



### CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR EN MODO LOTE PARA LA PRODUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR UNA CEPA DE *Escherichia coli* MODIFICADA EN SU SISTEMA DE TRANSPORTE DE SUSTRATO

René Soto Martínez<sup>1</sup>, Luis Caspeta Guadarrama<sup>1</sup>, Guillermo Gosset Lagarda<sup>2</sup>, Francisco Bolívar Zapata<sup>2</sup>, Blanca Lilia Barrón<sup>3</sup>, O. Tonatiuh Ramírez Reivich<sup>1</sup>, Alvaro R. Lara R.<sup>4</sup>

Departamentos de <sup>1</sup>Medicina Molecular y Bioprocesos y de <sup>2</sup>Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM; <sup>3</sup>Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

<sup>4</sup> Departamento de Procesos y Tecnología de la UAM-Cuajimalpa

Fax: (777) 3138811, Correo Electrónico: rsoto@ibt.unam.mx

Palabras clave: ADN plasmídico, cultivos por lote, altas concentraciones de sustrato.

**Introducción.** Los avances en tecnologías como la vacunación especializada con ADN y la terapia génica, han generado una alta demanda de ADN plasmídico. La producción de ADN plasmídico se realiza generalmente empleando a *E. coli* en cultivos a alta densidad celular con el objeto de incrementar los rendimientos volumétricos del proceso<sup>1</sup>. Lo anterior no puede ser logrado mediante cultivos por lote ya que existen limitaciones técnicas y la producción de metabolitos (especialmente el acetato) afectaría el desempeño de *E. coli* en el cultivo. Una solución al inconveniente anterior es el empleo de una cepa de *E. coli* modificada en su sistema natural de transporte de sustrato (PTS)<sup>2</sup>, la cual presenta un muy bajo sobreflujo metabólico. Esto permite utilizar altas concentraciones de sustrato inicial, obteniendo altas densidades celulares en cultivos por lote con una muy baja acumulación de acetato en el medio de cultivo<sup>3</sup>. El presente trabajo pretende explorar dicha estrategia para incrementar la productividad de ADN plasmídico en los cultivos de *E. coli*.

**Metodología.** Se empleó como modelo de ADN plasmídico una vacuna experimental contra parotiditis<sup>4</sup>. La cepa bacteriana empleada fue la W3110 PTS<sup>-</sup>GalP<sup>+</sup> (denominada VH33) y su cepa parental (W3110). Se usó un medio de cultivo químicamente definido con glucosa como fuente de carbono (a concentraciones de 5, 50 y 100 g/L) y ampicilina como presión de selección. Los cultivos se realizaron en biorreactores de laboratorio de 1 L, en condiciones completamente aerobias, temperatura de 37 °C y pH de 7.0. La biomasa se determinó mediante peso seco. El ADN plasmídico fue extraído mediante un kit comercial (Qiagen), y se cuantificó por espectrofotometría. La cuantificación de glucosa residual se llevó a cabo con un analizador bioquímico YSI. El acetato se cuantificó mediante HPLC.

**Resultados y discusión.** En el cuadro 1 se resume el desempeño de la cepa modificada a diferentes concentraciones de glucosa inicial. El cultivo de dicha cepa no mostró acumulación de acetato, inclusive a una concentración de glucosa inicial de 100 g/L, aunque a esta concentración la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento biomasa sustrato ( $Y_{X/S}$ ) mostraron un

decremento del 48 % y del 35 %, respecto a los cultivos con 5 g/L de glucosa. En contraste, se observó una acumulación de 0.6 g/L de acetato en los cultivos de la cepa W3110 a concentraciones de glucosa tan bajas como 5 g/L. Los máximos rendimientos volumétricos de los cultivos con 100 g/L de glucosa fueron similares a los de otros procesos de producción reportados previamente<sup>1</sup>.

Cuadro 1. Desempeño de la cepa VH33 con glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo.

Glucosa (g/L)	5	50	100
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.25 (± 12 %)	0.26 (± 10 %)	0.14 (± 2 %)
$Y_{X/S}$ (g <sub>biomasa</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	0.57 (± 7 %)	0.44 (± 1 %)	0.37 (± 3 %)
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	3.0 (± 6 %)	23.5 (± 7 %)	39.6 (± 5 %)
$P_{m\acute{a}x}$ (mg <sub>plasmido</sub> /L)	10.22 (± 15 %)	76.81 (± 9 %)	93.61 (± 32 %)
Productividad (mg <sub>plasmido</sub> /(Lh))	1.24 (± 26 %)	4.79 (± 17 %)	3.88 (± 47 %)

**Conclusiones.** El empleo de una cepa modificada en su sistema de transporte de glucosa permitió alcanzar altas densidades celulares sin acumulación de acetato en el medio de cultivo. Por lo tanto, la estrategia de cultivo propuesta es viable para obtener altos rendimientos de ADN plasmídico en cultivos por lote.

**Agradecimientos.** Financiamiento proporcionado por CONACYT (Ciencia Básica 84447), PROMEP 908065

#### Bibliografía.

- O'Mahony K, Freitag R, Hilbrig F, Müller P, Schumacher I. (2007). Strategies for high titre plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Proc. Biochem.* 42: 1039-1049.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotech.* 14: 1039-1049.
- Lara AR, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. (2008). Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 99(4): 893-901.
- Herrera ME, Barrón BL. (2007). Evaluación de una vacuna de DNA contra la infección del virus de la parotiditis humana (MuV). *Biología.* 11(1): 28-33.