



## Producción de proteína recombinante en cepas de *Escherichia coli* con genoma reducido.

Elisa Ramírez Campos, Juan Carlos Sigala, Alvaro R. Lara, Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Ciudad de México, CP. 05370, 2183806379@alumnos.cua.uam.mx

**Palabras clave:** genoma reducido, bioproductos, GFP.

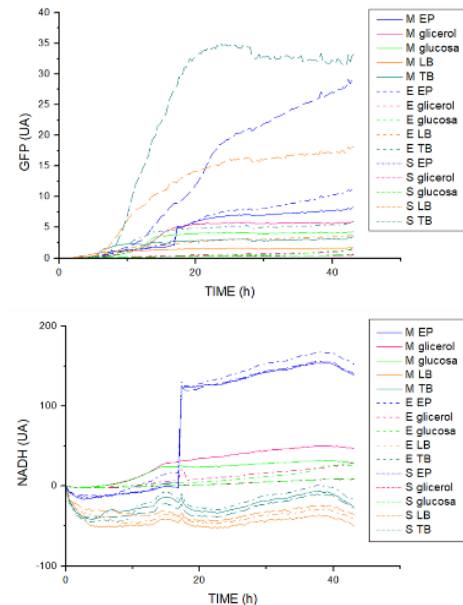
**Introducción.** *Escherichia coli* es el procarionte más utilizado para la producción de proteínas recombinantes. Recientemente, el genoma de *E. coli* ha sido reducido por la eliminación precisa de genes no esenciales y otras secuencias de ADN que le permiten ser genéticamente estable con un desempeño metabólico robusto (1). A nivel laboratorio se ha mostrado que un chasis de genoma reducido reduce la carga metabólica de la replicación y la expresión de un gran número de genes (2). Se han obtenido cepas con deleciones múltiples seriadas al genoma a partir de la cepa MG1655 (3). La cepa MDS42 tiene un genoma reducido en 14.3% respecto a su progenitora, y se comercialmente se nombró SG6265. La deleción adicional del gene *recA* dio origen a la cepa E6328. A pesar del interés que han causado dichas cepas, su capacidad de producción de proteínas recombinantes no ha sido evaluada sistemáticamente.

El objetivo de este trabajo es valorar el impacto de del genoma reducido de *E. coli* en la producción de una proteína recombinante (GFP) en modo lote y lote alimentado empleando medios convencionales y comerciales en microbiorreactores.

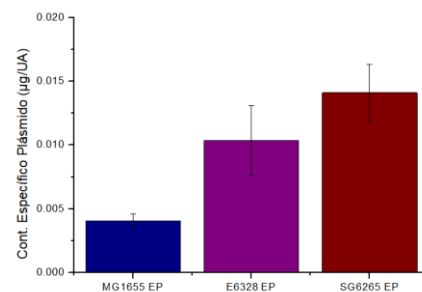
**Metodología.** Se transformaron las cepas MG1655 (ATCC, EUA), E6328 y SG6265 (Scarab Genomics, EUA) con el plásmido WF14, que tiene clonado el gen *gfp* de manera constitutiva (IBT-UNAM, México). Las cepas se cultivaron en placas de 48 microbiorreactores (BioLector, m2p-labs, Alemania). Se emplearon medios diferentes: Medio Mineral + 10g/L de glucosa (GLU) ó 10g/L de glicerol (GLI), caldo lisogénico (LB), Terrific Broth (TB) y medio EnPresso B (EP) (Biosilta, Alemania), que permite realizar cultivo en modo lote alimentado por liberación enzimática de glucosa. El volumen de cultivo fue de 800  $\mu$ L, agitación de 1500 rpm, y 37°C. Se monitoreó la Biomasa (UA), GFP (UA), NADH (UA), pH, y oxígeno disuelto. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico y se cuantificó en un Nanodrop (Thermo Fisher, MA, EUA).

**Resultados.** La cepa que más fluorescencia de GFP registró fue la E6328 en 3 medios diferentes (TB, EP, LB), seguido por las otras dos cepas en el medio EP. Las lecturas de fluorescencia en NADH, sugieren un metabolismo con comportamiento similar dependiendo el medio en el que se encuentran. Esto se puede observar en la figura 1 (Fig. 1). Se encontró, además que las cepas mutantes contienen un mayor contenido específico de plásmido que la cepa nativa, en el medio EP. La diferencia

en el contenido de ADN plasmídico entre las mutantes no fue significativa (Fig. 2).



**Fig. 1.** GFP y NADH. Gráficas que muestran la fluorescencia de GFP (arriba) y NADH (abajo) durante el cultivo de 43h de las 3 cepas (MG1655-M, línea; E6328, E -; y SG6265, S, -.-) en 5 medios.



**Fig. 2.** Contenido de plásmido por UA de biomasa, obtenido en el medio EP por cada cepa.

**Conclusiones.** Los resultados sugieren que las cepas con el genoma reducido generan más eficientemente el plásmido WF14 y la proteína GFP, sin alterar notoriamente el metabolismo de la célula.

**Agradecimientos.** Al CONACyT por la beca que financia el proyecto.

### Bibliografía.

1. Lee, JH., et al. (2009) *Microb. Cell Fact.* 8:2
2. Couto et al. (2018) *Microb. Cell Fact.* 17:8
3. Pósfai, G., et al. (2006) *Science* 312 (5776), 1044-1046.

