obtener la máxima actividad de proteína recombinante utilizando una concentración veinticinco veces menor que la recomendada por el fabricante permitiendo así un ahorro económico importante.

Las principales aportaciones de este trabajo de tesis han sido el desarrollo de un método analítico para medir el IPTG, una molécula utilizada como inductor de proteínas recombinantes y obtener datos experimentales que se han contrastado con hipótesis teóricas y modelos matemáticos que se habían realizado anteriormente. Así pues, también hemos podido minimizar la cantidad necesaria de inductor para obtener el máximo de nuestra proteína de interés.

Alfred Fernández Castañé

Departament d'Enginyeria Química

"Study of transport Mechanisms involved in IPTG uptake by E.coli in high cell density cultures" Tesis doctoral de Alfred Fernández Castañé defendida el 20 de abril de 2012 bajo la dirección de Josep López Santín y Glòria Caminal Saperas.