

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO CELULAR DE *Daucus carota* Y LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA LTB-Syn

Christian Carreño Campos¹, Ma. Luisa Villarreal Ortega¹, Anabel Ortiz Caltempa¹ y Sergio Rosales-Mendoza²

Laboratorio de Plantas Medicinales (CEIB)¹, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62210, Cuernavaca, Morelos, chrcam12@gmail.com

Laboratorio de Biofármacos Recombinantes², Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, 78210, SLP México.

Palabras clave: *Daucus carota*, proteína recombinante, optimización

Introducción. Recientemente se desarrolló una vacuna candidata de origen vegetal contra α -Syn basada en una proteína quimérica que comprende la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* y tres epítomos específicos de α -Syn (LTB-Syn) (1). Se transformó genéticamente el antígeno LTB-Syn en callos de *D. carota* (zanahoria) con *Agrobacterium* y se indujeron respuestas humorales cuando se administró por vía oral en ratones (2). Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar enfoques prácticos que incrementen la producción de la proteína LTB-Syn mediante cultivos en suspensión celular de *D. carota*. En este sentido, los modelos factoriales y el método de superficie de respuesta (MSR) se han utilizado para la optimización en la composición de los medios de cultivo como una manera atractiva para aumentar la producción de proteínas recombinantes (3,4). El objetivo de este trabajo es diseñar y optimizar las condiciones del medio de cultivo con células en suspensión de *D. carota* para incrementar la producción de la proteína LTB-Syn.

Metodología. Se optimizó el medio de cultivo para incrementar la producción de biomasa y proteína LTB-Syn utilizando estrategias de diseños factoriales en cultivos de suspensión de la especie *D. carota*. Se utilizó el modelo de Plackett-Burman (PB) con el fin de determinar qué factores nutritivos y físicos son los más influyentes sobre el crecimiento celular y producción de la proteína. Para obtener las condiciones nutritivas óptimas del medio de cultivo se utilizó *in silico* la metodología de superficie de respuesta (MSR). Con los resultados de PB y MSR optimizado, se realizó experimentalmente una cinética de crecimiento en matraz con la línea MSRZ4 de *D. carota*. Los cultivos se mantuvieron a 120 rpm, en luz constante ($24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) a 25°C por 24 días. Se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento por triplicado (peso fresco y seco, μ , td, variación de pH, consumo de azúcares y producción de proteína).

Resultados. Los diseños factoriales de PB mostraron siete factores esenciales para el medio de cultivo, pero solo tres tenían mayor significancia (inóculo, urea, y pH) sobre la producción de biomasa y proteína de interés. En la fase de optimización con MSR utilizando el diseño Box-Behnken se analizaron las condiciones óptimas estimadas en el medio de cultivo para tener la máxima producción de biomasa: inóculo 9.97g/L, urea 3g/L y pH 5.0. Una vez validado el modelo con el medio de cultivo MSR se realizó la cinética de crecimiento en matraz, en donde se obtuvo 17.9 g/L de biomasa en peso seco a los 15 días, con un tiempo de duplicación de 6 días ($\mu = 0.12 \text{ d}^{-1}$), dos días menos que en los cultivos en medio MS estándar.

La variación de pH del medio en la cinética permaneció estable entre 5.1 y 5.6 desde el día 9 al 24. El consumo de azúcares se observó que durante los primeros 6 días de cultivo se fue hidrolizando la sacarosa a glucosa y fructosa, teniendo una preferencia por la glucosa y después por la fructosa hasta su consumo total entre los días 12 y 15 (Figura 1).

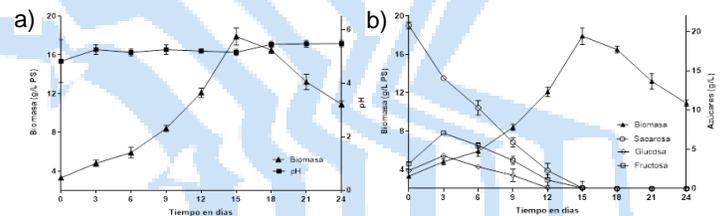


Fig. 1 Curva de crecimiento de la línea MSRZ4 de *D. carota* en matraz. (a) variación de pH, (b) consumo de azúcares.

Se observó que la máxima producción de la proteína LTB-Syn estaba a los 15 días del cultivo, obteniéndose 5 veces más los rendimientos de la proteína respecto al medio MS estándar (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimientos de biomasa y proteína LTB-Syn de la línea MSRZ4 de *D. carota* en matraz

Sistema	Biomasa (g/L PS)	LTB-Syn ($\mu\text{g}/\text{g PS}$)	$Y_{P/X}^C$ ($\mu\text{gP}/\text{gX}$)
Matraz (medio MSR)	17.9	2.83	0.16
Matraz (medio MS estándar)	15.4	0.92	0.03

Conclusiones. Los modelos experimentales estadísticos permitieron incrementar los rendimientos de biomasa y proteína LTB-Syn a nivel de matraz.

Agradecimiento. A CONACyT por la beca otorgada para la realización de este proyecto No. 858164.

Bibliografía.

- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, et al. (2005) *Neuron*. 46(6):857-868.
- Arévalo-Villalobos JI, Govea Alonso DO, Rosales-Mendoza S (2020). *J Biotechnol*. 309:75-80.
- Vasilev N, Grömping U, Lipperts A, Raven N, Fischer R, Schillberg S (2013). *Plant Biotechnol J*. 11, 867-874.
- Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadtmann J, Fischer R, Hellwig S (2010). *Biotechnol Bioeng*. 107(2), 278-289.