



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Respuesta de la carga y el sobreflujo metabólico de *Escherichia coli* DH5a en la producción de ADNp bajo condiciones de estrés:
experimentación y modelado**

Tesis que presenta

Fernando Grijalva Hernández

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dr. Ricardo Aguilar López**

México, D.F.

Enero 2019



Comité tutorial

Director de tesis:

Dr. Ricardo Aguilar López

Asesores:

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Dr. Jaime Ortega López

Dr. Álvaro Raúl Lara Rodríguez

Dr. Roberto Ruíz Medrano



El trabajo que aquí se presenta se realizó en los laboratorios de control y análisis dinámico y de biocatálisis del departamento de biotecnología y bioingeniería del centro de investigación y estudios avanzados del instituto politécnico nacional (Cinvestav-IPN), unidad Zacatenco, ciudad de México, México.



Dedicatoria:

A mis padres **Margarita y Horacio** quienes me apoyaron tanto moral como económicamente para concluir satisfactoriamente esta elección que hice de retomar mis estudios y que a pesar de las adversidades siempre han estado no sólo en el aspecto profesional sino en cada uno de los aspectos de mi formación como persona.

A mi hermano **Daniel y su familia** para quienes quiero seguir siendo un motivo de orgullo y para mis sobrinos de ejemplo y como lo dije hace tanto tiempo, eres mi único hermano, pero por mucho estoy seguro que eres el único que necesitaba.

A mi abuelita **Paulina** por cada abrazo y beso cada vez que te veo, como si fuera el último o el primero.

A mi tía **Remedios** quien seguirá siendo parte de un apoyo que pareciera no existir, pero que indudablemente está.

Por último, a mis dos grandes pérdidas durante mi estancia en la maestría: mi tío **José Luís†** de quien con admiración puedo decir “que valiente” y mi hermano por elección **Sergio†** de quien siempre mantendré la promesa de hacer las cosas por los dos.



Agradecimientos:

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría (Becario 485106).

Al Dr. Ricardo Aguilar López y la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas por su apoyo incondicional e invaluable consejos, así como su tolerancia frente a las que nos vimos involucrados para la conclusión de éste trabajo.

A los doctores Jaime Ortega López, Álvaro Raúl Lara Rodríguez y Roberto Ruíz Medrano por todas las observaciones y consejos que surgieron y que gracias a ellos puedo tener una idea clara de lo que se debe seguir haciendo para enriquecer más los proyectos que pretenda poner en marcha.

Al IBQ. Jesús Vega por recordarme que la pasión es uno de los ingredientes clave de la investigación.

A la Dra. Laura Jenitzia y María del Carmen Fontaine quienes siempre estuvieron ahí para escuchar cuando perdía el camino.

Por último, a todos y cada uno de las personas que he conocido en éste parpadeo llamado vida, ya que han sido parte de mi formación y crecimiento.



Contenido	
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de las vacunas	2
1.1.1 Las vacunas de ADN plasmídico	2
1.2 Producción de ADN plasmídico	3
1.2.1 Combinación plásmido-huésped	4
1.2.2 Medio de cultivo	5
1.2.3 Condiciones de producción	5
1.2.4 Modo de operación del reactor	6
1.3 Métodos para el incremento de la replicación de ADNp: estrés causado sobre <i>E. coli</i> y su consecuencia sobre el sobreflujo y carga metabólica	9
1.4 Desarrollo de modelos para sistemas biológicos de producción	12
1.4.1 Balances macroscópicos	13
1.4.1.1 Modelos cinéticos NO estructurados	14
1.4.2 Sistemas dinámicos	16
1.4.2.1 Sistema lineal	16
1.4.2.2 Sistema NO lineal	16
1.4.2.3 Linealización de un sistema NO lineal	17
1.4.3 Estimación de estados en reactores	19
1.4.3.1 Problemas sobre la estimación de estados	19
1.4.3.2 Observadores y observabilidad	20
1.5 Justificación	21
1.6 Hipótesis del trabajo	22
1.7 Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 2	24
DESCRIPCIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 Etapa 1	25
2.2 Etapa 2	31
2.3 Etapa 3	42
CAPÍTULO 3	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 Relación entre la producción de ADNp y la expresión de NPT II	47



3.1.1	Efecto del tiempo de reacción sobre la linealidad de la curva de calibración de NPT II por el método ELISA	47
3.1.2	Producción de ADNp mediante <i>Escherichia coli</i> DH5α en cultivo por lote	48
3.1.3	Validación del método ELISA y evaluación de la extracción de NPT II	50
	Validación	50
	Efecto de los ciclos de sonicación sobre la extracción de NPT II a diferentes concentraciones de biomasa	51
3.1.4	Cinética de la síntesis de NPT II cuantificada por ELISA y comparada con LC-MS/MS en <i>Escherichia coli</i> DH5α durante la producción ADNp en cultivo por lote	52
3.2	Experimentación, modelado y observabilidad durante la producción de ADNp	56
3.2.1	Observabilidad aplicada a la estimación de ADNp en cultivo por lote utilizando <i>Escherichia coli</i> DH5α mediante un observador de estado simple	57
3.2.2	Experimentación y modelado para investigar el comportamiento cinético debido a la temperatura en la producción de ADNp mediante <i>Escherichia coli</i> DH5α	63
	3.2.2.1 Experimentos para la producción de ADNp	64
	3.2.2.2 Identificación paramétrica, sensibilidad y simulaciones	66
	3.2.2.3 Termodinámica y análisis de la influencia de la temperatura sobre los parámetros	70
3.3	Estudio de la combinación de factores de estrés para el incremento en la producción de ADNp 78	
3.3.1	Cinéticas de producción de ADNp por <i>E. coli</i> creciendo con una concentración inicial de kanamicina de 50 mg/L a 30 °C y 42 °C en cultivo por lote	78
3.3.2	Producción de ADNp variando la concentración inicial de kanamicina en cultivo por lote a 30 y 42 °C	83
	Concentración máxima de biomasa, velocidad de crecimiento, velocidad consumo de glicerol y rendimiento de biomasa/glicerol	83
	Productos del sobreflujo metabólico	84
	Carga metabólica	85
	Producción de ADNp	86
	Análisis estadístico	88
	Cambios morfológicos	90
3.3.3	Efecto de la concentración de kanamicina en cultivos termo-inducidos de alta densidad celular	94
	CAPÍTULO 4	98
	CONCLUSIONES	98
	CAPÍTULO 5	102
	BIBLIOGRAFÍA	102
	CAPÍTULO 6	110
	ANÉXOS	110



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Mapa simplificado del plásmido pVAX-NH36 (tomado de Pérez-Martínez., 2009)	25
Fig. 2. Espectro completo de MS/MS de la Neomicina fosfotransferasa II (NPT II)	29
Fig. 3. Diagrama del observador de estado propuesto	34
Fig. 4. Rutas metabólicas simplificadas, involucradas en la producción de ADNp usando <i>Escherichia coli</i> DH5 α	37
Fig. 5. Linealidad y tiempo de reacción del método adaptado de ELISA para el análisis de NPT II. Las absorbencias de la curva de calibración fueron determinadas para concentraciones de 18 a 144 ng/mL e incubada a diferentes temperaturas. Cada punto en la curva representa el promedio de tres determinaciones en cada tiempo de reacción.	48
Fig. 6. Perfiles de producción del sistema <i>Escherichia coli</i> DH5 α -pVAX-NH36. A: producción de DCW y consumo de glicerol; B: rendimientos volumétricos de ADNp y NPT II; C: producción de ácidos orgánicos. Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes.	50
Fig. 7. Correlación entre los métodos ELISA y LC-MS/MS para la detección de NPT II en muestras de fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α -pVAX1-NH36	53
Fig. 8. Rendimientos específicos de ADNp y NPT II en la fermentación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α -pVAX-NH36, en medio de cultivo definido a 37 °C. Las diferentes fases de producción son identificadas con números romanos. Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes.	56
Fig. 9. Dinámicas de la concentración de glucosa.	58
Fig. 10. Dinámicas de la concentración de biomasa.	59
Fig. 11. Dinámicas de la concentración de acetato.	59
Fig. 12. Dinámicas de la concentración de ADNp.	60
Fig. 13. Dinámicas de la concentración de glicerol.	60
Fig. 14. Trayectorias del desempeño para el observador propuesto para la estimación de plásmido con el uso de glucosa.	61
Fig. 15. Trayectorias del desempeño para el observador propuesto para la estimación de plásmido con el uso de glicerol.	61



- Fig. 16.** Comparación de la norma de error de estimación entre el observador Luenberger y el observador propuesto. 62
- Fig. 17.** Producciones máximas de biomasa, ácidos orgánicos (acetato, lactato, formiato y succinato), ADNp y NPT II en fermentaciones de *E. coli* DH5 α a diferentes temperaturas (30, 33, 35, 37, 40 y 42 °C). Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes. 66
- Fig. 18.** Cinéticas experimentales y simuladas de la producción de ADNp mediante *E. coli* DH5 α . Las líneas continuas representan las concentraciones modeladas y los círculos indican los valores experimentales a 37 °C. 69
- Fig. 19.** Perfiles obtenidos del análisis de sensibilidad local para todas las variables modeladas a lo largo del tiempo de producción: biomasa, glicerol, ADNp, acetato, lactato, formiato, succinato y NPT II. 70
- Fig. 20.** Rutas metabólicas implicadas en la producción de ADNp en *E. coli* en crecimiento aeróbico con medio mínimo más glicerol. A y B: glicólisis, ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ruta de las pentosas fosfato para la producción de intermediarios metabólicos usados en la síntesis de ADNp y NPT II; C: valores de energía de activación reportados para organismos mesófilos. Los asteriscos representan los productos metabólicos y las reacciones medidas en este trabajo. N.A: No disponible. 74
- Fig. 21.** Cinéticas de crecimiento de *E. coli* DH5 α y de consumo de glicerol bajo cinco diferentes estrategias incluidas en el diseño experimental. Las barras de error denotan las desviaciones experimentales entre duplicados. 81
- Fig. 22.** Concentración máxima de productos del sobreflujo metabólico bajo condiciones comunes de producción y las cinco diferentes estrategias incluidas en el diseño experimental. 82
- Fig. 23.** Relación entre la producción de NPT II, proteína total y ADNp 83
- Fig. 24.** Electroforesis en gel de agarosa para las 5 estrategias incluidas en el diseño experimental: línea 1 and 14, el marcador de peso molecular (1 kb DNA); líneas 3-4, T1 (1:1 and 1:2); líneas 5-6, T2 (1:1 and 1:2); líneas 7-8, T3 (1:1 and 1:2); líneas 9-10, T4 (1:1 and 1:4); y líneas 11-12, T5 (1:1 and 1:4). 88
- Fig. 25a.** Las imágenes de MEB en pares de muestras de *Escherichia coli* DH5 α de los experimentos llevados a cabo en esta etapa. Micrografía superior: x10000; Inferior: x25000. A-B: control a t=0 para todos los tratamientos; C-D, E-F y G-H fueron tomadas al estado estacionario (— 1 μ m). 93
- Fig. 25b. (continuación).** Las imágenes de MEB en pares de muestras de *Escherichia coli* DH5 α de los experimentos llevados a cabo en esta etapa. Micrografía superior: x10000; Inferior: x25000. A-B: control a t=0 para todos los tratamientos; I-J, K-L, M-N y O-P fueron tomadas al estado estacionario (— 1 μ m). 94



Fig. 26. Perfiles de cultivos en lote-alimentado usando glicerol a una velocidad de calentamiento de 0.025 °C/min desde 30 a 42 °C. A, B y C corresponden al cultivo control con 50 mg/L de concentración de kanamicina y D, E y F corresponden a un cultivo con 300 mg/L de concentración de kanamicina agregada por un pulso cuando comenzó el incremento de temperatura. Las barras de error indican las desviaciones experimentales entre experimentos duplicados. RV-ADNp = Rendimiento volumétrico de ADNp, RE-ADNp = Rendimiento específico de ADNp, PV-ADNp = Productividad volumétrica de ADNp, RV-NPTII = Rendimiento volumétrico de NPTII y RE-NPTII = Rendimiento específico de NPT II

96



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Modelos cinéticos de inhibición por sustrato	14
Tabla 2. Modelos cinéticos de inhibición por producto	14
Tabla 3. Combinación de modelos cinéticos.	15
Tabla 4. Programa de gradientes de elución de LC	28
Tabla 5. Condiciones de LC-MS/MS	29
Tabla 6. Diseño experimental 2 ² con el componente central para evaluar el efecto sinérgico sobre la producción de ADNp	43
Tabla 7. Resultados de la validación del método ELISA para la cuantificación de NPT II.	51
Tabla 8. Concentración de NPT II en muestras representativas de fermentación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α -pVAX1-NH36 a diferentes ciclos de sonicación determinados mediante ELISA.	52
Tabla 9 Errores de correlación y valores <i>p</i> calculados para la medición con ELISA y LC-MS/MS para la cuantificación de NPT II	54
Tabla 10. Valores para cada uno de los parámetros del modelo, obtenidos del ajuste paramétrico no lineal.	67
Tabla 11. Índices de la correlación lineal para cada variable de estado y el índice global del modelo comparado con los datos experimentales a 37 °C.	68
Tabla 12. Valores de energía de activación y constante de Arrhenius para cada parámetro analizado y el índice de correlación calculado a partir del ajuste al modelo de Arrhenius.	72
Tabla 13. Parámetros termodinámicos de la producción de ADNp mediante <i>E. coli</i> DH5 α bajo diferentes temperaturas entre 30 °C y 42 °C	77
Tabla 14. Resumen del efecto de las condiciones comunes de producción y tratamientos evaluados sobre la concentración máxima de biomasa, velocidad de crecimiento, rendimiento de biomasa y velocidad de consumo de glicerol en cultivo de <i>E. coli</i> -pVAX1-NH36.	78
Tabla 15. Resultados de todas las condiciones de los tratamientos evaluados sobre: rendimiento volumétrico y específico de ADNp, productividad volumétrica de ADNp y rendimiento volumétrico y específico de NPT II en cultivos por lote de <i>E. coli</i> -pVAX1-NH36. Los datos son reportados durante la fase estacionaria.	82
Tabla 16. ANOVA y prueba de significancia para rendimientos de ADNp y NPT II.	90



Nomenclatura

Símbolo	Descripción	Unidades
X	Concentración de biomasa	g/L
Gli	Concentración de glicerol	g/L
Ac	Concentración de acetato	g/L
Suc	Concentración de succinato	g/L
Form	Concentración de formiato	g/L
Lac	Concentración de lactato	g/L
ADNp	Concentración de plásmido	mg/L
NPT II	Concentración de neomicina fosfotransferasa II	mg/L
μ_{max}	Velocidades máxima de crecimiento	h^{-1}
vp_{Ac}	Velocidad de producción de acetato	h^{-1}
VC_{Ac}	Velocidad de consumo de acetato	h^{-1}
vp_{Suc}	Velocidad de producción de succinato	h^{-1}
VC_{Suc}	Velocidad de consumo de succinato	h^{-1}
vp_{Lac}	Velocidad de producción de lactato	h^{-1}
vp_{Form}	Velocidad de producción de formiato	h^{-1}
VC_{Form}	Velocidad de consumo de formiato	h^{-1}
V_{pDNA}	Velocidad de producción de plásmido	h^{-1}
V_{NPTII}	Velocidad de producción de NPT II	h^{-1}
K_{Gly}	Constate de afinidad para glicerol	g/L
K_{iAcX}	Constante de inhibición de crecimiento por acetato	g/L
K_{GlyAc}	Constate de afinidad para acetato	g/L
K_{Ac}	Constante de afinidad para consumo de acetato	g/L
K_{GlySuc}	Constante de afinidad para succinato	g/L
K_{Suc}	Constante de afinidad para consumo de succinato	g/L
K_{GlyLac}	Constante de afinidad para lactato	g/L
$K_{GlyForm}$	Constante de afinidad para formiato	g/L
K_{Form}	Constante de afinidad para consumo de formiato	g/L
$K_{iAcpDNA}$	Constante de inhibición de producción de plásmido por acetato	g/L
$K_{GlypDNA}$	Constante de afinidad de glicerol para producción de plásmido	g/L
$K_{GlyNPTII}$	Constante de afinidad de glicerol para producción de NPT II	g/L
vp_{maxAc}	Velocidad máxima de producción de acetato	h^{-1}
VC_{maxAc}	Velocidad máxima de consumo de acetato	h^{-1}
vp_{maxSuc}	Velocidad máxima de producción de succinato	h^{-1}
VC_{maxSuc}	Velocidad máxima de consumo de succinato	h^{-1}
vp_{maxLac}	Velocidad máxima de producción de lactato	h^{-1}
$vp_{maxForm}$	Velocidad máxima de producción de formiato	h^{-1}
$VC_{maxForm}$	Velocidad máxima de consumo de formiato	h^{-1}
$V_{maxpDNA}$	Velocidad máxima de producción de plásmido	h^{-1}
$V_{maxNPTII}$	Velocidad máxima de producción de NPT II	h^{-1}
Vdeg	Velocidad de degradación de NPT II	h^{-1}
m_{Gly}	Constante de energía de mantenimiento para glicerol	g/g.h
$Y_{X/Gly}$	Rendimiento de biomasa/glicerol	g/g
$Y_{Ac/Gly}$	Rendimiento de acetato/glicerol	g/g



$Y_{pDNA/Gly}$	Rendimiento de plásmido/glicerol	mg/g
$Y_{NPTII/Gly}$	Rendimiento de NPT II/glicerol	mg/g
$Y_{Ac/X}$	Rendimiento de acetato/biomasa	g/g
$Y_{Suc/X}$	Rendimiento de succinato/biomasa	g/g
$Y_{Lac/X}$	Rendimiento de lactato/biomasa	g/g
$Y_{Form/X}$	Rendimiento de formiato/biomasa	g/g
$Y_{pDNA/X}$	Rendimiento de plásmido/biomasa	mg/g
$Y_{NPTII/X}$	Rendimiento de NPT II/biomasa	mg/g
E_a	Energía de activación	kJ/mol
A	Constante de Arrhenius	h^{-1}
$\Delta H^\#$	Cambio de entalpía	kJ/mol
$\Delta S^\#$	Cambio de entropía	J/mol.K
$\Delta G^\#$	Cambio de energía libre de Gibbs	kJ/mol
g_1	Ganancia del observador	g/L
g_2	Ganancia del observador	h^{-1}
ξ	Error de estimación	-



RESUMEN

En el presente trabajo, se llevaron a cabo estudios experimentales y numéricos para realizar un análisis detallado de la respuesta sobre la carga y sobreflujo metabólico durante la producción de plásmido (ADNp) en cultivos por lote de *Escherichia coli* DH5 α . Se demostró que no existía una relación lineal entre la producción de ADNp y la expresión de la proteína, neomicina fosfotransferasa (NPT II), relacionada a la carga metabólica, mediante la adaptación y validación de un método ELISA para su cuantificación. Se propuso un observador de estados para estimar la concentración de ADNp en cultivos por lote, a partir de las mediciones de biomasa, concluyendo que el sistema es parcialmente observable para la medición de plásmido. Se propuso una estructura de modelo, que involucró 8 variables clave en la producción de ADNp para poder utilizarlo en un estudio numérico-experimental sobre el efecto de la temperatura (30, 33, 35, 37, 40 y 42 °C) y observar el comportamiento del sistema. Los valores estimados se ajustaron bien ($R^2 > 0.94$) a los datos experimentales a 37 °C. La energía de activación (E_a) y parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS y ΔG) fueron calculados para el crecimiento, producción de ADNp, producción y degradación de NPT II, producción y consumo de acetato, succinato, lactato y formiato. Una vez concluido el estudio sobre el efecto de la temperatura, se planteó una alternativa basada en una estrategia sinérgica, obteniendo resultados prometedores en cultivo por lote y mostrando un efecto combinado a 42 °C y 300 mg/L de kanamicina, obteniéndose un aumento de 49%, 35% y 65% en rendimiento volumétrico, rendimiento específico y productividad, respectivamente. Los resultados muestran que el estudio detallado de factores de estrés se puede aplicar para la producción de pDNA y se demostró que existen alternativas a nivel del reactor para su incremento, modificando las condiciones de cultivo, antes de estudiar las modificaciones genéticas de la cepa huésped, que han sido ampliamente propuestos.



ABSTRACT

In the present work, experimental and numerical studies were carried out to perform a detailed analysis of the response in overflow metabolism and metabolic burden for plasmid (pDNA) production in batch cultures of *Escherichia coli* DH5a. It was demonstrated that there is non-linear relationship between pDNA production and the expression of the protein related to metabolic burden, neomycin phosphotransferase (NPT II), through the adaptation and validation of an ELISA method for its quantification. Later, a state observer was proposed to estimate the concentration of pDNA in batch cultures, from the biomass measurements, concluding that the system is partially observable for the measurement of plasmid. A new structure of model was proposed, which involved 8 key variables in the production of pDNA for later use it in an experimental-numerical study (30, 33, 35, 37, 40 and 42 °C) of the effect of temperature on the behavior of the system. The estimated values were well adjusted ($R^2 > 0.94$) to the experimental data at 37 °C. The activation energy (E_a) and thermodynamic parameters (ΔH , ΔS and ΔG) were calculated for growth, pDNA production, production and degradation of NPT II, acetate, succinate, lactate, formate production and consumption. Finally, starting from the study on the effect of temperature, an alternative based on a synergistic strategy was proposed, obtaining promising results in the crop by batch and showing a combined effect at 42 °C and 300 mg/L of kanamycin, was obtained an increase of 49%, 35% and 65% in volumetric and specific yields and productivity. The results show that the study of stress factors can be applied for the production of pDNA and it was demonstrated that there are alternatives to a level of the reactor for its increase, modifying the culture conditions, before studying the genetic modifications of the host strain, which have been widely proposed.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1.1 Generalidades de las vacunas

Por definición, una vacuna es una solución que contiene un antígeno, que administrada por vía oral, nasal o intramuscular estimula una respuesta del sistema inmune y activa una protección contra el o los patógenos. Esta respuesta puede ser inespecífica, cuando actúa contra todos los patógenos o específica cuando la respuesta es contra de algún patógeno en particular (Clem, 2011).

La primera generación de vacunas o vacunas tradicionales, se basan en el uso de los patógenos causantes de la enfermedad atenuados o muertos que son introducidos al sistema inmunológico para inducir posteriormente una respuesta inmune, como las vacunas contra la poliomielitis y viruela.

La segunda generación de vacunas, está compuesta por subcomponentes como una proteína específica o bien una proteína recombinante con propiedades antigénicas, por ejemplo, las vacunas contra el dengue, difteria y hepatitis B. Debido al desarrollo global y a la exposición a numerosos microorganismos causantes de diversas enfermedades, se han tenido que buscar diversas alternativas para combatir a dichos patógenos. Una alternativa a las vacunas tradicionales es el desarrollo de vacunas de ADN plasmídico (ADNp) (Tahamtan et al., 2017).

1.1.1 Las vacunas de ADN plasmídico

Las vacunas de ADNp o de tercera generación, se han venido estudiando desde los años 90's y son una opción más segura frente a las vacunas tradicionales. Las vacunas de ADN o vacunas génicas, involucran la introducción de uno o más genes funcionales que inducirán respuesta inmune en el organismo vacunado para prevenir las enfermedades infecciosas (Rajcani et al., 2005). El plásmido es un ADN extracromosómico, el cual se replica en forma autónoma y se encuentra en la mayoría de las bacterias. Actualmente sólo se han probado vacunas de ADNp para uso veterinario, como la vacuna contra el virus del Nilo en caballos. Sin embargo, hay numerosos estudios en diferentes etapas de desarrollo contra otras enfermedades como VIH, algunos tipos de cáncer y algunas enfermedades causadas por parásitos como las enfermedades de chagas, malaria y leishmaniasis (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2018; Lara et al., 2012; Leitner et al., 2000). En particular, la



Leishmaniasis es una enfermedad causada por un parásito protozoo del género *Leishmania*, que en la actualidad afecta a cerca de 12 millones de personas en países en vías de desarrollo (Hotez, 2008). En el protozoo *Leishmaniasis donovani*, se encontró un ligando de fucosa-manosa (FML) y una glicoproteína (Santana, 2002), con propiedades antigénicas. El principal componente inmunológico del complejo FML y de la glicoproteína, (GP36) es el fragmento NH36 y tiene actividad de nucleosil hidrolasa de 36 kDa, que fue clonada en el vector VR1012, obteniéndose la vacuna VR1012-NH36, que resultó ser inmunoprotectora e inmunoterapéutica en ratones de laboratorio contra diferentes cepas de *Leishmania* (Aguilar-Be et al., 2004). Por lo que se ha considerado que éste antígeno podría ser un candidato para atacar la leishmaniasis, en sus dos formas: visceral y cutánea.

Las vacunas de ADNp presentan algunas ventajas como son la tolerancia y seguridad, simplicidad en el diseño, no contienen organismos patógenos ni restos de estos, mínimos riesgos de inducción de una respuesta inmune contra antígenos propios o el ADN en sí mismo, se pueden incluir diversos plásmidos en una formulación contra diversas enfermedades o contra varias cepas de la misma inmunidad, costos de producción relativamente bajos y su transporte y distribución no requieren cadena fría ya que el plásmido purificado es estable a temperatura ambiente. En cuanto a las desventajas quizás la más importante es que se requieren grandes cantidades de ADNp súper-enrollado por cada dosis administrada, que van del orden de microgramos en animales, hasta miligramos en el humano, y además se debe cumplir con algunos requisitos como son: alto grado de pureza y cumplir con normas estrictas establecidas por la FDA (FDA, 1998). Por lo que es necesario desarrollar procesos de producción para dichas vacunas que sean reproducibles y económicamente factibles.

1.2 Producción de ADN plasmídico

Existen pocos reportes de producción a gran escala de ADNp en los que se obtienen concentraciones en órdenes de g/L, por lo que se requiere de estudios de escalamiento como un área de oportunidad en el ámbito de la ingeniería de fermentaciones (Carnes et al., 2006).



De manera general, los pasos involucrados en el proceso de producción de ADNp son: fermentación, aislamiento y purificación (Prazeres, 1999). Los aspectos más importantes para la producción por fermentación de plásmidos van desde el diseño del plásmido hasta las estrategias de fermentación incluyendo el diseño y preparación del medio de cultivo que tienen un marcado efecto sobre la productividad.

1.2.1 Combinación plásmido-huésped

La selección de plásmido a usar comúnmente se lleva a cabo, seleccionando un plásmido que utilice un gen de resistencia a antibiótico. Este método asegura que solo las células que contengan ese plásmido con las características seleccionadas, podrán propagarse en el medio de cultivo diseñado. Para el plásmido pVAX1-NH36 (utilizado en este trabajo) y otros plásmidos en trabajos relacionados a producción de ADNp o proteínas recombinantes, la kanamicina o la neomicina son los antibióticos que se usan y son recomendados por la FDA (FDA, 1996). Por otro lado, una característica importante en la producción de ADNp es el tamaño del plásmido, ya que muchos reportes han concluido que mientras más grande es el plásmido empleado, el estrés generado al huésped se incrementaría, lo que conlleva a una disminución de rendimiento máximo que podría ser alcanzado (Levy et al., 2000); sin embargo, este estrés también conocido como carga metabólica, se ha asociado y comprobado que es principalmente debido a la cantidad de proteína de resistencia (NPT II para el caso de kanamicina) producida y no al tamaño del plásmido usado (Rozkov et al., 2004).

La combinación correcta entre el huésped utilizado y el plásmido seleccionado es importante, generalmente se utilizan cepas de *E. coli*. Si bien es general el hecho de que existen una carga metabólica debido a la presencia del plásmido en el huésped, no existe a la fecha un consenso sobre una cepa en particular basada en el genotipo o fenotipo. Sin embargo, si se han reportado diferencias en la cantidad y calidad del plásmido producido en función de la cepa seleccionada, por ejemplo, algunas cepas como DH1, DH5 α , HB101, MG1655 y C600 han mostrado producir cantidades elevadas de ADNp de alta calidad (90% de plásmido súper enrollado) (O'Mahoney et al., 2007; Yau et al., 2008).



1.2.2 Medio de cultivo

Las condiciones de crecimiento involucran ciertos factores que nos hace reflexionar en un inicio, acerca de la formulación del medio, el cual a su vez afecta la calidad y rendimiento del plásmido, así como los costos finales de producción. El proceso de fermentación debe balancear tanto la demanda de las cantidades de nutrientes requeridos para la producción de energía, biomasa y mantenimiento celular. Para la formulación del medio de cultivo, deben tomarse en cuenta: el efecto de los componentes sobre el rendimiento y calidad del plásmido, rendimiento de biomasa, consistencia entre lotes, algunas interferencias en el o los procesos de purificación, así como aquellos aspectos regulatorios.

Generalmente se requiere del uso de medios de cultivo definidos o semi-definidos, ya que en la literatura se ha observado que se pueden obtener mayor número de copias de plásmido que en medios complejos (O'Kennedy y Patching, 1997) y especialmente en fermentaciones por lote alimentado (Carnes, 2011). El diseño del medio de cultivo tiene un alto impacto sobre la producción dependiendo del plásmido que se esté utilizando, además debe cumplir con los requerimientos ordenados por la FDA, como: no se permite el uso de productos derivados de fuentes animales. Los medios complejos no estimulan la producción de pDNA (Shoham et al., 1990); en tanto que los medios definidos y semidefinidos promueven la síntesis de pDNA y brindan estabilidad mayor al 63% en comparación con los medios complejos (Prather et al., 2003). Una desventaja de los medios definidos y semi-definidos es que al aumentar la velocidad de crecimiento se aumenta la producción de acetato, el cual es generado por una sobrecarga en el metabolismo. Su producción se debe a un desbalance del consumo de sustrato, sobre todo cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono (Duttweiler y Gross., 1998), por lo que se puede utilizar glicerol para remplazarla.

1.2.3 Condiciones de producción

La relación de plásmido súper-enrolados en comparación con las isoformas lineal y abierta se ve afectada por el oxígeno y la temperatura. El oxígeno desempeña un papel importante en la estabilidad del plásmido. La temperatura óptima de



crecimiento para *E. coli* es de 37 °C, sin embargo, se han utilizado temperaturas más bajas (30 °C) como estrategia de crecimiento. Se ha demostrado que se pueden emplear a altas temperaturas (42 °C), se puede emplear para inducir la amplificación selectiva del plásmido con orígenes de replicación tales como pUC y pMM1 que se ha demostrado que son sensibles a temperaturas y que por lo mismo aumentan el número de copias y a la vez reduce la velocidad de síntesis de ARN y ADN que se toman como contaminantes en la producción de plásmidos (Prazeres et al., 1999; Prather et al., 2003). Existen reportes como el de Filomena *et al.*, 2009 en el que con *Escherichia coli* DH5 α transformada con el plásmido pVAX1-LAcZ crecida a diferentes temperaturas (30, 32, 37 y 40 °C), se obtuvieron rendimientos específicos de plásmido, de 4.6 mg/g y 5.56 mg/g y grados de pureza de 35.68% y 45.72% respectivamente, a 37 y 40 °C.

Otros factores que regulan el crecimiento celular como la concentración de oxígeno disuelto (OD) y la concentración de antibiótico se deben investigar en los casos particulares cuando se diseña y optimiza un proceso para la producción de ADNp. La concentración de oxígeno disuelto también actúa como un indicador de la deficiencia de los nutrientes o de la formulación del medio de cultivo, especialmente en las fermentaciones en lote alimentado (Prather et al., 2003). Ha sido demostrado que, bajo condiciones de no limitación por oxígeno, las células alcanzan altas concentraciones en el medio de fermentación. Generalmente, el control del nivel de oxígeno disuelto a nivel de biorreactor se puede llevar a cabo mediante una cascada en el control de la agitación o bien por enriquecimiento en el aire suministrado, manteniendo el flujo de aire constante. En el caso del uso de antibiótico debe de aplicarse a casos particulares cuando se diseña y optimiza un proceso para la producción de ADNp.

1.2.4 Modo de operación del reactor

El principal objetivo de una fermentación para la producción de ADNp es maximizar su productividad, optimización de producción de biomasa y rendimiento específico. Un objetivo adicional es maximizar la pureza del plásmido al final de la fermentación. Dentro de la estrategia de crecimiento, la cantidad de inóculo y el modo



de fermentación (por lote, lote alimentado o continuo) pueden impactar de manera significativa el proceso.

Cultivo por lote

Las fermentaciones en lote por su propia naturaleza tienen desventajas fundamentales que resultan en el rendimiento limitados de pDNA. Esto es debido a inhibición por sustrato y precipitación de sales a altas concentraciones de nutrientes en el medio. Por otro lado, la velocidad de crecimiento en fermentaciones por lote no puede ser controlada de manera directa. La desventaja quizás más grande que tiene este modo de fermentación es que todos los nutrientes en un inicio están en exceso y eso hace que la velocidad de crecimiento sea esencialmente la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) que es indeseable en la producción de plásmidos. El perfil de crecimiento de una fermentación en lote consiste en una fase lag, una fase exponencial y una fase estacionaria que puede ser descrita de manera adecuada por una cinética tipo Monod (Shuker y Kargi, 2002). También se ha discutido que una velocidad de crecimiento reducida está relacionada de manera cercana a un incremento en el rendimiento específico del plásmido y que a su vez esto se puede alcanzar a una baja temperatura. De acuerdo al tipo de plásmido y el huésped utilizado, se pueden llegar a alcanzar rendimientos celulares entre 4 g/L y 29 g/L y a su vez rendimientos específicos de plásmido entre 8 mg/g y 17 mg/g con la estrategia en lote.

Cultivo por lote alimentado

Esta estrategia se define como un cultivo en lote donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo. El lote alimentado es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados. Así, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa.



Una de las estrategias de alimentación más simples y efectivas es la exponencial. Esto permite que el cultivo crezca a una velocidad predeterminada menor a su μ_{max} . Otro tipo de estrategia de alimentación conocido como control indirecto de alimentación de sustrato está basado en la medición en línea de parámetros fisiológicos como el pH, oxígeno disuelto y la concentración celular. Este tipo de fermentación es especialmente útil para la producción de plásmidos debido a la adición controlada y constante de los nutrientes que permite el control de la velocidad de crecimiento. Así también, la fermentación en lote alimentado da como resultado rendimientos elevados de biomasa (Ongkudon et al., 2011).

En la literatura se han reportado diferentes estrategias de fermentación para la producción de plásmidos, Danquah y Forde (2008), obtuvieron una densidad celular de 10 g/L con un rendimiento volumétrico de 500 mg/L utilizando *Escherichia coli* DH5 α -pUC19. Listner et al. (2006), obtuvieron una densidad celular y rendimiento de ADNp de 50 g/L y 1200 mg/L respectivamente utilizando diferentes construcciones de plásmidos en el sistema de *Escherichia coli*. Con objeto de reducir la presencia de isoformas de plásmido, tomando en cuenta que pueden existir 3 estructuras terciarias: súper enrollada, abierta y lineal. Las formas abierta y lineal se consideran como impurezas debido a su baja tasa de inmunización en comparación con la forma súper enrollada (Ricci y Hernandez., 2000); así mismo, para disminuir la concentración de toxinas, se ha empleado una estrategia conjunta que, en el modo de lote alimentado, es iniciar con una primera etapa de cultivo a 30 °C para reducir la acumulación de plásmido inestable y posteriormente se realiza un cambio de temperatura (37 °C o 42 °C) una vez alcanzada una concentración de biomasa dada. La principal ventaja lograda con esta estrategia, es que la acumulación subproductos o represores metabólicos debido a la alimentación controlada de nutrientes (fuente de carbono, fosfato y oxígeno), se ve significativamente reducida (Prather et al., 2003). Para llevar a cabo una fermentación en modo lote alimentado se inicia primero en modo en lote, esto es, bajo condiciones no limitadas y una velocidad de crecimiento óptima. Cuando uno o más nutrientes se han consumido, lo cual ocurre en la fase tardía de la fase exponencial, se cambia a lote alimentado (Park et al., 2004; Carnes, 2008). Para sincronizar el consumo y la alimentación de sustrato, si la medición de este no es



posible en línea, la primera estrategia consiste en un control a lazo abierto en donde la velocidad de alimentación de sustrato está controlada en un modelo previamente establecido, basado en datos experimentales, este control de alimentación puede consistir en una velocidad de alimentación, constante, lineal o exponencial (Furuichi et al., 2007; Carnes et al., 2006). La otra estrategia de alimentación que se utiliza es el control indirecto de sustrato que se basa en la medición en línea de parámetros fisiológicos como el pH, oxígeno disuelto y concentración celular.

El cultivo o fermentación continua presenta en general más ventajas en términos de la productividad obtenida de productos primarios como lo son las células, ya que la velocidad de crecimiento en condiciones de estado estacionario es controlada por la velocidad de dilución a velocidades menores a μ_{max} . (Tejeda-Mansir et al., 2008).

1.3 Métodos para el incremento de la replicación de ADNp: estrés causado sobre *E. coli* y su consecuencia sobre el sobreflujo y carga metabólica

Existen diferentes métodos que son usados para incrementar la tasa de replicación y el número de copias de ADNp por célula, los cuales causan estrés, mediante diferentes mecanismos moleculares. La *limitación por aminoácidos* activa la respuesta estricta en *E. coli*, basada en el incremento de la concentración del nucleótido ppGpp (guanosina 5'difosfato 3'difosfato), el cual, a su vez, inhibe la actividad de la ARN polimerasa, que en consecuencia suprime la síntesis de ARNr, ARNt y ADNp. La síntesis de ppGpp es realizada por la enzima *relA* que codifica para la ppGpp sintetasa I (Silva et al., 2012). Cepas de *E. coli* como la DH5 α que son mutantes de *relA* no producen ppGpp durante la limitación por aminoácidos (Riethdorf et al., 1989), por lo que la baja concentración de este nucleótido permite la acumulación de ARNt no cargados, disminuyendo la formación del complejo inhibitorio de la replicación (RNAII-RNAI) en los plásmidos tipo pColE1, incrementando su replicación (Silva et al., 2012). Otro método utilizado, consiste en la *adición de AMP*, el cual permite el incremento en el número de copias de ADNp, solamente en mutantes de *relA* y mediante la acumulación de ARNt no cargados desplazando el equilibrio hacia los reactivos de la reacción de carga de los ARNt (Wang et al., 2007). La *adición de*



cloranfenicol incrementa los rendimientos finales de pDNA, teniendo como base, la disminución del crecimiento celular, debido a la unión a los ribosomas y como consecuencia inhibir la síntesis de proteínas, seguida de la replicación de ADN cromosomal (Reinikainen et al., 1989; Hoffmann y Rinas, 2001). Al final, la inhibición de la replicación del ADN cromosomal permite que la maquinaria de replicación de la bacteria pueda ser utilizada en una mayor tasa para producir un mayor número de copias de plásmido.

Aunque la tendencia actual es utilizar plásmido libre de antibióticos en la producción de vacunas de ADNp debido al riesgo de reacciones graves de hipersensibilidad en pacientes, todavía se han utilizado pDNA que contienen gen de resistencia a la kanamicina (*nptII*) (García-Rendón et al. 2017; Gomes et al, 2017; Islas-Lugo et al, 2016), debido a que este antibiótico no se usa comúnmente para tratar infecciones humanas (Cranenburgh et al., 2004; Nelson et al., 2013; Vandermeulen et al., 2011). y NPTII (producto del gen *nptII* y la cual fosforila la kanamicina impidiendo su unión a ribosomas bacterianos) no posee ninguna de las características asociadas con proteínas alergénicas y toxicidad en humanos (FDA, 1997).

Aunado a lo anterior, la concentración de antibiótico en la fermentación es necesaria para mantener una presión de selección y para garantizar la segregación correcta del ADNp que contiene el gen de resistencia a la kanamicina que codifica NPT II (Hassan et al., 2016). La síntesis de NPT II consume varios precursores metabólicos, energía y poder reductor que pueden usarse para la replicación de ADNp, reduciendo los rendimientos finales en el proceso de producción (Rozkov et al., 2004; Cunningham et al., 2009). Esta carga metabólica se asocia principalmente con la síntesis de NPT II y no necesariamente con el aumento del tamaño del plásmido (Rozkov et al., 2004). Algunos estudios indican que aproximadamente el 20% de la proteína intracelular total es marcador de resistencia y la cantidad de NPT II que se expresa es mucho mayor que la requerida para la selección y el mantenimiento. Además, la alta producción de NPT II tiene un efecto adverso sobre los procesos de separación y purificación (Panayotatos N., 1988; Rozkov et al., 2004). La exposición a aminoglucósidos activa la expresión del grupo del gen *cps* que codifica varias de las enzimas implicadas en la síntesis y translocación exopolisacáridos y polisacáridos capsulares (PSC) (Rahn et



al., 1999), que muestran un efecto sobre la absorción de aminoglucósidos y podría estar involucrado en la protección celular; por otro lado, las endotoxinas que generalmente se refieren a CPS son los principales contaminantes en la producción de productos biológicos por *E. coli* (Ebel et al., 1999, Stevenson et al., 1996, Taber et al., 1987).

Otro factor importante que también ha mostrado un efecto positivo en el aumento de la velocidad de replicación en la producción de ADNp es la temperatura. El aumento de la temperatura (40-45 °C) produce pDNA cuando estos contienen un origen de replicación de pUC (un derivado de pMB1) (Silva F. et al., 2009; Jaén et al., 2013) debido a que este contiene una única mutación de base (de guanina a adenina) en el cebador de replicación (llamado ARN II) el cual afecta su plegamiento evitando la interacción con el represor (ARNI), reprimiendo eficazmente la síntesis de ADNp (Lin-Chao et al., 1992). Además, bajo esta condición, el rendimiento de biomasa se reduce y el sobreflujo metabólico aumenta debido a la respuesta por choque térmico (HSR) (Guisbert et al., 2004). Esta respuesta se traduce en una elevada síntesis de varias proteínas (principalmente proteasas y chaperonas), entre las que se pueden mencionar son: DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL y GroES. La síntesis de este conjunto de proteínas tiene como objetivo proteger al huésped del posible daño por el calor y controlar la homeostasis, incrementando la termo-resistencia (Valdez-Cruz et al., 2010).

En términos fisiológicos, la velocidad de consumo de la fuente de carbono se incrementa y por lo tanto los flujos de carbono también, siendo una excepción las rutas metabólicas del anabolismo como la de las pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), en las que disminuye el flujo de carbono; debido al incremento en la ruta glicolítica, cuando el flujo de carbono llega al nodo del piruvato, este es excretado en forma de ácidos orgánicos (acetato, lactato, succinato y formiato), reduciendo el flujo hacia CAT y por lo tanto de la cadena respiratoria. También Hasan y Shimizu (2008), observaron un aumento en el consumo de oxígeno y producción de CO₂, así, como en estudios transcripcionales se ha demostrado una represión de genes de proteínas de CAT.



En conclusión y de acuerdo con lo anterior, tanto la kanamicina como la temperatura inducen la síntesis de varias proteínas codificadas en *cps* y proteínas de choque térmico (HSP), que incluyen proteasas y chaperonas, que proporcionan protección contra la exposición al antibiótico kanamicina, lo que demuestra que la sobreexpresión del sistema GroEL/GroES protege el potencial de membrana de la bacteria y rescata el crecimiento celular (Goltermann et al., 2013; Guisbert et al., 2004; VanBogelen y Neidhardt, 1990).

1.4 Desarrollo de modelos para sistemas biológicos de producción

Un modelo matemático es una formulación matemática de la operación de un sistema en términos de sus constituyentes y mecanismos. En una fermentación aeróbica, los principales constituyentes son el sustrato, el oxígeno, la biomasa, el volumen del reactor, los flujos de sustrato, así como de aire, mientras que los principales mecanismos son el crecimiento microbiano, la transferencia de masa (aireación) y el mezclado (Gernaey et al., 2010). El desarrollo y construcción de un modelo siempre se ha caracterizado por mezclar aspectos teóricos con aspectos prácticos (experimentos). Es por ello que el proponer modelos matemáticos complejos, en ocasiones en la práctica, se cae, en procesos con variaciones no deseadas (Moser et al., 1985). En los modelos de simulación, los procesos son representados por una combinación de modelos empíricos y mecanísticos. En cuanto más conocimiento se genera del proceso, los modelos mecanísticos reemplazan de manera gradual a los empíricos. Los modelos mecanísticos para procesos de fermentación son desarrollados basándose en balances de masa, energía y momentum, apoyado con la formulación de apropiados modelos matemáticos apropiados, de los mecanismos como expresiones cinéticas para reflejar las dinámicas del proceso.

Una clasificación ampliamente aceptada de los modelos mecanísticos de los procesos microbiológicos es la siguiente:

	No-estructurado	Estructurado
No segregado	Caso ideal	



	Un solo componente. Descripción de las células como promedio	Multicomponente Descripción de las células como promedio
Segregado	Un solo componente Población celular heterogénea	Multicomponente Población celular heterogénea, células tratadas a nivel individual Caso real

1.4.1 *Balances macroscópicos*

Los sistemas fermentativos tienen características cinéticas intrínsecas como: configuración del fermentador, gradientes de concentración de la alimentación, dispersión, recirculación (si la presenta), nivel del volumen de trabajo (por toma de muestra). Este tipo de procesos ocasionan por la transformación que se lleva como (o en) función del tiempo, cambios en la estructura con una velocidad que depende de las condiciones del proceso mismo. Los modelos son relacionados a través de ecuaciones que cumplen con leyes de conservación de masa (balances), las cuales, a su vez, se deben resolver, para poder describir los cambios que se presenten en términos de las variables de estado modeladas (concentraciones de biomasa, sustrato y productos). Los balances macroscópicos basados en modelos pueden ser utilizados y de hecho lo son, para escalar procesos, para predecir comportamientos bajo diferentes condiciones de operación, para la optimización del proceso mismo, control y la posible identificación de fallas (Dunn et al., 2003; Schugerl and Bellgardt 2000). Por lo anterior, los modelos cinéticos son herramientas indispensables para describir y comprender de manera detallada el comportamiento de sistemas fermentativos como la producción de ADNp.



1.4.1.1 Modelos cinéticos NO estructurados

Debido a que, en los modelos NO estructurados, las reacciones biológicas solamente pueden ser descritas por variables macroscópicas que, de una manera u otra, describen las condiciones en el fermentador, este tipo de modelos proveen una simple pero útil descripción de las cinéticas de crecimiento, lo cual puede ser aplicado para procesos con un propósito diseñado. En los últimos años, se han utilizado en procesos de fermentación, modelos que son principalmente no estructurados que se ajustan bien al crecimiento, consumo de sustrato y producción de metabolitos (Gernaey et al., 2010).

La dinámica en los sistemas ha llevado al estudio de estos y como resultado, varios modelos biológicos NO estructurados han sido estudiados con estructuras tipo Monod, inhibición por sustrato y producto, Chen y Hashimoto, Contois y Levenspiel (Chen y Hashimoto., 1980). Sus estructuras algebraicas son:

Tabla 1. Modelos cinéticos de inhibición por sustrato

Modelo	Ecuación μ
Haldane	$\left[\frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2 K_i^{-1}} \right]$
Moser	$\left[\frac{\mu_m S^n}{K_S + S^n} \right]$

Tabla 2. Modelos cinéticos de inhibición por producto

Modelo	Ecuación μ
Boulton	$\left[\frac{\mu_m K_P}{K_P + P} \right]$
Levenspiel	$\mu_m \left[1 - \frac{P}{K_P} \right]^m$
Luong	$\mu_m \left[1 - \left(\frac{P}{K_P} \right)^m \right]$



Además de una combinación de estos como son:

Tabla 3. Combinación de Modelos cinéticos.

Modelo	Ecuación μ
Haldane-Boulton	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2 K_i^{-1}} \right] \left[\frac{K_P}{K_P + P} \right] X$
Haldane-Levenspiel	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2 K_i^{-1}} \right] \left[1 - \frac{P}{K_P} \right]^m X$
Haldane-Luong	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2 K_i^{-1}} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{K_P} \right)^m \right] X$
Moser-Boulton	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S^n}{K_S + S^n} \right] \left[\frac{K_P}{K_P + P} \right] X$
Moser-Levespiel	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S^n}{K_S + S^n} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{K_P} \right)^m \right] X$
Moser-Luong	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S^n}{K_S + S^n} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{K_P} \right)^m \right] X$
Levenspiel	$\mu(S, P, X) = \mu_m \left[1 - \frac{P}{P^*} \right]^n \left[\frac{S}{K_S + S} \right] X$
Aiba	$\mu(S) = \left[\frac{\mu_m S^n}{K_S + S^n} \right] \exp\left(\frac{-S}{K_I}\right)$
Contois	$\mu(S, X) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S X + S} \right]$
Chen y Hashimoto	$\mu(S) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S S_0 + (1 - K_S) S} \right]$
Monod	$\mu(S) = \left[\frac{\mu_m S}{K_S + S} \right]$
Andrew	$\mu(S) = \left[\frac{\mu_m S}{(K_S + S)(1 + S K_i^{-1})} \right]$

A pesar del número elevado de modelos que se han desarrollado con el objetivo de describir los sistemas biológicos, el tipo de modelos NO estructurados se ve limitado por lo reducido de las variables que contemplan en su estructura. Sin embargo, las bondades de este tipo de modelos, los vuelven una herramienta muy útil para describir e incluso predecir el comportamiento de sistemas fermentativos.



1.4.2 Sistemas dinámicos

La definición de un sistema puede ser tomado como un conjunto de elementos que interactúan y puede ser estudiado. Existen diferentes tipos de sistemas, los cuales pueden clasificarse de acuerdo con sus características, por ejemplo, una clasificación ampliamente utilizada es la que divide los sistemas en *abierto* y *cerrado*, si es que existe una transferencia de masa y energía con los alrededores o no, respectivamente (Sieniutycz, 2016). Otra clasificación es la que está en función de la dependencia al tiempo, clasificando los sistemas en *autónomos* y *no autónomos*. Por último, una clasificación que se entiende en muchas ciencias exactas sobre los sistemas analizados es la que los agrupa en sistemas *lineales* y *no lineales*.

1.4.2.1 Sistema lineal

Un sistema lineal posee dos propiedades básicas que gobiernan su comportamiento:

- *El principio de superposición*: Si el sistema es lineal y una entrada I_1 tiene una respuesta R_1 , y otra entrada I_2 tiene una respuesta R_2 , la suma de las entradas (I_1+I_2) da como resultado una suma de las respuestas (R_1+R_2). El principio de superposición establece que la respuesta de un sistema lineal a un cambio en la magnitud M es exactamente el mismo como M veces la unidad de la respuesta del sistema.
- *Independencia del carácter de la respuesta dinámica y condiciones del proceso*: Cuando un sistema es lineal, la respuesta R del proceso a un cambio en la entrada I , la dinámica de R es independiente de las condiciones a las cuales se está operando; por lo que, cuando se lleve a cabo un cambio en la entrada a diferentes condiciones de operación al estado estacionario llevará a cambios de la misma magnitud y dinámica en la salida (Bernstein, 2005).

1.4.2.2 Sistema NO lineal



Cuando un proceso muestra un comportamiento NO lineal como los procesos físicos en la naturaleza, una buena aproximación sería un modelo lineal, sin embargo, una forma más realista para su representación sería un modelo NO lineal. Así mismo, la representación de un sistema mediante un modelo NO lineal, conlleva un aumento en el costo del análisis dinámico que se realizará ya que un sistema NO lineal no exhibe las propiedades de los sistemas lineales, por lo que la respuesta obtenida para la suma de las entradas no es igual a la suma de las respuestas individuales como sucedería en un sistema lineal (Bequette, 1998).

1.4.2.3 *Linealización de un sistema NO lineal*

Debido a que muchos procesos fermentativos son NO lineales, la linealización de estos sistemas se puede llevar a cabo para realizar un análisis dinámico, debido a la facilidad en el entendimiento de modelos lineales y lo cual es necesario para métodos en el diseño de controladores y observadores del sistema. El comportamiento de un sistema NO lineal cercano a una condición de estado estacionario (cuando no existen variaciones en función del tiempo del sistema), conocido como punto de equilibrio, puede ser determinado mediante la linealización en ese punto. A continuación, se explica la linealización de modelos NO lineales para un punto de equilibrio.

$$\dot{x}_1 = \frac{dx_1}{dt} = f_1(x_1, x_2, u) \quad (1)$$

$$\dot{x}_2 = \frac{dx_2}{dt} = f_2(x_1, x_2, u) \quad (2)$$

$$y = g(x_1, x_2, u) \quad (3)$$

Ahora, si las funciones f_1 y f_2 son continuamente diferenciables, se puede realizar la expansión de ambas ecuaciones en forma de series de Taylor, obteniendo:



$$f_1(x_1, x_2, u) = f_1(x_{1s}, x_{2s}, u_s) + \left. \frac{\partial f_1}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_1 - x_{1s})$$

$$+ \left. \frac{\partial f_1}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_2 - x_{2s}) + \left. \frac{\partial f_1}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (u - u_s)$$

+ Términos de orden mayor

$$f_2(x_1, x_2, u) = f_2(x_{1s}, x_{2s}, u_s) + \left. \frac{\partial f_2}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_1 - x_{1s})$$

$$+ \left. \frac{\partial f_2}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_2 - x_{2s}) + \left. \frac{\partial f_2}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (u - u_s)$$

+ Términos de orden mayor

$$g(x_1, x_2, u) = g(x_{1s}, x_{2s}, u_s) + \left. \frac{\partial g}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_1 - x_{1s})$$

$$+ \left. \frac{\partial g}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (x_2 - x_{2s}) + \left. \frac{\partial g}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} (u - u_s)$$

+ Términos de orden mayor

De la linealización a partir del estado estacionario:

$$f_1(x_{1s}, x_{2s}, u_s) = f_2(x_{1s}, x_{2s}, u_s) = 0$$

y

$$g(x_{1s}, x_{2s}, u_s) = y_s$$

Debido a que la constante de derivación es cero:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{d(x_1 - x_{1s})}{dt} \quad y \quad \frac{dx_2}{dt} = \frac{d(x_2 - x_{2s})}{dt}$$



Se puede escribir el modelo de espacio de estado:

$$\begin{bmatrix} \frac{d(x_1 - x_{1s})}{dt} \\ \frac{d(x_2 - x_{2s})}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial f_1}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} & \left. \frac{\partial f_1}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} \\ \left. \frac{\partial f_2}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} & \left. \frac{\partial f_2}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 - x_{1s} \\ x_2 - x_{2s} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial f_1}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} \\ \left. \frac{\partial f_2}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} \end{bmatrix} [u - u_s]$$

$$y - y_1 = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial g}{\partial x_1} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} & \left. \frac{\partial g}{\partial x_2} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 - x_{1s} \\ x_2 - x_{2s} \end{bmatrix} + \left. \frac{\partial g}{\partial u} \right|_{x_{1s}, x_{2s}, u_s} [u - u_s]$$

La cual es la forma de un modelo de espacio de estado:

$$\dot{x}' = Ax' + Bu'$$

$$y' = Cx' + Du'$$

Donde (·) indica las variables de desviación (Bequette, 1998).

Cualquier matriz puede caracterizarse por su determinante y rango, información que es muy útil en los análisis de observabilidad, controlabilidad y sensibilidad paramétrica.

1.4.3 Estimación de estados en reactores

1.4.3.1 Problemas sobre la estimación de estados

En biorreactores, el monitoreo de las variables temporales, resulta fundamental, sin embargo, no todas estas variables pueden medirse de manera directa y en línea (Goffaux y Vande Wouwer, 2005); así mismo, la implementación de sensores para el monitoreo de todas esas variables sería inviable, por su costo y/o limitaciones



tecnológicas (López-Pérez et al., 2013). Existen alternativas para la cuantificación de variables para las cuales no se cuentan con sensores, como la estimación usando algoritmos matemáticos conocidos como observadores de estado (Zhang y Henson, 2001). El problema del diseño del observador surge naturalmente en un enfoque de sistema, tan pronto como se necesita información interna no medida a partir de mediciones externas. En general, de hecho, está claro que no se pueden usar tantos sensores como señales de interés que caractericen el comportamiento del sistema con respecto a restricciones tecnológicas, razones de costos, especialmente dado que tales señales pueden venir en un número bastante grande, y pueden ser de varios tipos: por lo general incluyen parámetros, señales temporales que caracterizan el sistema (variables de estado) y perturbaciones externas no medidas (Lyubanova, 2016; Kostov et al., 2015).

1.4.3.2 *Observadores y observabilidad*

Un observador de estado es un algoritmo matemático el cual reconstruye la evolución en el tiempo del vector de estados de un sistema, y se basa en mediciones relacionadas que sean de fácil medición (biomasa o fuente de carbono) y empleando un modelo matemático del sistema estudiado (Besancon, 2007). O sea, un observador puede interpretarse como una herramienta que, utilizando mediciones obtenidas con sensores físicos, puede realizar la estimación de variables relacionadas en un modelo del sistema. Esta herramienta reproduce el sistema estudiado, alimentándose con las entradas que recibe el proceso real y también recibiendo datos del monitoreo de variables de salida (Mohd Ali et al., 2015).

El diseño de condiciones de observabilidad para sistemas no lineales es un problema desafiante (incluso para sistemas conocidos con precisión) que ha recibido una cantidad considerable de atención. Una primera categoría de técnicas consiste en aplicar algoritmos lineales al sistema linealizados alrededor de la trayectoria estimada.



1.5 Justificación

Las vacunas basadas en pDNA se pueden desarrollar de manera segura y rápida en comparación con las vacunas tradicionales, con rendimientos específicos de pDNA alrededor de 15 mg/g y con una pureza superior al 90 % de la isoforma súper enrollada, por lo que es de interés generar conocimiento referente a los factores que afectan su producción. La experimentación y el modelado matemático de la etapa fermentativa constituyen una combinación importante para su comprensión y así poder diseñar y desarrollar procesos altamente productivos.



1.6 Hipótesis del trabajo

El estudio numérico-experimental de la carga metabólica y sobreflujo metabólico en la producción de pDNA bajo condiciones de estrés, permitirá elucidar detalles del proceso fermentativo y plantear una estrategia que permita incrementar los rendimientos finales de producción.



1.7 Objetivos

Objetivo general

Estudiar la respuesta de la carga metabólica y el sobreflujo metabólico de *Escherichia coli* DH5 α sobre la producción de pDNA bajo condiciones de estrés.

Objetivos específicos

- Evaluar la carga metabólica en términos de la producción de NPT II durante la producción de ADNp
- Proponer una estructura de observador para estimar la concentración de ADNp en cultivos por lote de *E. coli* DH5 α
- Realizar fermentaciones a diferentes temperaturas en cultivos por lote del sistema *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36
- Proponer un modelo cinético de la producción de pVAX1-NH36 para el estudio numérico del efecto de la temperatura
- Evaluar una estrategia sinérgica para el incremento de la producción de ADNp, utilizando temperatura y concentración de antibiótico como factores de estrés



CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS



2.1 Etapa 1

Cepa bacteriana y plásmido usado

La combinación huésped-plásmido fue *E. coli* DH5 α cuyo genotipo es $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk^-, mk^+) gal^+ phoA supE44 \lambda^- thi^1 gyrA96 relA1$ y como vector, pVAX-NH36 (3936-bp), el cual contiene un fragmento de ADN que codifica para el antígeno NH36 de *Leishmania donovani* (Sánchez-Casco, 2013) y su mapa se presenta en la Fig. 2. El plásmido pVAX-NH36 contiene *kan^r* y un origen de replicación pUC (derivado de pMB1) para un elevado número de copias (Invitrogen, 2012).

E. coli DH5 α -pVAX1-NH36 se propagó en placas de agar LB (Luria-Bertani) cuya formulación es: 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona de soya, 15 g/L de agar y 50 μ g/mL de sulfato de kanamicina. Se usó una sola colonia de esta placa para inocular un matraz con deflectores de 1000 mL con un sistema de aireación, el cual contiene 200 mL de medio mineral químicamente definido (CDMM, descrito enseguida) más 12.5 g/L de glicerol. El matraz de agitación se incubó en un agitador orbital (New Brunswick, EE.UU.) a 30 $^{\circ}$ C, 250 rpm, 0.5 vvm y con un diámetro de agitación orbital de 10 mm. Como crioprotección celular, se añadieron 20 mL de glicerol al 80% (p/v) cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO_{600nm}) de 8 y se hicieron alícuotas de 10 mL se congelaron inmediatamente sobre hielo seco y se almacenaron a -70 $^{\circ}$ C (Banco de semillas CDMM).

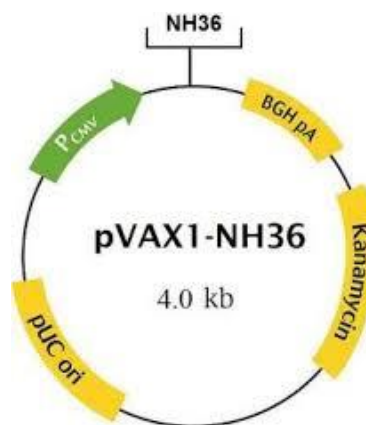


Fig. 1. Mapa simplificado del plásmido pVAX-NH36 (tomado de Pérez-Martínez., 2009)



Medio e inóculo

Medio

El medio CDMM para crecimiento de *E. coli* DH5 α previamente modificado (Islas-Lugo, 2016) tenía la siguiente composición (g/L): 5.8 de K₂HPO₄; 7.5 de KH₂PO₄; 0.125 de antiespumante 204; 5.92 de (NH₄)₂SO₄; 2.3 de MgSO₄.7H₂O; 2 de NaCl; 2.85 mg de FeCl₆.H₂O; y 14.7 mL solución de elementos traza (SET). La SET contenía la siguiente composición en g/L: 2 de ZnCl₂.4H₂O, 2 de CoCl₆.H₂O, 2 de Na₂MoO₄.2H₂O, 1.9 de CuCl₂.2H₂O, 1.6 de H₃BO₃, 1.6 de MnSO₄.H₂O, 0.6 de ácido cítrico y 1 g de CaCl₂.

Inóculo

Se inocularon 10 mL de banco de semilla en un biorreactor de 750 mL que contenía 200 mL de CDMM más 12.5 g/L de glicerol, 50 μ g/mL de kanamicina y 40 μ g/mL de tiamina y se llevó a cabo la fermentación a 30 °C, 1200 rpm, 1 vvm. El cultivo se usó como inóculo (20% v/v) cuando monitoreó un aumento de %OD, alcanzando un consumo completo de glicerol y OD_{600nm} de 24 (DCW de 9 g/L).

Fermentaciones

Para la etapa 1, las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado en un biorreactor de 2 L el cual contenía 1 L de medio CDMM más 200 mL de inóculo y se creció a 30 °C, 37 °C y 42 °C, 1200 rpm y 1 vvm. El %OD se mantuvo por arriba del 30% mediante el enriquecimiento con oxígeno puro cuando fue requerido. Se tomaron muestras de 5 mL que se utilizaron para analizar la concentración de peso seco (DCW), glicerol y NPT II. El DCW fue estimado midiendo DO_{600nm} en la dilución apropiada de la muestra y utilizando una curva de calibración: $gDCW/L=0.38 \times DO_{600nm}$ asegurando que $DO_{600nm} < 0.4$. Esta curva de calibración se generó a partir de muestras centrifugadas (10 mL) en una centrifuga Sorval a 10 000 rpm y 4 °C durante 10 min. El peso del paquete celular fue determinado mediante peso seco (secado a 85 °C durante toda la noche). Los sobrenadantes fueron usados para el análisis de glicerol utilizando un método espectrofotométrico previamente reportado (Bondioli y Della, 2005). Para la cuantificación de ADNp, las mismas muestras fueron diluidas con agua



destilada y una alícuota de esa dilución que equivalía a 300 μ gDCW fueron centrifugados a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 min. Los paquetes celulares fueron almacenados a -20 °C para el subsecuente análisis de plásmido. El ADNp se extrajo utilizando un kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración extrínseca (Cp) de ADNp en la solución purificada (de los 300 μ gDCW) fue medida espectrofotométricamente a DO_{260nm} y DO_{280nm} utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop UV ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, Alemania) y se calculó utilizando la siguiente correlación: DO_{260nm}=1 corresponde a un Cp de 50 mg/L en la solución purificada. Los ácidos orgánicos (acetato, lactato, succinato y formiato) fueron analizados en los sobrenadantes utilizando un HPLC Varian PS-430 (Agilent Technologies., Santa Clara, CA) como fue reportado con anterioridad por (Soto, 2011). La cuantificación de NPT II fue realizada tomando 1 mL de cada muestra para obtener el extracto celular y analizado mediante ELISA descrito y reportado en el apéndice A1 y LC-MS/MS, respectivamente.

Extracción

Tres muestras de fermentación correspondientes a 2.0, 5.0 y 8.25 h de tiempo de cultivo, las cuales representan las fases de crecimiento exponencial, exponencial y estacionario, respectivamente, se usaron para establecer ciclos de sonicación. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos se re-suspendieron al mismo volumen inicial en el amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM de Bio-Rad (EE.UU.) pH 7.4, NaCl 200 mM de J.T. Baker (EE. UU.), EDTA 15 mM de Bio-Rad (EE. UU.), 100 μ M de PMSF de Sigma-Aldrich (EE. UU.). Las muestras se sonicaron mediante un ciclo de 50% de amplitud durante 45 s, reposando la muestra 1 minuto en hielo y se reinició hasta completar 4 ciclos, en cada ciclo se realizó una dilución adecuada. La dilución correspondiente a cada ciclo de sonicación se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. La extracción se evaluó midiendo NPT II mediante ELISA. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar la media de cada ciclo de sonicación, para buscar una diferencia estadística a el nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$).



Solución estándar y curva de calibración

Se utilizó una solución estándar de NPT II comercial obtenida de Adgia, Elkhart, Indiana USA, disuelta en Tris-HCl 20 mM pH 8.0 (Bio-Rad) y almacenada a -80 °C hasta su uso. Las soluciones de trabajo se prepararon mediante la dilución de la solución estándar de NPT II con una solución amortiguadora de carbonatos, la cual contenía Na₂CO₃ 0.3 M y NaHCO₃ 0.7 M (J. T. Baker, USA), para su uso en el método ELISA. Las soluciones para generar la curva de calibración para los métodos ELISA y LC-MS/MS contenían 18, 36, 72, 108 y 144 ng/mL.

LC-MS/MS para cuantificar NPT II

Los puntos para generar la curva de calibración y los lisados celulares de las muestras de fermentación fueron digeridos enzimáticamente con un método modificado (Shevchenko et al., 2007). La separación cromatográfica fue realizada en una columna Agilent ZORBAX SB C18 (0.5 mm x 150 mm, 5 μ m). El programa de gradientes de elución se reporta en la Tabla 4. El analito fue identificado en un espectrómetro de masas Qtrap 3200 (Sciex); los parámetros establecidos para realizar la identificación están reportados en la Tabla 5. La identificación y cuantificación se realizaron en MRM (Modo de Reacción Múltiple) con las siguientes transiciones MS/MS: 851.91 \rightarrow 545.28 y 851.91 \rightarrow 689.28 (Q1 \rightarrow Q3), las cuales corresponden a las series b6 y y6 del péptido de NPT II TDL SGALNELQDEAAR (851.9158 Th, z=2⁺) (Uniprot, acceso: tr|Q08JA8|Q08JA8). Los iones 545.28 y 689.28 fueron elegidos para la cuantificación, de acuerdo al patrón de fragmentación reportado en la Fig. 1. Las áreas de los picos en los cromatogramas generados tanto de las soluciones de los puntos de la curva como de las muestras fueron usadas para la cuantificación de NPT II.

Tabla 4. Programa de gradientes de elución de CL

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.00-3.00	90.00	10.00
35.00	40.00	60.00
36.00-45.00	10.00	90.00
46.00-120.00	90.00	10.00

Solvente A Solución acuosa al 0.1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (ATF), *solvente B* Solución acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0.1 % (v/v)



Tabla 5. Condiciones de LC-MS/MS

Parámetros (Abreviación, unidades)	Valor
Gas de cono (CUR, psi)	25
Tensión de rociado de iones (IC, V)	-4500
Temperatura (TEM, °C)	150
Fuente de iones 1 (GS1, psi)	15
Fuente de iones 2 (GS2, psi)	0
Potencial de ruptura (DP, V)	-70
Potencial de entrada (EP, V)	-10
Energía de colisión (CE, eV)	-40

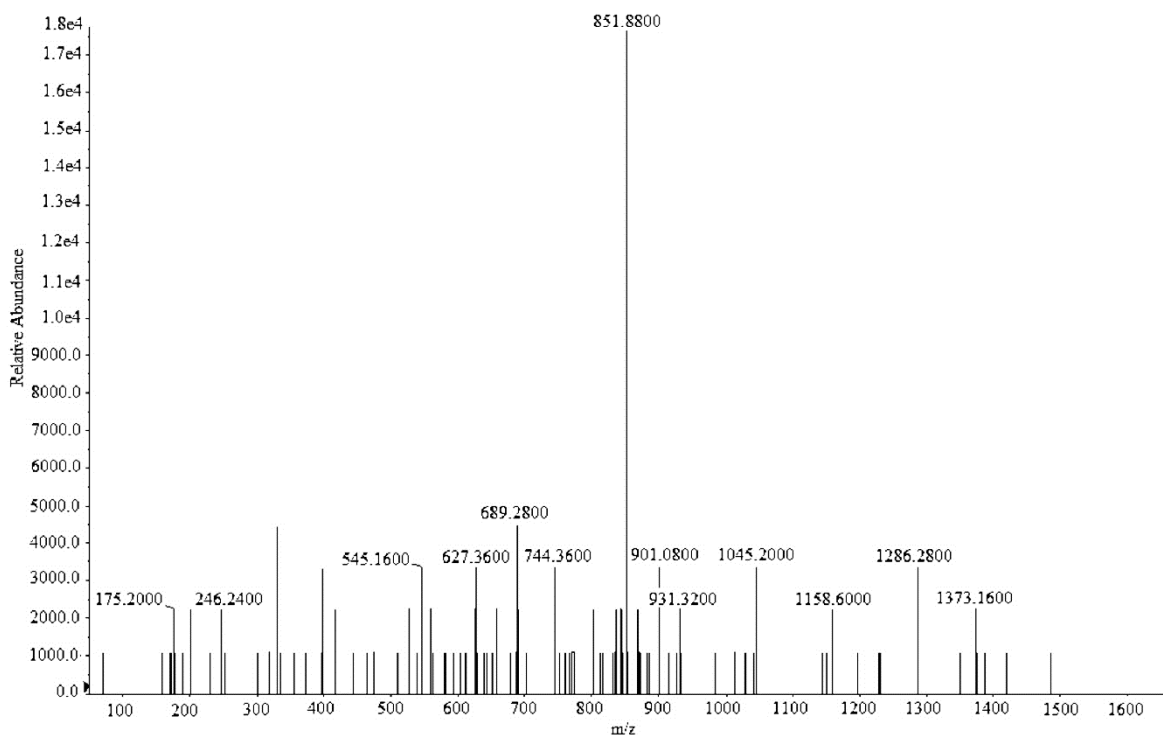


Fig. 2. Espectro completo de MS/MS de la Neomicina fosfotransferasa II (NPT II)

Procedimiento para cuantificar NPT II mediante ELISA y evaluación de los tiempos de reacción

Para el análisis de ELISA se utilizaron las siguientes soluciones, PBS la cual contiene NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, solución de lavado, la cual es la solución PBS más 0.05% v/v de Tween20, solución de bloqueo,



que es la solución de lavado más 3% p/v de leche descremada, solución de citrato conteniendo ácido cítrico y citrato de sodio 0.1 M, solución de sustrato con 1 mg/mL de diclorhidrato de O-fenilendiamina disuelto en la solución de citrato más 4 μ L de H₂O₂ al 30% v/v. La prueba de ELISA se realizó usando placas Nunclmmunoplates 96-wells, Maxisorp de 0.4 mL y un lector Multiskan EX. El procedimiento detallado para el análisis de NPT II mediante ELISA se muestra en el Anexo A1.

Validación del método ELISA para la cuantificación de NPT II

Se llevó a cabo una validación parcial del método ELISA adaptado, en la cual se evaluó: linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión (coeficiente de variación, CV) y exactitud (error medio relativo, MRE). La linealidad del sistema fue determinada usando el método de mínimos cuadrados, el criterio de aceptación fue un valor de regresión ≥ 0.99 (r^2) y el rango lineal de operación fue establecido entre los valores mayor y menor con una exactitud y precisión satisfactorias.

LOD es la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectado, el cual fue determinado con 10 soluciones del blanco de reactivos. Este método proporciona, en el mejor de los casos, una estimación y se basa en la distribución normal gaussiana de las mediciones en blanco alrededor de cero. LOQ es la cantidad más pequeña de analito que se puede medir cuantitativamente en la muestra con precisión y precisión aceptables. La precisión que describe la cantidad de variación que se produce dentro de un ensayo, puede evaluarse determinando la variación entre las repeticiones analizadas a diversas concentraciones en la curva estándar y debe ser $\leq 10\%$. La precisión expresa la proximidad del valor determinado al valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y debe ser $\leq 15\%$. Precisión y precisión se evaluaron en el rango lineal de la curva de calibración. La precisión y exactitud intraensayo se determinaron mediante la medición de las soluciones de la solución estándar de NPT II (20, 60 y 100 ng/mL) cinco veces en el mismo día. La precisión y exactitud interensayo se evaluaron mediante la medición de las mismas soluciones de la solución estándar de NPT II cinco veces en días diferentes, los parámetros descritos se determinaron con las siguientes ecuaciones:



$$LOD = \bar{x}_i + 3s \quad (4)$$

$$LOQ = \bar{x}_i + 10s \quad (5)$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}_i} \times 100 \quad (6)$$

$$MRE = \frac{\bar{x}_i - x}{x} \times 100 \quad (7)$$

Donde s es la desviación estándar, \bar{x}_i la media de las concentraciones observadas, y x la concentración real.

2.2 Etapa 2

Modelo matemático para propuesta de observador

Las expresiones cinéticas y de velocidad específica de crecimiento propuestas por Lopes et al., 2014 utilizadas para proponer la estructura de observador son la siguientes:

Velocidad específica de crecimiento en glucosa:

$$\mu_s = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S} \frac{K_{isa}}{K_{isa} + A} \frac{K_{ixp}}{K_{ixp} + \frac{P}{X}} \frac{K_{ixa}}{K_{ixa} + A} \quad (8)$$

Velocidad específica de crecimiento en glicerol:

$$\mu_g = \mu_{\max g} \frac{G}{k_g + G} \frac{K_{igs}}{K_{igs} + S} \frac{K_{iga}}{K_{iga} + A} \frac{K_{ixp}}{K_{ixp} + \frac{P}{X}} \frac{K_{ixa}}{K_{ixa} + A} \quad (9)$$

Velocidad específica de crecimiento en acetato:

$$\mu_a = \mu_{\max a} \frac{A}{k_a + A} \frac{K_{ias}}{K_{ias} + S} \frac{K_{iga}}{K_{iga} + G} \frac{K_{ixp}}{K_{ixp} + \frac{P}{X}} \frac{K_{ixa}}{K_{ixa} + A} \quad (10)$$

Utilizando las expresiones cinéticas (8-10), se formularon las ecuaciones de balance de masa siguientes para un cultivo por lote:

Balance de masa para glucosa (g/L):



$$\frac{dS}{dt} = -\mu_s \frac{X}{Y_{xs}} \quad (11)$$

Balance de masa para acetato (g/L):

$$\frac{dA}{dt} = -(Y_{Pa/s}\mu_s + Y_{Pa/g}\mu_g)X \quad (12)$$

Balance de masa para plásmido (g/L):

$$\frac{dA}{dt} = -(Y_{P/Xs}\mu_s + Y_{P/Xg}\mu_g + Y_{P/Xa}\mu_a)X \quad (13)$$

Balance de masa para glicerol (g/L):

$$\frac{dG}{dt} = -\mu_g \frac{X}{Y_{Xg}} \quad (14)$$

Balance para biomasa (g/L):

$$\frac{dX}{dt} = -(\mu_s + \mu_g + \mu_a)X \quad (15)$$

Enfoque de observabilidad

Considerando el espacio de estado descrito anteriormente que representa el modelo para un fermentador en lote (8-15):

$$\dot{x} = f(x) \quad (16)$$

$$y = h(x) = Cx \quad (17)$$

Aquí, $x \in \mathcal{R}^n$ es el vector de las variables de estado (con $n=5$), $y \in \mathcal{R}$ es la correspondiente salida medida para este caso y es considerada la biomasa total medida en línea y $f(x)$ es una función vector diferenciable, tal que $f: \mathcal{R}^n \rightarrow \mathcal{R}^n$ está dada por (8-15).

Como se explicó anteriormente, para facilitar el análisis de sistemas NO lineales, una transformación a un sistema lineal es necesario, esta transformación se realiza mediante linealización por series de Taylor y es válido para un punto de estado estacionario y su vecindad según lo estipulado por el teorema de Grobman-Hartman



(Guysinsky et al., 2003). Para linealizar el presente sistema, se consideraron los sistemas (16-17):

$$\dot{x} = Ax \quad (18a)$$

$$y = Cx \quad (18b)$$

donde A está definida como:

$$A(\bar{x}) = \left[\frac{\partial f}{\partial x} \right]_{x=\bar{x}} \quad (19)$$

Ahora, a partir de un marco general, consideramos lo siguiente, son los conjuntos finitos $Y = (y, y', y'', y'''\dots)^T \in \mathfrak{R}^m$ y $X = (x_1, x_2, x_3, x_4\dots)$, con $m \leq n$, el cual está relacionado a la salida del sistema y derivados en tiempo finito; por lo tanto, es posible construir el siguiente sistema dinámico lineal:

$$\begin{bmatrix} y \\ y' \\ y'' \\ \vdots \\ y^{n-1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Cx \\ CAx \\ CA^2x \\ \vdots \\ CA^{n-1}x \end{bmatrix}$$

O en forma de vector:

$$Y = OX \quad (20)$$

Donde:

$$O = [C, CA, CA^2, CA^3, \dots, CA^{n-1}]^T \quad (21)$$

Como puede observarse, si el vector de estado puede determinarse, la matriz O (llamada matriz de observabilidad) debe ser invertible (rango completo) para obtener:

$$X = O^{-1}Y \quad (22)$$

Tal que, el vector de estado X es observable con respecto a la salida Y medible.



El análisis de observabilidad local es resumido a continuación:

Un sistema de tiempo continuo lineal (o linealizado) es observable si y solo si el rango $(O) = n$, donde n es el orden del sistema (Donchain y Chen, 1992).

Estructura de observador propuesto:

El sistema (23) se propuso como un observador de estado para el sistema (16) y (17) (Fig. 3):

$$\dot{\hat{x}} = f(\hat{x}(t)) - g_1 \left(\xi_1 + \int_0^t \xi_1(\sigma) d\sigma + g_2 \right) \quad (23)$$

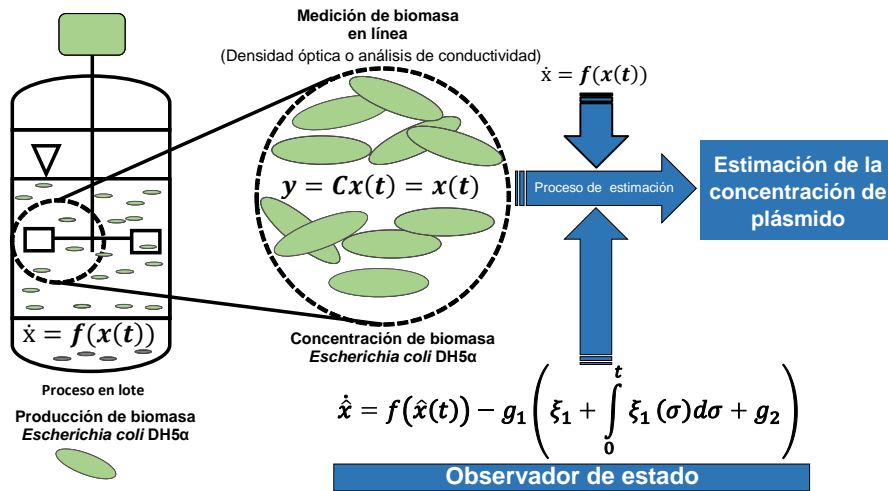


Fig. 3. Diagrama del observador de estado propuesto

Bajo el supuesto de que $\|f_i(x) - f_i(\hat{x})\| \leq F$, lo cual es una suposición realista basado en el principio de conservación de masa, la retroalimentación anterior produce una estabilización dinámica del error de estimación correspondiente $\xi_1 = x - \hat{x}$. Ahora, seleccionando los parámetros g_1 y g_2 para obedecer la siguiente restricción:

$$g_1 g_2 \approx F < \infty \quad (24)$$

A partir de las ecuaciones (16) y (23) y aplicando la suposición antes mencionada, así como la desigualdad de Cauchy–Schwarz, podemos generar la siguiente dinámica en la estimación del error:



$$\|\dot{\xi}_1\| \leq -g_1 \left(\|\xi_1\| + \int_0^t \|\xi_1(\sigma)\| d\sigma \right) \quad (25)$$

Se puede observar que la desigualdad (25) es lineal y que depende de las variables de estado del sistema; por lo tanto, para analizar la estabilidad y la convergencia del observador, se aplica a la desigualdad la transformada de Laplace, como es mostrado a continuación:

$$s\|X(s)\| - \|X(0)\| - s\|\widehat{X}(s)\| + \|\widehat{X}(0)\| \leq -g_1(\|X(s)\| - \|\widehat{X}(s)\|) - g_1s^{-1}(\|X(s)\| - \|\widehat{X}(s)\|) \quad (26)$$

Sin pérdida de generalidad, se supone que la condición inicial de desigualdad (13) es homogénea, por ejemplo, $x(0)=0$ y $\hat{x}(0)=0$, entonces:

Mediante un arreglo algebraico:

$$(s^2 - g_1s - g_1)\|X(s)\| \leq (s^2 - g_1s - g_1)\|\widehat{X}(s)\| \quad (27)$$

O

$$\|X(s)\| \|\widehat{X}(s)\|^{-1} \leq (s^2 - g_1s - g_1)^{-1}(s^2 - g_1s - g_1) \quad (28)$$

Ahora, consideramos el teorema del valor final para la transformada de Laplace para evaluar el comportamiento asintótico de la desigualdad (28) como se muestra:

$$\lim_{s \rightarrow 0} \|X(s)\| \|\widehat{X}(s)\|^{-1} \leq \lim_{s \rightarrow 0} (s^2 - g_1s - g_1)^{-1}(s^2 - g_1s - g_1) \quad (29)$$

Por consiguiente:

$$\lim_{s \rightarrow 0} (s^2 - g_1s - g_1)^{-1}(s^2 - g_1s - g_1) = g_1^{-1}g_1 = 1 \quad (30)$$

Y

$$\lim_{s \rightarrow 0} \|X(s)\| \|\widehat{X}(s)\|^{-1} \leq 1 \quad (31)$$

O en dominio de tiempo:



$$\lim_{t \rightarrow \infty} \|X(t)\| \|\hat{X}(t)\|^{-1} \leq 1 \quad (32)$$

Posteriormente se llevó a cabo un análisis teórico-experimental; los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Fermentaciones y métodos analíticos

Las variables analizadas en esta sección fueron biomasa, glicerol, ADNp, NPT II y ácidos orgánicos, todas estas mediciones se realizaron como se ha descrito en la etapa 2.1 de materiales y métodos. Las fermentaciones para evaluar el efecto de la temperatura y realizar el correspondiente análisis termodinámico, se realizaron también siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior con 20 g/L de glicerol como fuente de carbono y manteniendo una concentración de oxígeno por arriba del 30%, las fermentaciones fueron por duplicado y controlando a temperatura constante de 30, 33, 35, 37, 40 y 42 °C, en cada cultivo. Las tomas de las muestras se realizaron cada 1 hasta el consumo total del glicerol y a partir de ese momento cada 30 minutos para caracterizar la cinética de la re-asimilación de los ácidos orgánicos.

Desarrollo del modelo

Se procedió a identificar los flujos de entrada y salida y se identificaron ocho concentraciones principales conforman la estructura del modelo: concentraciones de glicerol, biomasa, ADNp, NPT II, acetato, succinato, lactato y formiato; es importante incluir la cinética de formación y consumo de cuatro últimas especies químicas.

La Fig. 4 muestra las redes metabólicas simplificadas implicadas en la producción de ADNp por *Escherichia coli* DH5α creciendo en glicerol las cuales se analizaron. La glucólisis, la vía de la pentosa fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) comprenden la mayor parte de las reacciones, que producen los intermediarios metabólicos necesarios para la síntesis de biomasa, ADNp y NPT II, así como ácidos orgánicos debidos al sobreflujo metabólico. El crecimiento aeróbico de *E. coli* en glicerol, incorpora esta molécula en el metabolismo central como dihidroxiacetona fosfato (DHAP), un metabolito que puede participar tanto en procesos gluconeogénicos como glucolíticos.

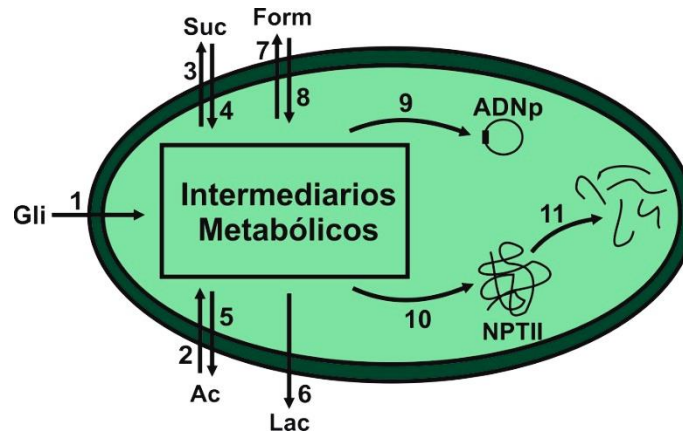


Fig. 4. Rutas metabólicas simplificadas, involucradas en la producción de ADNp usando *Escherichia coli* DH5 α

En una segunda etapa se ha observado una producción baja de metabolitos relacionados al sobreflujo metabólico (acetato entre ellos), durante el crecimiento de *E. coli* en glicerol y cuya asimilación ha podido asociarse experimentalmente a un aumento en la producción de ADNp, como es reportado en los experimentos del trabajo actual y en otros reportados en la literatura (Lopes et al., 2014; Cortés et al., 2016). Ha sido demostrado que la producción de indol en cultivos que usan glicerol indica un flujo de carbono importante a través de la ruta de aminoácidos, que está relacionada con la producción de proteínas como NPT II, sin embargo, en datos experimentales obtenidos en este trabajo, no se pudo encontrar una relación entre la asimilación de los ácidos excretados con un aumento en la producción de NPT II. Además, se consideró que la producción de biomasa solo dependía del consumo de glicerol y que la fuente de carbono representaba el sustrato limitante. Finalmente, se sabe que la producción de ADNp se caracteriza por presentar inhibición del crecimiento y producción de plásmido por acumulación de acetato, siendo de 3 y 5 g/L, respectivamente, como ha sido reportado en otros trabajos (Lopes et al., 2014; Xu et al., 2005).

Con todas las consideraciones anteriores se procedió a generar el siguiente conjunto de ecuaciones cinéticas y diferenciales, que se basan en el enfoque clásico de balance de masa, que comprende el modelo cinético propuesto:



$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{\text{Gly}}{K_{\text{Gly}} + \text{Gly}} \right) * \left(1 - \left(\frac{\text{Ac}}{K_{i\text{AcX}}} \right) \right) \quad (33)$$

$$u_{p\text{Ac}} = u_{p\max\text{Ac}} * \left(\frac{\text{Gly}}{K_{\text{GlyAc}} + \text{Gly}} \right) \quad (34)$$

$$u_{c\text{Ac}} = u_{c\max\text{Ac}} * \left(\frac{\text{Ac}}{K_{\text{Ac}} + \text{Ac}} \right) \quad (35)$$

$$u_{p\text{Suc}} = u_{p\max\text{Suc}} * \left(\frac{\text{Gly}}{K_{\text{GlySuc}} + \text{Gly}} \right) \quad (36)$$

$$u_{c\text{Suc}} = u_{c\max\text{Suc}} * \left(\frac{\text{Suc}}{K_{\text{Suc}} + \text{Suc}} \right) \quad (37)$$

$$u_{p\text{Lac}} = u_{p\max\text{Lac}} * \left(\frac{\text{Gly}}{K_{\text{GlyLac}} + \text{Gly}} \right) \quad (38)$$

$$u_{p\text{Form}} = u_{p\max\text{Form}} * \left(\frac{\text{Gly}}{K_{\text{GlyForm}} + \text{Gly}} \right) \quad (39)$$

$$u_{c\text{Form}} = u_{c\max\text{Form}} * \left(\frac{\text{Form}}{K_{\text{Form}} + \text{Form}} \right) \quad (40)$$

$$u_{p\text{DNA}} = u_{\max p\text{DNA}} * \left(\frac{\text{Gly}}{k_{\text{Gly}} + \text{Gly}} \right) * \left(\frac{\text{Ac}}{K_{\text{Ac}} + \text{Ac}} \right) * \left(1 - \frac{\text{Ac}}{K_{i\text{Ac}p\text{DNA}}} \right) \quad (41)$$

$$u_{\text{NPTII}} = u_{\max\text{NPTII}} * \left(\frac{\text{Gly}}{k_{\text{Gly}} + \text{Gly}} \right) \quad (42)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (43)$$

$$\frac{d\text{Gly}}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{X/\text{Gly}}} + \frac{u_{p\text{Ac}}}{Y_{\text{Ac}/\text{Gly}}} + \frac{u_{p\text{DNA}}}{Y_{p\text{DNA}/\text{Gly}}} + \frac{u_{\text{NPTII}}}{Y_{\text{NPTII}/\text{Gly}}} + m_{\text{Gly}} \right) * X \quad (44)$$

$$\frac{d\text{Ac}}{dt} = (u_{p\text{Ac}} - u_{c\text{Ac}}) * X * Y_{\text{Ac}X} \quad (45)$$



$$\frac{dSuc}{dt} = (v_{pSuc} - v_{cSuc}) * X * Y_{SucX} \quad (46)$$

$$\frac{dLac}{dt} = v_{pLac} * X * Y_{LacX} \quad (47)$$

$$\frac{dForm}{dt} = (v_{pForm} - v_{cForm}) * X * Y_{FormX} \quad (48)$$

$$\frac{dpDNA}{dt} = v_{pDNA} * X * Y_{pDNA X} \quad (49)$$

$$\frac{dNPTII}{dt} = (v_{NPTII} - v_{deg}) * X * Y_{NPTIIX} \quad (50)$$

La ecuación (33) representa el crecimiento específico de la biomasa, la estructura del modelo de velocidad de crecimiento obedece a una inhibición del producto propuesta por Levenspiel, basada en el conocimiento general de que el acetato puede inhibir el crecimiento celular (Xu et al., 2005). Las ecuaciones (34) - (38) representan los metabolitos del sobreflujo producidos durante el crecimiento celular y el consumo de glicerol; para cultivos a diferentes temperaturas se observó que las fases de consumo de productos del sobreflujo metabólico (excepto lactato) se retrasaron, con la reducción de las concentraciones de acetato, formiato y succinato en el medio de cultivo cuando el glicerol estaba casi ausente.

Como se establece en las suposiciones, la ecuación (41) representa la velocidad de producción de ADNp basada en una cinética dual de sustrato que involucra concentraciones de glicerol y acetato considerando la información extraída de la ruta metabólica, ya que se ha demostrado que la adición de acetato al medio de cultivo puede ser asimilado para producir más ADNp (Xu et al., 2005), este fenómeno se muestra también en el presente trabajo. Para incluir en la estructura del modelo, la carga metabólica debido a la presencia de ADNp, la producción de neomicina fosfotransferasa II (NPT II) se representa en la ecuación (42) y como se observó en los experimentos llevados a cabo, la producción de NPT II solo depende del consumo de glicerol.



Las ecuaciones (43) - (48) representan las ecuaciones de balance de masa, donde la ecuación (43) describe el balance de biomasa que incorpora la ecuación Eq. (33) como un término de crecimiento celular. La ecuación (4) describe el balance de glicerol en función del tiempo e incluye términos de consumo del principal sustrato, producción de metabolitos principales en el sistema: biomasa, acetato, ANDp y NPT II; también incluye un parámetro de constante de mantenimiento, que es justificado por varios autores en la producción de ADNp por cultivos de lotes alimentados (Jaén et al., 2013; Munguía-Soto et al., 2015). Las ecuaciones (42) - (45) representan el comportamiento dinámico de productos del sobreflujo metabólico que incluyen producción y asimilación (acetato, formiato y succinato) y el lactato solamente producido. Las ecuaciones (46) - (47) describen la producción de ADNp y NPT II, que incluyen en el balance de masa para NPT II, un parámetro para la degradación observada en los experimentos llevados a cabo.

Análisis de sensibilidad paramétrica

Una vez identificado el conjunto de valores de los parámetros que maximizan el ajuste del modelo a los datos experimentales, se procedió a realizar un análisis de sensibilidad local para determinar los parámetros que más influyen en el comportamiento de la estructura propuesta (Pianosi et al., 2016).

Teóricamente, diferenciar el vector de las ecuaciones de estado (x) con respecto al vector de parámetros (θ), y suponiendo que el vector de las variables de entrada (u) no depende de θ , se tiene que:

$$\frac{d}{dt} \frac{dx}{d\theta} = \left. \frac{\partial f(x,u,\theta)}{\partial x} \right|_{x=x(t,\theta^0)} \frac{dx}{d\theta} + \left. \frac{\partial f(x,u,\theta)}{\partial \theta} \right|_{x=x(t,\theta^0)} \quad (51)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = \left. \frac{\partial f(x,u,\theta)}{\partial x} \right|_{x=x(t,\theta^0)} S(t) + \left. \frac{\partial f(x,u,\theta)}{\partial \theta} \right|_{x=x(t,\theta^0)} \quad (52)$$

donde S son las ecuaciones de sensibilidad, definidas como:



$$S(t) = S_{ij}(t) = \frac{dx_i(t, \theta^0)}{d\theta_j}; i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, p \quad (53)$$

y su número máximo es $n \times p$.

Para la comparación analítica entre parámetros, se calculó una sensibilidad relativa S_r , definida como:

$$S_{ij}^r(t) = \theta^0 \left(\frac{\partial x_i(t, \theta^0)}{\partial \theta_j} \right) \neq 0; i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, p \quad (54)$$

Sin embargo, como las ecuaciones de sensibilidad dependen del tiempo, fue necesario calcular la integral de las ecuaciones de sensibilidad para obtener una comparación más completa del efecto numérico de los parámetros sobre el desempeño del modelo de la siguiente manera:

$$I = \int_0^t S(\tau) d\tau \quad (55)$$

donde t es el tiempo de fermentación.

Un valor de sensibilidad relativa para cualquier parámetro diferente de 0 indica que el modelo cambiaría su comportamiento si el parámetro cambia su valor, aunque sea ligeramente, pero si la sensibilidad relativa es igual a 0, el rendimiento del modelo permanecerá sin cambios, independientemente del valor del parámetro.

Análisis termodinámico

Para describir el efecto de la temperatura sobre las velocidades de producción y/o de consumo, se considera la ecuación de Arrhenius y esta dependencia está dada por:

$$\ln v = \ln A - (E_a/RT) \quad (56)$$

Al graficar $\ln v$ contra el recíproco de la temperatura, se debe observar una relación lineal en el rango de temperatura estudiado. La pendiente de la línea obtenida



permite calcular la energía de activación (E_a) y la intercepción a la ordenada corresponde a $\ln A$. Los valores de las energías de activación ($E_{a(i)}$) y las constantes de Arrhenius ($A_{(i)}$) permitieron la determinación de diferentes parámetros termodinámicos como variaciones en entalpía ($\Delta H_{(i)}$), entropía ($\Delta S_{(i)}$) y energía libre de Gibbs ($\Delta G_{(i)}$) según las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H = E_a - RT \quad (57)$$

$$\Delta S = R * ((\ln A - \ln K_B) / (h - \ln T)) \quad (58)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (59)$$

Donde, K_B (1.38×10^{-23} J/K) es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck (2.39×10^{-30} J.h).

2.3 Etapa 3

Fermentaciones en lote

El efecto de la temperatura y la concentración de kanamicina en la producción de pDNA se evaluó utilizando un diseño experimental 2^2 con el componente central mostrado en la Tabla 6. Además, se realizaron dos condiciones de producción comunes (CPC) a 30 °C y 42 °C, ambas con una concentración inicial de 50 mg/L de kanamicina, debido a reportes que utilizan una estrategia de cultivo para la producción de ADNp que consiste en una fase de crecimiento inicial para acumular altas concentraciones de biomasa a bajas temperaturas (30-37 °C), seguido de un aumento de temperatura (42- 45 °C) para inducir una alta tasa de replicación de ADNp (revisada por Jaén et al., 2013); las fermentaciones se llevaron a cabo con 20 g/L de glicerol como fuente de carbono y manteniendo una concentración de oxígeno por arriba del 30%. El análisis estadístico se realizó al 99% de nivel de confianza utilizando el software Minitab 17.



Tabla 6. Diseño experimental 2² con el componente central para evaluar el efecto sinérgico sobre la producción de ADNp

Nomenclatura	Niveles codificados		Niveles reales	
	X1	X2	Temperatura (°C)	Kanamicina (mg/L)
T1	-	-	30	0
T2	-	+	30	300
T3	0	0	36	150
T4	+	-	42	0
T5	+	+	42	300
Condiciones comunes de producción				
CPC1 ^a	NIED ^b		30	50
CPC2	NIED		42	50

^a Condición común de producción; ^b No incluido en el diseño experimental

Fermentaciones en lote alimentado (cultivos termo-inducidos de alta densidad celular)

Para los cultivos en lote-alimentado, el CDMM tenía la siguiente composición (g/L): K₂HPO₄, 5.8; KH₂PO₄, 7.5; antiespumante 204, 0.0125; (NH₄)₂SO₄, 2.5; MgSO₄·7H₂O, 2.3; NaCl, 2; FeCl₆·6H₂O, 22.7 mg; y 4 mL de TMS. La solución de alimentación tenía la siguiente composición (g/L): glicerol, 650; kanamicina, 0,05; clorhidrato de tiamina, 0,04; MgSO₄·7H₂O, 1,15; TMS, 4 mL/L. El pH del medio se ajustó a 7.2. Las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado en un biorreactor de 2 L con 1 L de CDMM más 25 ml de banco de semillas de CDMM crioconservado (que contiene 5 g/L de glicerol) a 1200 rpm y 1 vvm. El pH se controló a 7.2 por adición automática de una solución de NH₄OH al 30%. El %OD se mantuvo por encima del 30% de saturación, enriqueciendo el aire con oxígeno puro. El control de pH se inició cuando OD_{600nm} era 1.3 (0.5 gDCW/L) para evitar la limitación de nitrógeno y la fase de alimentación comenzó cuando el cultivo tenía una OD_{600nm} de 22 (8 gDCW/L). La bomba de alimentación se programó de acuerdo a la ecuación (55):

$$F(t) = \frac{\mu X V e^{\mu t}}{Y_{x/s} S_i} \quad (60)$$

Donde F(t) es el flujo de alimentación de la solución de glicerol (L/h), μ es la velocidad específica de crecimiento deseada (h⁻¹) durante la fase de lote-alimentado, X es la concentración de biomasa al final de la fase de lote (gDCW/L), V es el volumen



inicial del medio de cultivo (L), Si es la concentración de glicerol en la solución de alimentación (g/L), $Y_{x/s}$ es el rendimiento del sustrato sobre biomasa (g/g) y t es el tiempo desde el inicio de la fase de lote-alimentación (h). El valor de los parámetros fueron $\mu = 0.31 \text{ h}^{-1}$ a 30 °C y 0.15 h^{-1} a 37 °C, $X = 8 \text{ gDCW/L}$ y $Y_{x/s} = 0.47 \text{ g/g}$, estos valores utilizados para calcular el flujo de alimentación para los lotes-alimentados exponenciales dieron como resultado velocidades de crecimiento específicas cercanas a las velocidades de crecimiento específicas deseadas.

El cultivo control se llevó a cabo aumentando la temperatura desde 30 °C hasta 42 °C a una velocidad de calentamiento (HR) de 0.025 °C/min. El inicio del aumento de temperatura se realizó cuando $OD_{600\text{nm}} = 22$ (8 gDCW/L) en el cultivo. Para comprobar el efecto de la alta concentración de kanamicina en cultivos termo-inducidos de alta densidad celular se utilizó la misma estrategia para el control, aumentando la concentración de kanamicina a 300 mg/L cuando se inició el aumento de la temperatura, por un pulso de solución de kanamicina (50 mg/mL). El DCW, el glicerol residual, los rendimientos de ADNp, los ácidos orgánicos y los rendimientos de NPT II se analizaron tomando 5 mL de muestra.

Métodos analíticos para cuantificación

Las variables analizadas para esta sección fueron biomasa, glicerol, ADNp, NPT II y ácidos orgánicos, todas estas mediciones se realizaron como se ha descrito en la etapa 2.1 de materiales y métodos. Las tomas de las muestras se realizaron a tiempo 0 de cada experimento y otra toma cuando se alcanzó el estado estacionario, observándose un aumento rápido del %OD en el medio. Otros análisis adicionales realizados en esta etapa fueron los que se describen a continuación:

Cuantificación de plásmido súper enrollado

La isoforma súper enrollada de plásmido en la solución purificada se cuantificó por electroforesis usando un gel de agarosa al 0,8% en amortiguador TBE (Tris HCl 45 mM, H_3BO_3 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 50 V durante 90 min y se tiñó con bromuro de etidio (5 $\mu\text{g/mL}$). Las fracciones de ADNp totales, que incluye la isoforma súper enrollada, se estimaron usando un análisis densitométrico de ADNp utilizando



el software ImageJ versión 1.47 y una cantidad conocida de DNA Ladder calibrado de 1 kb (Biolabs, EE. UU.) como estándar.

Microscopía electrónica de barrido

Para evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de kanamicina en la morfología del sistema *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36, se realizó MEB. Para todos los tratamientos incluidos en el diseño experimental, 1 mL de caldo de cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm y 4 °C. Las muestras se lavaron dos veces con amortiguador PBS (pH = 7.2) y se volvieron a suspender en 1 mL del mismo amortiguador. A continuación, 10 μ l de suspensión se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio (1 cm x 1 cm) con un fijador de glutaraldehído al 2,5% (v/ v) en PBS, durante toda la noche, posteriormente se lavaron tres veces con PBS seguido de una fijación con tetraóxido de osmio al 1% a 4 °C durante 2 h. Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS. La deshidratación de las muestras se logró mediante lavado con concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90% y 100%, Sigma Aldrich). En el último paso, todas las muestras se secaron con CO₂ líquido (Tousimis, Samdri-795, Rockville, Maryland) y finalmente se recubrieron con partículas de oro durante 2 minutos (Denton Vacuum Desk V, Los Ángeles, CA). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV (JEOL, Tokio, Japón).



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1 Relación entre la producción de ADNp y la expresión de NPT II

Durante la primera etapa en el desarrollo de este proyecto, demostramos si efectivamente existía una relación lineal entre la expresión de NPT II y la producción de ADNp como ya había sido propuesto anteriormente por Cunningham et al., (2009); con el objetivo de evaluar la pertinencia de cuantificar la carga metabólica en términos de la expresión de la proteína, la cual confiere la resistencia al antibiótico kanamicina. Debido a que no se encontró un método cuantitativo reportado en literatura, lo primero fue adaptar y validar un método de ELISA para la cuantificación de NPT II en cultivos de *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36 como se describe a continuación.

3.1.1 Efecto del tiempo de reacción sobre la linealidad de la curva de calibración de NPT II por el método ELISA

Las mediciones de la absorbencia de cada uno de los tiempos de reacción son mostradas en la Fig. 5; los coeficientes de correlación de cada una de las curvas a los diferentes tiempos de reacción fueron obtenidos mediante el método adaptado de ELISA para el análisis de NPT II. El método se basa en la oxidación del compuesto O-fenilendiamina (OPD) mediante la enzima peroxidasa (HRP), conjugada con el anticuerpo secundario, es medida por el monitoreo en el cambio de absorbencia ($DO_{492\text{ nm}}$) debido a la formación del compuesto 2,3-diaminofenazina (DAP). Para 12, 16 y 20 minutos, el coeficiente de correlación fue menor a 0.99, mientras que, para los tiempos de reacción 4 y 8 minutos el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99; siendo el criterio de aceptación que el coeficiente de correlación sea mayor a 0.99 ($R^2 \geq 0.99$).

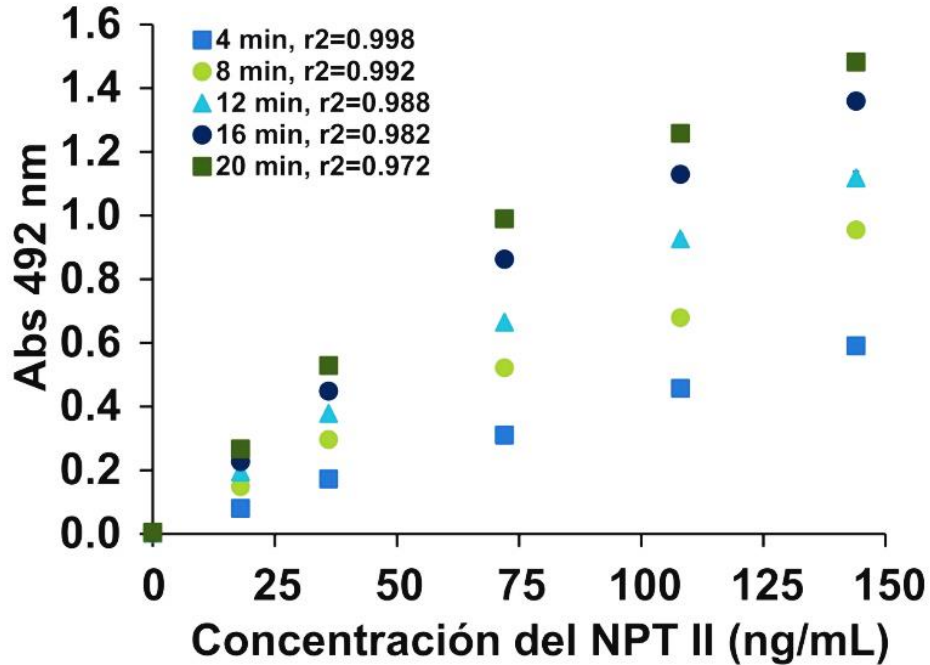


Fig. 5. Linealidad y tiempo de reacción del método adaptado de ELISA para el análisis de NPT II. Las absorbencias de la curva de calibración fueron determinadas para concentraciones de 18 a 144 ng/mL e incubada a diferentes temperaturas. Cada punto en la curva representa el promedio de tres determinaciones en cada tiempo de reacción.

Para los tiempos evaluados a 4 y 8 minutos, la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario y no a la cantidad de sustrato disponible en la mezcla; por lo tanto, la velocidad dependerá de la enzima acoplada, la cual es proporcional a la concentración de NPT II para la concentración de sustrato inicial utilizada. El tiempo de reacción seleccionado fue de 8 minutos con el objetivo de tener el mayor tiempo posible para procesar la mayor cantidad de muestras, sin perder linealidad.

3.1.2 Producción de ADNp mediante *Escherichia coli* DH5 α en cultivo por lote

Los datos de la producción de ADNp (DCW, consumo de glicerol y producción de ADNp y ácidos orgánicos) de la fermentación modelo (medio de cultivo definido) son mostrados en la Fig. 6. La velocidad máxima específica de crecimiento fue



0.29 \pm 0.02 h⁻¹ durante la fermentación hasta que el glicerol fue consumido totalmente (Fig. 6 A), este valor es similar al reportado para condiciones de producción similares (Munguía-Soto et al., 2015); el valor máximo de DCW fue 9.3 \pm 0.12 g/L y para el rendimiento volumétrico fue de 57.0 \pm 1.25 mg/L de DNAp. Estos valores son similares a los descritos para condiciones previamente reportadas usando también un medio de cultivo definido con glicerol como fuente de carbono y energía y *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36 como sistema de replicación (Islas et al., 2016; García-Rendón et al., 2017). En los procesos de producción de ADNp, la acumulación de acetato está relacionada generalmente con la cepa utilizada, sin embargo, también depende de las características del plásmido (Phue et al., 2008). Bajo esta condición estudiada, la producción volumétrica de ADNp se incrementó 6% debido al consumo (re-asimilación) de los ácidos orgánicos producidos, principalmente acetato (1.54 \pm 0.18 g/L) (Fig. 6 B y C). Esta contribución de carbono para el incremento de ADNp ha sido relacionada a la asimilación de los productos del sobreflujo metabólico y descrita previamente (Cortés et al., 2016; Lopes et al., 2014). Al mismo tiempo, se utilizaron tres muestras de esta fermentación para evaluar la extracción por sonicación de NPT II, posteriormente se evaluaron los métodos ELISA y LC-MS/MS para medir la cinética completa de la síntesis de NPT II.

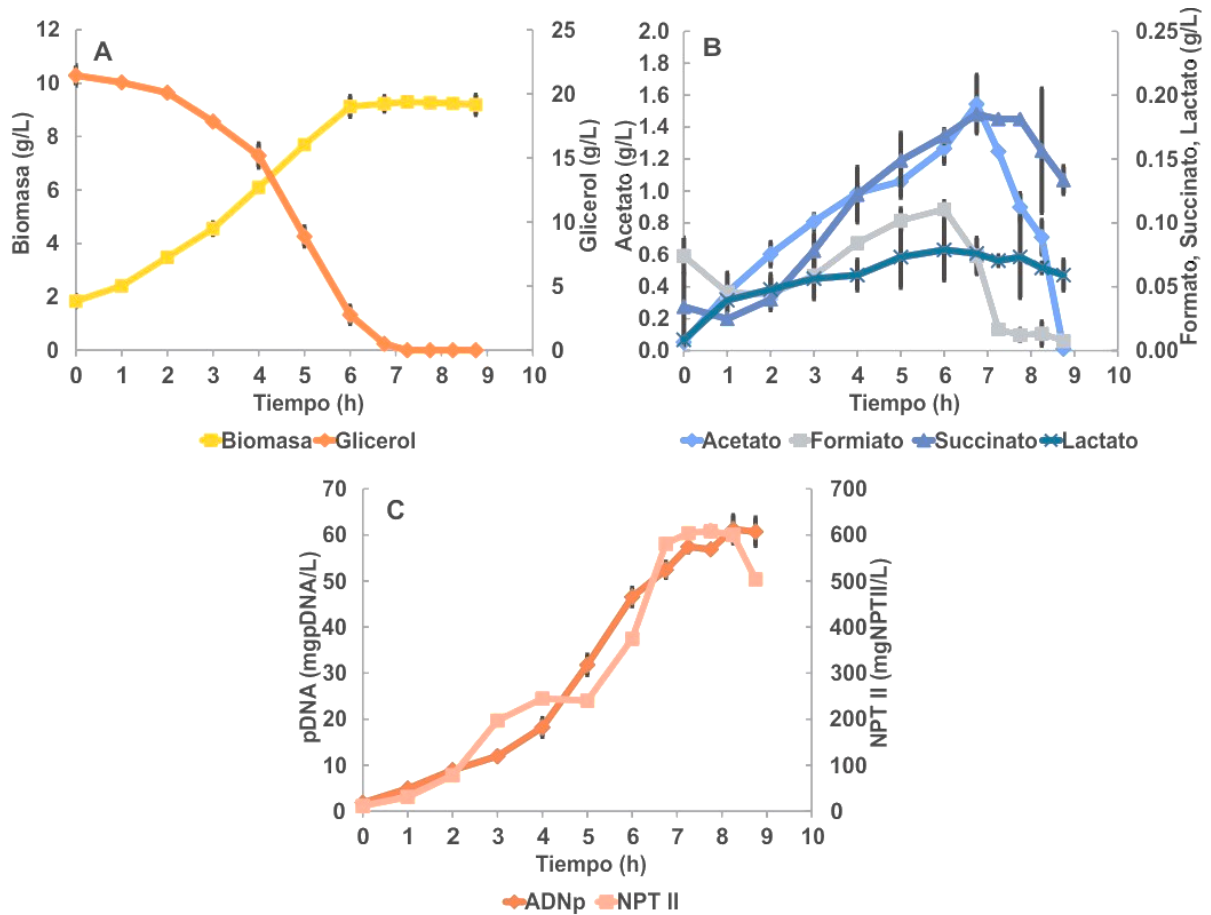


Fig. 6. Perfiles de producción del sistema *Escherichia coli* DH5 α -pVAX-NH36. A: producción de DCW y consumo de glicerol; B: rendimientos volumétricos de ADNp y NPT II; C: Perfiles de ácidos orgánicos. Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes.

3.1.3 Validación del método ELISA y evaluación de la extracción de NPT II

Validación

Para la validación del método ELISA para la cuantificación de NPT II, se calculó la linealidad del sistema con el objetivo de evaluar si el ensayo es capaz de proporcionar resultados equivalentes sin importar del rango cuantitativo de la curva estándar, ya que la muestra será interpolada. El límite de detección (LDD), el límite de cuantificación (LDC), la precisión y exactitud fueron evaluadas, de acuerdo al tiempo



de reacción de 8 minutos, previamente establecido. Así como las curvas de calibración, graficando las absorbencias a 492 nm ($DO_{492\text{ nm}}$) y concentración de NPT II (ng/mL), la linealidad del sistema fue obtenido de los datos graficados con un rango de coeficientes de correlación desde 0.9903-0.9951. El rango operacional lineal de la solución de NPT II fue desde 18 a 144 ng/mL. La precisión y la exactitud del método ELISA se resumen en la Tabla 7. La precisión del método ELISA fue calculada desde 2.79% a 8.27%, el criterio de aceptación establecido, es que debería ser menor o igual a 10 %; mientras que el rango de exactitud fue calculado desde 3.77% a 13.75%, cuyo criterio de aceptación es que debería ser menor o igual a 15%. Los datos calculados para LDD y LDC fueron 0.065 y 0.105 ng/mL, respectivamente.

Tabla 7. Resultados de la validación del método ELISA para la cuantificación de NPT II.

NPT II ng/mL	CV (%)		Error medio relativo (%)	
	Intraensayo	Interensayo	Intraensayo	Interensayo
20	5.08	8.27	6.40	13.75
60	2.56	2.79	8.43	3.77
100	2.02	3.27	4.82	9.18

Efecto de los ciclos de sonicación sobre la extracción de NPT II a diferentes concentraciones de biomasa

El objetivo de evaluar la extracción mediante sonicación en muestras representativas de fermentación de *E. coli* DH5 α -pVAX-NH36, fue la de obtener la máxima eficiencia en la extracción, y la reproducibilidad, así como analizar si había cambios en los rendimientos específicos de NPT II. Los resultados de la extracción mediante sonicación se encuentran presentados en la Tabla 8. Las tres muestras (1) 3.5, (2) 7.7 y (3) 9.2 gDCW/L fueron seleccionadas para evaluar la extracción de NPT II. Como puede verse en la Tabla 8, para la muestra 1, a partir del segundo ciclo las diferencias en la NPT II extraída no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (57.72 ± 5.68 mgNPTII/L y 16.49 ± 1.62 mgNPTII/gDCW). Para las muestras 2 y 3, a partir del tercer y cuarto ciclo, las diferencias en la extracción no mostraron diferencias significativas. En la misma Tabla 8 también se muestra que, en todos los casos, los rendimientos específicos de NPT II no fueron estadísticamente significativos para los



mismos casos, con lo cual se puede concluir que el método de extracción mediante sonicación es 100% eficiente. Con los datos mostrados, la extracción de la proteína NPT II puede ser garantizada en 1 mL a un máximo de 9.2 gDCW/L; por lo que, si se trabaja con cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli* DH5 α , deberán hacerse diluciones apropiadas con el objeto de garantizar y recuperar completamente la NPT II sintetizada.

Tabla 8. Concentración de NPT II en muestras representativas de fermentación de *Escherichia coli* DH5 α -pVAX1-NH36 a diferentes ciclos de sonicación determinados mediante ELISA.

DCW (g/L)	Ciclos de sonicación							
	1		2		3		4	
	NPT II (mg/L)	^a Y _{NPTII/DCW} (mg/g)	NPT II (mg/L)	Y _{NPTII/DCW} (mg/g)	NPT II (mg/L)	Y _{NPTII/DCW} (mg/g)	NPT II (mg/L)	Y _{NPTII/DCW} (mg/g)
3.5	49.32 \pm	14.09 \pm	57.72 \pm	16.49 \pm	73.49 \pm	21.00 \pm	77.16 \pm	22.05 \pm
	4.82	1.38	5.68	1.62	2.73	0.78	2.73	2.13
7.7	154.93 \pm	20.12 \pm	199.5 \pm	25.92 \pm	242.1 \pm	31.45 \pm	246.8 \pm	32.06 \pm
	6.56	0.85	6.87	0.89	6.31	0.82	8.78	1.14
9.2	457.05 \pm	34.46 \pm	516.9 \pm	68.77 \pm	596.8 \pm	73.37 \pm	609.9 \pm	75.01 \pm
	6.37	2.33	7.78	2.74	3.15	2.71	6.56	6.02

^a Rendimiento específico de NPT II. Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar de tres corridas independientes.

3.1.4 Cinética de la síntesis de NPT II cuantificada por ELISA y comparada con LC-MS/MS en *Escherichia coli* DH5 α durante la producción ADNp en cultivo por lote

La comparación global en 12 muestras tomadas de la fermentación por los métodos ELISA y LC-MS/MS es mostrada en la Fig. 7. Con la ecuación $y=0.9784x + 7.766$ ($r^2=0.9965$, $n=12$), se obtuvo una buena correlación entre ELISA (x) y LC-MS/MS (y). Los resultados anteriores sugieren que ELISA and LC-MS/MS son igualmente útiles para la determinación de la cantidad de NPT II.

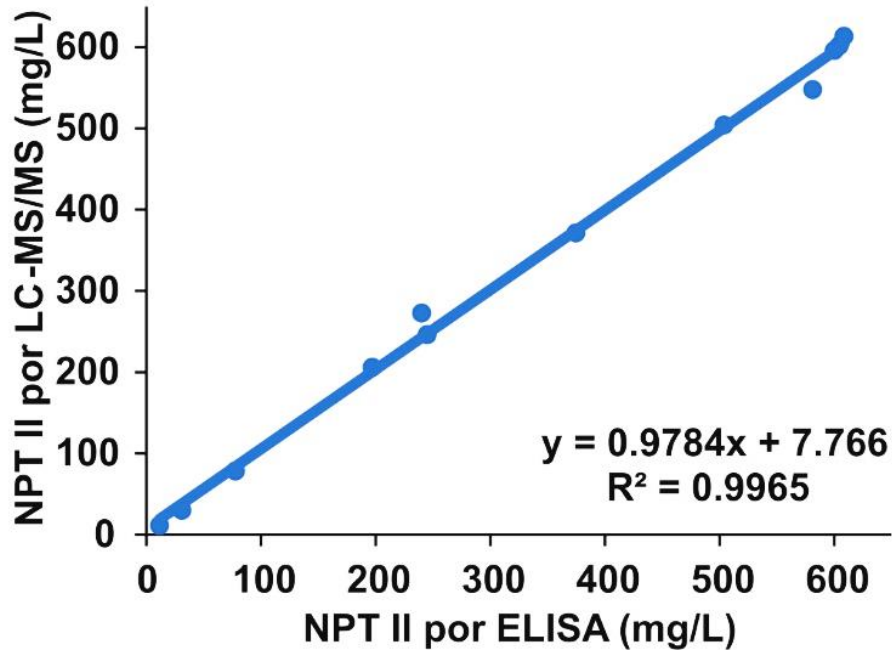


Fig. 7. Correlación entre los métodos ELISA y LC-MS/MS para la detección de NPT II en muestras de fermentación de *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36

Los errores de correlación y valores p entre cada muestra determinada mediante ambos métodos analíticos se muestran en la Tabla 9. A pesar de los porcentajes de los errores de correlación fueron determinados en un rango entre 8% a 77%, los valores p indican que las determinaciones llevadas a cabo por el método ELISA no muestran diferencias significativas comparadas con el método LC-MS/MS.



Tabla 9 Errores de correlación y valores p calculados para la medición con ELISA y LC-MS/MS para la cuantificación de NPT II. Por favor que tu tabla no sobrepase los márgenes

Muestra	Medias (mg/L)		Desviación estandar		Intervalo de confianza		Error de correlación (%)	Valor p
	ELISA	LC-MS/MS	ELISA	LC-MS/MS	ELISA	LC-MS/MS		
1	11.48	11.53	0.91	0.78	[9.2257, 13.7441]	[9.6038, 13.4629]	8	0.947
2	30.93	30.03	1.58	1.47	[27.0117, 34.8434]	[26.3712, 33.6955]	24	0.578
3	77.69	78.40	0.91	0.20	[75.4323, 79.94]	[77.9032, 78.8968]	44	0.363
4	196.96	206.00	5.97	12.08	[182.139, 211.782]	[199.256, 226.077]	30	0.393
5	244.77	246.13	3.28	2.84	[236.63, 252.92]	[239.084, 253.183]	19	0.053
6	240.05	272.87	7.45	44.32	[221.549, 258.544]	[162.781, 382.952]	75	0.295
7	374.55	371.40	4.17	4.70	[364.193, 384.917]	[359.717, 383.083]	28	0.444
8	581.05	547.73	7.88	23.03	[561.476, 600.624]	[490.513, 604.953]	77	0.071
9	604.16	601.70	3.97	4.45	[594.316, 614.013]	[590.644, 612.757]	24	0.448
10	608.37	613.27	13.77	20.00	[574.155, 642.586]	[563.584, 662.95]	20	0.430
11	599.96	595.97	10.34	10.93	[574.288, 625.64]	[568.821, 623.112]	16	0.763
12	503.81	504.033	4.17	2.40	[493.447, 514.174]	[498.07, 509.997]	26	0.851

Para analizar la relación que existe entre la producción de ADNp y la síntesis de NPT II, se calcularon los rendimientos específicos de ADNp y NPT II en todas las muestras de fermentación utilizando como sistema de replicación *E. coli* DH5 α -pVAX-NH36, estos datos son mostrados en la Fig. 8. El rendimiento específico para NPT II máximo fue alcanzado a las 7.75 h, con un valor fue 66.5 mgNPTII/gDCW, alcanzado durante la fase estacionaria del crecimiento; sin embargo, los datos de rendimientos volumétricos y específicos para ADNp y NPT II mostraron varias fases de producción durante toda la cinética de fermentación (Fig. 6 B y Fig. 8). Durante la primera fase de



producción (I en Fig. 8), se pudo observar un incremento lineal en la producción de ADNp (3.44 mgADNp/L h) y un incremento exponencial en la síntesis de NPT II; como ya fue mencionado, tanto los precursores metabólicos, como el poder reductor y la energía, se utilizan para la síntesis de la proteína NPT II para este caso en específico, debido a la presencia de una alta cantidad de antibiótico al comienzo de la fermentación, es necesario direccionar los recursos para la síntesis de esta proteína y de esta manera reducir el efecto inhibitorio de la kanamicina, reduciéndose así esta primera fase de la replicación de ADNp. Posteriormente, en una segunda fase de producción (II en Fig. 5), no se apreció un aumento significativo de la síntesis de NPT II durante 2 h y después su síntesis se incrementó hasta alcanzar la fase estacionaria, durante todo el tiempo que duró esta segunda fase, la velocidad de producción de ADNp incrementó en 4 veces (12.10 mgADNp/L h). Por último, en la tercera fase (III en Fig. 8) se identificó que no se apreció un incremento en la síntesis de NPT II, incluso, fue evidente un decremento en la concentración de esta proteína, desde 67 hasta 56 mgNPTII/L, no así para el caso de ADNp, donde la acumulación de plásmido en la célula se incrementó hasta el término de la fermentación. Este comportamiento puede ser atribuido a la acción de la actividad de proteasas, esto para poder obtener carbono de alguna fuente que ya no se necesita en tales concentraciones. Además, no hay cambios en el rendimiento volumétrico de NPT II, una vez que el glicerol se consume por completo y se inicia el consumo de ácidos orgánicos, por lo que puede ser un indicativo de que no se utiliza carbón asimilado en forma de ácidos orgánicos, para la síntesis de NPT II.

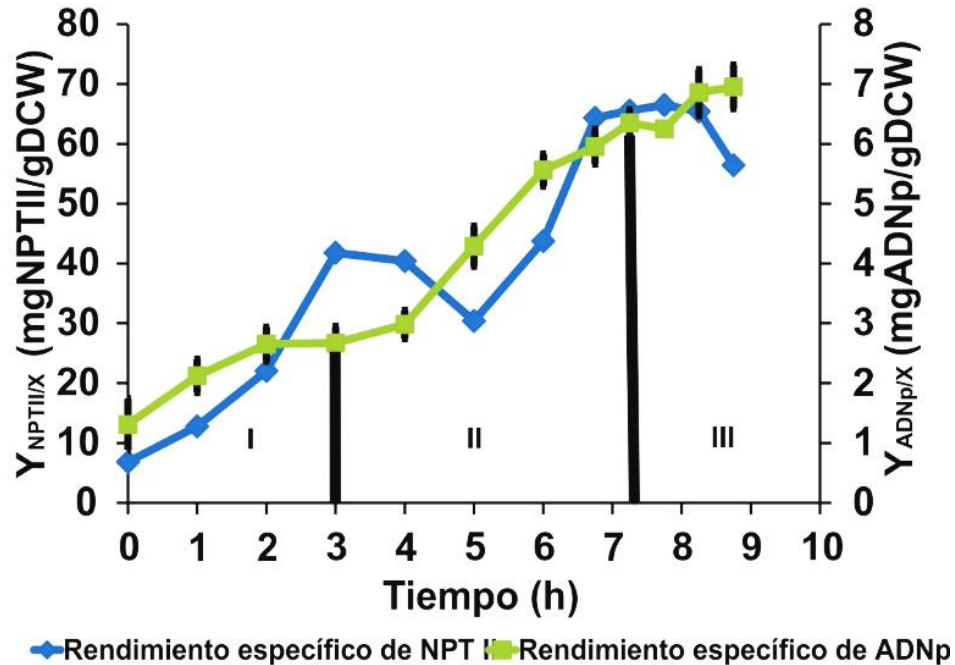


Fig. 8. Rendimientos específicos de ADNp y NPT II en la fermentación de *Escherichia coli* DH5 α -pVAX-NH36, en medio de cultivo definido a 37 °C. Las diferentes fases de producción son identificadas con números romanos. Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes.

3.2 Experimentación, modelado y observabilidad durante la producción de ADNp

En la segunda etapa del proyecto una vez concluido que existía una relación NO lineal entre la producción de ADNp y la síntesis de NPT II, se planteó realizar un estudio numérico de la influencia de la temperatura sobre parámetros cinéticos y termodinámicos en la producción de plásmido, en medio de cultivo definido con *Escherichia coli* DH5 α ; sin embargo, antes de la propuesta propia de un modelo cinético, en un análisis bibliográfico, un modelo cinético fue considerado (Lopes et al., 2014), donde mediante un enfoque de balances de masas, se modelaron los comportamientos para las concentraciones de ADNp, fuentes de carbono (glicerol y glucosa), acetato y biomasa, para proponer una estructura de observador y así, estimar la concentración de ADNp.



3.2.1 Observabilidad aplicada a la estimación de ADNp en cultivo por lote utilizando *Escherichia coli* DH5 α mediante un observador de estado simple

Aunque han existido esfuerzos para el desarrollo de métodos para el monitoreo de la concentración de ADNp, todos requieren de conocimiento especializado de análisis, el cual involucra un entrenamiento para su implementación, así como equipamiento especializado, todo ello conlleva a un incremento en los costos del proceso de producción. En una primera contribución de esta segunda parte del proyecto doctoral, a partir de evaluar la necesidad de contar con una herramienta para estimar la concentración de ADNp, se presenta un observador de estado con inyección de retroalimentación de salida de tipo lineal para lograr la convergencia asintótica de las variables de estado de estimación a las reales correspondientes. Para este fin, se propuso aplicar la estructura de observador a un biorreactor en lote perfectamente agitado para la estimación de la concentración de plásmido (pVAX-LacZ) mediante *Escherichia coli* DH5 α , considerando a la concentración de biomasa como la medida de salida del proceso y empleando como punto de referencia un modelo cinético previamente reportado y corroborado experimentalmente (Lopes et al., 2014).

Para ilustrar los resultados obtenidos, el comportamiento del observador propuesto fue evaluado mediante experimentos numéricos. El objetivo del observador propuesto es intentar inferir la concentración de plásmido, porque en la práctica, la concentración de plásmido se mide generalmente por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, que son dispositivos de medición relativamente costosos y producen datos discretos y con retraso de tiempo. De lo anterior, se realizaron simulaciones numéricas para mostrar el rendimiento de la metodología de estimación propuesta.

Primero, se realizó un análisis de observabilidad local empleando la matriz de observabilidad $[O]$ en el punto de equilibrio; $x_{eq}=[0 \ 0 \ 0.087 \ 0 \ 11.52]$ en g/L, donde el rango de la matriz de observabilidad es $[O]=4$. Con esto, se puede concluir que el biorreactor es detectable, esto es, la concentración de masa no observada es estable (Gupta et al., 2014). En el caso presente, la concentración de masa no observable correspondió a la concentración de glicerol y presentó un comportamiento dinámico estable, como se muestra en las simulaciones numéricas. El modelo descrito por las



ecuaciones (4) - (8) es simulado bajo las siguientes condiciones iniciales, $S_0=6.8$ g/L, $A_0=0.1$ g/L, $P_0=0.01$ g/L, $G_0=5.4$ g/L y $X_0=1.5$ g/L, mismas condiciones que reproducen adecuadamente las condiciones experimentales reportadas (Lopes et al., 2014) y la condición inicial del observador es 5.5, 0.15, 0.015, 6 y 2, respectivamente. Las ganancias correspondientes del observador propuesto son seleccionadas como $g_1=[0.5 \ 15 \ 0.01 \ 0.1 \ 10]$ en g/L y $g_2=[0.2 \ 0.1 \ 0.11 \ 0.1 \ 0.1]$ en 1/h. El desempeño de convergencia del observador propuesto se compara con un observador clásico de Luenberger, el cual tiene la siguiente estructura matemática $\dot{\hat{x}} = f(\hat{x}(t)) - g_1 \xi_1$ (ver las Figs. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16). Con esto, en las Figuras 9, 10, 11, 12 y 13 se muestra que el observador propuesto es muy cercano a los valores actuales. La estimación de la concentración de plásmido mediante el observador es cercana al valor actual; de hecho, el valor estimado sigue muy cercano el valor actual en todo el dominio de tiempo, como se muestra en la Fig. 12.

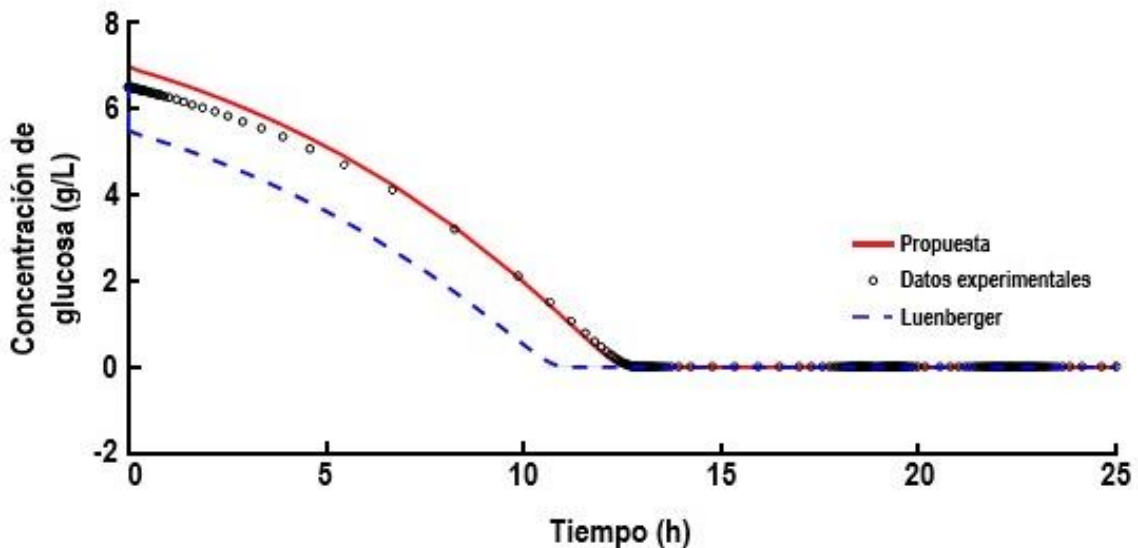


Fig. 9. Dinámicas de la concentración de glucosa.

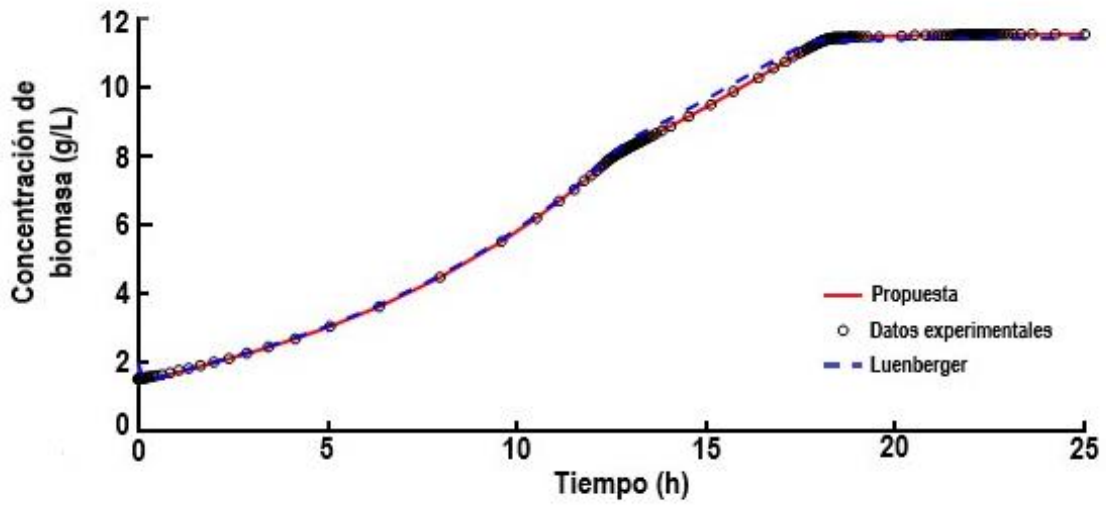


Fig. 10. Dinámicas de la concentración de biomasa.

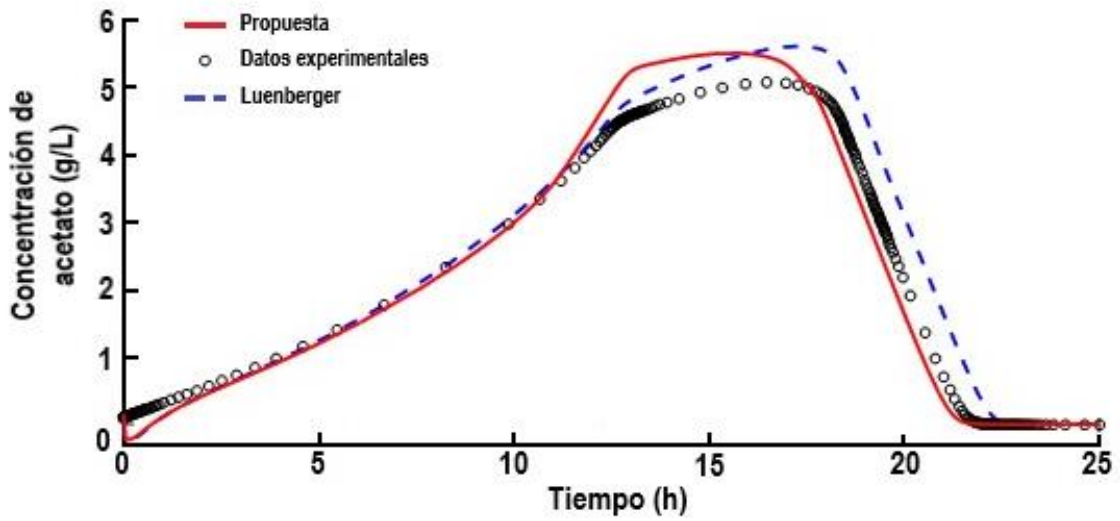


Fig. 11. Dinámicas de la concentración de acetato.

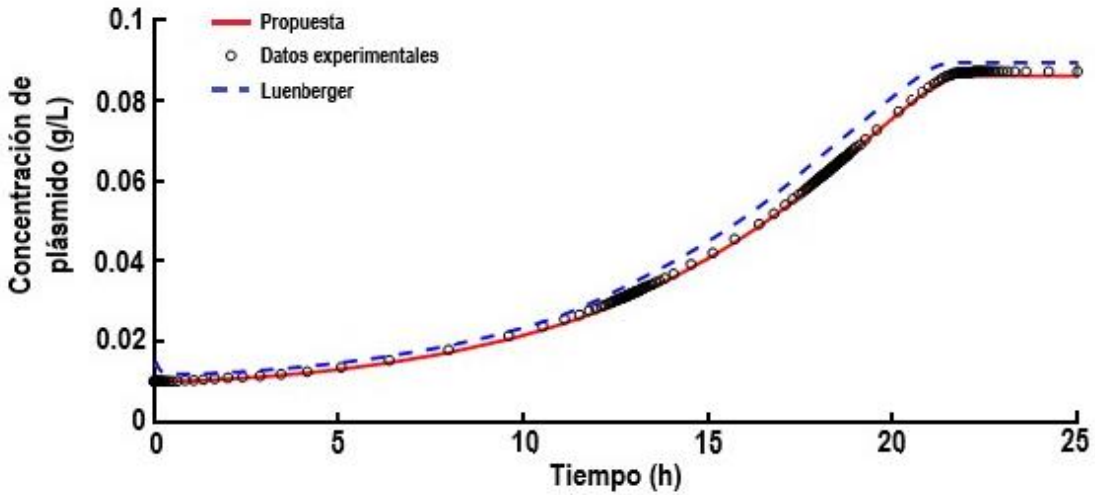


Fig. 12. Dinámicas de la concentración de ADNp.

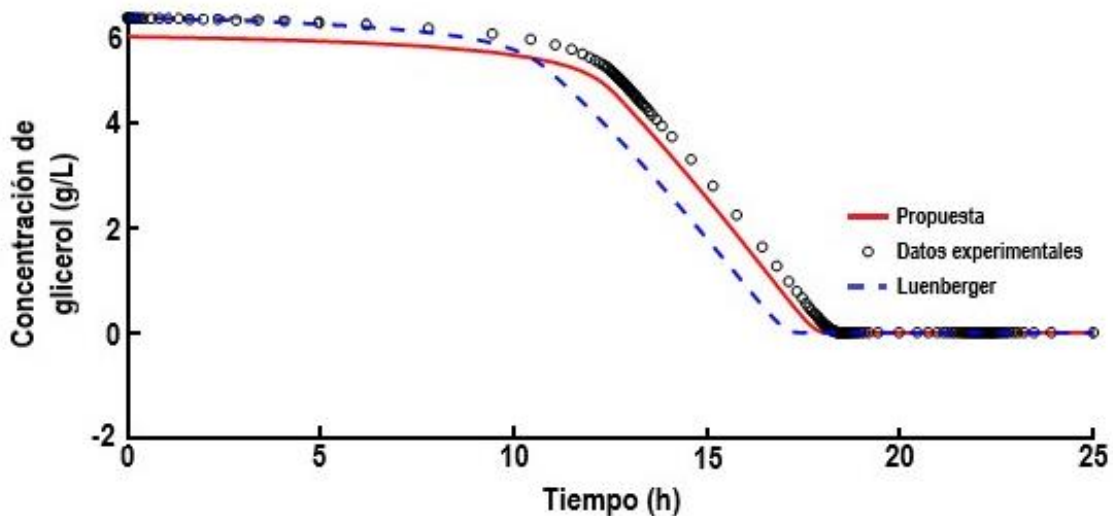


Fig. 13. Dinámicas de la concentración de glicerol.

Las trayectorias del observador son mostradas en las Figs. 14 y 15. Finalmente, al computar la norma de error de estimación con el observador propuesto se reveló una tendencia asintótica a cero, mientras que el observador de Luenberger mantuvo un comportamiento oscilatorio, por lo que el observador propuesto tiene un mejor desempeño que el observador Luenberger (Fig. 16). Los experimentos numéricos muestran que los valores estimados convergen a sus correspondientes valores de las variables de estado dentro de al menos las primeras 5 h.

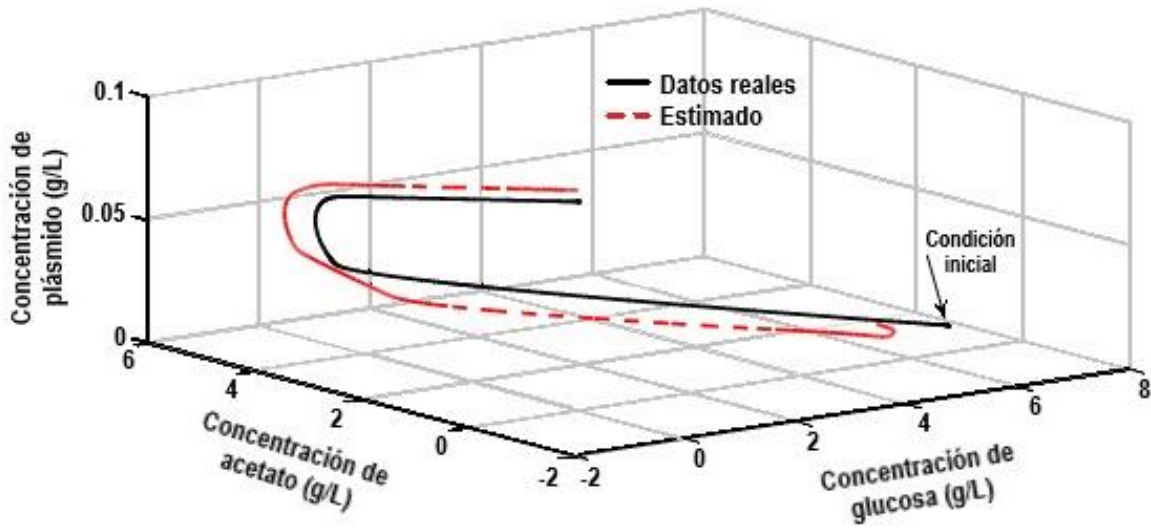


Fig. 14. Trayectorias del desempeño para el observador propuesto para la estimación de plásmido con el uso de glucosa.

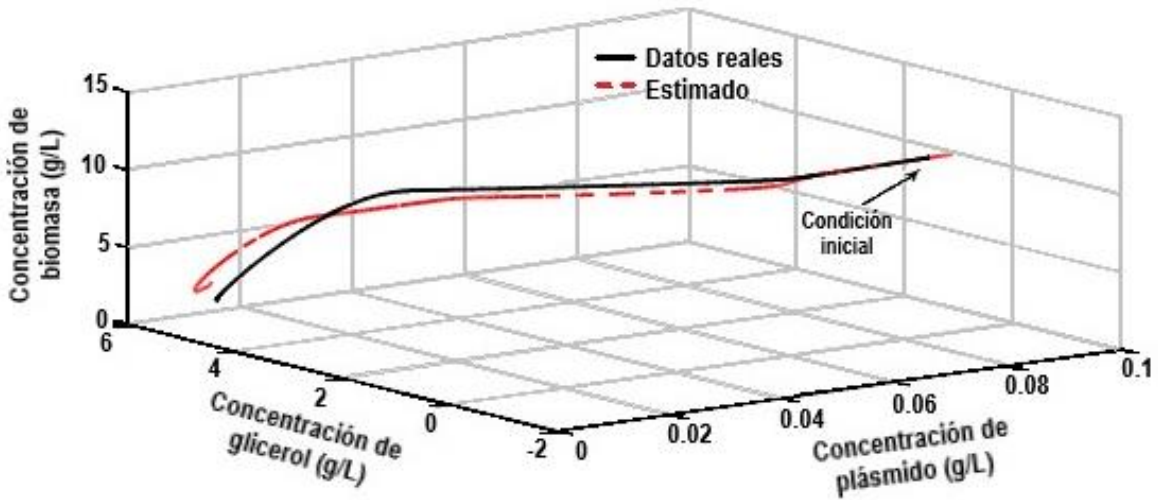


Fig. 15. Trayectorias del desempeño para el observador propuesto para la estimación de plásmido con el uso de glicerol.

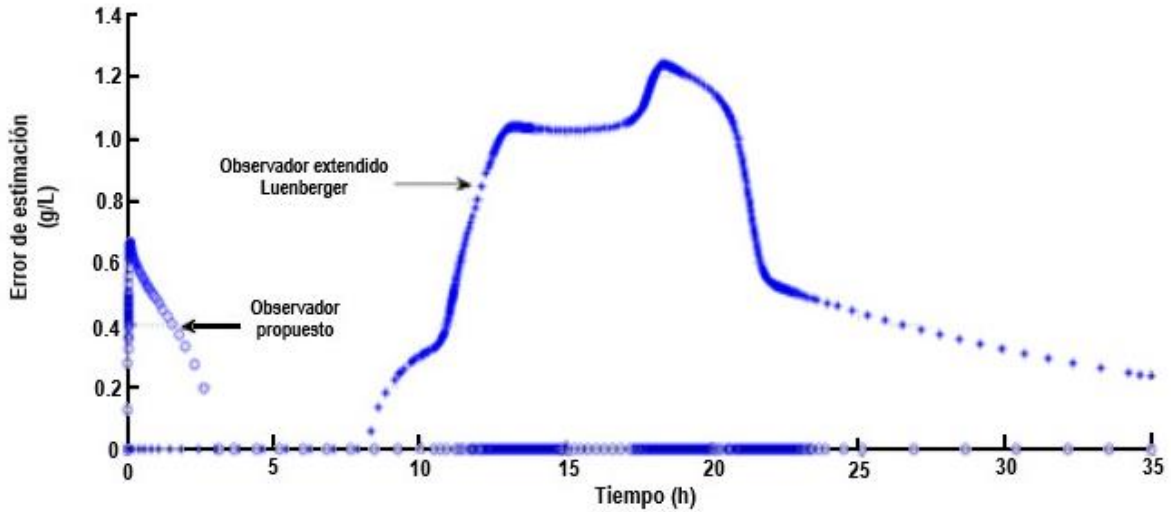


Fig. 16. Comparación de la norma de error de estimación entre el observador Luenberger y el observador propuesto.

Es de notar que la estructura de observador propuesta alcanza un desempeño satisfactorio considerando un diseño simple (estructura PI) bajo una elección específica de los parámetros del observador, que ayudan a compensar el límite superior de la no linealidad principal del biorreactor (término cinético) imponiendo un comportamiento lineal estable del error de estimación como se mostró previamente. La metodología propuesta evita los marcos matemáticos complejos en comparación con otras técnicas como modo deslizante, súper twisting y observadores de estado adaptativos, donde las inclusiones diferenciales, la teoría de Lyapunov y los algoritmos de optimización se consideran en su diseño e implementación (Didi et al., 2015; Martinez-Fonseca et al., 2014; Ali et al., 2015; Rodriguez et al., 2015).

Después de evaluar la estimación de la concentración de ADNp mediante el observador de estados propuesto, utilizando el modelo propuesto por Lopes et al (2014); realizamos un análisis de las variables involucradas en el modelo, así como las características de la estructura propuesta, concluyendo que, el ajuste realizado para su calibración puede no haber sido adecuado, debido a que en la dinámica del sistema no se contempla la contribución de carbono de los 30 g/L del extracto de levadura y bactotripton utilizado en los experimentos; esto es una desventaja del medio de cultivo semi-definido para proponer un modelo cinético, ya que los datos



obtenidos para los 17 parámetros contenidos en la estructura matemática pueden subestimarse o sobreestimarse; así mismo, este no involucra todas las entradas y salidas que ya fueron reportadas por Cunningham et al (2009), por lo que se propuso un modelo con el objetivo de realizar un análisis del comportamiento debido al efecto de la temperatura sobre la producción de ADNp, sobreflujo metabólico y carga metabólica.

3.2.2 Experimentación y modelado para investigar el comportamiento cinético debido a la temperatura en la producción de ADNp mediante Escherichia coli DH5 α

Partiendo del modelo cinético tomado para realizar la propuesta de un observador de estado para la estimación de la concentración de ADNp, es importante mencionar que este es solamente interpretativo utilizando un medio mínimo semi-definido con glucosa, glicerol y una mezcla de estos. El modelo de Silva et al., 2014, mostró un buen desempeño, sin embargo, el ajuste realizado para su calibración puede no haber sido adecuado, debido al hecho de que, en la dinámica del sistema, no se contempla la contribución de carbono de los 30 g/L del extracto de levadura y la bactotriptonna utilizada en los experimentos. Lo anterior es una desventaja de los medios de cultivo semi-definidos para proponer un modelo cinético, ya que los datos obtenidos para los 17 parámetros contenidos en la estructura matemática pueden estar subestimados o sobreestimados. Sin embargo, en cuanto a los estudios conocidos, no existe un estudio numérico de la influencia de la temperatura en la producción de ADNp y productos relacionados con el sobreflujo metabólico (acetato, lactato, formiato y succinato) y la carga metabólica (principalmente síntesis de NPT II). Si bien hay algunos esfuerzos para proponer modelos que describan la producción de ADNp, ninguno de ellos implica todas las entradas y salidas importantes que ya se han reportado (Cunningham et al., 2009), por lo tanto, en esta etapa se propuso un modelo matemático fenomenológico para cuantificar y describir el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la producción del plásmido, permitiendo el cálculo de varios parámetros termodinámicos del sistema. Los resultados en consecuencia



proporcionan una mejor comprensión de los efectos de la temperatura en las actividades de la célula para un mayor desarrollo del proceso.

3.2.2.1 Experimentos para la producción de ADNp

Se llevaron a cabo fermentaciones en lote en biorreactor para la producción de ADNp por duplicado con una concentración inicial de glicerol de 20 g/L aproximadamente y controladas a temperatura constante de 30, 33, 35, 37, 40 y 42 °C. En la Fig. 17 se muestran los resultados máximos experimentales para los 8 estados incluidos en el modelo propuesto en la etapa 2 de la sección de materiales y métodos (glicerol, biomasa, ADNp, acetato, lactato, formiato, succinato y NPT II). Los datos experimentales revelaron que la biomasa aumentó exponencialmente al inicio y dependiendo de la temperatura de operación entró a la fase estacionaria en diferentes momentos. En la tabla 12, se observa que la velocidad específica máxima incrementó de 0.25 h⁻¹ a 30 °C y a 0.33 h⁻¹ a 42 °C, la biomasa máxima alcanzada fue de 8.04±0.34 gDCW/L a y una de 7.63±0.23 gDCW/L, respectivamente, permaneciendo casi constante como se reportó anteriormente (Jaén et al., 2013). La acumulación de acetato también incrementó con la temperatura, alcanzando valores cercanos a 5 g/L a 42 °C y de 0.7 g/L a 30 °C; sin embargo, se observó una disminución en la velocidad de asimilación del acetato, siendo de 0.45 h⁻¹ a 30 °C a 0.002 h⁻¹ a 42 °C, esto puede deberse a una disminución en las funciones metabólicas de *E. coli*. Así mismo, el aumento en los productos del sobreflujo podría ser atribuido a la respuesta al choque térmico, que se sabe que reduce la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Wittman et al., 2007); los ácidos relacionados al sobreflujo metabólico, formiato, succinato y lactato, no mostraron un aumento importante de la concentración en las muestras (Fig. 17). La concentración máxima de ADNp incrementó de manera importante cuando la temperatura alcanzó los 35 °C, siendo de 26.7±1.46 mg/L a 30 °C, 42.9±0.94 mg/L a 33 °C y 52.1±2.47 mg/L a 35 °C y casi constante a 40 °C y 42 °C, siendo de 115.9 mg/L y 118.0 mg/L, respectivamente; esto se puede atribuir a un incremento en la velocidad de producción de ADNp, calculadas para cada una de las temperaturas evaluadas (30 °C, 33 °C, 35 °C, 40 ° y 42 °C), en 0.39 h⁻¹, 0.44 h⁻¹, 0.61 h⁻¹, 1.24 h⁻¹ y 1.34 h⁻¹, respectivamente. Los estudios han demostrado que el número



de copias del plásmido con origen de replicación pUC aumentan a 37 °C comparados con 30 °C, pero otras temperaturas se han estudiado a detalle para toda la cinética de producción en esta parte del trabajo. A 40 °C y 42 °C, no se observó ningún incremento en la concentración de plásmido, debido a que a 42 °C no se observó la asimilación de acetato y la concentración de este fue mayor y a un posible efecto negativo sobre la replicación del mismo como ya ha sido reportado (Xu et al., 2005). En muchos estudios la carga metabólica impuesta por la presencia del plásmido se ha relacionado a la producción de ácidos del sobreflujo metabólico (Ow et al., 2006); sin embargo, aquí se evaluaron las cinéticas completas de la producción de un producto (NPT II) relacionado a la carga metabólica, y los resultados indicaron que la proteína NPT II y la producción de acetato son independientes; así mismo para todos los experimentos se observó un proceso de desnaturalización de la proteína, cuyas velocidades se calcularon. La velocidad máxima de producción de NPT II incrementó desde 0.07 h⁻¹ a 30 °C y 0.18 h⁻¹ a 42 °C, alcanzando a cada una de estas velocidades, una concentración máxima de 222.9 \pm 2.70 mg/L y 276.5 \pm 15.11 mg/L, respectivamente. Se cuantificó la concentración más alta de la proteína en las muestras tomadas, siendo 680.0 \pm 15.12 mg/L a 37 °C. Finalmente, basado en los datos obtenidos y mostrados en la Fig. 17, la temperatura óptima para la producción de ADNp en *E. coli* DH5 α de 40 °C, tomando en cuenta que no hubo incremento significativo en la producción de ADNp entre 40 °C y 42 °C (115.88 \pm 10.40 mg/L y 117.99 \pm 12.26 mg/L), pero no así, para los productos relacionados al sobreflujo metabólico (principalmente acetato), el cual hubo una disminución del 49% a 40 °C con respecto a 42 °C.

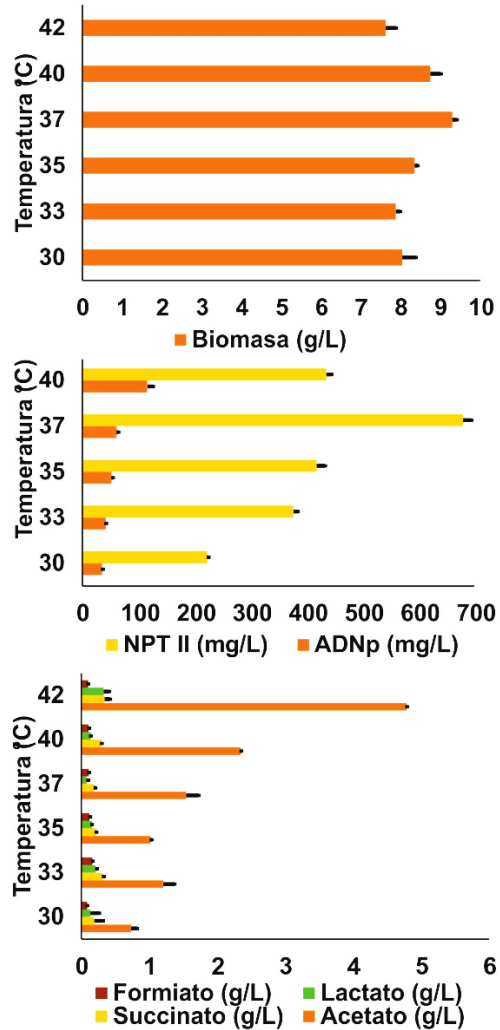


Fig. 17. Producciones máximas de biomasa, ácidos orgánicos (acetato, lactato, formiato y succinato), ADNp y NPT II en fermentaciones de *E. coli* DH5 α a diferentes temperaturas (30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C y 42 °C). Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos diferentes.

3.2.2.2 Identificación paramétrica, sensibilidad y simulaciones

Después de la construcción del modelo se procedió a realizar la identificación y ajuste paramétrico para cada parámetro incluido en el modelo propuesto, este paso se realizó a partir de un conjunto de datos experimentales obtenidos a 37 °C, considerando las siguientes condiciones iniciales: 21.44 g/L, 1.84 g/L, 1.83 mg/L, 0.053 g/L, 0.03 g/L, 0.042 g/L, 0.023 g/L y 12.4 mg/L para las concentraciones de glicerol, biomasa, ADNp, acetato, lactato, formiato, succinato y NPT II, respectivamente.



Utilizando el programa ModelMaker 3.0.3 se realizó el ajuste paramétrico no lineal a los datos experimentales mediante el algoritmo Levenberg-Marquardt; los valores de los parámetros obtenidos se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores para cada uno de los parámetros del modelo, obtenidos del ajuste paramétrico no lineal.

Número de parámetro	Parámetro	Valor	Unidades
1	μ_{\max}	0.31	h^{-1}
2	K_{Gly}	0.40	g/L
3	K_{iAcX}	3.99	g/L
4	K_{GlyAc}	0.005	g/L
5	K_{Ac}	1.60	g/L
6	K_{GlySuc}	0.017	g/L
7	K_{Suc}	0.205	g/L
8	K_{GlyLac}	0.017	g/L
9	$K_{GlyForm}$	0.003	g/L
10	K_{Form}	0.848	g/L
11	$K_{iAcpDNA}$	6.014	g/L
12	$K_{GlypDNA}$	0.008	g/L
13	$K_{GlyNPTII}$	0.005	g/L
14	$v_{p\max Ac}$	0.165	h^{-1}
15	$v_{C\max Ac}$	0.213	h^{-1}
16	$v_{p\max Suc}$	0.495	h^{-1}
17	$v_{C\max Suc}$	0.391	h^{-1}
18	$v_{p\max Lac}$	0.022	h^{-1}
19	$v_{p\max Form}$	1.191	h^{-1}
20	$v_{C\max Form}$	7.369	h^{-1}
21	$v_{\max pDNA}$	0.606	h^{-1}
22	$v_{\max NPTII}$	0.121	h^{-1}
23	v_{deg}	0.015	h^{-1}
24	m_{Gly}	0.003	g/g h
25	$Y_{X/Gly}$	0.509	g/g
26	$Y_{Ac/Gly}$	0.202	g/g
27	$Y_{pDNA/Gly}$	13.874	mg/g
28	$Y_{NPTII/Gly}$	67.092	mg/g
29	$Y_{Ac/X}$	0.475	g/g
30	$Y_{Suc/X}$	0.017	g/g
31	$Y_{Lac/X}$	0.060	g/g
32	$Y_{Form/X}$	0.011	g/g
33	$Y_{pDNA/X}$	12.042	mg/g
34	$Y_{NPTII/X}$	200	mg/g



Para cuantificar la calidad en el ajuste del modelo se realizó un análisis de regresión lineal para cada estado y se calculó un valor de correlación global con respecto al ajuste del modelo a los datos experimentales a 37 ° C. Los resultados de este análisis de correlación son mostrados en la Tabla 11. Como se puede observar para el ajuste paramétrico se calcularon coeficientes de correlación mayores a 0.99 para todos los estados a excepción de la concentración de acetato, la dinámica de esta concentración podría no estar representada con una mayor precisión debido a la estructura de la ecuación diferencial que la describe, debido a que los datos experimentales del consumo de acetato comenzaron después de haber alcanzado una concentración máxima a las 6.8 h del proceso de fermentación. Este comportamiento puede verse en la Fig. 18

Tabla 11. Índices de la correlación lineal para cada variable de estado y el índice global del modelo comparado con los datos experimentales a 37 °C.

Variable	R²
Biomasa (g/L)	0.998
Glicerol (g/L)	0.985
ADNp (mg/L)	0.983
Acetato (g/L)	0.799
Succinato (g/L)	0.962
Lactato (g/L)	0.970
Formiato (g/L)	0.934
NPT II (mg/L)	0.918
Global	0.944
(X²)	203

Tras identificar el conjunto de valores de parámetros que maximizaron el ajuste del modelo a los valores experimentales, se procedió a realizar un análisis de sensibilidad local basado en la aplicación de la matriz de información de Fisher, que permite cuantificar el grado de interferencia de cada parámetro en su variación numérica en cualquier momento de simulación y sus intervalos de confianza en su determinación numérica en diferentes etapas de la producción de ADNp.

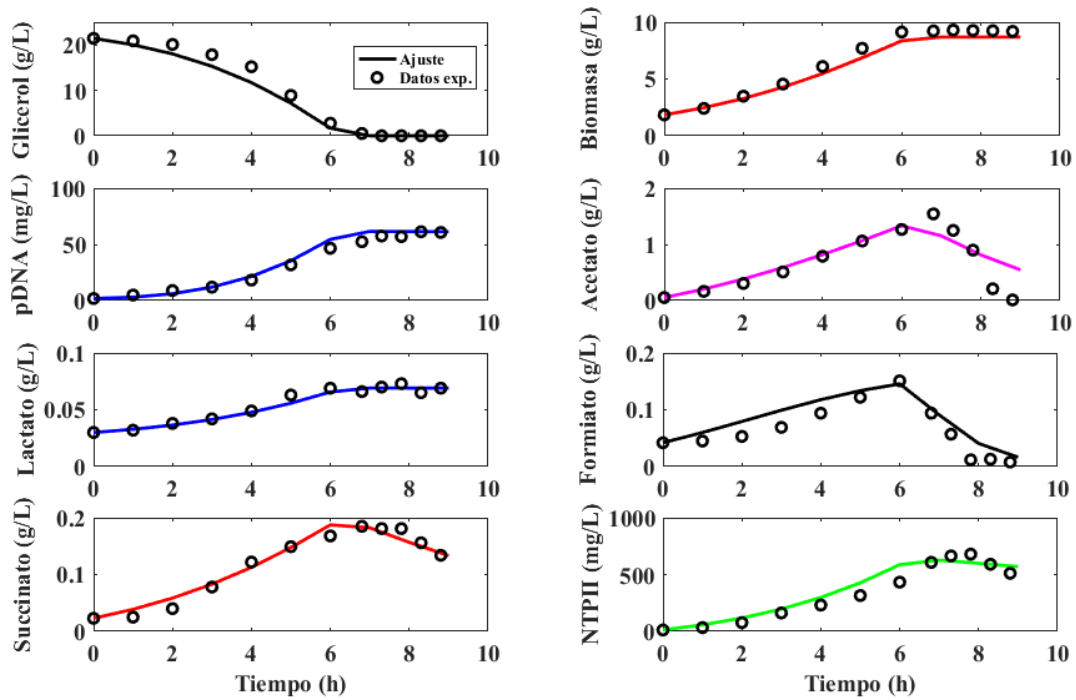


Fig. 18. Cinéticas experimentales y simuladas de la producción de ADNp mediante *E. coli* DH5 α . Las líneas continuas representan las concentraciones modeladas y los círculos indican los valores experimentales a 37 °C.

En la Fig. 19 se muestra que el modelo es altamente sensible a la determinación precisa de la velocidad de crecimiento, las velocidades de producción de ADNp y NPT II, así como las velocidades de producción y consumo de ácidos orgánicos (productos del sobreflujo metabólico), este tipo de información podría proporcionar una base para hacer ajustes a técnicas analíticas o numéricas para el cálculo de estos parámetros en experimentos futuros, también, debido a la importancia de 11 (velocidades) de los 34 parámetros contenidos en el modelo, estos parámetros fueron seleccionados para realizar el análisis numérico de sus valores a las diferentes temperaturas y para calcular los valores de la energía de activación y la constante de Arrhenius.

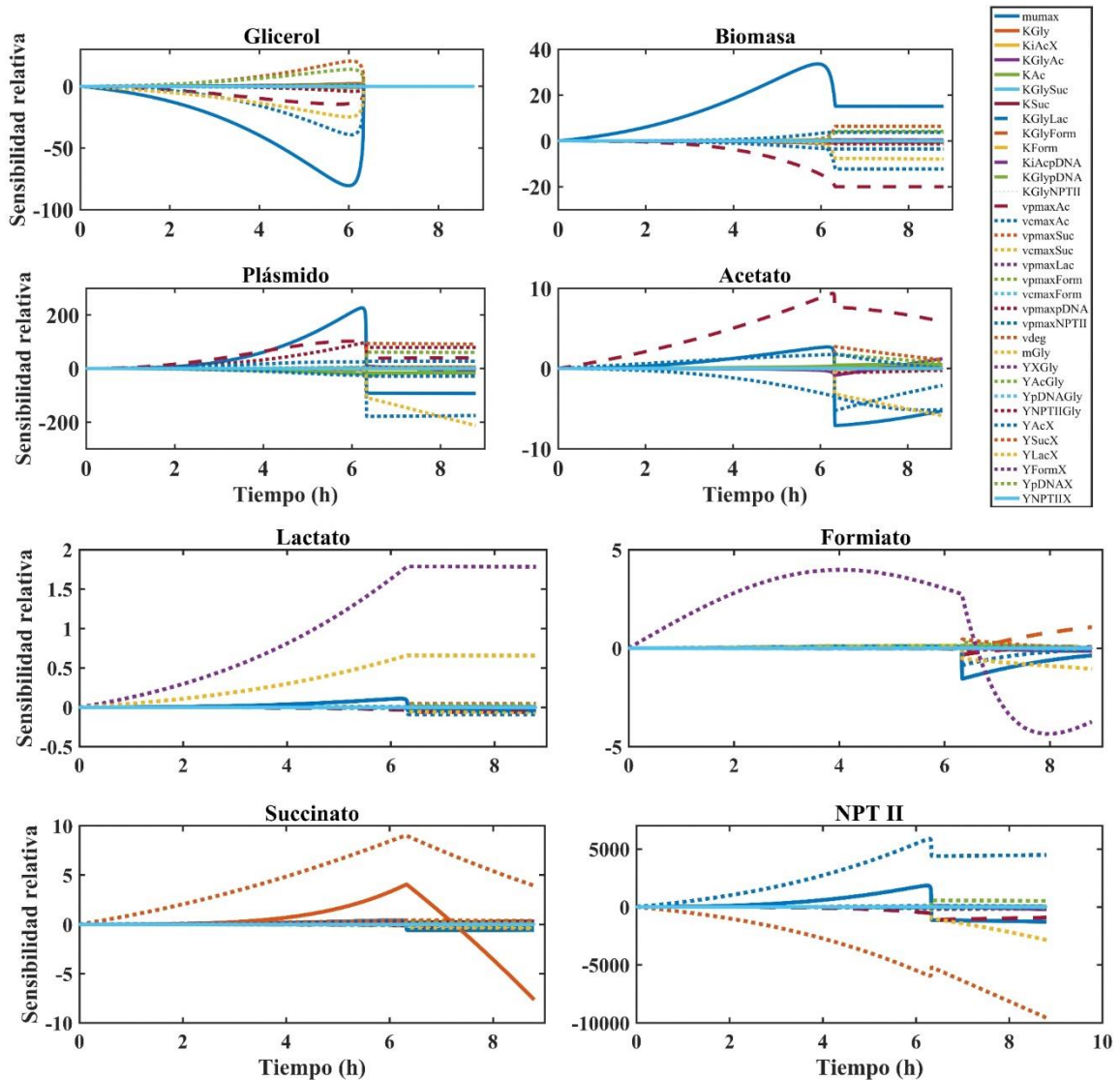


Fig. 19. Perfiles obtenidos del análisis de sensibilidad local para todas las variables modeladas a lo largo del tiempo de producción: biomasa, glicerol, ADNp, acetato, lactato, formiato, succinato y NPT II.

3.2.2.3 Termodinámica y análisis de la influencia de la temperatura sobre los parámetros

A escala industrial, la temperatura del proceso es uno de los factores más importantes para determinar el costo de producción y la calidad del producto. La influencia de la temperatura en el proceso de producción de pDNA por *E. coli* DH5 α se estudió con respecto a los parámetros cinéticos (velocidades) relacionados con



biomasa, glicerol, ADNp, metabolitos del sobreflujo metabólico y NPT II, su producción o consumo según corresponda de acuerdo con el modelo propuesto. En la Tabla 12, las velocidades máximas para cada una de las variables incluidas en el modelo mostraron un incremento como función de un aumento de la temperatura (μ_{\max} , $vp_{\max Ac}$, $vp_{\max Suc}$, $vc_{\max Suc}$, $vp_{\max Lac}$, $vp_{\max Form}$, $vc_{\max Form}$, $v_{\max pDNA}$, $v_{\max NPTII}$, and v_{deg}), excepto para la velocidad de consumo de acetato ($vc_{\max Ac}$), esta observación es importante debido a que en la mayoría de los sistemas de producción de ADNp uno de los mayores problemas es la presencia de altas concentraciones de acetato en caldo de fermentación que está relacionado a la inhibición del crecimiento y producción de ANDp (Lopes et al., 2014; Xu et al., 2005); termodinámicamente, el consumo de acetato no está favorecido y por lo tanto, la medición de este, debe ser cuidadosamente cuantificado debido a un posterior aumento de la temperatura que tiene como objetivo favorecer la replicación del producto de interés (ADNp). La energía de activación más baja (E_a) y la entalpía y la entropía de activación más bajas para la formación del producto se consideran un requisito previo para verificar la estabilidad del cultivo a la temperatura de incubación. Usando el método de ajuste de curvas de mínimos cuadrados, se obtuvieron valores de las velocidades estimadas a partir de los datos experimentales en el rango de 30-42 °C. Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos para evaluar el efecto de la temperatura en los parámetros del modelo fueron claramente evidentes, la energía de activación (E_a) para biomasa, ADNp, acetato, succinato, lactato, formiato y producción de NPT II, así como, la reasimilación de acetato, succinato y formiato y la degradación del NPT II se determinaron aplicando la relación con la ecuación de Arrhenius. La E_a es la energía absorbida o liberada necesaria para que las moléculas alcancen el estado reactivo (Van Boekel et al., 2008). En esta parte del trabajo realizado, la dependencia a la temperatura de las velocidades de reacción se ajustó muy bien a los resultados experimentales mostrados en la Tabla 12, obteniendo coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0.90 para todos los parámetros, excepto la tasa máxima de producción de lactato ($vp_{\max Lac}$), esto podría deberse a varias cosas, incluyendo toma de muestras, método analítico para la cuantificación, límite de detección del método para la variable



modelada y esto también relacionado con el orden de magnitud de la concentración en el sistema de producción.

Tabla 12. Valores de energía de activación y constante de Arrhenius para cada parámetro analizado y el índice de correlación calculado a partir del ajuste al modelo de Arrhenius.

Parámetro	Valores					$E_{a(i)}$ (kJ/mol)	$\ln A_{(i)}$ (h ⁻¹)	R^2
	30 °C	33 °C	35 °C	40 °C	42 °C			
μ_{max}	0.25	0.28	0.30	0.31	0.33	16.5	5.1933	0.918
VP_{maxAc}	0.07	0.09	0.20	0.18	0.30	84.5	30.998	0.825
VC_{maxAc}	0.451	0.326	0.099	0.011	0.002	-382.1	-151.87	0.945
VP_{maxSuc}	0.28	0.35	0.74	2.20	2.10	146.7	56.783	0.853
VC_{maxSuc}	0.30	0.32	0.95	3.15	4.35	186.4	72.399	0.775
VP_{maxLac}	0.017	0.087	0.05	0.02	0.27	84.9	29.941	0.494
$VP_{maxForm}$	0.40	0.81	1.10	1.21	1.56	77.9	30.287	0.830
$VC_{maxForm}$	2.0	4.1	6.7	9.5	3.0	123.2	49.772	0.922
$V_{maxpDNA}$	0.39	0.44	0.61	1.24	1.34	90.9	35.046	0.969
$V_{maxNPTII}$	0.07	0.11	0.12	0.16	0.18	58.2	20.522	0.938
V_{deg}	0.014	0.029	0.045	0.073	0.082	115.6	41.81	0.928

Los valores de las energías de activación para el crecimiento microbiano reportadas en la literatura varían considerablemente, desde 7 kJ/mol a 79 kJ/mol (Kumar, Dasgupta y Das, 2014; Bokhari, Latif y Rajoka, 2008), esta variación podría ser debido a diferencias que van desde la naturaleza del microorganismo hasta el modelo usado para la estimación de las velocidades de crecimiento (Huang, Hwang y Phillips, 2011). El valor de E_a para el crecimiento de *E. coli* DH5 α fue estimado en 16.5 kJ/mol, este valor pequeño es debido a los valores pequeños de las velocidades de crecimiento, calculados a partir del modelo propuesto, pero los cuales están cercanos a los valores previamente reportados (Jaén et al., 2013); así mismo, la pequeña variación entre el valor de las velocidades máximas con respecto a la temperatura, proporcionó un valor pequeño de la pendiente (E_a/R) que influyó en el cálculo de este valor informado para la E_a del crecimiento celular. Los valores estimados de las energías de activación para producción de acetato, succinato y formiato (E_{a2} , E_{a4} y E_{a7}) fueron 84.5 kJ/mol, 146.7 kJ/mol y 77.9 kJ/mol, respectivamente, estos valores indican la cantidad de energía necesaria para que la célula alcance el estado de transición para secretar cada uno de esos productos al medio de cultivo, siendo todos



esos valores, menores que los correspondientes calculados para su re-asimilación ($E_{a3}=-382.1$ kJ/mol, $E_{a5}=186.4$ kJ/mol and $E_{a8}=123.2$ kJ/mol); aunque estos valores muestran que la producción de cada uno de estos ácidos orgánicos relacionados con el sobreflujo metabólico se ve favorecida termodinámicamente, de la misma manera, cuando realizamos un análisis de las reacciones enzimáticas involucradas en la producción de cada uno de ellos, puede deducirse de la valores de energía de activación de las reacciones enzimáticas, que la producción de acetato (16.0 kJ/mol) es mayormente favorecida que por ejemplo, para la producción de lactato (58.0 kJ/mol) como se muestra en la Fig. 20. Los valores de energía de activación para la producción de ADNp (E_{a9}) y NPT II (E_{a10}) fueron calculadas, siendo 90.92 kJ/mol y 58.19 kJ/mol, respectivamente.

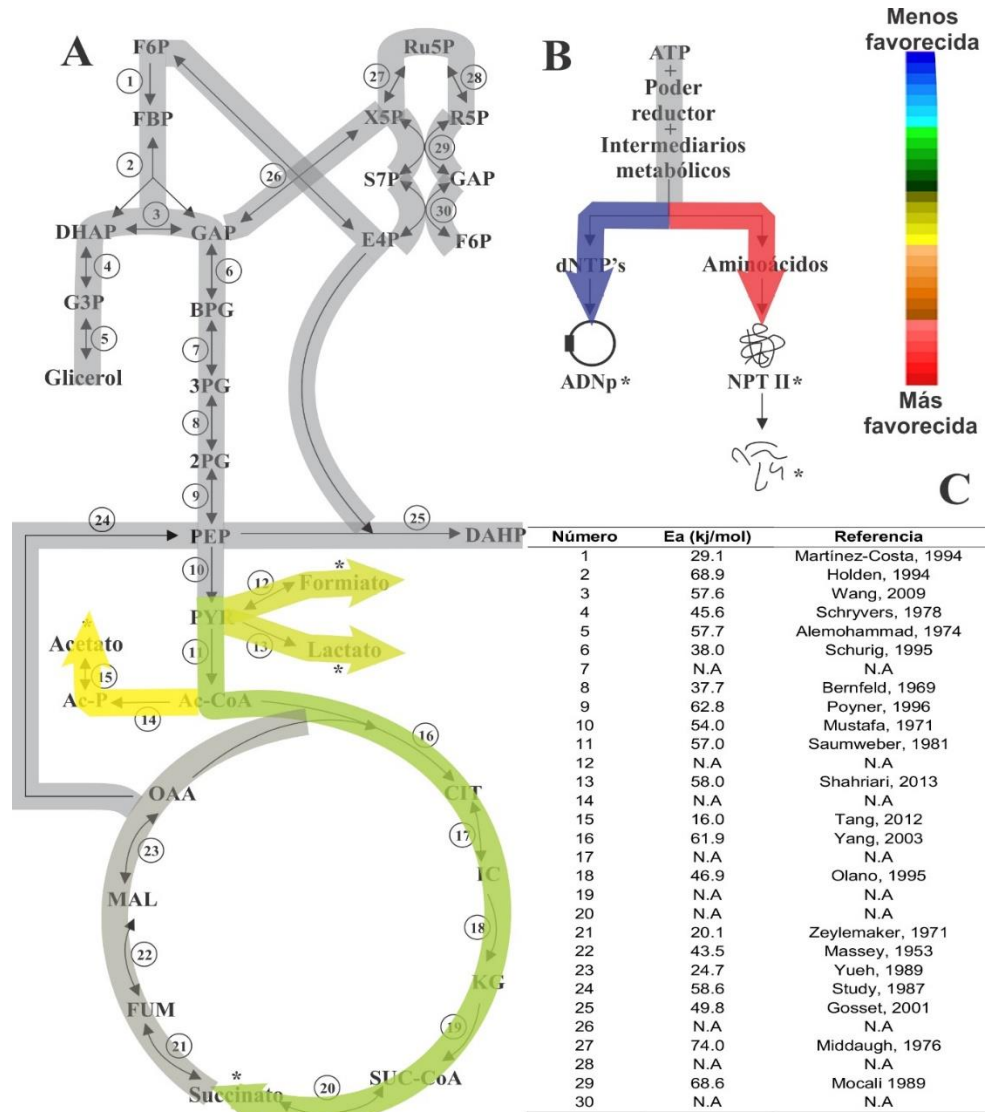


Fig. 20. Rutas metabólicas implicadas en la producción de ADNp en *E. coli* en crecimiento aeróbico con medio mínimo más glicerol. A y B: glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta de las pentosas fosfato para la producción de intermediarios metabólicos usados en la síntesis de ADNp y NPT II; C: valores de energía de activación reportados para organismos mesófilos. Los asteriscos representan los productos metabólicos y las reacciones medidas en este trabajo. N.A: No disponible.

Con el fin de revisar la termoestabilidad del sistema de producción de ADNp, se calcularon las magnitudes de entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y energía libre de Gibbs (ΔG), en el rango de temperatura de 30 °C a 42 °C, estos datos son mostrados en la



tabla 13. Los valores de las entalpías para la producción de acetato, succinato, lactato y formiato ($\Delta H_{(2)}$, $\Delta H_{(4)}$, $\Delta H_{(6)}$ and $\Delta H_{(7)}$) y para el consumo de acetato, succinato y formiato ($\Delta H_{(3)}$, $\Delta H_{(5)}$, and $\Delta H_{(8)}$), fueron calculados, siendo 81.93, 144.15, 82.32, 75.37, -384.68, 183.81, and 120.66 kJ/mol, respectivamente. Esto implica que el calor total necesario para alcanzar la velocidad máxima de producción de los ácidos es significativamente ($p < 0.05$) menor que para su re-asimilación, para los tres casos de producción y consumo analizados; como resultado de esto, la producción de los ácidos orgánicos, en general, se ve más favorecida termodinámicamente que el consumo de los ácidos como función de la temperatura. Los datos de entalpía para la producción de pDNA y NPT II que se calcularon fueron 88.35 kJ/mol y 55.62 kJ/mol, por lo tanto, se puede observar que la velocidad de producción de ADNp con un valor significativamente mayor ($p < 0.05$) de entalpía es más sensible a los cambios en la temperatura del sistema de producción, lo cual está asociado con los datos de las producciones máximas para ambas variables reportadas en el presente trabajo, asimismo, con todos estos datos se demuestra que el aumento en la producción de plásmidos se ve favorecido termodinámicamente (Lin-Chao y Chen, 1992).

Los valores de entropía para la formación de productos, el consumo de ácidos orgánicos y la degradación NPT II proporcionan información sobre el grado de desorden durante el proceso de producción de ADNp y los metabolitos relacionados con el sobreflujo metabólico y la carga metabólica, estos datos también se muestran en la Tabla 13. La entropía para la producción de acetato, succinato y formiato ($\Delta S_{(2)}$, $\Delta S_{(4)}$, $\Delta S_{(6)}$ and $\Delta S_{(7)}$) así como, para el consumo de los mismos ($\Delta S_{(3)}$, $\Delta S_{(5)}$, and $\Delta S_{(8)}$), fueron calculados siendo -121.28, -158.67, -119.75, -120.25, 143.90, -181.31 y -148.50 kJ/mol.K, respectivamente. Los signos negativos que se observan reflejan que los procesos de formación de ácidos orgánicos y el consumo de ácidos orgánicos, implican que el sistema en general tiene un alto grado de orden en el rango estudiado de temperaturas (30 °C a 42 °C); sin embargo, los altos valores positivos obtenidos para el consumo de acetato excretado al medio de cultivo, es específicamente un fenómeno con un alto grado de desorden, estos resultados están relacionados con los resultados observados a 42 °C donde no observamos la re-asimilación de acetato (datos no mostrados). Los datos de entropía para la producción de ADNp y NPT II



calculados fueron, -127.15 kJ/mol.K y -106.09 kJ/mol.K , estos valores también son negativos, lo que refleja que hay un bajo desorden en la formación de plásmido y NPT II durante el crecimiento celular utilizando glicerol como única fuente de carbono y energía. Estos datos muestran que el mecanismo de protección en respuesta al choque térmico de *E. coli* es altamente efectivo, lo que implica la expresión de proteasas y chaperonas, incluido el sistema GroEL/GroES que protege a la célula del daño que puede causar el choque térmico a altas temperaturas (más de $40 \text{ }^\circ\text{C}$) (Guisbert et al., 2004).

Aunque existen trabajos relacionados con la parte cinética de la producción de ADNp, todavía existe una gran brecha relacionada con la parte termodinámica en este proceso de producción, que es importante debido a que muchos trabajos ya informaron la importancia de la temperatura sobre el aumento en la producción de plásmido; asimismo, no debemos olvidar que los parámetros cinéticos estimados a escala de laboratorio (matraz) pueden variar significativamente cuando el proceso se pretende escalar industrialmente, principalmente debido a fenómenos de transferencia. Por otro lado, los parámetros termodinámicos estimados a nivel de laboratorio se pueden aplicar de manera confiable a escala industrial, ya que son independientes de la escala del reactor utilizada.



Tabla 13. Parámetros termodinámicos de la producción de ADNp mediante *E. coli* DH5 α bajo diferentes temperaturas entre 30 y 42 °C

	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol.K)	ΔG (kJ/mol)
Producción de acetato	-81.93 \pm 0.04	72.28 \pm 0.12	-103.83 \pm 0.36
Consumo de acetato	384.68 \pm 0.04	-1448.20 \pm 0.12	823.48 \pm 6.40
Producción de succinato	-144.15 \pm 0.04	286.67 \pm 0.12	-231.01 \pm 1.31
Consumo de succinato	-183.81 \pm 0.04	416.51 \pm 0.12	-310.01 \pm 1.89
Producción de lactato	-82.32 \pm 0.04	63.49 \pm 0.12	-101.56 \pm 0.32
Producción de formiato	-75.37 \pm 0.04	66.37 \pm 0.12	-95.48 \pm 0.33
Consumo de formiato	-45.33 \pm 0.04	236.69 \pm 0.12	-118.70 \pm 1.05
Producción de ADNp	-88.35 \pm 0.04	105.94 \pm 0.12	-120.45 \pm 0.51
Producción de NPT II	-59.85 \pm 0.04	7.58 \pm 0.12	-62.20 \pm 0.03
Degradación de NPT II	-113.01 \pm 0.04	162.18 \pm 0.12	-162.15 \pm 0.76



3.3 Estudio de la combinación de factores de estrés para el incremento en la producción de ADNp

3.3.1 Cinéticas de producción de ADNp por *E. coli* creciendo con una concentración inicial de kanamicina de 50 mg/L a 30 °C y 42 °C en cultivo por lote

Con el objetivo de comparar los datos obtenidos en este trabajo, fue necesario caracterizar las condiciones comunes 1 y 2 (CPC1 y CPC2) con una concentración inicial de kanamicina de 50 mg/L a dos temperaturas diferentes (30 y 42 °C), tales condiciones son comúnmente usadas para incrementar la concentración de biomasa en el cultivo (30 °C) y alta temperatura (42 °C) para inducir la replicación de pDNA. Estos experimentos fueron comenzados con una concentración inicial de glicerol de 20 g/L; esta cantidad de fuente de carbono y energía fue completamente consumida llegando a la fase estacionario del cultivo. En CPC1, la velocidad de crecimiento (μ) fue de 0.232 h⁻¹ y una velocidad de consumo de glicerol (q_s) fue 0.73 g/L h, alcanzando una concentración máxima de biomasa de 7.8 gDCW/L con un rendimiento de biomasa sobre glicerol ($Y_{x/s}$) de 0.32 g/g (Tabla 13 y Fig. 21). Cuando la temperatura se controló a 42 °C (CPC2), μ y q_s fueron 22.8% y 50.7% mayores, respectivamente, comparados con el cultivo CPC1; sin embargo, $Y_{x/s}$ disminuyó hasta 0.26 g/g.

Tabla 14. Resumen del efecto de las condiciones comunes de producción y tratamientos evaluados sobre la concentración máxima de biomasa, velocidad de crecimiento, rendimiento de biomasa y velocidad de consumo de glicerol en cultivo de *E. coli*-pVAX1-NH36.

Tratamiento	X_{max} (gDCW/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (gDCW/g)	q_s (g/gDCW.h)
T1	8.63±0.01	0.249±0.00	0.35±0.02	0.72±0.05
T2	7.90±0.06	0.196±0.01	0.31±0.00	0.63±0.03
T3	9.02±0.12	0.285±0.01	0.37±0.01	0.76±0.03
T4	6.85±0.01	0.241±0.00	0.26±0.01	0.92±0.02
T5	7.54±0.21	0.300±0.01	0.30±0.01	0.98±0.04
CPC1	7.8±0.03	0.232±0.01	0.32±0.02	0.73±0.00
CPC2	6.6±0.00	0.285±0.02	0.26±0.04	1.10±0.05



La acumulación de acetato puede estar relacionado a la inhibición del crecimiento y al incremento de la producción de ADNp (Zhin-nan et al., 2005). En experimentos a nivel matraz, el sobreflujo metabólico (acumulación de acetato) puede atribuirse a las condiciones de cultivo (cambios de pH y %OD no controlado), por esta razón, in este trabajo, el pH y %OD fueron controlados en todas las fermentaciones, para asegurar que la acumulación de acetato es debido al efecto de la temperatura. Las concentraciones máximas de los productos del sobreflujo metabólico son mostradas en la Fig. 22. A pesar de que, los datos de la acumulación de acetato pueden ser presentados en términos volumétricos, es imposible realizar una comparación adecuada con otros reportes, debido a las diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono que han sido usadas en los cultivos por lote, por esta razón, la presentación de la acumulación de acetato debe presentarse en términos de rendimiento de acetato en glicerol o glucosa. Los cálculos obtenidos como rendimiento de acetato sobre glicerol ($Y_{Ac/s}$) fueron de 0.04 g/g in CPC1 y 0.24 g/g en CPC2, por otro lado, el incremento de acumulación de lactato fue de 6 veces y no se observaron cambios en las concentraciones obtenidas para formiato y succinato. Este incremento en los productos del sobreflujo metabólico en la fermentación a alta temperatura ha sido reportado, de la misma manera, los resultados obtenidos para $Y_{Ac/s}$ en el presente trabajo fueron más bajos, esto puede ser por el uso de glicerol en lugar de glucosa en las fermentaciones (Jaén et al., 2013; Martins et al., 2015). Sin embargo, la producción máxima de acetato observada fue más alta comparada con los cultivos por lote en los cuales se utilizó glucosa a 37 °C (Borja et al., 2012; Goncalves et al., 2013).

El rendimiento volumétrico (97.6 mg/L) y específico (12.9 mg/gDCW) y productividad volumétrica (13.9 mg/L h) de ADNp 42 °C y 50 mg/L de kanamicina (CPC2) se incrementaron 3.7, 4.2 y 4.2 veces, respectivamente, comparados con 30 °C y 50 mg/L de kanamicina (CPC1). El efecto de la temperatura sobre todos los parámetros medidos en la producción de ADNp fueron similares a algunos que han sido previamente reportados en trabajos previos (Carnes et al., 2006; Jaén et al., 2013; Silva et al., 2008).

La principal causa de la carga metabólica en la producción de plásmidos como pVAX1-NH36 es la síntesis de NPT II, la cual es producida en cantidades innecesarias



para el mantenimiento y selección del plásmido (Cunningham et al., 2009). Cuando la fermentación se llevó a cabo a 42 °C, el rendimiento volumétrico (185.59 mg/L) y específico (24.6 mg/gDCW) de NPT II y el porcentaje de NPT II/proteína total (4.2%) (%NPTII/PT) obtenidos, fueron 1.2, 1.4 y 1.6 veces mayores, respectivamente, comparados con los obtenidos en la fermentación a 30 °C, sin embargo, los valores de %NPTII/PT en este trabajo, fueron menores a los reportados previamente (Rozkov et al., 2004); la relación entre la expresión de NPT II y la producción de ADNp ($Y_{\text{NPTII/ADNp}}$) disminuyó, debido a un incremento en la producción de ADNp (Tabla 14 y Fig. 23).

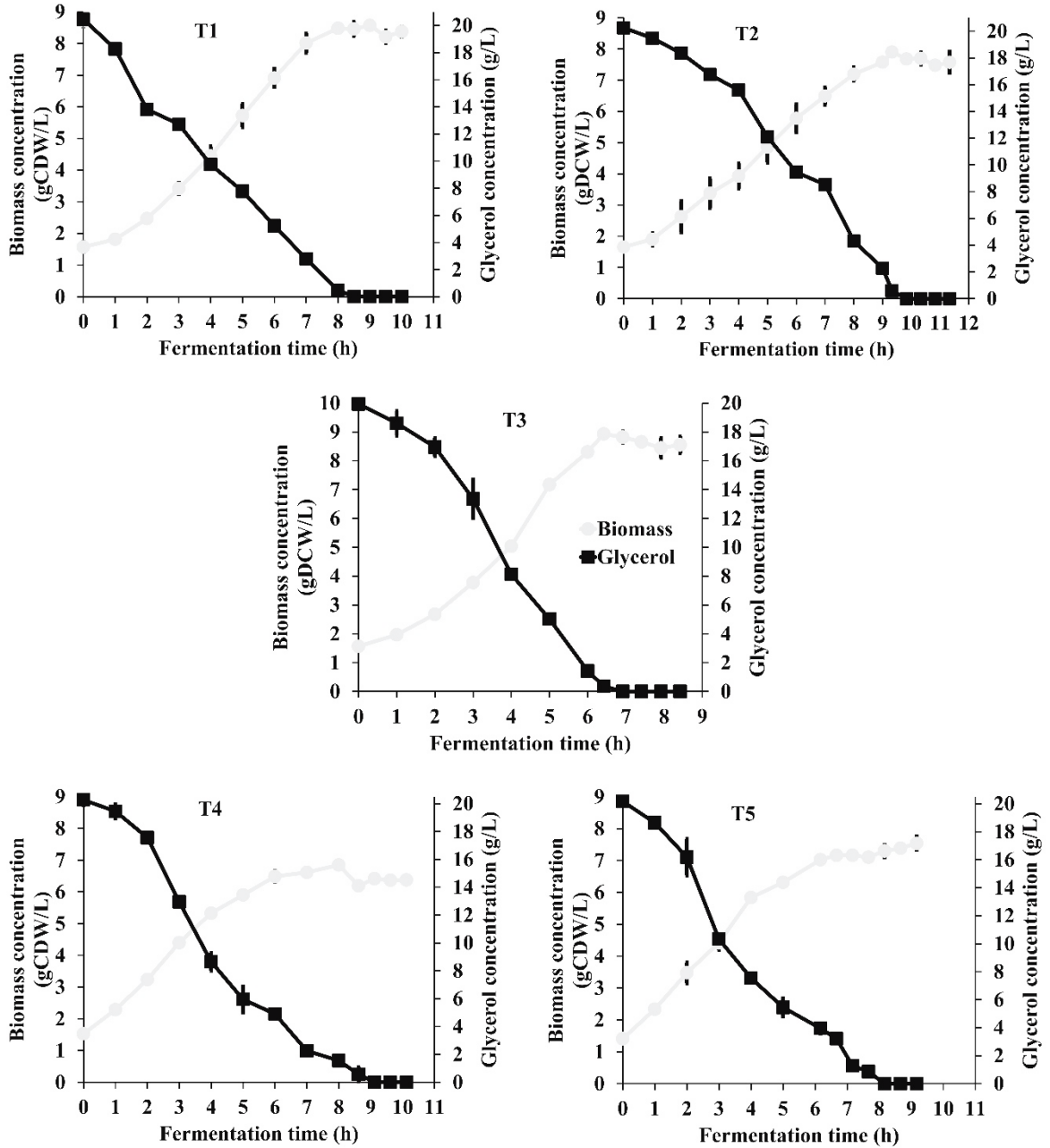


Fig. 21. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* DH5 α y de consumo de glicerol bajo cinco diferentes estrategias incluidas en el diseño experimental. Las barras de error denotan las desviaciones experimentales entre duplicados.

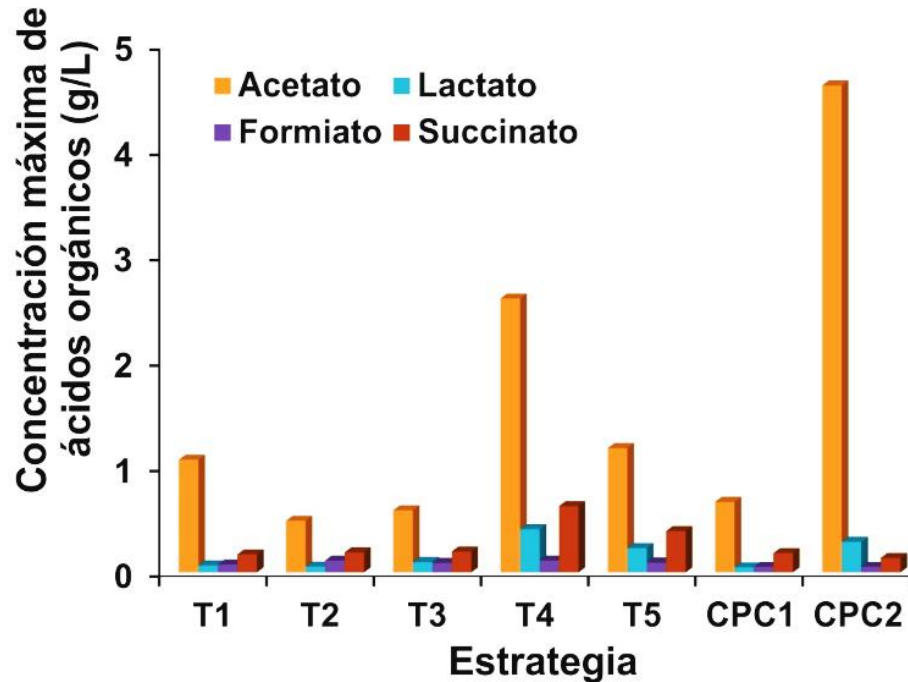


Fig. 22. Concentración máxima de productos del sobreflujo metabólico bajo condiciones comunes de producción y las cinco diferentes estrategias incluidas en el diseño experimental.

Tabla 15. Resultados de todas las condiciones de los tratamientos evaluados sobre: rendimiento volumétrico y específico de ADNp, productividad volumétrica de ADNp y rendimiento volumétrico y específico de NPT II en cultivos por lote de *E. coli*-pVAX1-NH36. Los datos son reportados durante la fase estacionaria.

Temperatura (°C)	Kan ^a (mg/L)	RV-ADNp ^b (mg/L)	RE-ADNp ^c (mg/gDCW)	PV-ADNp ^d (mg/L.h)	RV-NPTII ^e (mg/L)	RE-NPTII ^f (mg/gDCW)
30	0	27.2±0.76	3.2±0.09	3.2±0.09	125.21±10.66	14.5±3.27
30	300	33.9±2.47	4.3±0.34	3.6±0.27	115.57±10.71	14.6±1.46
36	150	57.4±1.71	6.4±0.11	9.0±0.27	558.02±31.50	61.9±2.67
42	0	102.2±1.36	14.9±0.21	11.9±0.16	126.82±10.65	18.5±1.54
42	300	151.8±2.55	20.1±0.23	19.7±0.33	244.18±9.98	32.4±0.41
30	50	26.3±0.51	3.1±0.16	3.3±0.22	151.96±9.56	18.05±2.12
42	50	97.6±4.22	12.9±1.93	13.9±1.04	185.59±10.32	24.6±1.14

^a Kan = Kanamicina, ^b RV-ADNp = Rendimiento volumétrico de ADNp, ^c RE-ADNp = Rendimiento específico de ADNp, ^d PV-ADNp = Productividad volumétrica de ADNp, RV-NPTII = Rendimiento volumétrico de NPTII y ^f RE-NPTII = Rendimiento específico de NPTII. Los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar de dos fermentaciones independientes.

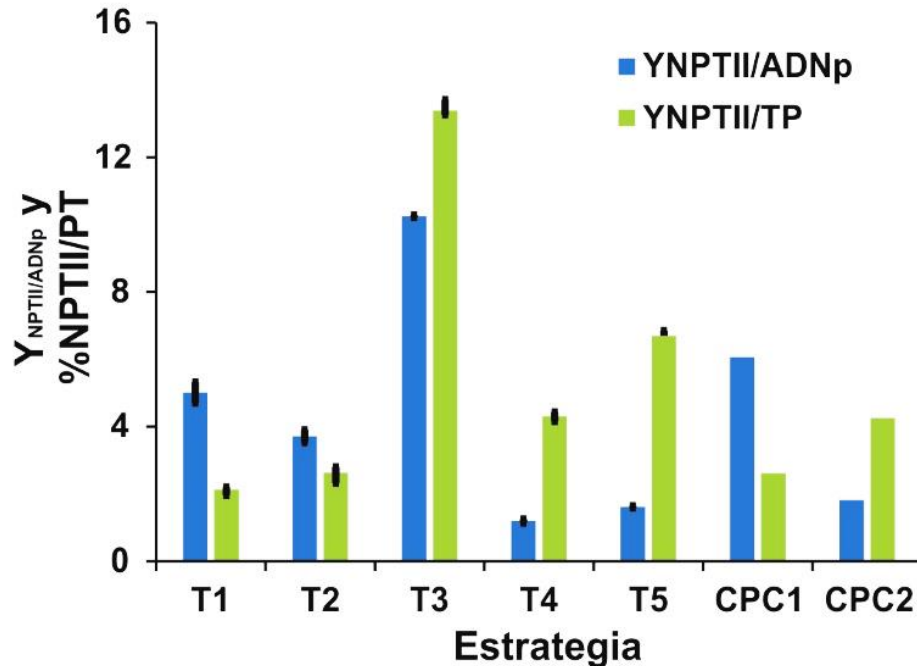


Fig. 23. Relación entre la producción de NPT II, proteína total y ADNp

3.3.2 Producción de ADNp variando la concentración inicial de kanamicina en cultivo por lote a 30 y 42 °C

Concentración máxima de biomasa, velocidad de crecimiento, velocidad consumo de glicerol y rendimiento de biomasa/glicerol

Los perfiles de producción de biomasa y consumo de glicerol a 30 °C y 42 °C, variando la concentración inicial de kanamicina (0 y 300 mg/L) se muestran en la Fig. 21, cuando la concentración inicial de kanamicina se redujo a 0 mg/L (T1), los valores de μ no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a 30 °C y 42 °C, sin embargo, a partir de concentraciones de kanamicina de 50 mg/L hasta 300 mg/L, los resultados obtenidos para este parámetro depende de la temperatura y no es función de la concentración de antibiótico. La temperatura (30 °C o 42 °C) no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) sobre $Y_{X/S}$ utilizando una concentración inicial de kanamicina de



300 mg/L, pero a 50 mg/L y 0 mg/L, las diferencias in este parámetro fueron claramente evidentes como función de la temperatura.

Inesperadamente, las condiciones extremas del diseño experimental (T4 y T5) mostraron resultados inversos a los previamente reportados para T1 y T2, ambos tratamientos fueron llevados a cabo a 42 °C, pero para altas concentraciones de antibiótico (300 mg/L), se observó un incremento en X_{max} , μ , $Y_{X/S}$ y q_s del 10%, 24.5%, 15.4% y 6.5%, respectivamente. Nuestros resultados muestran algunas diferencias en comparación con los reportados por Faraji et al., 2006, debido al uso de un diseño experimental de factor simple (con o sin kanamicina) llevado a cabo a 37 °C; en el punto central del diseño llevado a cabo a 36 °C y una concentración de kanamicina de 150 mg/L (T3) se obtuvieron los máximos para X_{max} y $Y_{X/S}$, siendo 9.02 g/L y 0.37 g/g, respectivamente (Fig. 21 y Tabla 22), estos valores son similares a los descritos para condiciones similares previamente reportados (Munguía-Soto et al., 2015).

Productos del sobreflujo metabólico

Cuando se desea estudiar algún efecto sobre el proceso de producción de ADNp, el perfil de la acumulación de productos del sobreflujo metabólico debe ser analizado, debido a que la acumulación de acetato puede estar relacionado a la inhibición del crecimiento e incremento de la producción de ADNp (Zhin-nan et al., 2005). En este trabajo, diferencias importantes en la acumulación de metabolitos de la fermentación fueron cuantificados (Fig. 22).

La concentración máxima de productos del sobreflujo metabólico (principalmente acetato) en la fermentación de *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36, la cual fue llevada a cabo a 30 °C y 50 mg/L de kanamicina (CPC1) fue 0.67 g/L, pequeñas cantidades de acetato acumulada, fue consistente con las características metabólicas de la cepa DH5 α usada aquí (Phue et al., 2008). Cuando la concentración inicial de kanamicina fue 0 mg/L (T1), la producción de acetato mostró un incremento de 60% y esta producción incrementó 27% debido a un incremento en la concentración inicial de kanamicina a 300 mg/L, por otra parte, en la fermentación llevada a cabo a 42 °C and 50 mg/L de kanamicina inicial (CPC2), la producción de acetato (4.62 g/L), disminuyó cuando la concentración inicial de kanamicina fue disminuida o incrementada. En el



tratamiento a 42 °C y 0 mg/L de kanamicina (T4), la reducción en la producción de acetato fue 44%, mientras, que en el tratamiento a 42 °C y 300 mg/L de kanamicina 300 mg/L (T5), la reducción fue de 74.5%. La exposición de *E. coli* a altas concentraciones de kanamicina que se evaluaron en T2, T3 y T5 resultaron en una menor producción de productos del sobreflujo metabólico con se muestra en la Fig. 22; este fenómeno podría deberse al mal plegamiento proteico (de enzimas involucradas en las rutas metabólicas del glicerol y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) causado por el exceso de antibiótico (Cavallero et al., 1990).

Estos resultados obtenidos podrían ser explicados por los mecanismos de acción y transporte de los aminoglicósidos (transportadores unidos a quinonas). Se ha propuesto que el requisito del transporte de electrones produce una polaridad negativa del transportador debido a la reducción, esto facilitaría la unión de un antibiótico catiónico (como kanamicina). El aminoglicósido unido sería conducido a través de la membrana y transferido a los ribosomas, los objetivos celulares finales. Este proceso necesariamente limitaría la cantidad de quinonas disponibles (u otros transportadores) para el flujo de electrones. Como el CAT está relacionado con la respiración bacteriana, una cantidad de flujo de electrones produciría una disminución del CAT (Bryan and Kwan., 1983).

Carga metabólica

La cuantificación de la síntesis de NPT II es importante debido a que es un indicador de la carga metabólica en el proceso de fermentación de *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36, así mismo, este producto es considerado un contaminante en el proceso posterior de purificación, sin embargo, es importante mencionar que NPT II no tiene alguna de las características asociadas con proteínas alergénicas y efectos tóxicos en humanos (FDA, 1997). La concentración máxima de NPT II (558 mg/L) fue obtenida en el punto central del diseño experimental (T3), este valor disminuyó hasta 152 mg/L (equivalente a 73 % en reducción de la síntesis de NPT II) a 30 °C bajo las diferentes concentraciones iniciales de kanamicina evaluadas (0, 50 y 300 mg/L); cuando los experimentos fueron realizados a 42 °C bajo la misma concentración inicial de kanamicina, la síntesis de NPT II fue 23%, 33% y 44%, respectivamente, comparado



con la concentración máxima de NPT II obtenida in T3 (Tabla 14). De la misma manera que en T3, los valores máximos de expresión de NPT II-ADNp producido ($Y_{NPTII/pDNA}$) y expresión de NPT II/proteína total (%NPTII/PT) (Fig. 23); fueron 10 mgNPTII/mgpDNA and 13 %NPTII/PT, respectivamente. Los tratamientos T1, T2, T4 y T5 estuvieron en el rango de síntesis de NPT II, en comparación con las condiciones comunes de producción (CPC 1 y CPC 2).

La proteína RpoH is un indicador de la resistencia al calor en cultivos de *E. coli* realizados a altas temperaturas, regulando la expresión de HSP's; las cuales confieren protección a la desnaturalización de las proteínas debido al calor. Además, la exposición a kanamicina causa un incremento en los niveles de la proteína RpoH, lo cual a su vez incrementa una tolerancia al calor (Axenov et al., 2013; Narberhaus et al., 2003). A temperaturas por encima de 42 °C, la interacción entre RpoH y DnaK es reducida debido al cambio conformacional en RpoH y debido a que el complejo DnaK/DnaJ se encuentra quelado por la abundancia de proteínas desnaturalizadas por el calor. Todo esto podría explicar el por qué a 42 °C hay un incremento en la síntesis de NPT II como función de la concentración de kanamicina, aunque a 37 °C se haya obtenido el incremento más alto.

Producción de ADNp

Para que un proceso de producción de ADNp sea técnica y económicamente viable, se requiere que los rendimientos específico y volumétrico sean lo más elevados posible, así como la productividad. Los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos evaluados de temperatura y concentración inicial de kanamicina son mostrados en la Tabla 14. A 30 °C y 0 mg/L de kanamicina (T1), los rendimientos volumétrico y específico, así como la productividad obtenidas fueron 27.2 mg/L, 3.2 mgpDNA/gDCW and 3.2 mgpDNA/L h, con 50 mg/L de kanamicina (CPC1) estos valores no incrementaron; sin embargo, con una concentración inicial de kanamicina de 300 mg/L (T2) fueron 24%, 34%, and 12% más altos, respectivamente, comparados con T1 (Tabla 14); la replicación de ADNp se encuentra altamente regulada a temperaturas por debajo de 37 °C (Lin-Chao et al., 1992). A 42 °C y una concentración de 300 mg/L de kanamicina (T5), un rendimiento volumétrico de 151.8 mgpDNA/L, un



rendimiento específico de 20.1 mgpDNA/gDCW y una productividad de 19.7 mgpDNA/L.h fueron obtenidos. Comparando estos resultados con los obtenidos bajo las condiciones de 42 °C y 0 mg/L de kanamicina (T4), se obtuvo un incremento de 49%, 35% and 65% en los rendimientos volumétrico, específico y en la productividad. Por lo tanto, el aumento observado a temperatura constante se puede atribuir al aumento en la concentración de antibiótico. Cuando *E. coli* es expuesta a antibióticos β -lactámicos tales como la ampicilina (también usado para selección), la sobre expresión de la proteína DpiA afecta la estabilidad y replicación del plásmido mediante la activación del sistema DpiAB en plásmidos de elevado número de copias como pVAX1 el cuales contiene regiones ricas en secuencias A+T en el origen de replicación y también esta misma proteína induce la respuesta SOS. La kanamicina como marcador de selección tiene ventajas moleculares para la producción de ADNp debido a que no incrementa la expresión de DpiA y, por lo tanto, no activa el sistema DpiAB (Miller et al., 2004). Los valores obtenidos en el componente central del diseño a 36 °C y 150 mg/L de kanamicina (T3) para el rendimiento volumétrico fue 57.4 mg/L, siendo similar a lo reportado previamente bajo condiciones de 50 g/L a 37 °C y 50 mg/L de kanamicina y 6.4 mg/gDCW de rendimiento específico, siendo 20 % mayor bajo las mismas condiciones (Islas-Lugo et al., 2016). La replicación de pVAX1-NH36 estuvo altamente regulada, a pesar de que la concentración inicial de kanamicina fue 3 veces mayor.

La forma súper enrollada es la forma preferida de ADNp para el uso en terapia génica y en vacunas (Prazeres et al., 1999). La FDA recomienda que las vacunas basadas en ADNp tengan un contenido >80% de la isoforma súper enrollada (Morgan et al., 2002). Este criterio se basa en la opinión de que el plásmido súper enrollado tiene una actividad biológica superior en comparación con otras formas de plásmido. Esta parte del artículo reporta el efecto de los tratamientos evaluados, sobre la pureza y la relación de ADNp (pVAX1-NH36) súper enrollado usando *E. coli* DH5 α , siendo esta una cepa comercial de rápido crecimiento, la cual ha mostrado una relación de ADNp súper enrollado mayor a 90% (Yau et al., 2008). El análisis densitométrico se presenta en la Fig. 24, la cual muestra que, en todos los tratamientos evaluados en el



trabajo, los porcentajes de plásmido súper enrollado alcanzaron porcentajes mayores al 90%.

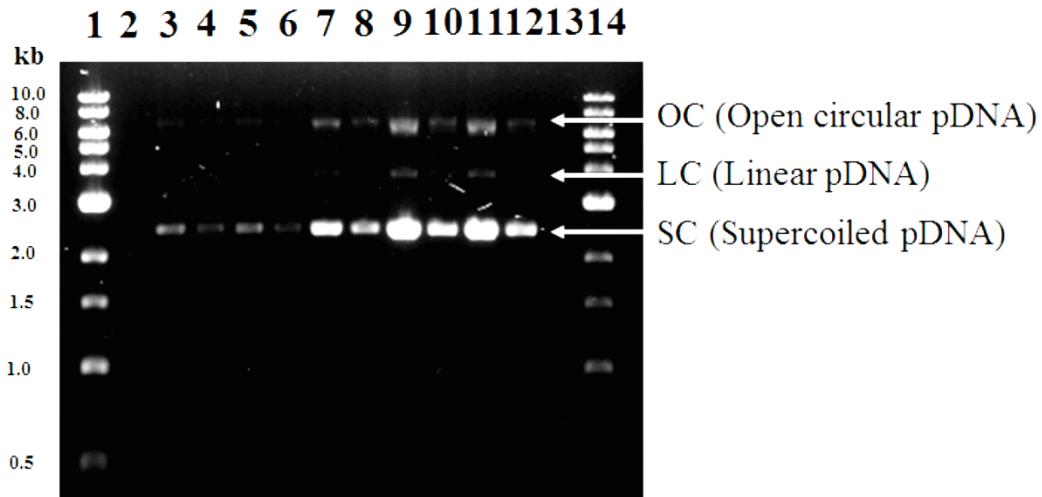


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa para las 5 estrategias incluidas en el diseño experimental: línea 1 and 14, el marcador de peso molecular (1 kb DNA); líneas 3-4, T1 (1:1 and 1:2); líneas 5-6, T2 (1:1 and 1:2); líneas 7-8, T3 (1:1 and 1:2); líneas 9-10, T4 (1:1 and 1:4); y líneas 11-12, T5 (1:1 and 1:4).

Análisis estadístico

Los resultados de ANOVA para los rendimientos volumétrico y específico de ADNp, la productividad volumétrica de ADNp, así como los rendimientos volumétrico y específico de NPT II se reportan en la Tabla 15. Aquí, ANOVA para todos los rendimientos manifiesta que son altamente significativos (valores F 1278.05, 1465.21, 1501.93, 647.58, y 988.45, respectivamente, y valores de probabilidad muy bajos $p=0$ para todas las variables de respuesta). Los valores pronosticados de R^2 de 99.61%, 99.66%, 99.66%, 99.23% y 99.49% para los rendimientos volumétrico y específico de ADNp, la productividad volumétrica de ADNp, así como los rendimientos volumétrico y específico de NPT II, respectivamente, están cerca del R^2 ajustado de 99.86%, 99.88%, 99.88%, 99.72% y 99.82%, respectivamente. Esto muestra que el modelo se ajusta a los datos de manera adecuada. Por lo general, para que las predicciones sean significativas, el valor F y el valor t deben ser más altos que los valores p de baja



probabilidad. Los valores de $p < 0.01$ indican que los términos del modelo son significativos al 99% de nivel de confianza.

Los resultados del ANOVA para las variables implican que los efectos positivos lineales de la temperatura ($p < 0.01$) y la concentración de kanamicina ($p < 0.01$) dominan en todos los tratamientos estudiados, teniendo una influencia significativa en la producción de ADNp y NPT II. La contribución lineal de la temperatura (A) a la producción de pDNA es mayor que para la producción de NPTII; por el contrario, la contribución lineal de la concentración de antibióticos (B) es menor, según el ANOVA, de acuerdo con la observación de que las altas temperaturas aumentan la replicación de pDNA, pero no la producción de NPT II, así como las altas concentraciones de antibióticos reducen la producción de metabolitos de desbordamiento, permitiendo un aumento de pDNA y NPT II evidenciando un efecto sinérgico para el aumento del producto de interés y reduciendo la producción de ácidos orgánicos, principalmente acetato, que inhibe la producción de biomasa y en concentraciones más altas, la replicación del plásmido.



Tabla 16. ANOVA y prueba de significancia para rendimientos de ADNp y NPT II.

	Término	Valor F	Valor t	Valor p
Rendimiento volumétrico de ADNp	A	5441.28	73.77	0.000
	B	462.92	21.52	0.000
	A*B	271.15	16.47	0.000
	Punto central	*	-14.62	0.000
Rendimiento específico de ADNp	A	6366.57	79.79	0.000
	B	335.05	18.3	0.000
	A*B	139.32	11.8	0.000
	Punto central	*	-22.03	0.000
Productividad volumétrica de ADNp	A	6250.64	79.06	0.000
	B	694.52	26.35	0.000
	A*B	551.25	23.48	0.000
	Punto central	*	-3.5	0.025
Rendimiento volumétrico de NPT II	A	96.01	9.8	0.001
	B	65.69	8.1	0.001
	A*B	91.34	9.56	0.001
	Punto central	*	54.52	0.000
Rendimiento específico de NPT II	A	360.41	18.98	0.000
	B	148.69	12.19	0.000
	A*B	143.83	11.99	0.000
	Punto central	*	65.37	0.000

Cambios morfológicos

Algunos cambios morfológicos incluyendo filamentos han sido previamente mostrados con detalle para diferentes condiciones de cultivo como limitación de nutrientes y alta presión hidrostática (Mañas et al., 2004; Wainwright et al., 1999). El daño celular y cambios morfológicos de los cultivos de *E. coli* DH5 α -pVAX1-NH36 bajo condiciones de estrés por temperatura y concentración de kanamicina son mostrados en imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Fig. 25a y b). Las condiciones CPC1 y CPC2 están de acuerdo con las características



morfológicas reportadas previamente, como es mostrado en Fig. 25b, las células individuales de *E. coli* tienen forma cilíndrica y tienen aproximadamente 800 nm de ancho y 2.5 μ m de largo a 30 °C y 50 mg/L de kanamicina (M-N); por otra parte, las células creciendo a 42 °C y 50 mg/L de kanamicina (O-P) muestran esencialmente una morfología filamentosa, esto es, que se elongan y replican su ADN, pero sin dividirse (Silva et al., 2008).

Las células de *E. coli* DH5 α en la muestra control mostradas en la Fig. 25a (A-B) tomadas a t=0 fueron de formas cilíndricas gordas con su membrana intacta, esta es la morfología típica, correspondiente a la condición T1 (C-D) tomada a estado estacionario; sin embargo, algunos cambios fueron observados en la integridad de la membrana en todos los demás tratamientos. Las células crecidas a 30 °C y 300 mg/L de kanamicina hubo hundimiento en la parte media de algunas células y una membrana arrugada, indicando una fuga parcial de citoplasma (E-F); este daño puede estar asociado a la disminución de la producción de metabolitos de sobre flujo y atribuido a la alta concentración de antibiótico, la alteración de morfología en la superficie de las células de *E. coli* después del tratamiento con agentes antimicrobianos ya ha sido reportado previamente (Mangoni et al., 2004).

En el punto central del diseño, las imágenes de MEB claramente muestran filamentación limitada y la producción de cantidades considerables de PSC extracelular por *E. coli* (G-H); debido a esto, es importante mencionar que las endotoxinas son generalmente referidas como lipopolisacáridos y que son el mayor contaminante en la producción de ADNp por bacterias gram negativas como *E. coli*, perjudicando el proceso de separación y purificación y por lo tanto un incremento en costo del proceso, razón por la cual, estos resultados muestran evidencia de no comenzar cultivos de *E. coli* para obtención de biomasa bajo condiciones de producción de 36-37 °C debido a la producción de PSC puede ser asociado en este caso con la velocidad de crecimiento del cultivo.

Las micrografías I-J en la Fig. 25b muestran una morfología filamentosa que refiere cuando las células se elongan y replican su ADN, pero sin dividirse, la evidencia muestra que la limitación por nutrientes y el estrés oxidativo activan la formación de una estructura filamentosa (Ackerley et al., 2006; Wainwright et al., 1999); en la



muestra tomada durante este tratamiento se puede apreciar un incremento en el tamaño de la célula de 4 veces respecto al control. Se sabe que en mantenimiento y la replicación de los plásmidos de elevado número de copias impone una carga metabólica en *E. coli* DH5 α , resultando en una desregulación de los genes relacionados a la síntesis de la pared celular (Ow et al., 2006). Las micrografías K-L muestran la misma morfología filamentosa; pleomorfismo se puede también observar solo bajo condiciones de alta temperatura y concentración de kanamicina, tanto la morfología filamentosa como el pleomorfismo en *E. coli* ya ha sido previamente inducido debido a la adición de ampicilina en el medio de cultivo (Wainwright et al., 1999). De acuerdo a estos resultados mostrados en las imágenes obtenidas mediante MEB, la concentración de antibiótico tiene un mayor efecto sobre el daño celular que la temperatura, de manera similar, el estrés debido a la elevada concentración de antibiótico y temperatura inhiben de una manera desconocida, la producción de PSC.

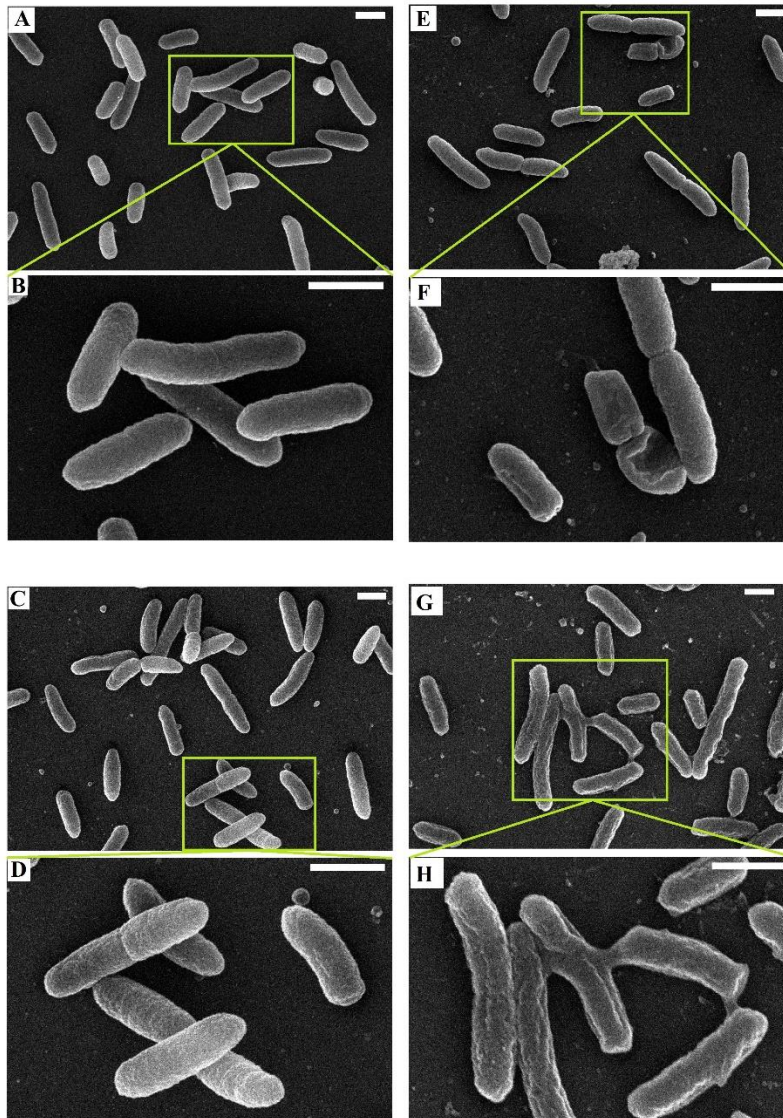


Fig. 25a. Las imágenes de MEB en pares de muestras de *Escherichia coli* DH5 α de los experimentos llevados a cabo en esta etapa. Micrografía superior: x10000; Inferior: x25000. A-B: control a t=0 para todos los tratamientos; C-D, E-F y G-H fueron tomadas al estado estacionario (— 1 μ m).

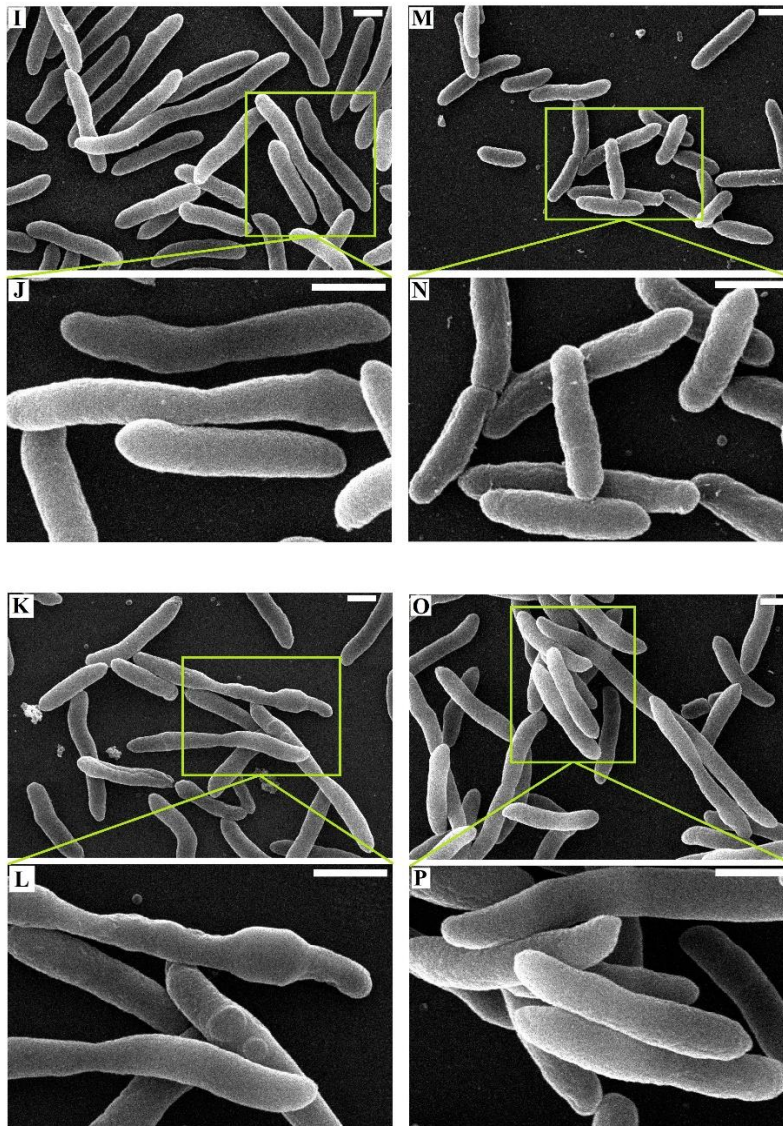


Fig. 25b. (continuación). Las imágenes de MEB en pares de muestras de *Escherichia coli* DH5 α de los experimentos llevados a cabo en esta etapa. Micrografía superior: x10000; Inferior: x25000. A-B: control a t=0 para todos los tratamientos; I-J, K-L, M-N y O-P fueron tomadas al estado estacionario (— 1 μ m).

3.3.3 Efecto de la concentración de kanamicina en cultivos termo-inducidos de alta densidad celular

Con el fin de evaluar la mejor condición obtenida en los cultivos por lote, se llevaron a cabo cultivos de alta densidad celular (aproximadamente 50 gDCW/L), los resultados obtenidos en cultivos de alta densidad celular se muestran en la Fig. 6. Se realizó un cultivo en lote-alimentado que sirvió como control a una velocidad de calentamiento de 0.025 °C/min y 50 mg/L de concentración de kanamicina y este sirvió como base para la comparación. Como se puede ver en la Fig. 26A, el cultivo se mantuvo a una tasa de crecimiento de 0.31 h⁻¹ durante un rango de temperatura de 30 a 37 °C y luego a 0.15 h⁻¹ de 37 a 42 °C hasta alcanzar una concentración de biomasa



de 48.75 ± 0.72 gDCW/L con un rendimiento específico de NPT II de 51.05 ± 2.37 mg/gDCW y un rendimiento específico de ADNp de 7.65 ± 0.48 mg/gDCW a las 24.3 h de cultivo, correspondiente a un aumento del 20% comparado con el valor en donde se comenzó el aumento de la temperatura, este nivel en el incremento del ADNp acumulado, ya fue previamente calculado en cultivos termo-inducidos desde 30 a 42 °C a una velocidad de calentamiento de 0.0125 °C/min, utilizando un medio de cultivo semi-definido patentado (Carnes et al, 2011). En la Fig. 26B se muestra el rendimiento volumétrico y la productividad de 372.50 ± 17.68 mg/L y 15.31 ± 0.73 mg/L h, respectivamente, manteniendo esa producción lineal hasta el final de la fase de lote-alimentado, todos los resultados de rendimientos de ADNp fueron similares a lo que han sido reportados previamente bajo condiciones similares de lote-alimentado (Jaén et al, 2013). La acumulación de acetato fue evidente cuando la temperatura alcanzó aproximadamente 37 °C, permaneciendo casi constante hasta el final del cultivo, alcanzando un máximo de 1.8 g/L. El formiato y el succinato se consumieron totalmente al final del tiempo de lote-alimentado, el lactato alcanzó un máximo de 1 g/L aproximadamente a las 20.7 h.

El cultivo en modo de lote-alimentado para evaluar la mejor condición del lote (42 °C y 300 mg/L de kanamicina) se pudo aplicar con éxito a un cultivo de alta densidad celular; en la Fig. 26D se muestra que la alta concentración de antibiótico (6 veces más que lo que se usa comúnmente) no tiene efectos estadísticamente significativos ($p > 0.05$) sobre el crecimiento en comparación con el control, alcanzando 49.10 ± 1.23 gCDW/L. Sin embargo, al final de la fase de lote-alimentado, se obtuvieron diferencias importantes en los rendimientos específicos de NPT II y principalmente de ADNp siendo 41.06 ± 0.04 mg/gDCW y 15.47 ± 0.65 mg/gDCW, respectivamente, lo que representa una disminución de aproximadamente 20% en el rendimiento específico de NPT II y un aumento de 2 veces en el rendimiento específico de ADNp, en comparación con el cultivo control. El aumento importante en la producción de ADNp fue observado después de las 20.7 h, cuando el cultivo alcanzó una temperatura de 37 °C y tenía un tiempo de exposición de aproximadamente 4.7 h a una concentración de 300 mg/L de kanamicina; en la Fig. 26E, este comportamiento es evidente en términos de productividad volumétrica y productividad en comparación con la Fig. 26B, los valores



máximos alcanzados para estos dos parámetros fueron 759.00 ± 12.73 mg/L y 31.19 ± 0.52 mg/L h, respectivamente; mediante la estrategia evaluada se obtuvieron valores similares o superiores a los reportados en varios trabajos (Danquah et al, 2008; Ongkudan, 2011; Phue et al, 2008). La síntesis de productos del sobreflujo metabólico también mostró diferencias importantes, el producto de principal interés (acetato) aumentó 26% (2.24 ± 0.04 g/L) en comparación con el cultivo control, sin embargo, se consumió casi en su totalidad al final de la fermentación, comportamiento que no se observó en el cultivo de control como se puede ver en la Fig. 26F y C.

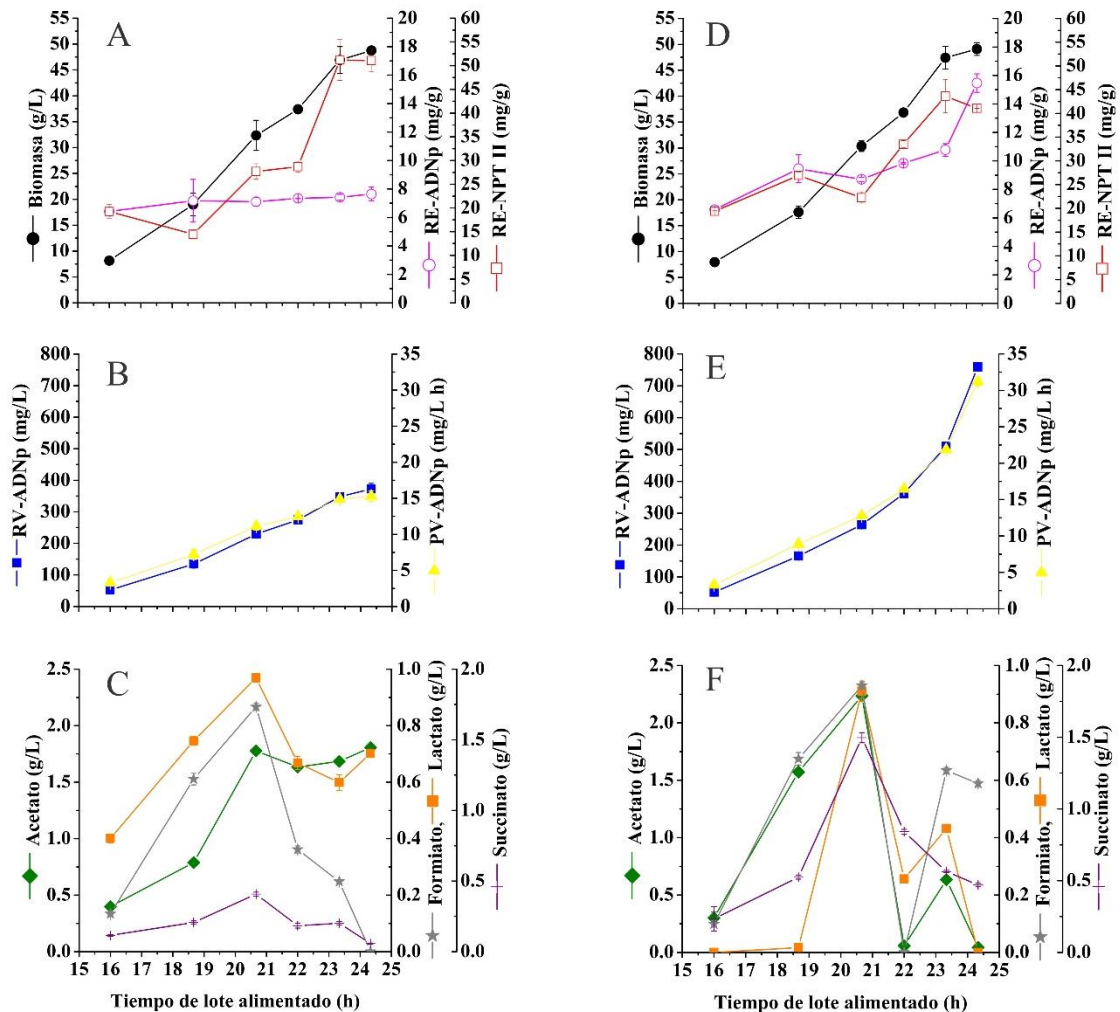


Fig. 26. Perfiles de cultivos en lote-alimentado usando glicerol a una velocidad de calentamiento de 0.025 °C/min desde 30 a 42 °C. A, B y C corresponden al cultivo



control con 50 mg/L de concentración de kanamicina y D, E y F corresponden a un cultivo con 300 mg/L de concentración de kanamicina agregada por un pulso cuando comenzó el incremento de temperatura. Las barras de error indican las desviaciones experimentales entre experimentos duplicados. RV-ADNp = Rendimiento volumétrico de ADNp, RE-ADNp = Rendimiento específico de ADNp, PV-ADNp = Productividad volumétrica de ADNp, RV-NPTII = Rendimiento volumétrico de NPTII y RE-NPTII = Rendimiento específico de NPT II



CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES



Se sabe que los recursos que se dirigen a la producción de NPT II afectan la producción de ADNp. Este trabajo indicó una correlación no lineal entre la producción de ADNp y NPT II y, además, cuando la tasa de producción de NPT II se redujo significativamente, la velocidad de producción de plásmidos se incrementó hasta 4 veces. Por lo tanto, pueden desarrollarse estrategias para minimizar la carga metabólica impuesta por la expresión de NPT II antes de descartar el uso del plásmido marcador de resistencia a antibióticos. La cuantificación precisa de NPT II por ELISA contribuirá a mejorar la comprensión de las estrategias propuestas en el futuro. Se logró probar que NO existe una relación lineal entre la producción de ADNp y la expresión de la proteína NPT II que confiere resistencia a kanamicina en cultivos con *E. coli* DH5 α y pVAX1-NH36 como plásmido.

En una siguiente etapa, se propuso un observador de estado para la estimación en línea de las variables dinámicas clave en un cultivo por lote para la producción de plásmido utilizando *E. coli* DH5 α . Este estimador de estado resuelve el problema de la medición en línea de la concentración de ADNp en el proceso de producción en lote a través de las mediciones de concentración de biomasa, debido a su fiabilidad real y costo reducido en comparación con el tiempo de muestreo y análisis de otras metodologías.

Debido a lo restringido de varios modelos que han sido propuestos para describir la producción de ADNp y la experimentación en esos trabajos, posterior a la propuesta de un observador de estado, se propuso una nueva estructura de modelo mucho más enriquecido con variables clave en la producción de plásmido para poder evaluar numéricamente el efecto de la temperatura sobre el sistema de producción. Los parámetros del modelo se estimaron y se ajustaron usando una técnica de regresión no lineal para minimizar la desviación de la suma de cuadrados entre las predicciones del modelo y los datos experimentales. Los valores estimados se ajustaron bien a los datos experimentales a 37 °C. De un conjunto de experimentos a diferentes temperaturas, se pudieron estimar valores de velocidades de crecimiento, producción y consumo, según corresponda; los valores de velocidad máxima de crecimiento, de producción de acetato y producción de NPT II aumentaron como función de la temperatura, no así con la velocidad máxima de producción de ADNp, la



cual disminuyó. A partir de estos valores y utilizando el modelo de Arrhenius, se pudieron calcular los valores de energías de activación para la producción de estas cuatro variables, siendo 16.5 kJ/mol, 84.5 kJ/mol, 58.2 kJ/mol y 90.9 kJ/mol, respectivamente. La alta temperatura también aceleró la producción de acetato, lo que está relacionado con la inhibición de la producción de células de crecimiento y pDNA. Para la aplicación en escala de producción, algunos parámetros cinéticos pueden tener que ajustarse de acuerdo con la variación en la cepa de *E. coli* y la fuente de carbono. En esta parte del trabajo, se demostró el efecto de la temperatura en las actividades de las células y cómo esto podría ser elucidado y cuantificado mediante la utilización de un modelo matemático bueno y representativo. Según el análisis de E_a de las vías metabólicas involucradas en la producción de ADNp, se determinó que la producción está favorecida termodinámicamente en este orden, NPT II (carga metabólica) > ácidos orgánicos (sobreflujo metabólico) > ADNp. Esta contribución para una mejor comprensión del efecto de factores medioambientales como la temperatura en la producción de pDNA y podría aplicarse como una herramienta para el posterior desarrollo del proceso.

En una última etapa y habiendo analizado la termodinámica del sistema, se planteó una alternativa basada en una estrategia sinérgica, obteniendo resultados prometedores en cultivo por lote y mostrando un efecto combinado a 42 °C y 300 mg/L, se obtuvo un aumento de 49%, 35% y 65% en rendimiento volumétrico, rendimiento específico y productividad. El aumento en el rendimiento volumétrico y la productividad se debe principalmente al aumento en el rendimiento específico y no a la reducción de la biomasa final obtenida y la reducción en el tiempo de fermentación. Los resultados nos permiten proporcionar evidencia sobre la capacidad de usar altas concentraciones de antibióticos para reducir los productos de desbordamiento metabólico (principalmente acetato) y la síntesis de NPT II relacionada con la carga metabólica. El uso combinado de dos factores de estrés (temperatura y concentración de kanamicina) no afectó la calidad del plásmido producido, siendo una ventaja sobre el proceso aguas arriba y su posterior purificación. Finalmente, con base en las micrografías tomadas a los cultivos, se concluye que comenzar un cultivo a 36-37 °C como normalmente se realiza el proceso de producción de ADNp, porque implica la



síntesis de exopolisacáridos que comprometen las etapas de separación y purificación. Se puede concluir también que la mejor estrategia observada en lote, pudo realizarse en cultivo termo-inducido de alta densidad celular, obteniéndose resultados iguales o mejores que varios reportados en literatura; para rendimientos volumétrico y específico, así como productividad, los resultados fueron 759.00 mg/L, 15.47 ± 0.65 mg/gDCW y $31.19 \pm$ mg/L h, respectivamente; lo que representa un aumento de 2 veces, respecto al cultivo control (solamente termo-inducido), al mismo tiempo que con la estrategia propuesta, los productos relacionados al sobreflujo y carga metabólica fueron disminuidos, lo que podría impactar en los costos relacionados a la parte de separación y purificación.

Estos resultados sugieren que el estrés basado proceso combinado de temperatura y concentración de kanamicina se puede aplicar para la producción de pDNA eficaz en *E. coli* proceso de cultivo, mostrando que hay todavía otras alternativas a nivel del reactor, la modificación de las condiciones de cultivo, sin la participación de modificaciones genéticas del microorganismo que han sido ampliamente propuestos.



CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA



- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J., Matin, A., (2006). Effect of Chromate Stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3371-3381. doi:10.1128/JB.188.9.3371-3381.2006
- 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 Souza, C. B & Dumonteil E. (2005). Cross-Protective Efficacy of a Prophylactic *Leishmania donovani* DNA Vaccine against Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(2), 812-819. doi:10.1128/IAI.73.2.812-819.2005
- Alemohammad, M. M., & Knowles, C. J., (1974). Osmotically Induced Volume and Turbidity Changes of *Escherichia coli* due to Salts, Sucrose and Glycerol, with Particular Reference to the Rapid Permeation of Glycerol into the Cell. *Journal of General Microbiology*, 82, 125-142. doi:10.1099/00221287-82-1-125.
- Axenov, A., Jang, S., Jones, M., (2013). Pretreatment with Sub-minimal Inhibitory Concentration of Kanamycin Increases RpoH Levels in *Escherichia coli* SC122. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 17, 29-33.
- Bequette, B. W., (1998). *Process Dynamics: Modeling, Analysis, and Simulation*. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences.
- Bernfeld, P., Bieber, R. E., & Watson, D. M., (1969). Kinetics of water-insoluble phosphoglycerate mutase. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology*, 191, 570-578. doi:10.1016/0005-2744(69)90350-7
- Bernstein, D. S., (2005). *Matrix Mathematics: Theory, Facts, and Formulas with Application to Linear Systems Theory*. Princeton University Press.
- Besancon, G., (2007). *Nonlinear observers and applications*. Berlin; New York. Springer
- Bokhari, S. A. I., Latif, F., & Rajoka, M.I., (2008). Kinetics of high-level of β -glucosidase production by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Humicola lanuginosa* in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 724-733. doi:10.1590/S1517-83822008000400024
- Bondioli, P., & Della Bella, L., (2005). An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(3), 153-157. doi:10.1002/ejlt.200401054
- Borja, G.M., Mora, E., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O.T., Lara, A.R., (2012). Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microbial Cell Factories*, 132(11). doi:10.1186/1475-2859-11-132
- Bryan, L.E., Kwan, S., (1983). Roles of Ribosomal Binding, Membrane Potential, and Electron Transport in Bacterial Uptake of Streptomycin and Gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(6), 835-845.
- Carnes, A. E., Hodgaon, C. P., Luke, J. M., Vincent, J. M., & Williams, J. A., (2009). Plasmid DNA Production Combining Antibiotic-Free Selection, Inducible High Yield Fermentation, and Novel Autolytic Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(3), 505-515. doi:10.1002/bit.22415
- Carnes, A. E., Luke, J. M., Vincent, J. M., Schukar, A., Anderson, S., & Hodgson, C. P. (2011). Plasmid DNA fermentation strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2), 354-63. doi:10.1002/bit.22936.
- Carnes, A.E., Hodgson, C.P., & Williams J.A. (2006). Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45, 155-166. doi:10.1042/BA20050223
- Cavallero, A., Eftimiadi, C., Radin, L., Schito, G.C., (1990). Suppression of Tricarboxylic Acid Cycle in *Escherichia coli* Exposed to Sub-MICs of Aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 295-301.
- Chen Y.R., & Hashimoto A.G., (1980). Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(10), 2081-2095. doi:10.1002/bit.260221008
- Clem, A. S. (2011). Fundamentals of Vaccine Immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 73-78. doi:10.4103/0974-777X.77299
- Cortés, J. T., Flores, N., Bolívar, F., Lara, A. R., Ramírez, O. T., (2016). Physiological effects of pH gradients on *Escherichia coli* during plasmid DNA production. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 598-611. doi:10.1002/bit.25817



- Cranenburgh, R. M., Lewis, K. S., & Hanak, J. A. J., (2004). Effect of plasmid copy number and lac operator sequence on antibiotic-free plasmid selection by operator-repressor titration in *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7,197–203. doi:10.1159/000079828.
- Cunningham, D. S., Koepsel, R. R., Ataa, M. M., & Domach, M. M., (2009). Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint. *Microbial Cell Factories*, 8(27), 1-17. doi:10.1186/1475-2859-8-27
- Danquah, M. K., & Forde, G. M., (2008). Development of a Pilot-scale Bacterial Fermentation for Plasmid-based Biopharmaceutical Production Using a Stoichiometric Medium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 158-167. doi:10.1007/s12257-007-0080-2
- Didi, I., Dib, H., & Cherki, B., (2015). A Luenberger-type observer for the AM2 model. *Journal of Process Control*, 32, 117–126. doi:10.1016/j.jproc.ont.2015.04.010
- Dochain, D., & Chen, L., (1992). Local observability and controllability of stirred tank reactors. *Journal of Process Control*, 2(3), 139–144. doi:10.1016/0959-1524(92)85003 -F
- Dunn I..J., Heinzle, E., Ingham J., Prenosil, J.E., (2003) Biological Reaction Engineering: Dynamic
- Duttweiler, H. M., & Gross, D. S., (1998). Bacterial growth medium that significantly increases the yield of recombinant plasmid. *BioTechniques*, 24(3), 438-444.
- Ebel, W., & Trempy J.E., (1999). *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colonic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *Journal of Bacteriology*, 181, 577-584.
- Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Rockville, MD, USA: 1997. <https://www.fda.gov/>
- Furuichi, K., Katakura, Y., Ninomiya, K., Shioya, S., (2007). Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. *Applied Environment Microbiology*, 73, 3137–3143. doi:10.1128/AEM.01307-06
- García-Rendón, A., Munguía-Soto, R., Montesinos-Cisneros, R. M., Guzman, R., Tejeda-Mansir, A., (2017). Performance analysis of exponential-fed perfusion cultures for pDNA vaccines production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 342–349. doi:10.1002/jctb.5011
- Gernaey, K. V., Lantz, A. E., Tufvesson, P., Woodle, J. M., & Sin, G., (2010). Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 346-354. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.006
- Goffaux, G., Vande Wouwer, A., (2005). Bioprocess State Estimation: Some Classical and Less Classical Approaches. In: Meurer T., Graichen K., Gilles E.D. (eds) Control and Observer Design for Nonlinear Finite and Infinite Dimensional Systems. *Lecture Notes in Control and Information Science*, 322. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Goltermann, L., Good, L., & Bentin, T., (2013). Chaperonins Fight Aminoglycoside-induced Protein Misfolding and Promote Short-term Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 10483-10489. doi:10.1074/jbc.M112.420380
- Gomes, L. C., & Mergulhão, F. J., (2017). Effects of antibiotic concentration and nutrient medium composition on *Escherichia coli* biofilm formation and green fluorescent protein expression, *FEMS Microbiology Letters*, 364, 1–8. doi:10.1093/femsle/fnx042
- Goncalves, G.A., Prazeres, D.M., Monteiro, G.A., Prather, K.L., (2013). De novo creation of MG1655-derived E. coli strains specifically designed for plasmid DNA production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 611–20. doi:10.1007/s00253-012-4308-5
- Gosset, G., & Bonner, C. A., (2001). Microbial Origin of Plant-Type 2-Keto-3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthases, Exemplified by the Chorismate- and Tryptophan-Regulated Enzyme from *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 4061–4070. doi:10.1128/JB.183.13.4061
- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C.Z., Gross, C.A., (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes and Development*. 18, 2812-2821. doi:10.1101/gad.1219204
- Gupta, M. K., Tomar, N. K., & Bhaumik, S., (2014). Detectability and observer design for linear descriptor systems. In: *22nd mediterranean conference on control and automation*, palermo,1094–1098. doi:10.1109/med.2014.69615 20
- Guysinsky, M., Hasselblatt, B., & Rayskin, V., (2003). Differentiability of the Hartman-Grobman linearization. *Discrete and Continuous Dynamical Systems*, 9(4), 979–984



- Hasan, C. M. M., & Shimizu, K., (2008). Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene expressions in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 7:35. doi:10.1186/1475-2859-7-35
- Hassan, S., Keshavarz-Moore, E., Ward, J., (2016). A cell engineering strategy to enhance supercoiled plasmid DNA production for gene therapy. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 2064-2071. doi: 10.1002/bit.25971
- Hoffmann, F., & Rinas, U., (2001). Plasmid amplification in *Escherichia coli* after temperature upshift is impaired by induction of recombinant protein synthesis. *Biotechnology Letters*, 23(22), 1819-1825. doi:10.1023/A:1012718200638
- Holden, C. P., & Storey, K. B., (1994). Purification and characterization of aldolase from the cold hardy insect *Epiblema scudderiana*: Enzyme role in glycerol biosynthesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(3), 265–270. doi:10.1016/0965-1748(94)90006-X
- Huang, L., Hwang, A., & Phillips, J., (2011). Effect of Temperature on Microbial Growth Rate-Mathematical Analysis: The Arrhenius and Eyring-Polanyi Connections. *Journal of Food Science*, 76, 553–560. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02377.x
- Islas-Lugo, F., Vega-Estrada, J., Alvis, C. A., Ortega-López, J., Montes-Horcasitas, M. del Carmen., (2016). Developing strategies to increase plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5α using batch culture. *Journal of Biotechnology*, 233, 66–73. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.06.025
- Jaén, E.K., Lara, A.R., Ramírez, O.T., (2013). Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 79, 230-238. doi:10.1016/j.bej.2013.08.006
- Journal of Gene Medicine web presence 2018. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
- Kostov, G., Lyubenova, V., Shopska, V., Petelkov, I., Ivanov, K., Iliev, V., Denkova, R., Ignatova, M., (2015). Software sensors for monitoring the biomass concentration and the kinetics of continuous beer fermentation with immobilized cells. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles*, 68(11), 1439–1448
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D., (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresources Technology*, 167, 358–366. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.118.
- Lara, A.R., Ramírez, O.T., & Wunderlich, M., (2012). Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods in Molecular Biology*, 824, 271-303.
- Leitner, W.; Ying, H.; Restifo, N. (2000). DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 18, 765-777.
- Levy, M. S., O'Kennedy, R. D., Ayazi-Shamlou, P., & Dunnill, P. (2000). Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, 18(7), 296-305. doi:10.1016/S0167-7799(00)01446-3
- Lin-Chao, S., Chen, W., Wong, T., (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology*. 6(22), 3385-3393. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02206.x
- Listner, K., Bentley, L., Okonkowski, J., Kistler, C., Wnek, R., Caparoni, A., Junker, B., Robinson, D., Salmon, P., & Chartrain, M., (2006). Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnology Progress*, 22, 1335–1345. doi:10.1021/bp060046h
- López-Pérez, P., Neria González, M. I., & Aguilar-López, R., (2013). Cadmium concentration stabilization in a continuous sulfate reducing bioreactor via sulfide concentration control. *Chemical Papers*, 67(3), 326-335. doi:10.2478/s11696-012-0274-8
- Lyubenova, V., (2016). Monitoring the kinetics of bioprocess variables theory and applications. *Information Technologies and Control*, 14(1), 2-12. doi:10.1515/itc-2016-0016
- Mañas, P., Mackey, B.M., (2004). Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential- and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3), 1545-1554. doi:10.1128/AEM.70.3.1545-1554.2004
- Mangoni, M.L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Di Giulio, A., Rinaldi, A.C., (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 380(3), 859-865. doi:10.1042/BJ20031975



- Martinez-costa, O. H., Estevez, A. M., Sanchez, V., & Aragon, J. J., (1994). Purification and properties of phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Biochemistry Banner*, 226(3), 1007–1017. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.01007.x
- Martinez-Fonseca, N., Chairez, I., & Poznyak, A., (2014). Uniform step by step observer for aerobic bioreactor based on super-twisting algorithm. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(12), 2493–2503. doi:10.1007/s0044 9-014-1227-0
- Martins, L.M., Pedro, A.Q., Oppolzer, D., Sousa, F., Queiroz, J.A., Passarinha, L.A., (2015). Enhanced biosynthesis of plasmid DNA from *Escherichia coli* VH33 using Box–Behnken design associated to aromatic amino acids pathway. *Biochemical Engineering Journal*, 97(2), 117–126. doi:10.1007/s00253-012-4308-5
- Massey, V., (1953). Studies on fumarase. III. The effect of temperature. *Biochemistry Journal*, 53, 72–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13032036>.
- Middaugh, C. R., & MacElroy, R. D., (1976). The effect of temperature on ribose-5-phosphate isomerase from a mesophile, *Thiobacillus thioparus*, and a thermophile, *Bacillus caldolyticus*. *Journal of Biochemistry*, 79, 1331–44.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N., (2004). SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science*. 305, 1629–1631.
- Mocali, A. & Paoletti, F., (1989). Transketolase from human leukocytes. Isolation, properties and induction of polyclonal antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 180, 213–219. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14636.x
- Modeling Fundamentals with Simulation Examples Weinheim: Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA. 8-53
- Mohd Ali, J., Ha Hoang, N., Hussain, M. A., & Dochain, D., (2015). Review and classification of recent observers applied in chemical process systems. *Computers & Chemical Engineering*, 76(8), 27-41. doi:10.1016/j.compchemeng.2015.01.019
- Morgan, G.J., Hatfull, G.F., Casjens, S., Hendrix, R.W., (2002). Bacteriophage Mu genome sequence: Analysis and comparison with Mu-like prophages in *Haemophilus*, *Neisseria*, and *Deinococcus*. *Journal of Molecular Biology*, 317(3), 337-359. doi:10.1006/jmbi.2002.5437
- Munguía-Soto, R., García-Rendón, A., Garibay-Escobar, A., Guerrero-Germán, P., Tejeda-Mansir, A., (2015). Segregated growth kinetics of *Escherichia coli* DH5 α -NH36 in exponential-fed perfusion culture for pDNA vaccine production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62, 795–805. doi:10.1002/bab.1339
- Mustafa, T., Moon, T. W., Hochachka, P. W., (1971). Effects of Pressure and Temperature on the Catalytic and Regulatory Properties of Muscle Pyruvate Kinase From an Off Shore Benthic Fish. *American Zoologist*, 11(3), 451–466. doi:10.1093/icb/11.3.451
- Narberhaus, F., Balsiger, A., (2003). Structure-Function Studies of *Escherichia coli* RpoH (σ^{32}) by In Vitro Linker Insertion Mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 185, 2731-2738.
- Nelson, J., Rodriguez, S., Finlayson, N., Williams, J., Carnes, A., (2013). Antibiotic-free production of a herpes simplex virus 2 DNA vaccine in a high yield cGMP process., *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9(10), 2211–2215. doi:10.4161/hv.25048
- O'Mahony, K., Freitag, R., Hilbrig, F., Müller, P., & Schumacher, I. (2007). Strategies for high titre plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5a. *Process Biochemistry*, 42, 1039-1049. doi:10.1016/j.procbio.2007.03.014
- O'Kennedy R. D., & Patching, J. W. (1997). Effects of medium composition and nutrient limitation on loss of the recombinant plasmid pLG669-z and beta-galactosidase expression by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 319–25.
- Olano, J., & De Bioqui, D., (1995). Kinetics and Thermostability of NADP-Isocitrate Dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*, 61(6), 2326–2334.
- Ongkudon, C. M., Ho, J., & Danquah, M. K., (2011). Mitigating the looming vaccine crisis: production and delivery of plasmid-based vaccines. *Critical reviews in Biotechnology*, 31(1), 32-52. doi:10.3109/07388551.2010.483460
- Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W., & Yap, M. G. S., (2006). Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 391–398. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.048



- Panayotatos, N., (1988). Recombinant protein production with minimal-antibiotic-resistance vectors. *Gene*, 74(2), 357-363.
- Phue, J. N., Lee, S. J., Trinh, L. B., & Shiloach, J., (2008). Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5α). *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 831-836.
- Pianosi F, Beven K, Freer J, Hall JW, Rougier J, Stephenson DB, Wagener T (2016) Sensitivity analysis of environmental models: A systematic review with practical workflow. *Environ Model Softw* 79:214-232
- Poyner, R. R., Laughlin, L. T., Sowa, G. A., & Reed, G. H., (1996). Toward identification of acid/base catalysts in the active site of enolase: Comparison of the properties of K345A, E168Q, and E211Q variants. *Biochemistry*, 35, 1692–1699. doi:10.1021/bi952186y
- 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. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 865-883. doi:10.1016/S0141-0229(03)00205-9
- Prazeres, D., Ferreira, G., Monteiro, G., Cooney, C., & Cabral, J. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology*, 17(4), 169-174. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01291-8
- pVAX1 user guide, Invitrogen: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pvax1_man.pdf (revised 2012)
- Rahn, A., Drummel-Smith, J., & Whitfield, C., (1999). Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colonic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2307-2313.
- Rajcani, J., Mosko, T., Rezuchova, I., (2005). Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved?. *Reviews in Medical Virology*. 15, 303–325. doi:10.1002/rmv.467
- Reinikainen, P., Korpela, K., Nissinen, V., Olkku, J., Söderlund, H., & Markkanen, P., (1989). *Escherichia coli* plasmid production in fermenter. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(4), 386-393. doi:10.1002/bit.260330403
- Riethdorf, S., Schroeter, A., & Hecker, M., (1989). RelA mutation and pBR322 plasmid amplification in amino acid-starved cells of *Escherichia coli*. *Genetics Research*, 54(3), 167-171. doi:10.1017/S0016672300028627
- Rodriguez, A., Quiroz, G., Femat, R., Mendez-Acosta, H. O., de Leon, J., (2015). An adaptive observer for operation monitoring of anaerobic digestion wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 269, 186–193. doi:10.1016/j.cej.2015.01.038
- Rozkov, A., Avignone-Rossa, C.A., Ertl, P.F., Jones, P., O’Kennedy, R.D, Smith, J.J., & Dale, J.W., Bushell, M.E. (2004). Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 909-915. doi:10.1002/bit.20327
- Sanchez-Casco M, Dumontel E & Ortega-Lopez J, (2013). Production optimisation of a DNA vaccine candidate against leishmaniasis in flask culture. *African Journal of Biotechnology*, 12(31), 4874-4880. doi:10.5897/AJB12.1360
- Santana, D.M., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G. P., Sturm, N. R., Palatnik de Sousa, C. B., & Campbell, D. A. (2002). Nucleoside hydrolase from *Leishmania* (L.) *donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(2), 315-319. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00010-5
- Saumweber, H., Binder, R., & Bisswanger, H., (1981). Pyruvate Dehydrogenase Component of the Pyruvate Dehydrogenase Complex from *Escherichia coli* K12 Purification and Characterization. *European Journal of Biochemistry Banner*, 114(2), 407–411. doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05161.x
- Schryvers, A., Lohmeier, E., & Weiner, J. H., (1978). Chemical and functional properties of the native and reconstituted forms of the membrane-bound, aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 783–8.
- Schugerl K., Bellgardt K.H. (2000) Bioreaction Engineering: Modeling and Control. Springer-Verlag, 1-30
- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E., & Knowles, J. R., (1995). Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic



- bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *The EMBO Journal*, 14, 442–451. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07020.x
- Shahriari, A., Dawson, N. J., Bell, R. A. V., & Storey, K. B., (2013). Stable suppression of lactate dehydrogenase activity during anoxia in the foot muscle of *Littorina littorea* and the potential role of acetylation as a novel posttranslational regulatory mechanism. *Enzyme Research*. doi:10.1155/2013/461374.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M., (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols*, 1, 2856-2860. doi:10.1038/nprot.2006.468
- Shoham, Y., & Demain, A. L., (1990). Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 330-336.
- Shuler, M. L., & Kargi, F., (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. (2nd ed.). Prentice Hall.
- Sieniutycz, S., (2016). *Thermodynamic Approaches in Engineering Systems*. Elsevier.
- Silva, F., Passarinha, L., Sousa, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., (2009). Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 1408-1414. doi:10.4014/jmb.0805.329
- Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C., (2012). Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 2571-2580. doi:10.1007/s00253-011-3668-6
- Soto, R., Caspeta, L., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Lara, A. R., (2011). High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochemical Engineering Journal*, 56(3), 165-171. doi:10.1016/j.bej.2011.06.003
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R., (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colonic acid. *Journal of Bacteriology*. 178, 4885-4893.
- Study, A. C., Wedding, R. T., (1987). Temperature Effects on Phosphoenolpyruvate Carboxylase from a CAM and a C4 Plant. *Plant Physiology*, 85, 497–501.
- Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.L., Arrow, A.S., (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiology Reviews*, 51, 439-457.
- Tahamtan, A., Charostad, J., Hoseini-Shokouh, S. J & Barati, M. (2017). An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine*. 5(3), doi:10.5812/jamm.12315
- Tang, A. K., Motoshima, H., & Watanabe K., (2012). Cloning, expression and purification of cold adapted acetate kinase from *Shewanella* species AS-11. *African Journal of Biotechnology*, 11(29), 7454–7463. doi:10.5897/AJB11.3741
- Tejeda-Mansir, A., & Montesinos, R. M., (2008). Upstream Processing of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Recent patents on Biotechnology*, 2(3), 156-172. doi:10.2174/187220808786241015
- Valdez-Cruz, N. A., Caspeta, L., Pérez, N. O., Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. A., (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories*, 9(18). doi:10.1186/1475-2859-9-18
- Van Boekel, M. A. J. S., (2008). Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 144–158. doi:10.1111/j.1541-4337.2007.00036.x.
- VanBogelen, R.A., & Neidhardt, F.C., (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5589-5593. doi:10.1073/pnas.87.15.5589
- Vandermeulen, G., Marie, C., Scherman, D., Pr eat, V., (2011). New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Molecular Therapy*. 19(11) 1942–1949. doi:10.1038/mt.2011.182
- Wainwright, M., Canham, L.T., Al-Wajeeh, K., Reeves, C.L., (1999). Morphological changes (including filamentation) in *Escherichia coli* grown under starvation conditions on silicon wafers and other surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 224-227. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00602.x



- Wang, Y., Berlow, R. B., Loria, J. P., (2009). Role of Loop–Loop Interactions in Coordinating Motions and Enzymatic Function in Triosephosphate Isomerase. *Biochemistry*, 48, 4548–4556. doi:10.1021/bi9002887.
- Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., & Wegrzyn, G., (2007). Adenosine monophosphate-induced amplification of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 57(3), 265-274. doi:10.1016/j.plasmid.2006.10.002
- Wittmann, C., Weber, J., Betiku, E., Krömer, J., Böhm, D., & Rinas, U., (2007). Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 132, 375–384. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.495
- Xu, Z. N., Shen, W. H., Chen, H., & Cen, P. L., (2006). Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *Journal of Zhejiang University Science*, 6(5), 396–400. doi:10.1631/jzus.2005.B0396
- Yang, W., & Drueckhammer, D. G., (2003). Computational Study of the Citrate Synthase Catalyzed Deprotonation of Acetyl-Coenzyme A and Fluoroacetyl-Coenzyme A: Demonstration of a Layered Quantum Mechanical Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(24), 5986–5994. doi:10.1021/jp034717v
- Yau, S.Y., Keshavarz-Moore, E., Ward, J., (2008). Host Strain Influences on Supercoiled Plasmid DNA Production in *Escherichia coli*: Implications for Efficient Design of Large-Scale Processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(3), 529-544. doi:10.1002/bit.21915
- Yueh, A. Y., Chung, C. & Lai, Y., (1989). Purification and molecular properties of malate dehydrogenase from the marine diatom *Nitzschia alba*, *Biochemical Journal*, 258, 221–228.
- Zeylemaker, W. P., Jansen, H., Veeger, C. & Slater, E. C., (1971). Studies on succinate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology*, 242(1), 14–22. doi:10.1016/0005-2744(71)90083-0
- Zhang, Y., & Henson, M. A., (2001). Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models. *Biotechnology Progress*, 17(4), 647-660. doi:10.1021/bp010048w
- Zhin-nan, X., Wen-he, S., Hao, C., Pei-lin, C., (2005). Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *Journal of Zhejiang University Science*, 6(5), 396–400. doi:10.1631/jzus.2005.B0396



CAPÍTULO 6

ANÉXOS



Anexo A1. Protocolo para la cuantificación de NPT II mediante ELISA

Ensayo ELISA

- Agregar 100 μ L por pozo de la dilución (en solución de carbonatos) del extracto proteico obtenido de la lisis de *Escherichia coli* DH5 α de cada una de las muestras de fermentación, así como los puntos de la curva estándar.
- Incubar a 4 $^{\circ}$ C durante 18 horas.
- Agregar 100 μ L por pozo de solución de bloqueo e incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora.
- Lavar 3 veces con 300 μ L por pozo (con solución de lavado).
- Quitar el exceso de líquido en una toalla absorbente (no golpear la placa para evitar afectar la unión del complejo Ag).

Adición del Anti-cuerpo primario

- A cada pozo se agregan 100 μ L del Ab primario (anti-NPT II) a una concentración de 5 μ g/mL, diluido en solución de carbonato.
- Depositar el líquido en el centro del pozo, evitando la formación de burbujas.
- Incubar durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C.
- Lavar 5 veces con 300 μ L por pozo (con solución de lavado).

Adición del Anti-cuerpo secundario conjugado

- Agregar 100 μ L por pozo de la solución de Ab secundario (Anti-Conejo IgG, H+L conjugado con HRP) a una concentración de 0.5 μ g/mL.
- Incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora, cubrir de la luz.
- Lavar 5 veces con solución de lavado.
- Quitar el exceso de líquido.
- Agregar 100 μ L por pozo de solución de revelado.
- Incubar en la oscuridad durante 8 minutos.
- Parar la reacción con 100 μ L por pozo de solución de paro.
- Medir la absorbencia en un lector ELISA a una longitud de onda de 492 nm.

 Realizar estas actividades con la menor intensidad de luz posible.

Lavado de placas

Se adicionan 300 μ L por pozo de buffer de lavado (PBS-Tween20 al 0.05 %) con una pipeta multicanal (si se cuenta con ella). Agitar oscilatoriamente durante 15 segundos y desechar el líquido. Colocar la placa sobre un material absorbente (que no suelte partículas) para retirar el exceso de líquido.