

Autores: Jose María Sanz, Silvia Gómez, Bárbara Díez, Raúl Sánchez

¹Centro Tecnológico CARTIF, Av. Francisco Vallés 4, Boecillo, Valladolid, España

INTRODUCCIÓN

Los hongos y los oomicetos son los dos grupos más importantes de patógenos vegetales eucariotas. Los métodos existentes para la gestión de estas enfermedades suelen ser limitados, caros y con el tiempo pueden hacer que el patógeno tolere el método de control. Además, la aplicación de fungicidas químicos puede conllevar un impacto negativo en los ecosistemas.

Por lo tanto, la búsqueda de productos respetuosos con el medio ambiente para la gestión de las enfermedades en cultivos es una prioridad en todo el mundo. La tecnología del ARNi, con su especificidad sin precedentes como objetivo de las plagas y su bajo impacto medioambiental, está evolucionando rápidamente como una prometedora alternativa segura a los pesticidas inorgánicos tóxicos. Pero el coste de producción del ARN representa un reto importante para el despliegue de la tecnología de ARNi.

OBJETIVO

- 1) Testar estrategias de fermentación alternativas diseñadas para la expresión y obtención de ARNs.
- 2) Incrementar significativamente el rendimiento del ARNs durante el proceso de fermentación.

RESULTADOS

Utilizando biorreactores a escala de laboratorio de 2 L y 5 L se estudiaron parámetros de fermentación como el medio de cultivo o el modo de operación, que influyen en la producción de ARNs.

Se testaron dos medios de cultivo: LB (convencional) y DeLisa (económico). Como se observa en la Fig. 1, los resultados muestran un incremento de DCW (g/L) utilizando el medio de cultivo DeLisa, en lugar del medio convencional LB. Además, la cantidad de ARNs extraído también fue mayor en las fermentaciones con DeLisa como medio de cultivo alternativo.

| | LB | DeLisa |
|--------------------|------|--------|
| DCW (g/L) | 5.6 | 6.9 |
| Total RNA (ng/uL)* | 492 | 550 |
| 260/280 | 1.91 | 2.04 |
| 230/280 | 1.94 | 2.11 |

Figura 1: Producción de DCW (g/L) y RNA (ng/uL) en distintos medios de cultivo

Posteriormente, se probaron tres modos de operación: discontinuo (batch), semicontinuo (fed-batch) y continuo. Para la fermentación continua se utilizó un sistema de microfiltración tangencial, que recircula la biomasa y retira el caldo de cultivo del fermentador (Fig. 2). Tras cada fermentación se realizó extracción de ARN. Los resultados mostraron que la estrategia en continuo mejoraba los rendimiento de DCW, con respecto a los otros modos (Fig. 3), incrementándose también la cantidad de ARNs.



Figura 2: Biorreactor en continuo con microfiltración

En conjunto, todo ello supone una ventaja importante si el proceso quiere ser escalado para llevar a cabo la producción industrial de ARNs.

Finalmente, la Fig. 4 muestra el proceso optimizado de fermentación en continuo.

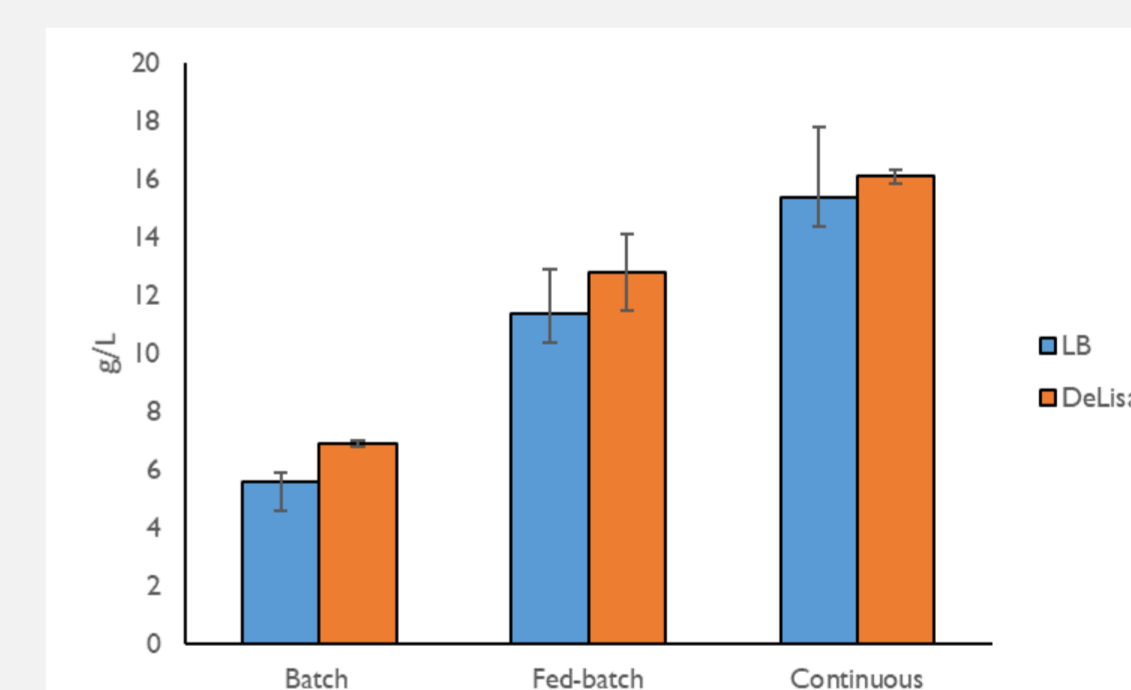


Figura 3: Producción de DCW (g/L) en distintos modos de cultivo



Figura 4: Preinoculum (8 h) → Batch (4 h) → Induced fed-batch (24 h) → Induced fed-batch + harvesting (40 h)

CONCLUSIONES

Como conclusión, en este estudio se ha logrado definir un medio de cultivo que mejora el rendimiento de la fermentación convencional, así como un modo de operación más optimizado que también permite incrementar la biomasa bacteriana y el ARN producido. Todo ello redundará en una mayor cantidad de ARNs generados por proceso, con lo cual se incrementa el rendimiento final y se abaratan los costes.

Esta estrategia puede ser utilizada para la producción a gran escala de ARNs y es adecuada para entornos industriales y de bajos recursos.

CONTRIBUCIÓN A LOS ODS



Desarrollado por:

Financiado por:

Proyecto PLEC2021-008076 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea Next Generation EU/ PRTR