



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza."

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

MODELACIÓN Y SIMULACIÓN DE UN CULTIVO PERFUSIVO LIMITADO POR GLUCOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE PVAX1-NH36 COMO VACUNA

Tesis Que para obtener el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Presenta

ANGÉLICA GARCÍA RENDÓN

Hermsillo, Sonora. Marzo, 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado con mucho amor y cariño

A Dios que me ha dado las fuerzas y me ha bendecido en cada etapa de mi vida.

A mis padres que me han apoyado hasta el último momento y que sin ellos no estaría donde estoy.

A mi abuela por su cariño, paciencia, enseñanzas y amor que han estado presentes toda mi vida.

A mis hermanos a quienes quiero mucho y que me han ayudado de diferentes maneras.

A mi pareja Julio, quien me apoya incondicionalmente con su amor y me inspira a ser mejor.

Y mi mayor motor e inspiración, mi hijo Julián la razón de todo lo que hago.

A toda mi familia, a todos los que me han ayudado, que me han tenido paciencia y han estado presentes en todo el camino.

Agradecimientos

La presente tesis es el resultado de un gran esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas, apoyándome, teniéndome paciencia, enseñándome e instruyéndome en todo momento. Gracias a todas esas personas que de distintas maneras me han dejado una gran enseñanza y aportaron mucho para mi formación tanto profesional como personal.

Primeramente, agradezco grandemente al Dr. Armando Tejeda por haberme dado la oportunidad de participar en su proyecto y haber confiado en mí todo el tiempo.

Agradezco a la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por facilitar las instalaciones y equipo necesario para el proyecto. Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo mediante el programa de becas de licenciatura.

A mi hermana Aurora que me acompañó cada día de este proyecto y fue mi maestra, mi instructora, y que con regaños necesarios me ayudó a terminar todo hasta el último día.

Gracias a todos.

INDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
1.0 INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivos específicos	4
2.0 ANTECEDENTES.....	5
2.1 Vacunas ADNp	5
2.2 Producción de ADNp.....	6
2.2.1 Elección del plásmido	7
2.2.2 Plásmido PVAX1-NH36	8
2.2.3 Medio de cultivo.....	8
2.2.4 Modos Fermentación.....	9
2.2.5 Lisis celular	12
2.2.6 Concentración y clarificación	12
2.2.7 Purificación	12

3.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	13
3.1 Equipo	14
3.2 Materiales	14
3.3. Ceba bacteriana y medio de cultivo	15
3.4 Cinética a nivel matraz	17
3.5 Preparación del inóculo para el biorreactor	17
3.6 Fermentación en lote y PAE.....	17
3.7 Modelo matemático	20
3.7.1 Cálculo para alimentación de entrada.....	20
3.7.2 Crecimiento celular	21
3.7.3 Producción de plásmido.....	22
3.7.4 Solución del modelo	23
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Cinética de crecimiento y consumo de sustrato	24
4.2 Análisis de plásmido	26
4.2.1 Pureza de plásmido.....	26
4.2.2 Rendimiento específico y volumétrico del plásmido	29
4.3 Control del oxígeno en modo lote y PAE	31
4.4 Análisis comparativo del efecto de la fuente de carbono.....	33
5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
5.1 Conclusiones	34
5.2 Recomendaciones	35
BIBLIOGRAFÍA	36

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de un bioproceso para la producción de vacunas de ADNp. (Tejeda, et al., 2018)
- Figura 2. Principales isoformas de los plásmidos: circular abierta (OC), superenrollado (SC) y lineal (L) (Prazeres et al. 2008)
- Figura 3. Modos de fermentación para la producción de ADNp. (Tejeda, et al., 2018).
- Figura 4. Esquema general de la metodología empleada.
- Figura 5. Esquema del sistema PAE utilizado para el cultivo de *E. coli* a nivel biorreactor.
- Figura 6. Esquema de organización del programa de MATLAB.
- Figura 7. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato nivel biorreactor en un sistema por lote (a) y cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato nivel biorreactor en un sistema por PAE (b), de un medio con glucosa. Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas solidas). Concentración de biomasa (○), Concentración de sustrato (■).
- Figura 8. Gel de electroforesis de muestras purificadas de la fermentación por lote. Líneas 1-5 corresponden a 0, 2, 4, 5 y 5.5 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.
- Figura 9. Gel de electroforesis de muestras lisadas y purificadas de la fermentación PAE. Líneas 1-8 corresponden a time 0, 4, 5, 5.5, 6, 8, 10 y 12 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.
- Figura 10. Cinética de producción de plásmido para un medio con glucosa en fermentación por lote (a) y cinética de producción de plásmido para un medio con glucosa en fermentación por PAE (b). Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas solidas). Rendimiento volumétrico de plásmido (◆), Rendimiento específico de plásmido (▲).

Figura 11. Control de oxígeno disuelto durante experimento en modo lote (a) control de oxígeno disuelto durante experimento en modo PAE (b).

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio definido enriquecido con glucosa.

Tabla 2. Composición de soluciones trazas.

Tabla 3. Parámetros de cultivos por lote y PAE.

RESUMEN

A pesar del éxito de las vacunas contra organismos patógenos que necesitan de inmunidad mediada por células, las vacunas contra agentes como los de la tuberculosis, malaria, leishmaniasis y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, no son eficaces.

Actualmente una nueva generación de vacunas que utilizan ácido desoxirribonucleico (ADN) con genes terapéuticos, están siendo desarrolladas exitosamente, ya que estas vacunas pueden generar tanto respuestas inmunes humorales como celulares.

En este trabajo se investigó la fermentación por perfusión con alimentación exponencial (PAE) de *E.coli* DH5 α para la producción de pVAX1-NH36 para la aplicación en vacunas contra la leishmaniasis utilizando glucosa, como una fuente de carbono alternativa al glicerol. Se utilizaron modelos matemáticos para describir el crecimiento celular, la producción de plásmido y consumo de sustrato. La solución del modelo fue comparada con los resultados experimentales y usada para describir el comportamiento del sistema. Para la determinación de parámetros cinéticos se realizó un estudio en modo lote con tres repeticiones. El ajuste del modelo a los datos experimentales arrojó un coeficiente de determinación $r^2=0.99$ en concentración de masa, consumo de sustrato, rendimiento específico y volumétrico de plásmido. Estos parámetros fueron empleados para reproducir un cultivo PAE utilizando glucosa, lográndose una concentración celular de 86.0 OD₆₀₀ al término de 12 horas y una producción de plásmido de 13.3 mg/(L-h). En relación al control del oxígeno disuelto, se tuvo un adecuado control de este mismo en todos los experimentos con glucosa.

Este trabajo contribuye al diseño y flexibilidad de los sistemas PAE para la producción de vacunas de ADNp. El bioproceso PAE podría resultar técnica y económicamente adecuado debido a la reducción de la inversión de capital y costos operativos.

1.0 INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina es el descubrimiento de las vacunas, que han permitido el control o bien la erradicación de enfermedades de ámbito mundial como lo es la viruela. La vacunación ha resultado ser una buena medida de prevención en relación con su costo-beneficio, ya que la principal causa de muerte a nivel mundial son enfermedades infecciosas (Kurstak, 2002).

A pesar del éxito de las vacunas contra organismos patógenos que necesitan de inmunidad mediada por células, las vacunas contra agentes como los de la tuberculosis, malaria, leishmaniasis y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, no son eficaces. Debido a lo anterior, una nueva generación de vacunas que utilizan ácido desoxirribonucleico (ADN) conteniendo el gen de interés, están siendo desarrolladas exitosamente, ya que este tipo de vacunas pueden generar tanto respuestas inmunes humorales como celulares (Sanjay Gurunathan, et. al., 2000).

La Leishmaniasis es una enfermedad endémica, principalmente en países muy pobres, y afecta a 200 millones de personas en el mundo. El desarrollo de una vacuna de ADNp para la leishmaniasis, barata y segura puede ser la alternativa adecuada para estas economías. La Leishmaniasis es causada por un parásito protozoario, transmitido a humanos por medio de la picadura de la mosca de arena. Las manifestaciones clínicas varían desde lesiones cutáneas hasta enfermedades viscerales fatales.

Las vacunas de ADN, también conocidas como vacunas genéticas, vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN desnudo, entre otros términos, emplean un principio relativamente simple que ha abierto una nueva era en la inmunología, con un alto potencial como vacunas profilácticas y terapéuticas (Mota-Sánchez, Javier, 2009; Srivastava, et. al., 2003).

Uno de los vectores que se utilizan para transferir genes entre bacterias, transferencia horizontal de genes, son plásmidos bacterianos. Los plásmidos se consideran como cromosomas pequeños, auxiliares y prescindibles. Son pequeñas moléculas circulares de ADN de doble cadena, que se encuentran físicamente separadas y que se replican de manera independiente del ADN cromosómico de una célula, y, a diferencia de éste, no contienen información genética necesaria para el crecimiento y multiplicación de la célula (Bennett, 2008).

Escherichia coli ha sido durante mucho tiempo la cepa hospedera más importante de moléculas de ADN recombinante utilizadas por los investigadores y por la industria. Esto es debido a diversas ventajas presentadas por *E. coli* como son el rápido crecimiento con alta densidad celular y requerimientos nutrimentales mínimos, resultando costos de manufactura bajos. Así mismo, esta bacteria se encuentra genéticamente bien caracterizada, además existe disponibilidad de un gran número de vectores de clonación y cepas mutantes, haciendo de esta bacteria un atractivo huésped para el desarrollo de un bioproceso de producción de plásmidos (Tejeda-Mansir, et. al., 2008).

A medida que las vacunas de ADN avanzan hacia la aprobación de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, Rockville, MD, EUA), es esencial desarrollar procesos industriales mediante los cuales el ADN pueda ser producido económicamente a gran escala (Carnes, et. al., 2006). Al considerar los protocolos de optimización de plásmidos, es muy importante maximizar los rendimientos de estos a la vez que se minimizan los costos de fabricación. Los altos rendimientos específicos de plásmidos capitalizarán el uso de biorreactores y maximizará el rendimiento final de purificación en las etapas previas del proceso (Lopes, et al., 2014).

El glicerol es preferido usualmente como la fuente de carbono en cultivos de alta densidad, ya que lleva a una producción baja de acetato sin que este inhiba el crecimiento celular. Por otra parte, la glucosa es una opción convencional, no es muy cara y se metaboliza eficientemente. Sin embargo, los niveles altos de

glucosa son conocidos por llevar a una indeseable producción de acetato debido a su metabolismo (Carnes, 2005). Este inconveniente puede solucionarse con nuevos métodos de cultivo celular.

Diversas técnicas de cultivo celular de alta densidad se han desarrollado para el cultivo de cepas de *E. coli* recombinantes y no recombinantes, por ejemplo, utilizando sistemas de lote alimentado. Los cultivos por perfusión con alimentación exponencial (PAE) para la producción de plásmido, pueden ser un modo alternativo para llevar a cabo cultivos de alta densidad celular (HCDC, por sus siglas en inglés) con modernos equipos de apoyo en cultivo celular, filtración y bombas de manejo de líquidos. Los cultivos PAEs se llevan a cabo utilizando una tasa constante de alimentación de nutrientes en cultivos de células de mamíferos, así como en cultivos de *E. Coli* (Lee, et. al., 1989).

El gen NH36 es uno de los candidatos más prometedores para una vacuna de ADNp contra la leishmaniasis, ya que se ha probado en varios modelos animales. En este trabajo se investigó el comportamiento de la producción del plásmido pVAX1-NH36 hospedado en *E.coli* DH5 α en un biorreactor perfusivo con alimentación exponencial utilizando un medio definido con glucosa como sustrato limitante.

1.2 Objetivos

Analizar el comportamiento un cultivo PAE limitado por glucosa para la producción de pVAX1-NH36 como vacuna.

1.2.1 Objetivos específicos

1. Determinar parámetros cinéticos en un cultivo en lote a nivel biorreactor de *E. coli* DH5 α con pVAX1-NH36.
2. Estudiar la cinética de un cultivo PAE a nivel biorreactor de *E. coli* DH5 α con pVAX1-NH3.
3. Simular el comportamiento un cultivo PAE a nivel biorreactor de *E. coli* DH5 α con pVAX1-NH36.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Vacunas ADNp

La producción de ADN plasmídico (ADNp) ha adquirido un gran interés debido a su aplicación potencial en vacunas de ADN. Una vacuna de ADNp puede desarrollarse a partir de los genes de un patógeno para proporcionar inmunidad contra enfermedades (Prazeres, et al., 2003).

Las vacunas de ADNp permiten que los genes extraños se expresen transitoriamente en células transfectadas, imitando la infección patogénica intracelular e induciendo respuestas inmunes humorales y celulares (Danquah, et al., 2007).

Hasta la fecha, las vacunas de ADNp solo han sido autorizadas en el sector veterinario (Grunwald y Ulbert, 2015). Estos contribuyen a la validación de la tecnología en vacunas ADNp y promueve el uso de vacunas en humanos.

Al ver el potencial de las vacunas de ADN, con resultados recientes obtenidos en animales, indica que esta nueva tecnología podría revolucionar la vacunación en humanos (Robinson, et al., 1997). A la fecha se han iniciado más de 600 tratamientos basados en ADNp, vacunas contra el cáncer y ensayos clínicos de vacunas terapéuticas. Actualmente se está investigando el uso de estas vacunas contra muchas enfermedades infecciosas como la malaria, VIH, hepatitis B y C y tuberculosis (Shroff, et al., 1999; Chattergoon, et al., 1997). El número de protocolos aprobados de terapia génica utilizando vectores de suministro basados en ADNp ha aumentado exponencialmente desde 1995, lo que representa aproximadamente el 25% de los ensayos de terapia génica en curso (Mountain, 2000).

2.2 Producción de ADNp

El ADN plasmídico se produce a partir de un proceso de fermentación y un buen resultado de este proceso, depende de las interacciones entre el organismo huésped que alberga el vector de plásmido recombinante y el entorno en el que crece (O'Kennedy, et al., 2003). Una de las ventajas de la fermentación, es que todos los factores que influyen enormemente en el crecimiento celular, rendimiento del plásmido, calidad y estabilidad pueden ser controlados y examinados, como el pH, temperatura y oxígeno disuelto.

La formulación y composición del medio de cultivo, afecta gravemente en el rendimiento del proceso, haciendo que los nutrientes disponibles en el medio de crecimiento afecten el proceso de fermentación.

Los medios que contengan extracto de levadura y proteína hidrolizada son a utilizados frecuentemente ya que son relativamente simples de preparar y generalmente conducen a densidades celulares elevadas (Durland y Eastman,1998).

Además de los nutrientes complejos, se incluyen glucosa, glicerol u otros azúcares como fuente de carbono. Los metales trazas y las vitaminas también contribuyen al crecimiento y rendimiento del plásmido.

E. coli es un microorganismo que crece tanto en medios orgánicos ricos complejos como en medios químicos definidos por sal, siempre y cuando la fuente de carbono esté presente (Prather, et al., 2003).

El proceso para la producción de ADN plasmídico comprende generalmente en una escala de banco, con la construcción y selección de vectores de expresión, la selección de la célula huésped, la optimización de las condiciones de fermentación, y finalmente las etapas de aislamiento , purificación y acabado. (Fig. 1).

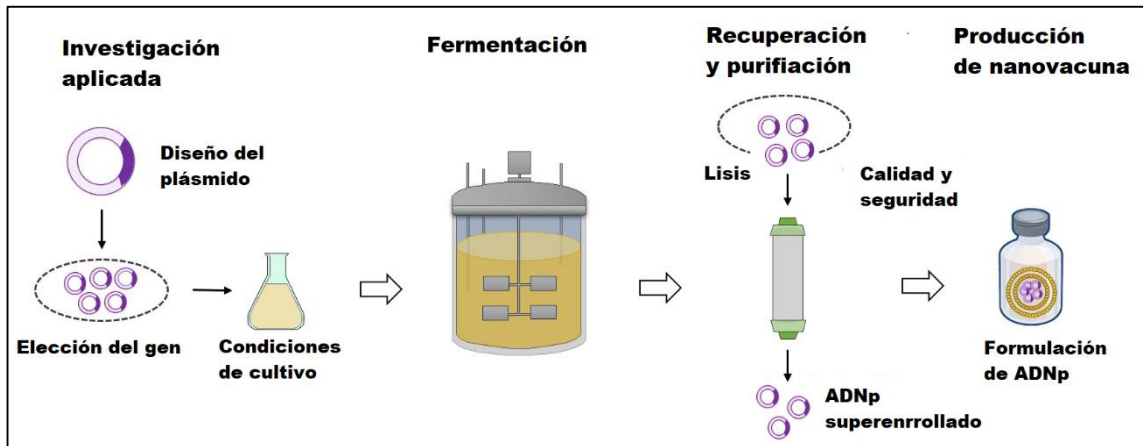


Figura 1. Esquema de un bioproceso para la producción de vacunas de ADNp. (Tejeda, et al., 2018)

Estas etapas del proceso que se clasifican en previas y posteriores, están integradas y no deben llevarse de manera individual. Las etapas posteriores de los productos biológicos se ven muy afectadas por las impurezas y contaminantes presentes en las corrientes de proceso, que dependen fuertemente del procesamiento previo y de las condiciones de fermentación (Kelly, et al., 1991).

2.2.1 Elección del plásmido

La elección del gen es importante, ya que proporciona un marco adecuado en el que las decisiones del proceso de producción deben desarrollarse. La mayoría de los investigadores se han plantado en los vectores de tipo ColE1 como base para la producción de vacunas de ADN para propagarse en la bien estudiada bacteria Gram-negativa *E. coli* (Lahijani, et al., 1996). Las razones por las cuales se hace esta selección son tres: en primer lugar, los derivados de ColE1 se han empleado comúnmente más como vectores útiles para la expresión de proteínas recombinantes. En segundo, se han modificado con éxito para replicar altos número de copias, aumentando el rendimiento teórico de producción de ADNp. Y, por último, los procesos de producción han sido altamente estudiados

utilizando *E. coli* como huésped para la producción de proteínas recombinantes (Prather, et al., 2003).

2.2.2 Plásmido PVAX1-NH36

Para el desarrollo de vacunas de ADNp contra la leishmaniasis se ha utilizado el plásmido pVAX1-NH36, con un tamaño de 4000 pares de bases (pb), el cual porta el gen de aproximadamente 1000 pb que codifica para la glicoproteína nucleósido hidrolasa (NH36), expresada por la mayoría de las especies del género *Leishmania* (Aguilar-Be I, et al., 2005).

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias que es endémica en más de 88 países. La Organización Mundial de la Salud estima que existen más de 12 millones de casos actualmente, con una incidencia anual de más de 600 mil casos y 500 mil muertes. La distribución geográfica en México es amplia y afecta por lo menos a 17 estados. Esta enfermedad puede ser clasificada en leishmaniasis visceral, si involucra la infección del hígado, el bazo, la médula espinal e inmunosupresión, causando severos daños y hasta la muerte de no ser atendida, o en leishmaniasis cutánea que se caracteriza por lesiones crónicas en la piel (Rosado-Vallado M, et al., 2005).

2.2.3 Medio de cultivo

La composición de los medios puede afectar drásticamente la calidad y rendimiento del plásmido. Los cultivos de alta densidad celular requieren un medio equilibrado que suministre cantidades adecuadas de nutrientes necesarios para el mantenimiento de la energía, la biomasa y la célula. Estos medios comúnmente contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, varias sales y trazas de metales. Normalmente los requisitos nutricionales se satisfacen con medios mínimos o semidefinidos. Una cepa de *E. coli* puede crecer relativamente en medios simples porque puede sintetizar todo lo que necesita de

una simple fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y varias sales (Carnes, 2005).

2.2.4 Modos Fermentación

El requerimiento de pequeñas cantidades de ADNp purificado para estudios de laboratorio se puede satisfacer mediante el cultivo de *E. coli* en matraces grandes, un proceso bastante sencillo. Para mayor rendimiento, el uso de biorreactores bien controlados puede aliviar muchas de las limitaciones del cultivo en matraz de agitación. En particular, el control del oxígeno disuelto y el pH, en los biorreactores permite un aumento significativo de la biomasa en comparación con los cultivos de frascos agitados (Listner, et al., 2006).

Los procesos de fermentación para plásmidos maximizan idealmente el rendimiento volumétrico (mg ADNp/L) como el rendimiento específico (g ADNp / g célula) de plásmido superenrollado de alta calidad. Los altos rendimientos volumétricos facilitan fermentaciones más pequeñas y económicas y un rendimiento específico alto mejora la pureza y rendimiento del plásmido (James, et al., 2006). Este proceso debe optimizarse para tener un alto porcentaje de plásmido superenrollado, ya que otras formas (Fig.2) de plásmido son difíciles de eliminar durante la purificación y son consideradas isoformas indeseables por organismos reguladores (US Food and Drug Administration 1996).

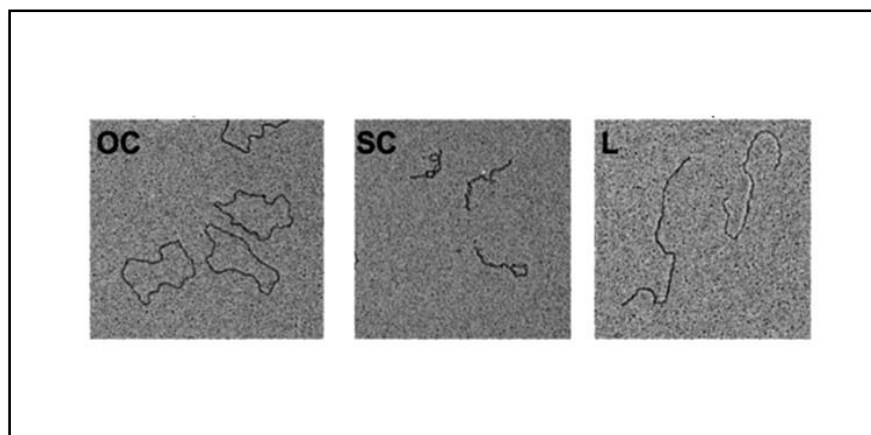


Figura 2. Principales isoformas de los plásmidos: circular abierta (OC), superenrollado (SC) y lineal (L) (Prazeres, et al., 2008).

Los principales modos de producción de plásmidos son el tipo lote, lote alimentado y el PAE.

Lote. En la fermentación en lote, se añaden todos los nutrientes desde el inicio, del cultivo (no se añade ningún nutriente durante la fermentación). A pesar de ser una técnica sencilla y rápida, los cultivos por lote también presentan desventajas como inhibición por sustrato y precipitación de sales en medios con concentraciones altas de nutrientes, además la velocidad de crecimiento no puede ser controlada directamente y esta cambia constantemente durante toda la fermentación hasta llegar a su fin.

Lote alimentado. En los cultivos por lote alimentado, los nutrientes son alimentados continua o semi-continuamente, mientras que el efluente se remueve de manera discontinua. Este cultivo se inicia con una fase por lotes. Una vez que las células consumen, se inicia una alimentación controlada del nutriente limitante a una velocidad cercana a la que es consumido. Estas fermentaciones alcanzan mejores rendimientos en la producción de plásmido que los cultivos por lote (Tejeda-Mansir, et al., 2008).

PAE. Cultivos convencionales de alta densidad celular utilizados en la producción de vacunas de ADNp en modo lote o lote alimentado, están limitados por la gran acumulación de sustancias tóxicas, daño celular o mayor inestabilidad del plásmido. Utilizando un cultivo PAE como método para la producción de plásmido puede ser una gran alternativa para cultivos de alta densidad evitando las limitaciones que los métodos convencionales presentan.

Los cultivos PAE se llevan a cabo usando una velocidad de alimentación exponencial de nutrientes. El cultivo comienza con una fase por lote, donde las células se inoculan en un volumen inicial de medio y una concentración inicial del sustrato limitante.

La alimentación controlada del nutriente limitante se inicia una vez ya que las células han consumido la cantidad de sustrato inicial. Se alimenta un flujo de medio fresco al reactor, mientras que al mismo tiempo se retira continuamente un mismo flujo de medio gastado, permitiendo así la eliminación de sustancias tóxicas. Las células se recirculan de nuevo al biorreactor por medio de un dispositivo de retención de células. (García-Rendón, et al., 2017).

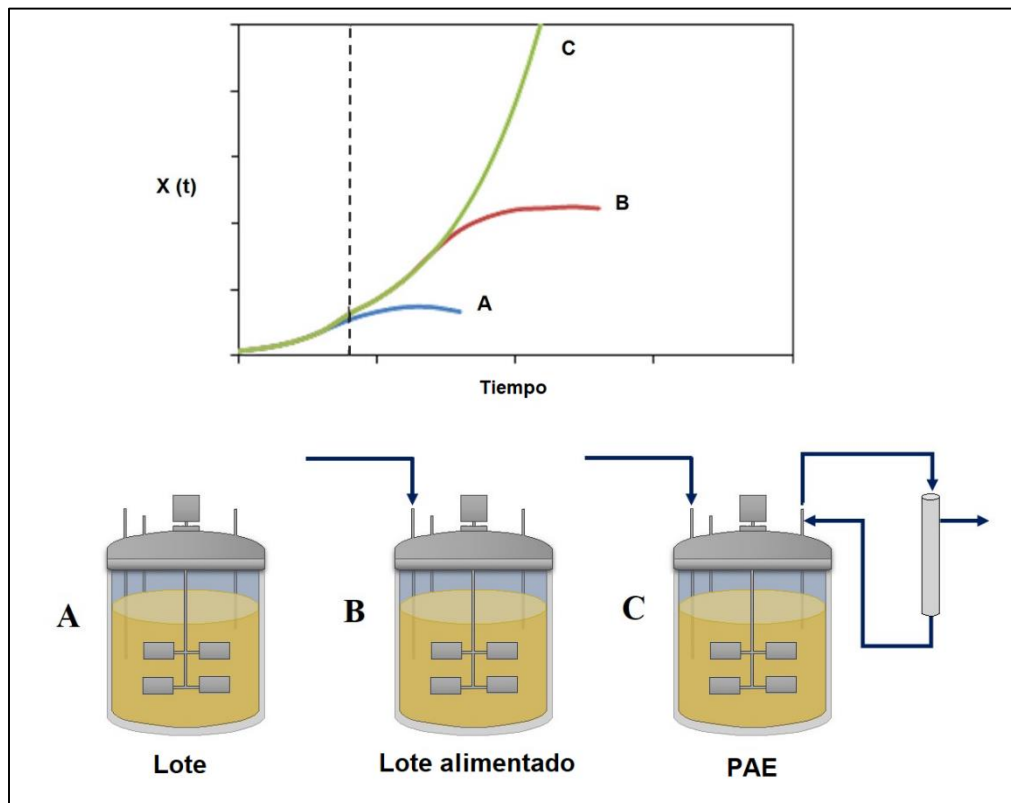


Figura 3. Modos de fermentación para la producción de ADNp. (Tejeda, et al., 2018).

2.2.5 Lisis celular

Una vez producida la *E. coli*, es necesario, romperla para recuperar el ADNp. Aunque se han ensayado métodos mecánicos como sonicación, molino de perlas y homogeneización (Carlson et al., 1995), el proceso de elección ha sido más a menudo una variación del procedimiento de lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (Birnboim, et al., 1979).

Este es un paso crucial en el proceso, el reactivo de lisis se debe añadir y mezclar de tal manera que se eviten los extremos del pH, porque se sabe que los valores superiores a 12.5 causan desnaturalización irreversible del plásmido.

El siguiente paso después de la lisis es la adición de una solución de neutralización, se obtiene un precipitado que se elimina luego por centrifugación o filtración.

2.2.6 Concentración y clarificación

Las etapas de clarificación y concentración después de la lisis, están diseñadas para eliminar proteínas y algunos ácidos nucleicos, y para reducir el volumen previo al proceso de la cromatografía. La precipitación de proteínas con acetato de amonio es un método de operación muy común en la industria de la biotecnología y no debe presentar problemas específicos (Prazeres, et al., 2007).

2.2.7 Purificación

En esta etapa del proceso, la mayoría de las impurezas en la corriente del proceso son ácido ribonucleico (ARN), fragmentos de ADN genómico, endotoxinas y variantes de plásmido. Las similitudes de estas moléculas con el ADNp y su amplio rango de pesos moleculares dificultan la purificación. La cromatografía de fase inversa y de afinidad se ha descrito para la purificación de plásmido, pero solo a escala de laboratorio

3.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Durante esta investigación se llevó a cabo la fermentación con glucosa como sustrato limitante de *E. coli* DH5 α -NH36 empleando dos técnicas de cultivo: sistema lote y sistema PAE, ambos a nivel biorreactor; para posteriormente evaluar el comportamiento de cada técnica. En la Figura 4 se muestra un diagrama del esquema general de la metodología empleada.

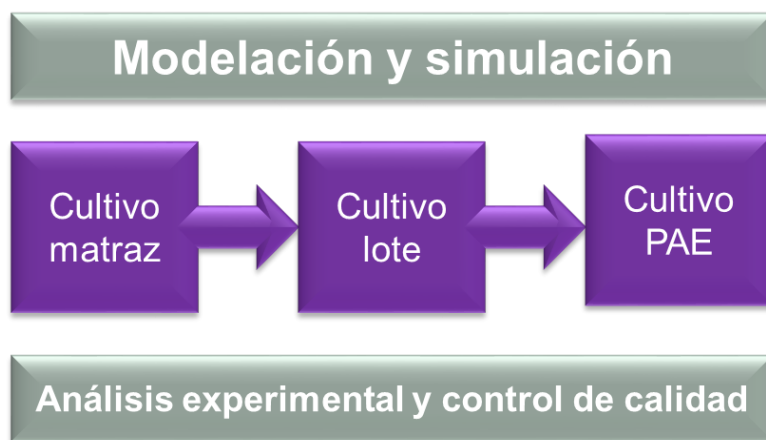


Figura 4. Esquema general de la metodología empleada.

Para evaluar el comportamiento de las técnicas de cultivo se llevaron distintas determinaciones. Se obtuvieron curvas de crecimiento celular y de consumo de sustrato y producción de plásmido. Además se determinó la pureza del plásmido de cada cultivo.

Los parámetros obtenidos se utilizaron en estudios de simulación (con ayuda del software MATLAB) conjuntamente con modelos matemáticos, para describir la cinética de los sistemas.

3.1 Equipo

Para la preparación de inóculos se utilizó una incubadora con agitación (Orbital 1575 de VWR International®, USA). En las fermentaciones a nivel biorreactor se utilizó un fermentador de 3.0 L marca Applikon equipado con un software de control ez-control. Durante las fermentaciones se controló la temperatura mediante una chaqueta de calentamiento eléctrica y un intercambiador de calor. En el caso del sistema PAE el biorreactor se acopló a un sistema de ultrafiltración (KrosFlo Resesearch II TFF System, USA).

En la determinación de la densidad óptica de los cultivos y las concentraciones de glucosa, se utilizó un espectrofotómetro (VWR UV-1600PC, USA). En la centrifugación de las muestras se utilizó la centrifuga Biofuge Stratos, (Thermo Fisher Scientific, USA). Las tinciones Gram realizadas fueron observadas en un microscopio óptico Leica ATC 2000.

En la estimación de la concentración de plásmido se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Akta Purifier 10UPC (GE Healthcare, USA) con una columna HIC Source 15 PHE PE de 10 x 4,6.

En el análisis en gel electroforesis y documentación de este, se utilizó una cámara de electroforesis (Biorad, USA), una fuente de voltaje (PowerPac™ Basic Biorad, USA) y un fotodocumentador (UVP MultiDoc-it Darkroom).

3.2 Materiales

Para la purificación de todas las muestras del cultivo, se utilizó GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich).

Para todas las muestras de los cultivos se determinó la concentración de glucosa con el kit Glucose (GO) Assay (Sigma Aldrich).

Todos los reactivos utilizados en la presente investigación son de grado analítico y fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, USA, excepto cuando se especifique lo contrario.

3.3. Cepa bacteriana y medio de cultivo

La bacteria utilizada fue *E. coli* DH5 α la cual contiene el plásmido pVAX1-NH36 con un tamaño de 4000 pb, conteniendo un gen de resistencia a la kanamicina para propósitos de selección, proporcionada por CINVESTAV-IPN (Ciudad de México).

Se utilizó un medio definido enriquecido con glucosa como fuente de carbono, conteniendo kanamicina a una concentración de 50 μ g/L y un pH de 7.0. La composición del medio se muestra a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del medio definido enriquecido con glucosa.

Componente	Concentración
KH ₂ PO ₄	13.3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0 g/L
C ₆ H ₈ O ₇	1.9 g/L
Sol. de citrato férrico	1.0 mL/L
Solución traza 1	1.0 mL/L
Solución traza 2	1.0 mL/L
Solución traza 3	1.0 mL/L
Solución traza 4	1.0 mL/L
Glucosa	13.0 g/L
MgSO ₄	1.2 g/L
Solución de biotina	1.0 mL/L
Solución de tiamina	1.0 mL/L
Solución de kanamicina	1.0 mL/L

Las composiciones de las soluciones trazas empleadas se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de soluciones trazas

	Componente	Conc. (g/L)
1	EDTANa ₂ -salt.2H ₂ O	28.2
2	CoCl ₂ .6H ₂ O	5.0
	MnCl ₂ .4H ₂ O	30.0
	CuCl ₂ .2H ₂ O	3.0
	H ₃ BO ₃	6.0
3	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4.2
4	Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	67.6

Las soluciones utilizadas de biotina y tiamina fueron de una concentración de 0.25 mg/L y 9.0 mg/L, respectivamente.

Para la preparación del medio de cultivo, el orden en que los elementos de este se mezclan, es de suma importancia para toda la experimentación, para tal efecto, en esta investigación se utilizó la metodología desarrollada en el laboratorio de bioprocesos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), que se describe a continuación.

1. Se mezcló en una solución 13.3 g/L KH₂PO₄, 4 g/L (NH₄)₂HPO₄, 1.9 g/L C₆H₈O₇, 1 ml/L Fe(III) citrato·H₂O, uno por uno hasta la disolución de cada sustancia y se esterilizó en autoclave.
2. Una vez esterilizada la solución de sales y a una temperatura menor de 50 °C, se agregaron 1 ml/L de cada una de las soluciones trazas en el siguiente orden: solución 1, solución 2, solución 3, solución 4.
3. Se esterilizó 13 g/L de glucosa y 1.2 g/L MgSO₄ por separado.
4. Se agregaron a la solución de glucosa una vez a temperatura ambiente, 1 ml/L de biotina, tiamina y kanamicina cada una.

3.4 Cinética a nivel matraz

Se realizó una fermentación por lotes a nivel matraz con un volumen de cultivo 70 mL (4 frascos de 500 mL) inoculados con células provenientes de un banco de células con una DO_{600} de 4.5 (con el cual se hicieron todos los cultivos en la experimentación) en una incubadora a una temperatura a 37°C y 350 rpm durante 12 horas, tomando muestras cada hora para monitorear el crecimiento.

3.5 Preparación del inóculo para el biorreactor

Se preparó 280 mL de medio definido con glucosa para cada experimento. Los cultivos se realizaron en 4 frascos de 500 mL con un volumen de operación de 65 mL. Los frascos fueron inoculados para obtener $DO_{600} = 0.1$ e incubados durante 9 h, a una temperatura de 37°C y una agitación de 350 rpm.

3.6 Fermentación en lote y PAE

En las fermentaciones se utilizó un volumen de operación de 1.0 L. Durante el cultivo se controló la temperatura a 37 °C. El oxígeno disuelto se controló estableciendo un punto de referencia de 30% de saturación con aire mediante burbujeo y agitación. También se controló durante toda la operación el pH utilizando como base y ácido, hidróxido de amonio y ácido fosfórico respectivamente. Se utilizó antiespumante C a una concentración de 100 $\mu\text{L/L}$ para la espuma que se llegó a formar durante la fermentación.

Durante ambas fermentaciones se tomó muestra cada hora para la cinética de crecimiento por DO_{600} , una vez medida, la muestra se centrifugó. La concentración de glucosa en el sobrenadante se determinó con el kit Glucose (GO) Assay (Sigma Aldrich) a una absorbancia de 540 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la purificación de las muestras se utilizó el kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich) conforme a las especificaciones e instrucciones del fabricante. La determinación de concentración de plásmido en

las muestras purificadas, se obtuvo mediante HPLC con una columna de HIC equilibrada con una solución de 1.5 M de sulfato de amonio. Se inyectó 30 μ L de muestra diluida (100 μ L de muestra + 400 μ L de la solución Buffer) al automuestreador.

El análisis de las muestras purificadas en gel electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa %0.8 en una cámara de electroforesis a 60V durante 120 minutos.

Lote. Para la fermentación en modo lote el cultivo se inició con una densidad óptica de 0.988, proveniente de un inóculo de 9 h con 4.56 de densidad óptica. Experimento replicado tres veces.

Se utilizó un medio definido con 13 g/L de glucosa como fuente limitante de acuerdo a los métodos descritos por Bohle y Ross.

PAE. La fermentación PAE consistió con una fase por lote al inicio seguido de una alimentación exponencial. El cultivo se inició con una densidad óptica de 0.950, proveniente de un inóculo de 10 h con 4.4 DO₆₀₀.

La fermentación PAE se realizó inicialmente en modo lote durante 5.5 h para propagar la masa celular. Luego se suministró una alimentación exponencial durante 6.5 h para mantener una tasa de crecimiento específica programada de $\mu_p = 0.25 \text{ h}^{-1}$. Al mismo tiempo el medio de cultivo del fermentador se bombeo a través de una membrana de ultrafiltración a una velocidad de 150 mL/min y el retenido fue de vuelta al biorreactor (Figura 5.)

La fase lote comenzó con 13 g/L de glucosa como fuente de carbono en un medio definido. En la fase de alimentación exponencial un medio definido con 18 g/L de glucosa fue alimentado al biorreactor.

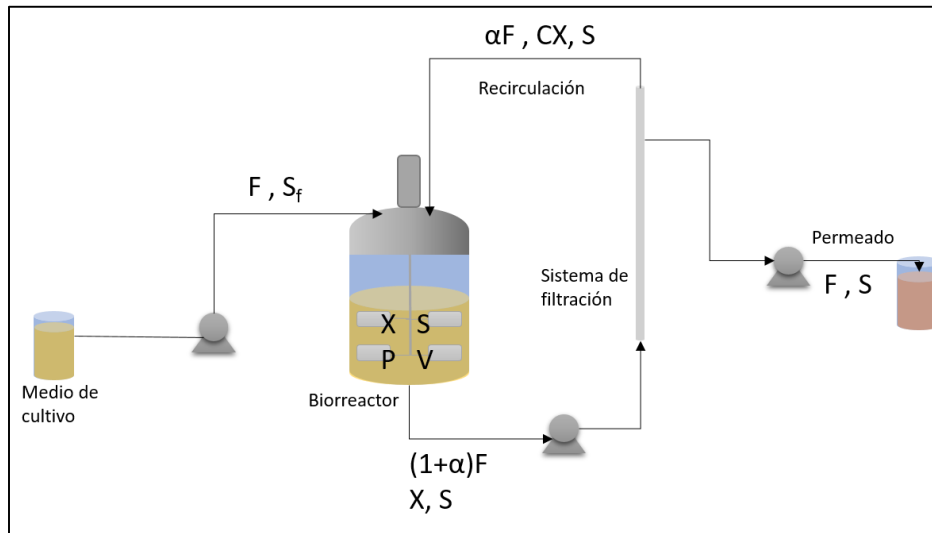


Figura 5. Esquema del sistema PAE utilizado para el cultivo de *E. coli* a nivel biorreactor.

Donde F es la velocidad de alimentación de medio de cultivo, que es igual a la velocidad del permeado. S_f es la concentración de sustrato en el medio de alimentación. X y S son concentraciones de células y sustrato dentro del biorreactor, respectivamente. V el volumen de operación, α es el factor de recirculación y C es un factor de concentración.

3.7 Modelo matemático

El modelo de crecimiento se derivó combinando fases de crecimiento lote y perfusión. Por lo tanto, fue esencial utilizar las ecuaciones que describen una cinética de crecimiento de un cultivo en la fase exponencial y validarlos mediante simulación asistida por computadora y usarlos para predecir el rendimiento del sistema.

Para el cálculo de la velocidad de alimentación en la fase exponencial perfusiva y describir el proceso de fermentación se utilizaron balances de masa de carbono, que implicaron el crecimiento de células bacterianas, consumo de glucosa y la formación de plásmidos.

3.7.1 Cálculo para alimentación de entrada

El balance de glucosa en la fase exponencial perfusiva puede ser descrita como:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_f - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde $Y_{X/S}$ es el coeficiente de rendimiento de biomasa a partir de glucosa o glicerol y μ es el crecimiento específico. Para el caso lote $F=0$ en la Ec. (1).

La velocidad de alimentación inicial F_0 , fue determinada para llevar la fase exponencial considerando una concentración constante de glucosa. Resolviendo la ecuación (1) para F_0 en el tiempo t_b (fin de la fase lote) se tiene:

$$F_0 = \frac{\mu_p X_0 V}{Y_{X/S_p} (S_f - S_{bf})} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde μ_p es el crecimiento específico deseado durante la fase exponencial, X_0 y S_{bf} son concentraciones de biomasa y sustrato al final de la fase lote, Y_{X/S_p} es el coeficiente de rendimiento de biomasa de glucosa durante la fase exponencial.

La velocidad inicial de alimentación F_0 , aumenta exponencialmente acuerdo al crecimiento específico deseado según la siguiente ecuación:

$$F = F_0 e^{\mu_p(t-t_b)} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde t indica el tiempo transcurrido de toda la fermentación.

3.7.2 Crecimiento celular

El balance de masa de las células en todo el biorreactor está dado por:

$$V \frac{dX}{dt} = \alpha FCX - (1 + \alpha)FX + \mu XV \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde α es la proporción de recirculación, C es el termino de concentración, F el flujo alimentado en forma exponencial (L/h), V el volumen (L), X concentración de biomasa (g/L).

Considerando una retención total de células y cero acumulaciones, el balance de masa de células en el sistema de filtración de flujo tangencial es:

$$C = \frac{(1 + \alpha)}{\alpha} \quad \text{Ec. (5)}$$

Combinando las ecuaciones (4) y (5), tenemos:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. (6)}$$

La ecuación anterior es igual en el caso por lote.

La tasa de crecimiento μ se describió mediante la bien conocida ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad \text{Ec. (7)}$$

Donde μ_m es la tasa de crecimiento específica máxima y K_s es el coeficiente de saturación de *E. coli*.

3.7.3 Producción de plásmido

El balance de masa de plásmido en una célula considerando una densidad celular constante está dado por:

$$\frac{dP}{dt} = \mu (Y_{p/x} - P) \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde P representa el contenido específico de plásmido y $Y_{p/x}$ es el coeficiente de rendimiento de plásmido.

3.7.4 Solución del modelo

Para la solución y ajuste del modelo se utilizó la herramienta computacional MATLAB. En la Figura 6 se presenta un diagrama de flujo de la organización del programa **funbatch.m**; programa que se utilizó en la solución de los modelos cinéticos.

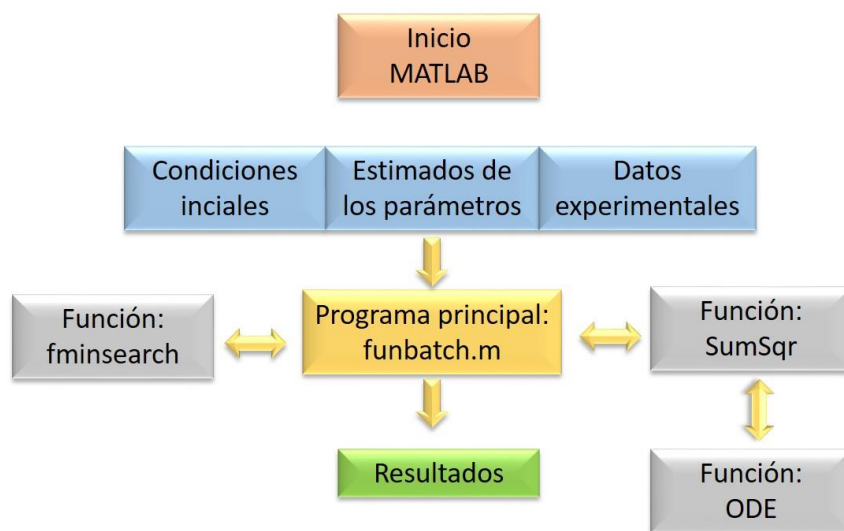


Figura 6. Esquema de organización del programa de MATLAB.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cinética de crecimiento y consumo de sustrato

Los datos experimentales de concentración celular y consumo de sustrato en los cultivos a nivel biorreactor por lote y PAE se muestran en la Figura 7.

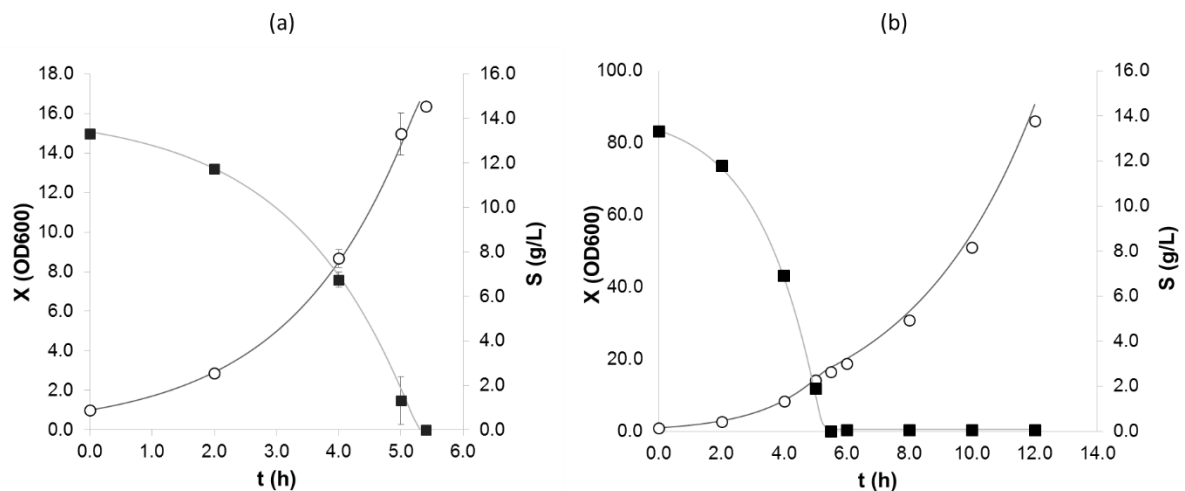


Figura 7. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato nivel biorreactor en un sistema por lote (a) sistema por PAE (b). Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas solidas). Concentración de biomasa (\circ), concentración de sustrato (\blacksquare).

El cultivo en lote (Figura 7a) duró 5.5 h y la máxima concentración celular obtenida fue de 16.36 DO_{600} . Los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una $r^2=0.99$ tanto para la concentración de masa como para concentración de sustrato.

EL cultivo PAE (Figura 7b) fue iniciado en modo lote durante 5.5 h para propagar la masa celular, después se implementó una alimentación exponencial durante 6.5 h para mantener una tasa de crecimiento programada de $\mu_p=0.25 \text{ h}^{-1}$. Al final del experimento la máxima concentración celular obtenida fue de 86.0 DO_{600} .

Los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una $r^2=0.99$ tanto para la concentración de masa como para concentración de sustrato.

Cabe mencionar que se pudo evitar la precipitación de sales tanto como en lote y PAE, las cuales ocasionaban problemas provocando taponamiento en las líneas de alimentación de este último y limitaba el crecimiento celular.

Se observa como un cultivo PAE puede llegar a concentraciones celulares hasta 5 veces mayor que un sistema por lote. También se puede apreciar que en los sistemas PAE no se tiene una fase estacionaria previa a la muerte celular, al contrario de un sistema en lote donde sí se puede observar una fase estacionaria antes de la fase de muerte.

4.2 Análisis de plásmido

Los análisis de plásmido consistieron en la determinación de pureza de plásmido por gel electroforesis y determinación de concentración de las muestras para la obtención del rendimiento específico y rendimiento volumétrico por medio de HPLC en ambos sistemas de cultivo.

4.2.1 Pureza de plásmido

Para control de calidad del plásmido, se llevaron a cabo determinaciones por electroforesis para ambos sistemas, lote y PAE, donde se analizó la presencia de isoformas en las muestras purificadas provenientes de las distintas fermentaciones.

En la Figura 8 se observa la imagen del gel de electroforesis tomada de las muestras del sistema en lote. Se puede observar la presencia del plásmido pVAX1-NH36 superenrollado y baja cantidades de la isoforma de circular abierta, también se observó como el contenido de plásmido va disminuyendo con el tiempo.

En la Figura 9 se puede apreciar también la disminución de plásmido con el tiempo en la fase lote del cultivo PAE. Sin embargo, al iniciar la alimentación de medio fresco al sistema, la concentración de plásmido empieza a incrementarse poco a poco hasta el final del experimento. Este resultado ha sido obtenido con glicerol como sustrato limitante (García-Rendón, et al., 2017) y ahora demostrado con glucosa.

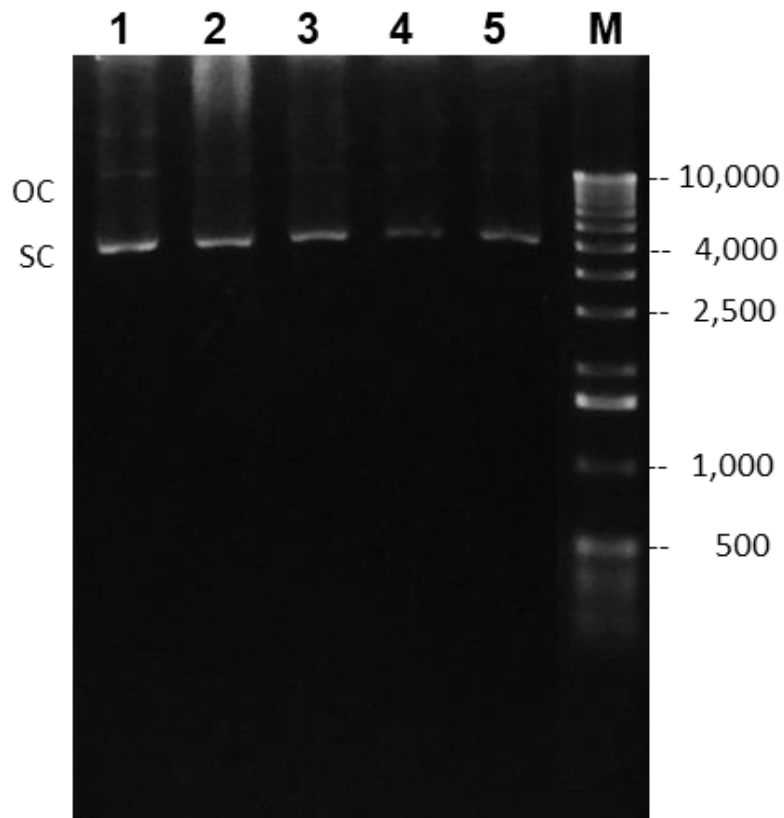


Figura 8. Gel de electroforesis de muestras purificadas de la fermentación por lote. Líneas 1-5 corresponden a 0, 2, 4, 5 y 5.5 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.

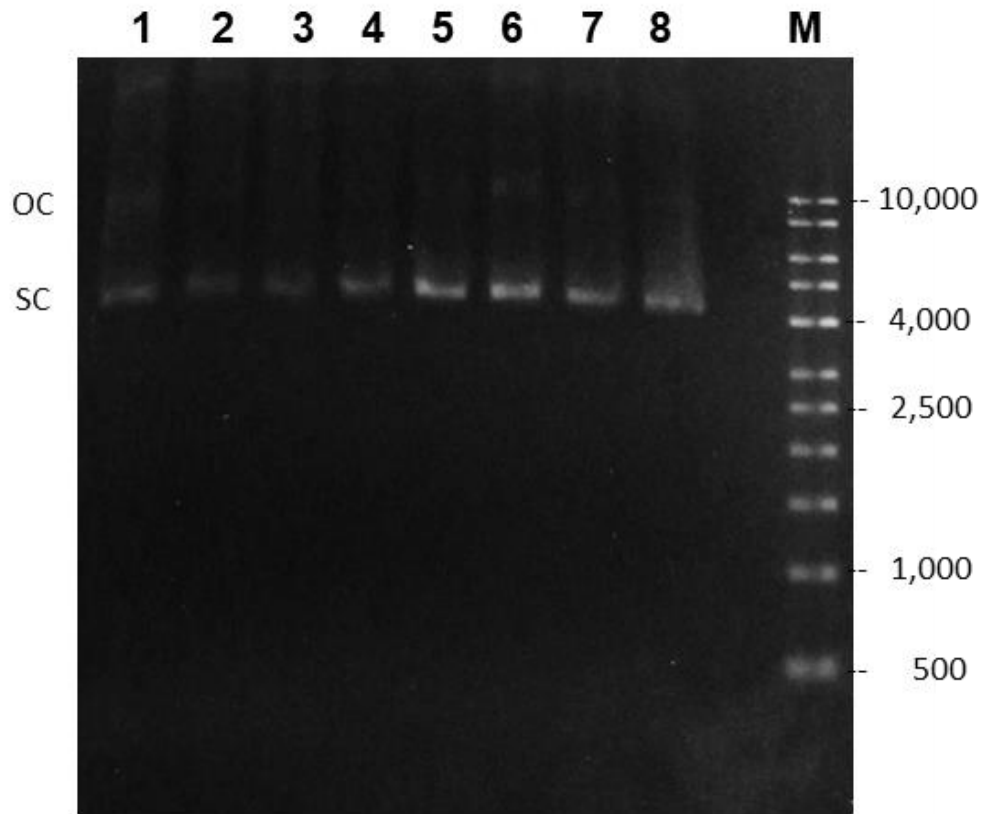


Figura 9. Gel de electroforesis de muestras lisadas y purificadas de la fermentación PAE. Líneas 1-8 corresponden a time 0, 4, 5, 5.5, 6, 8, 10 y 12 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.

4.2.2 Rendimiento específico y volumétrico del plásmido

La cinética de formación de plásmido expresada como de rendimiento específico y volumétrico en los cultivos a nivel biorreactor por lote y PAE se muestran en la Figura 10.

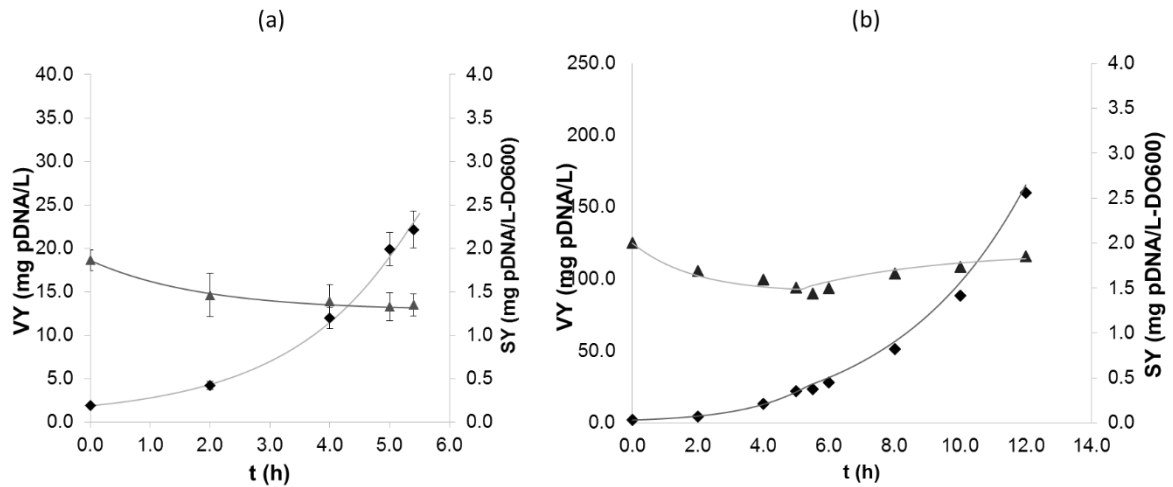


Figura 10. Cinética de producción de plásmido para un medio con glucosa en fermentación por lote (a) fermentación PAE (b). Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas solidas). Rendimiento volumétrico de plásmido (◆), Rendimiento específico de plásmido (▲).

En el experimento modo lote (Figura 10a), los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una $r^2=0.99$ tanto para rendimiento volumétrico y rendimiento específico. El rendimiento específico (SY) final fue de 1.35 mg/(L-OD₆₀₀) y un rendimiento volumétrico (VY) 22.10 mg/L.

En el experimento modo PAE (Figura 10b), los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una $r^2=0.99$ para

rendimiento volumétrico y $r^2=0.95$ para el rendimiento específico. El SY fue de 1.86 mg/(L-OD600) y el VY 160.00 mg/L.

Aquí se pudo corroborar los resultados cualitativos obtenidos en el análisis de pureza del plásmido por medio de electroforesis. Se observa que el rendimiento volumétrico de plásmido en un sistema PAE es por mucho, mayor que el rendimiento obtenido en el sistema por lote, ya que en este no se controló la velocidad a la que las células crecían, lo mismo que lleva a una disminución del rendimiento específico de plásmido conforme avanzan las horas, lo que también se puede observar en el método PAE durante su fase lote, pero al empezar la alimentación de medio de cultivo nuevo al biorreactor y la recirculación en este, se observa un ligero incremento hasta el fin del experimento, esto gracias a que el acetato acumulado durante la fase lote se retira por medio del método PAE, recirculando así solo medio limpio al biorreactor permitiendo un óptimo crecimiento de las células y buen desarrollo del plásmido.

4.3 Control del oxígeno en modo lote y PAE

Las gráficas de control de oxígeno durante los experimentos en modo lote y PAE se muestran a continuación en la Figura 11.

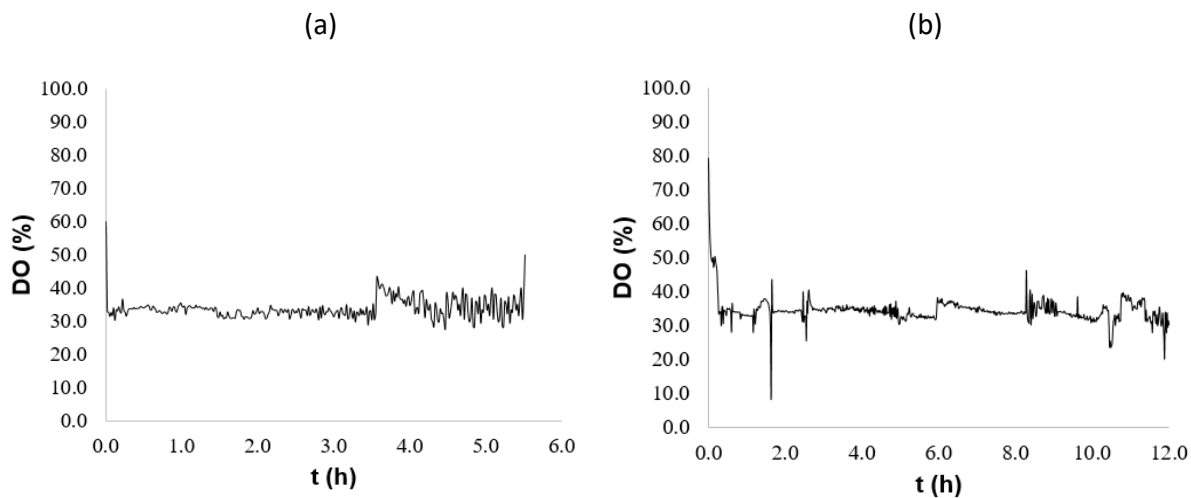


Figura 11. Control de oxígeno disuelto durante experimento en modo lote (a) control de oxígeno disuelto durante experimento en modo PAE (b).

Durante toda la experimentación con glucosa se mostró un comportamiento estable tanto en modo lote (Figura 11a) como con el sistema PAE (Figura 11b).

En cultivos aeróbicos de *E. coli* usando glucosa como sustrato, el rendimiento de biomasa basado oxígeno (Y_{x/O_2}) es más alto que usando otra fuente de carbón como lo es el glicerol (de Almeida, et al., 2010; Hempfling, et. al., 1975) esto implica una menor velocidad de consumo celular de oxígeno y conduce a un efecto sinérgico ya que en el cultivo es necesaria menos aireación y, en consecuencia, menos antiespumantes. En estas condiciones se obtiene un mejor control y transferencia de oxígeno. La adición de antiespumante incluso a bajas concentraciones, disminuye notablemente el coeficiente volumétrico de transferencia de masa gas-liquido kLa (Koch, et al., 1995). Aunque el mayor efecto está en el coeficiente de película kL , también se detecta algún efecto en el área específica (a) (Morao, et al., 1999).

4.4 Análisis comparativo del efecto de la fuente de carbono

Para determinar el efecto de la fuente de carbono utilizada en el medio, los resultados obtenidos en esta investigación en cultivos por lote y PAE fueron comparados con los resultados previamente reportados (García-Rendón, et al., en prensa) utilizando un medio definido con glicerol como fuente de carbono, en la Tabla 3 se muestra un resumen de los parámetros utilizados en el análisis.

Tabla 3. Parámetros de cultivos por lote y PAE.

Parámetros del cultivo lote				
Símbolo	Glucosa	Glicerol	Unidades	Descripción
X_0	1.00	1.00	OD ₆₀₀	Concentración inicial de biomasa
X_m	16.36	12.50	OD ₆₀₀	Máxima concentración de biomasa
μ_m	0.55	0.50	1/h	Velocidad de crecimiento máxima
$Y_{X/S}$	1.16	0.86	OD ₆₀₀ -L/g	Coefficiente de rendimiento (biomasa/sustrato)
$Y_{P/X}$	1.28	2.78	mg/(L-OD ₆₀₀)	Coefficiente de rendimiento (plásmido/biomasa)
Parámetros del cultivo PAE				
Símbolo	Glucosa	Glicerol	Unidades	Descripción
X_0	1.00	1.00	OD ₆₀₀	Concentración inicial de biomasa
X_m	86.00	66.50	OD ₆₀₀	Máxima concentración de biomasa
K_s	0.10	0.10	g/L	Constante de saturación
μ_p	0.25	0.25	1/h	Velocidad máxima de crecimiento
VD	3.00	3.00	L	Volumen total alimentado
$Y_{X/Sp}$	1.16	0.86	OD ₆₀₀ /(g/L)	Coefficiente de rendimiento fase PAE (biomasa/sustrato)
$Y_{P/Xb}$	1.44	2.85	mg/(L-OD ₆₀₀)	Coefficiente de rendimiento fase lote (plásmido/biomasa)
$Y_{P/Xp}$	1.90	3.65	mg/(L-OD ₆₀₀)	Coefficiente de rendimiento para la fase PAE (plásmido/biomasa)

La concentración final de biomasa utilizando glucosa en un cultivo PAE, fue un 31% más alto que con glicerol, y aunque este último presente una producción más alta de plásmido, sus costos operacionales son más altos que un cultivo con glucosa.

5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se demostró la flexibilidad del proceso para la producción de plásmido PVAX1-NH36 en relación a la fuente de carbono.
- El sistema PAE presenta mayores rendimientos específicos y volumétricos que el cultivo por lote.
- El uso de glucosa permite obtener una mayor densidad celular, que compensa parcialmente el bajo rendimiento específico (comparado con glicerol).
- La simulación de los modelos matemáticos utilizados presentaron un buen ajuste a los datos experimentales obtenidos.

5.2 Recomendaciones

Es importante el orden en que los componentes del medio se mezclan y se esterilizan, ya que es un factor primario para evitar la formación de sales que inhiben el crecimiento celular y ocasionan taponamiento en las mangueras y membrana utilizadas en el método PAE.

Todos los inóculos utilizados en los experimentos provinieron de un mismo banco de células para que todos los resultados sean replicados.

El sensor de oxígeno y pH juegan un papel muy importante en la fermentación, por lo cual, para evitar fallas en estos, es necesario esterilizar por separado solo con alcohol antes de incorporarlos al biorreactor.

Las muestras tomadas durante las fermentaciones deben ser procesadas en tiempo real permitiendo la toma de decisiones durante el bioproceso.

El congelamiento para la conservación de las muestras tomadas en la experimentación se realizó en glicerol, y estas debieron ser centrifugadas previas a cualquier análisis, para evitar que la presencia de glicerol interfiera en los resultados.

Para un mejor resultado en la producción de plásmido con la técnica PAE, se puede optar por una combinación con las dos fuentes de carbono, glucosa y glicerol, asegurando así una concentración alta de biomasa y un rendimiento volumétrico alto de plásmido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Be I, da Silva Zardo R, Paraguai de Souza E., Borja-Cabrera G P, Rosado-Vallado M, Mut-Martin M, García-Miss M R, Palatnik de Sousa C B, Dumonteil E. Cross protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73(2): 812–819.
2. Carlson A., Signs M., Liermann L., Boor, R. Jem K.I. (1995). Mechanical disruption of *E. coli* for plasmid recovery. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 303-315.
3. Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.*, 153, S347-S357.
4. Birnboim, H. C. (1988). Citation classic - a rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Current Contents/Life Sciences*(45), 12-12.
5. Carnes, A. E. (2005). Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess Int.*, 3(9), 36-44.
6. Carnes, A. E., Hodgson, C. P., Williams, J. A. (2006). Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 45, 155-166.
7. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications (Draft Guidance). US Food and Drug Administration: Rockville, MD, December 1996; www.fda.gov/cber/gdlns/plasmid.pdf.
8. Chattergoon, M., Boyer, J., Weiner, D. B. (1997). Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *Faseb Journal*, 11(10), 753-763.
9. Danquah, M. K., Forde, G. M. (2007). Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *J. Biosci. Bioeng.*, 104(6),

490-497.

10. de Almeida, A., Giordano, A. M., Nickel, P. I., Pettinari, M. J. (2010). Effects of Aeration on the Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Glycerol and Glucose in Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(6), 2036-2040.
11. Durland, R. H., Eastman, E. M. (1998). Manufacturing and quality control of plasmid-based gene expression systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 30(1-3), 33-48.
12. García-Rendón, A., Munguía-Soto, R., Montesinos-Cisneros, R. M., Guzman, R. Tejada-Mansir, A. (2017). Performance analysis of exponential-fed perfusion cultures for ADNp vaccines production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92: 342–349.
13. Grunwald, T. and Ulbert, S. (2015). Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4(1), 1-10.
14. Gurunathan, S., Klinman, D. M., Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: Immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 927-974.
15. Hempfling, W. P., Mainzer, S. E. (1975). Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of *Escherichia coli* in continuous culture. *J. Bacteriol.*, 123(3), 1076–1087.
16. Kelley B.D., Hatton T.A. (1991). The fermentation downstream processing interface. *Bioseparation*, 1 (5), 333-349.
17. Kurstak, E. (2017). Tenth World Congress on Vaccines, Immunisation and Immunotherapy. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 13(2), 253–254.
18. Koch, V., Ruffer, H. M., Schugerl, K., Innertsberger, E., Menzel, H., Weis, J. (1995). Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors. *Process Biochem.*, 30(5), 435-446.

19. Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N. A., Marquet, M. (1996). High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gen. Ther.*, 7(16), 1971-1980.
20. Lee, C. W., Gu, M. B., Chang, H. N. (1989). High-density culture of escherichia-coli carrying recombinant plasmid in a membrane cell recycle fermenter. *Enzym. Microb. Technol.*, 11(1), 49-54.
21. Leitner, W. W., Ying, H., & Restifo, N. P. (1999). DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 18(9-10), 765-777.
22. Listner K., Bentley L.K., Chartrain M. (2006). A simple method for the production of plasmid DNA in bioreactors. In: Saltzman WM, Shen H, Brandsma JL, editors. *DNA vaccines: Methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. p 295-309.
23. Lopes M. B., Martins G., Calado C. R. (2014). Kinetic modeling of plasmid bioproduction in *Escherichia coli* DH5 α cultures over different carbon-source compositions. *J Biotechnol* 186: 38-48
24. Morao, A., Maia, C. I., da Fonseca, M. M. R., Vasconcelos, J. M. T., Alves, S. S. (1999). Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Bioprocess Eng.*, 20(2), 165-172.
25. Mota-Sánchez, Javier. (2009). Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Pública Mex.*, 51(Supl. 3), s463-s469
26. Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends. Biotechnol.*, 18(3), 119-128.
27. O'Kennedy, R. D., Ward, J. M., Keshavarz-Moore, E. (2003). Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 83-90.
28. Prather, K. J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzym. Microb. Technol.*, 33(7), 865-883.

29. Prazeres, D. M. F. (2008). Prediction of diffusion coefficients of plasmids. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(4), 1040-1044.
30. Prazeres, D. M. F., Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A., Cooney, C. L., Cabral, J. M. S. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trend. Biotechnol.*, 17(4), 169-174.
31. Robinson H.L., Ginsberg H. S., Davis H. L., Johnston S. S., Liu M. A. (1997) The scientific future of DNA for immunization. In: American Society for Microbiology. The American Academy of Microbiology Colloquia. 3-31.
32. Rosado-Vallado M, Mut-Martin M, Garcia-Miss Mdel R, Dumonteil E. Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 2005; 23:5372–5379
33. Shroff K, Smith L, Baine Y, Higgins T. (1999). Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millenium. *Pharm. Sci. Technol. Today*. PSTT 2:205–12.
34. Srivastava, I. K., Liu, M. A. (2003). Gene vaccines. *Ann. Inter. Med.*, 138(7), 550-559.
35. Tejada-Mansir, Armando, Montesinos, Rosa M. (2008). Upstream Processing of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Recent Pat. Biotechnol.* (2): 156-172.
36. Williams, J. A., Carnes, A. E., Hodgson, C. P. (2009). Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.*, 27(4), 353-370.
37. Zeng, A. P., Deckwer, W. D. (1999). Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density. *Biotechnol. Progr.*, 15(3), 373-382.

