

## TERMOINDUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS DE *E. COLI* DE ALTA DENSIDAD CELULAR CON CONCENTRACIONES OSCILANTES DE GLUCOSA

Greta I. Reynoso-Cereceda<sup>1</sup>, Nestor O. Perez<sup>2</sup>, Norma A. Valdez-Cruz<sup>1</sup>, Mauricio A. Trujillo-Roldán<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, CDMX 04510. <sup>2</sup> Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., Tenancingo, Edo. De México 52400. \*maurotru@biomedicas.unam.mx

*Palabras clave:* *E. coli*, termoinducción, alta densidad celular.

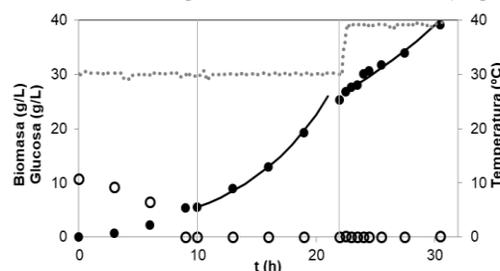
**Introducción.** La termoinducción de proteínas recombinantes (PR) en *E. coli* requiere del calentamiento del cultivo (>37°C), lo cual desencadena en las células la respuesta de choque térmico (1). Las PR tienden a agregarse en cuerpos de inclusión (CI), cuyas características estructurales difieren cuando se modifican las condiciones de cultivo (2). Los cultivos por lote alimentado, con la adición de un sustrato limitante (por ejemplo: glucosa), generan una alta densidad celular y elevadas productividades. Sin embargo, las deficiencias de mezclado en la escala productiva propician la formación de una zona de alta concentración de glucosa cercana al punto de adición (3,4). A su paso por esta zona, las células despiertan una respuesta transcripcional y metabólica para contender con el estrés generado (3). Sin embargo, se desconoce cómo dichas respuestas impactan en la producción de PR y su agregación en CI en cultivos termoinducidos.

El objetivo de este trabajo es analizar la arquitectura de los CI en *E. coli* W3110 termoinducible productora de rHuGM-CSF en cultivos de alta densidad celular ante gradientes de concentración de glucosa, reproducidos en un modelo de escalamiento descendente.

**Metodología.** La cepa de *E. coli* W3110 es propiedad de Probiomed S.A. de C.V. y contiene un plásmido con el gen codificante para rHuGM-CSF (factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos) bajo la regulación de un promotor termoinducible. Los cultivos control de alta densidad celular inician en fase lote en un STR de 1.2 L de volumen inicial en medio mínimo (1), seguida por la alimentación exponencial de glucosa. La producción de rHuGM-CSF se induce mediante calentamiento de 30°C a 39°C (Fig. 1). Para la reproducción de la zona de adición de glucosa se diseñó un sistema de dos reactores interconectados STR-PFR (Fig. 2). En dicho sistema se realizará un cultivo como se indicó para los cultivos control, con el punto de adición de glucosa a la entrada del PFR (Fig. 2). El crecimiento se analiza por turbidimetría (600 nm) y la glucosa mediante un analizador bioquímico (YSI2900). Los CI obtenidos se analizan en geles SDS-PAGE y sus características estructurales mediante susceptibilidad a la degradación por proteasa K y FTIR-ATR (2). La presencia de proteínas de choque térmico será determinada por inmunodetección de DnaK y GroEL.

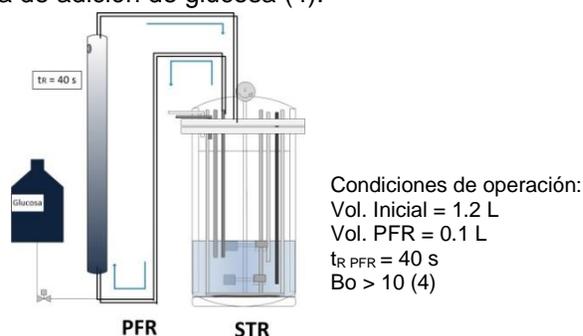
**Resultados.** El cultivo control crece ajustándose al modelo de alimentación exponencial alcanzando 40 g/L.

La glucosa inicial se consume durante el lote y se mantiene cercana a 0 g/L el resto del cultivo (Fig. 1).



**Fig. 1. Cultivo control por lote alimentado de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF.** Se muestra la concentración de biomasa (círculos negros) y de glucosa (círculos vacíos). También se presenta la concentración celular de acuerdo al modelo de alimentación exponencial (línea continua) y la temperatura (línea punteada). Las líneas verticales señalan el inicio de la fase de alimentación exponencial y de termoinducción (30-39°C).

El sistema STR-PFR propuesto mantiene un flujo pistón dentro del PFR (Fig. 2), lo que permite la reproducción de la zona de adición de glucosa (4).



**Fig. 2. Esquema representativo del sistema de dos compartimentos STR-PFR.**

**Conclusión.** Se logró un cultivo de alta densidad celular de *E. coli* produciendo rHuGM-CSF, que será reproducido en el sistema caracterizado de dos compartimentos STR-PFR.

**Agradecimientos.** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795). Beca CONACYT 478675.

### Bibliografía.

- Caspeta L, Flores N, Pérez NO, Bolívar F, Ramírez OT. (2009) *Biotechnol Bioeng* 102(2):468-82.
- Calcines-Cruz C, Olvera A, Castro-Acosta RM, et al. (2018) *Int J Biol Macromol* 108:826-836.
- Schweder T, Kruger E, Xu B, et al. (1999) *Biotechnol Bioeng* 65:151-159.
- George S, Larsson G, Enfors SO. (1993). *Bioprocess Biosyst Eng* 9. 249-257.