



## **ESCALAMIENTO DESCENDENTE: ESTUDIO DEL EFECTO DE GRADIENTES DE pH EN CULTIVOS DE *E. coli* RECOMBINANTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.**

José T. Cortés, Nohemí Flores, Francisco Bolívar, Alvaro R. Lara, **Octavio T. Ramírez**

Departamentos de Medicina Molecular y Bioprocesos y de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología,

Universidad Nacional Autónoma de México; Cuernavaca Morelos 62210; tonatiuh@ibt.unam.mx

*Heterogeneidades de pH, respuesta transcripcional, estrés metabólico, vacuna*

El escalamiento descendente es un acercamiento conceptual que ofrece herramientas experimentales para estudiar, a nivel laboratorio y de manera práctica, eficiente y económica, condiciones medioambientales que típicamente se presentan en biorreactores de gran escala. En particular, el escalamiento descendente es de gran utilidad para determinar el efecto de heterogeneidades ambientales, tales como oxígeno disuelto y concentración de sustratos, sobre el metabolismo y fisiología celular, así como sobre el desempeño de un bioproceso particular. Los gradientes ambientales que se pueden presentar en biorreactores de gran escala generalmente son el resultado de limitaciones físicas o restricciones inherentes en el diseño de sistemas de producción a nivel industrial. Una variable particularmente importante es el pH, ya que en biorreactores de gran escala se pueden presentar gradientes, de hasta varias unidades, entre las zonas de adición de álcali y/o ácido y zonas bien mezcladas del seno del líquido. A la fecha, existen pocos estudios de escalamiento descendente del pH debido a la dificultad de oscilar continuamente esta variable sin generar un problema de formación de sales y aumento de osmolaridad. *E. coli* es uno de los hospederos más empleados alrededor del mundo para producir proteínas recombinantes, siendo imprescindible no solo en aplicaciones biotecnológicas sino también en estudios básicos de muchas disciplinas. Consecuentemente, la información existente sobre fisiología y metabolismo de este microorganismo es realmente extensa. No obstante, un tema de gran importancia pero muy poco estudiado es el comportamiento de *E. coli* recombinante productora de ADN plasmídico al ser expuesta a fluctuaciones medioambientales, particularmente de pH.

En el presente trabajo se diseñó un sistema de escalamiento descendente, constituido por dos biorreactores de tanque agitado interconectados, cada uno con control de pH, independiente y diferente, y entre los que se recirculó caldo de cultivo para simular tiempos de residencia entre 60 y 240 s típicos de biorreactores de gran escala. En cultivos por lote fue posible generar gradientes de pH hasta de 0.9 unidades, con respecto a la condición control de 7.0, y determinar su efecto en parámetros cinéticos y estequiométricos, así como cambios en la topología del ADN plasmídico producido. Asimismo, se determinó el efecto de la respuesta transcripcional de 10 genes relacionados al estrés alcalino, incluyendo varios relacionados con el transporte de iones, el catabolismo de aminoácidos y reguladores transcripcionales.

Se mostrará cómo *E. coli* recombinante responde de manera diferencial entre el estrés alcalino constante y el intermitente. Los resultados obtenidos son de utilidad para el diseño de nuevas cepas bacterianas que puedan contender mejor con el problema de gradientes de pH, así como para desarrollar mejores diseños de biorreactores y estrategias de operación de cultivos a gran escala.

1. Borja M, Meza E, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR. 2012. Engineering *E. coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb Cell Fact* 11:132.
2. Lara AR, Galindo E, Ramírez OT, Palomares LA. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol Biotechnol* 34: 355-381.
3. Lara AR, Palomares LA, Ramírez OT. 2014. Scale-down: Simulating large-scale cultures in the laboratory. In: *Industrial Biotechnology*. C Wittmann and J Liao (eds). Wiley Biotechnology Series. In press.
4. Lara AR, Ramírez OT. 2012. Plasmid DNA Production for Therapeutic Applications. *Methods Mol Biol* 824: 271-303.