



EFFECTO DE LA PRESENCIA Y LONGITUD DEL PLASMIDO EN LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DE *E. coli* EN UN BIORREACTOR DE LOTE

Manuel Díaz de León Cabrero¹, Claudia Escudero Lourdes¹, Luis G. Navarro Tovar, María Isabel Isordia Jasso¹, Sergio Casas Flores², y Marco A. Sánchez Castillo¹

¹Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP

²División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

Tel. (444) 826 24 40, Fax. (444) 826 23 72, e-mail: masanchez@uaslp.mx

Palabras clave: velocidad específica de crecimiento, E. coli, biorreactor

Introducción. La producción de proteínas recombinantes a escala económicamente atractiva es un área de gran auge debido a sus aplicaciones en tratamiento médicos. La síntesis de estos productos de alto valor agregado requiere la optimización de condiciones y sistemas de reacción que favorezcan la máxima calidad del producto. Por esta razón, es necesario implementar biorreactores que controlen las variables que afectan el rendimiento de estos productos: temperatura, pH, fuente de carbono, agitación, concentración de oxígeno disuelto (COD) y, consecuentemente, la velocidad específica de crecimiento celular (μ). El control riguroso de estas variables permite realizar estudios cinéticos que evalúan el efecto de otros factores fundamentales. Por ejemplo, se ha documentado que para una misma cepa bacteriana la presencia intracelular de un plásmido se traduce en una disminución significativa de μ dado que los genes plasmídicos redirigen el metabolismo bacteriano hacia la síntesis de productos genéticos del plásmido y su replicación⁽¹⁾. Otros factores que tiene efecto sobre μ incluyen el número de copias intracelulares del plásmido y la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento. Este último factor afecta la integridad del plásmido y la inversión energética que implica a la célula metabolizar una u otra fuente de carbono. Nuestro grupo se propone implementar biorreactores de semilote para la síntesis de proteínas recombinantes, usando un sistema para la producción de interleucina humana-6 (hIL-6) en *E. coli* como modelo. En esta etapa del trabajo, se reporta el efecto de la presencia del plásmido pET43.1a y del mismo plásmido con el inserto del gen de la hIL-6, así como de la fuente de carbono sobre la μ de la cepa BL21 de *E. coli*.

Metodología. Los experimentos se realizaron en un reactor de lote de 250 mL de medio de cultivo semidefinido⁽¹⁾, a 37° C, presión atmosférica, COD aproximada de 7 mg/L. La μ se determinó para cultivos de la cepa BL21 de *E. coli* transformada con el vector de expresión pET-43.1 a(+), para aquellos transformados con la construcción pETHIL6 previamente generada en nuestro laboratorio y para cultivos de la cepa no transformada. Así mismo, se determinó el efecto de la fuente de carbono sobre la μ de la cepa BL21 de *E. coli* transformada con cualquiera de los plásmidos utilizando lotes con medios semidefinidos a base de glucosa ó glicerol.

Resultados y discusión. Durante la etapa de crecimiento celular la cepa BL21 de *E. coli* transformadas con el plásmido pET-43.1a(+) ó con la construcción pET-IL6 presentaron valores de μ significativamente inferiores con respecto a la cepa no transformada. Estos resultados son consistentes con reportes previos y sugieren la existencia de un desgaste metabólico que implica a la bacteria el mantener y copiar al plásmido. Por otro lado, el valor de μ no mostró diferencias significativas entre los cultivos de la cepa BL21 de *E. coli* transformada con cualquiera de los plásmidos, con y sin el inserto del gen hIL-6, a pesar de que la diferencia en la longitud de la cadena de transcripción de pETHIL-6 representa casi del doble con respecto al plásmido pET-43.1 a(+) el cual no contiene el inserto. La evaluación el efecto de la fuente de carbono sobre la μ de la cepa BL21 de *E. coli* tampoco mostró diferencias significativas. A este respecto se ha reportado⁽²⁾⁽³⁾ que la cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, la diferencia en la longitud de los plásmidos provoca un cambio significativo en la μ . Sin embargo esto no pudo demostrarse en este trabajo, lo que se puede deber a que la inversión energética que implica el transporte activo del glicerol hacia el interior de *E. coli*, tuvo un efecto más determinante sobre su metabolismo que la inversión energética para replicar el plásmido.

Conclusiones.

Bajo las condiciones experimentales usadas en este trabajo se determinó que la presencia intracelular del plásmido pET43.1a o de la construcción pETHIL6 en la cepa BL21 de *E. coli* produjo una disminución significativa en la μ .

Agradecimiento. Se agradece el apoyo del Programa de Inmersión a la Ciencia 2006 auspiciado por la UASLP

Bibliografía.

1. Tae Wan K, Bong Hyun Ch, Yong Keun Ch. (2005) Production of Soluble Human Interleukin-6 in Cytoplasm by Fed-Batch Culture of Recombinant *E. coli*, Biotechnol. Prog., vol. (21) 524-531.
2. Sang Yup L. (1996) High Cell Density Culture of *Escherichia coli*, TibTech., vol. (14) 98-105.
3. Patnaik, P. (2000) An Evaluation of Models for the Effect of Plasmid Copy Number on Bacterial Growth Rate, Biotech. Letters, vol. (22) 1719-1725.