



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Estrategias para incrementar la producción de ADN
plasmídico en *Escherichia coli* DH5 α en cultivo por lote”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Fabiola Islas Lugo

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México

Agosto, 2016

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio 20 de Biocatálisis del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, con asesoría del Dr. Jaime Ortega López, del Dr. Frédéric Thalaso Siret del departamento de Biotecnología y Bioingeniería, y la asesoría de la Dra. Lorena Amaya Delgado del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, y la asesoría del Dr. Eliseo Cristiani Urbina de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Agradezco al Ing. Jesús Vega Estrada y a la técnico María del Carmen Fontaine Sánchez por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres porque pusieron los cimientos que permitieron que lograra la finalización de este proyecto, por su apoyo incondicional, cariño y por ser un ejemplo de superación

A mis hermanas Carina y Maritza que siempre siempre siempre me han apoyado y me alientan e inspiran cada día para seguir

A mis hermanos Ruben y Eric por su apoyo, cariño y por estar siempre que los necesite

A Ivania y Azu por su amistad, y porque a pesar del tiempo y la distancia siempre estan brindandome su apoyo y buenos consejos

A todos mis compañeros Del Lab. Chucho, Carmelita, Lau, Fer Coevas (aunque no sea del Lab), Fer, Christian, por su amistad, consejos, apoyo, ayuda, y sobre todo por hacer más amena la estancia en el laboratorio.

A todas las personas que contribuyeron para el desarrollo de este proyecto

Índice

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Vacunas	13
1.1.1 Tipos de vacunas	13
1.2 Vacunas de ADN plasmídico.....	14
1.2.1 Plásmidos.....	17
1.2.2 Características de las vacunas de ADNp.....	17
1.2.3 Ventajas del empleo de vacunas de ADNp	18
1.2.4 Producción de vacunas de ADNp	19
a) Diseño del plásmido	21
c) Medios de cultivo.....	21
d) Condiciones de cultivo.....	23
e) Tipos de cultivo.....	26
1.2.5 Vacunas de ADN en México	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	31
3. HIPOTESIS.....	32
4. OBJETIVO GENERAL.....	33
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1. Producción de ADNp en un cultivo por lote en diferentes medios de cultivo a dos diferentes temperaturas.....	40
8.2 Evaluación de nutrientes agregados al medio M2.....	42
8.3 Evaluación del incremento de la temperatura a diferentes tiempos de cultivo	48

8.4 Evaluación de diferentes estrategias para incrementar la producción de ADNp en cultivos en lote	50
1) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de glicerol, manteniendo la concentración de nitrógeno orgánico constante	51
2) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico manteniendo constante el glicerol en 50 g/L	53
3) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico, manteniendo constante el glicerol en 50 g/L y realizando el control de pH con NH ₄ OH	56
4) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico, manteniendo constante el glicerol en 50 g/L y realizando el control de pH con NH ₄ OH	57
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. REFERENCIAS	68
12. ANEXOS	74
ANEXO 1.- Extracción de ADNp	74
1.1 QIAprep Spin Miniprep Kit	74
ANEXO 2.- Cuantificación de ADNp súper enrollado	75
2.1 Electroforesis con geles de agarosa:	75
2.1 Espectrofotometría	76
ANEXO 3.- Determinación de glicerol	77
3.1 Método espectrofotométrico (Bondioli y Della Bella 2005)	77

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso general para el desarrollo de una vacuna de ADNp (Modificado de Prather et al. 2003)..... 20
- Figura 2.** ADNp obtenido bajo diferentes estrategias de fermentación (Ruiz Hernández et al. 2011) 28
- Figura 3.** Perfil electroforético del plásmido pVAX-NH36, carriles 1-10: corresponden a los diferentes tiempos de cultivo (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas) en el medio M3 a 37°C, carril M marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA ladder (New England Biolabs)..... 45
- Figura 4.** Efecto de la concentración inicial de ELPS: (A) Biomasa, (B) ADNp, (C) Rendimiento específico y (D) Productividad volumétrica de *E. coli* DH5 α -pVAX.NH36 en un cultivo en lote, creciendo en medio mineral M3 con 50 g/L de glicerol a 37°C, controlando el pH con NaOH (o), controlando el pH con NH₄OH (●) y la estrategia propuesta (▲). 55
- Figura 5.** Producción de *E. Coli* DH5 α transformada con la construcción pVAX-NH36 en un cultivo en lote eliminando del medio mineral M3 el (NH₄)₂SO₄ con 50 g/L de glicerol, 8.34 g/L de ELPS y 20 mg/L de tiamina. Biomasa y producción de ADNp (A), Rendimiento específico y productividad volumétrica (B), Consumo de carbono y nitrógeno total (C) y pH y consumo de NH₄OH (D). 58
- Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa: Carril 1. Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladders); Carriles 2-4. Muestras; oc. ADNp circular abierto y sc. ADNp super enrollado. 60
- Figura 7.** Efecto de diferentes estrategias en un cultivo por lote a 37°C: (A) Biomasa y concentración de ADNp; (B) Rendimiento específico y

productividad de ADNp creciendo en medio mineral M3 con 50 g/L de glicerol y (E1) 42 g/L de ELPS, (E2) 8.34 g/L de ELPS controlando el pH con NaOH, (E3) 8.34 g/L de ELPS controlando el pH con NH₄OH, (E4) 8.34 g/L de ELPS con 20 mg/L de tiamina controlando el pH con NH₄OH. 62

Figura 8. Curva tipo obtenida de las diferentes concentraciones de glicerol
..... 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vacunas de ADNp aprobadas por la FDA	16
Tabla 2. Biomasa, producción, rendimiento y productividad de plásmido en <i>E. Coli</i> DH5 α transformada con la construcción pVAX-NH36 en un cultivo en lote	41
Tabla 3. Resultados de la concentración de los componentes a evaluar en el medio M2	43
Tabla 4. Experimentos propuestos para la evaluación de los nutrientes adicionados al medio M2	43
Tabla 5. Evaluación de los componentes del medio agregados al medio M2	44
Tabla 6. Tabla de resultados del incremento de temperatura en el medio M3 a las 8, 10 y 12 horas de cultivo.....	49
Tabla 7. Tabla de resultados con diferentes concentraciones de glicerol inicial.....	53
Tabla 8. Datos obtenidos para realizar la curva tipo.....	78

RESUMEN

Las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) consisten en un plásmido que contiene un fragmento de ADN que codifica para un antígeno. Entre las ventajas que presentan estas vacunas están: mayor seguridad, de fácil manufactura, químicamente estables a temperatura ambiente, lo cual redundando en los costos de almacenamiento y transporte; la principal desventaja es que se requiere cantidades considerables (miligramos) por dosis de ADNp grado farmacéutico para su aplicación.

La demanda de estas vacunas ha aumentado en los últimos años, por lo que es necesario desarrollar procesos a escala comercial que sean factibles económicamente y cumplan con los estándares regulatorios para estos sistemas. Una alternativa para obtener una mejor producción y productividad es a través de cultivos en biorreactor, los cuales nos permiten manipular diversas condiciones como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la concentración de los nutrientes que son clave para dichos procesos.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar estrategias para incrementar la producción ADNp en *Escherichia coli*, utilizando como modelo una vacuna contra leishmaniasis basada en el antígeno NH-36 (pVAX-NH36) a nivel de biorreactor, evaluando diferentes medios de cultivo, condiciones de cultivo: pH, temperatura, y diferentes relaciones de Carbono/Nitrógeno (C/N). Como resultado de estos estudios, utilizando una estrategia, en la cual el control de pH con NH₄OH se inició a las 5 horas después de la inoculación, se obtuvo una producción de ADNp de 213 mg/L, rendimiento específico de 10 mg/g con 92% de plásmido súper enrollado, y una productividad de 17.6 mg/L h, con 50 g/L de glicerol y 8.34 g/L de fuente de nitrógeno orgánico. La productividad de ADNp fue 42% más alta que lo reportado por otros autores bajo las mismas condiciones.

ABSTRACT

Plasmid DNA vaccines (pDNA) consist of a DNA fragment encoding an antigen, which is inserted into a plasmid. The advantages of these vaccines are: safety, easy manufacture, chemically stable at room temperature, resulting in less costs of storage and transportation; the main disadvantage is that considerable amounts (milligrams) of pharmaceutical grade pDNA is required for dose.

The demand for these vaccines has increased in recent years, so it is necessary to develop commercial-scale processes that are economically feasible and that comply with regulatory standards. An alternative for better production and productivity is to perform bioreactor culture, which allow us to manipulate the conditions culture such as temperature, pH, dissolved oxygen and nutrients concentration that are key to these processes.

The aim of this work was the development strategies to increase the production of pDNA in *Escherichia coli* in bioreactor, using as a model a vaccine against leishmaniasis based on the antigen NH36 (pVAX-NH36), evaluating different culture media, culture conditions: pH, temperature, and different carbon to nitrogen molar ratios (C/N). As a result of these studies, using a strategy in which the pH control with NH₄OH started 5 hours after inoculation, a pDNA production of 213 mg/L, specific yield of 10 mg/g, 92% of super coiled plasmid, and productivity of 17.6 mg/L h were obtained, using 50 g/L of glycerol and 8.34 g/L of organic nitrogen source. pDNA productivity achieved was 42% higher than that reported by other authors under the same conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vacunas

Por definición, las vacunas son un preparado de antígenos, administrados por vía oral o intramuscular, los cuales estimulan una respuesta del sistema inmune y activan una protección específica frente a los patógenos. Estas han tenido un gran impacto dentro de la salud pública, debido a que sirven para la prevención de diversas enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y protozoarios, sin embargo actualmente, el campo de investigación de las vacunas se enfoca al desarrollo de vacunas más seguras, así como el desarrollo de nuevos procesos para su producción.

1.1.1 Tipos de vacunas

Las vacunas las podemos dividir en dos grupos: Clásicas y Modernas (Salleras, 2001); dentro de las clásicas encontramos las siguientes:

- **Inactivadas:** Son vacunas que contienen microorganismos patógenos que han sido tratados con productos químicos o calor y han perdido su patogenicidad. Ejemplos de este tipo son: la gripe, el cólera y la hepatitis A.
- **Vivas atenuadas:** Contienen microorganismos que han sido cultivados expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades de virulencia o patógenas. Suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera, por ejemplo: la fiebre amarilla, el sarampión, la rubeola y las paperas.
- **Subunitarias:** Son fragmentos o componentes de un microorganismo, los cuales pueden crear una respuesta inmune. Un ejemplo

característico es la vacuna contra la hepatitis B, está compuesta solamente por la superficie del virus (formada por proteínas).

La aplicación de los conocimientos en biología molecular y virología, ha permitido el diseño de vacunas modernas, entre las que tenemos:

- **Vacunas comestibles:** Se refiere a la producción de vacunas antigénicas en plantas comestibles, por ejemplo: hepatitis B en tabaco (Giddings et al., 2000).
- **Vacunas de péptidos sintéticos:** Es una copia mediante síntesis química de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que realizan la función de antígeno, procedente de patógenos.
- **Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes:** Se refiere a la producción de vacunas de proteínas por medio de la inserción de ADN en sistemas de expresión tanto de bacterias como de plantas.
- **Vacunas de ADN plasmídico:** Consisten en la inyección directa de ADN a través de un plásmido al que se le ha insertado un gen que codifica para una proteína empleada como antígeno, que inducirá la activación del sistema inmune.

1.2 Vacunas de ADN plasmídico.

Las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) consisten en plásmidos bacterianos contruidos para expresar una proteína, la cual es empleada como antígeno.

La vacunación mediante el empleo de ADNp tuvo sus inicios en las observaciones de Jon A. Wolff, quien intentó utilizar ADNp como control

negativo en experimentos de transferencia genética en ratones. El resultado, sin embargo fue la demostración de que las células musculares son capaces de expresar genes como consecuencia de la inyección de ADNp, sin la necesidad de utilizar vectores virales o ADN encapsulado en liposomas. Estos resultados lo llevaron a plantear la posibilidad de que la transferencia genética mediante ADNp podría ser utilizada para el desarrollo de vacunas (Wolff et al., 1990).

Posteriormente, se reportó la generación de anticuerpos contra dos proteínas, la hormona de crecimiento humano y la α 1- antitripsina mediante la inoculación de ADN codificante para ambas, demostrando la posibilidad de realizar una inmunización genética, mediante bombardeo de partículas de oro cubiertas con ADN (Tang et al., 1992). Más adelante, el campo de la vacunación con ADN quedó firmemente establecido tras la demostración de que la inyección de vectores codificantes para proteínas de virus de la influenza protegían a animales ante un reto mortal (Ulmer, 2002). A partir de estos primeros experimentos se inició la investigación tanto en sectores académicos como a nivel privado para el desarrollo de vacunas basadas en ADN, contra una gran cantidad de enfermedades de origen viral, bacteriana y parasitaria.

En 1997 se iniciaron los estudios de una vacuna de ADN contra el virus del SIDA, y luego fueron ampliados a otras enfermedades como hepatitis B y malaria, confirmando que se puede inducir una respuesta inmune en humanos.

Actualmente han sido aprobadas tres vacunas para uso veterinario: La vacuna contra el virus del Oeste del Nilo, desarrollada en el 2005 por la USDA para su uso en caballos, actualmente se encuentra en la etapa II para el tratamiento en humanos; una segunda vacuna para combatir la infección

de necrosis hematopéyica en salmón, una tercera para el tratamiento de melanoma canino y además una cuarta que ha sido aprobada como terapia génica (tabla 1). Otras vacunas que se encuentran en ensayos clínicos con humanos son la influenza H5N1, la tuberculosis, la malaria, el dengue, etc. (Liu, 2011).

Tabla 1. Vacunas de ADNp aprobadas por la FDA

Vacuna	Compañía	Fecha de licencia y País	Descripción	Referencia
West Nile innovator ®	Center of Cáncer	2005 EUA	Vacuna contra el Virus del Oeste del Nilo para equinos	(Davis et al., 2001)
Apex-IHN ®	Novartis	2005 Canadá	Vacuna para evitar la infección por el virus de necrosis hematopoyética (NHI)	(Corbeil et al., 1999)
Life Tide-SWS ®	VGX Animal Health	2007 Australia	Vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino, esta vacuna genera una respuesta inmune completa contra la tirosinasa de perro	(Liao et al., 2006)
Vacuna de Melanoma canina ®	Merial	2008 EUA	Es un plásmido que codifica para el factor liberador de la hormona crecimiento (GHRH), aplicado a cerdos	(Khan et al., 2010)

1.2.1 Plásmidos

Son moléculas de ADN extracromosómico que se replican y transmiten en forma independiente del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía de 3 a 10 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula. Se clasifican en circulares y lineales, siendo circulares en la mayoría de los casos (Borja et al., 2013).

Los plásmidos, han cobrado una creciente relevancia como vectores en terapia génica y en vacunas de ADN por su capacidad de codificar para una proteína, la cual a su vez puede desencadenar una respuesta inmune o celular. También se utilizan como vectores de clonación y/o amplificación en ingeniería genética, al igual se pueden utilizar como vectores de expresión con lo cual es posible obtener grandes cantidades de proteína como insulina o péptidos con actividad antibacterial (Donnelly et al., 2003).

1.2.2 Características de las vacunas de ADNp

El ADNp usado como vacuna debe de contener elementos para la replicación y selección en hospederos bacterianos y para la expresión del antígeno en células eucariotas, además de cumplir con ciertas características de calidad y seguridad.

La FDA ha emitido la recomendación de que el ADNp, para ser empleado como fármaco debe encontrarse en forma superenrollada. Aunque dicha recomendación no está plenamente justificada, se basa en estudios que han mostrado que dicha isoforma es más efectiva para la expresión del gen terapéutico en el paciente que la isoforma relajada o lineal (Lahijani et al., 1996; Prazeres et al., 1999). Además la FDA sugiere que el contenido de

ADNp de la isoforma superenrollada debe contener como mínimo un 80% de esta isoforma, para reducir el riesgo de recombinación inespecífica con el cromosoma del hospedero y/o la recombinación viral; el contenido de ADN cromosomal, RNA y proteínas no debe de exceder el 1% de las dosis empleadas (FDA, 2007).

1.2.3 Ventajas del empleo de vacunas de ADNp

- Simplicidad en el diseño y de fácil administración,
- Son altamente seguras debido a que solo se introduce el gen de interés,
- La estabilidad de los vectores plasmídicos a diferentes temperaturas, permite disminuir costos en el proceso de producción, almacenamiento, transporte y administración.
- Elimina el requerimiento de una cadena de frío, facilitando una mayor accesibilidad geográfica y permitiendo llevar la vacunación hasta áreas remotas.
- El ADN de cualquier organismo vivo mantiene la información necesaria para codificar y producir las proteínas necesarias para su funcionamiento,
- Múltiples antígenos en la misma vacuna.
- Los productos de la vacunación con ADN se expresan directamente en el tejido blanco, representando esto una ventaja cuando se trabaja con antígenos de difícil obtención, con una pureza alta, o en concentraciones elevadas.
- Se obtienen a un costo por debajo de las vacunas tradicionales, su producción es relativamente simple y la mayoría de los laboratorios están equipados para su producción en cantidades adecuadas para investigación.

Desventajas:

- Se requieren altas dosis de ADNp de alta pureza para su aplicación.
- Respuestas inmunitarias frente al ADN, inmunotolerancia y autoinmunidad.
- Expresión del antígeno en forma inapropiada.

1.2.4 Producción de vacunas de ADNp

El proceso general para la producción de una vacuna de ADNp consta principalmente de 4 pasos, los cuales se muestra en la figura 1. Estos 4 pasos se agrupan en dos etapas: 1) Upstream, en donde se consideran: a) diseño del plásmido, selección del vector, del inserto y de la cepa hospedera, b) transformación y selección de la clona, c) producción del plásmido, la cual constituye una etapa fundamental. En tanto que la etapa Downstream considera la recuperación de la biomasa, la lisis celular y el método de purificación del plásmido súper enrollado. En este trabajo nos enfocaremos solo en la primera etapa a la etapa de producción del plásmido, la cual se ve afectada por el medio de cultivo, las condiciones de cultivo y el método de cultivo.

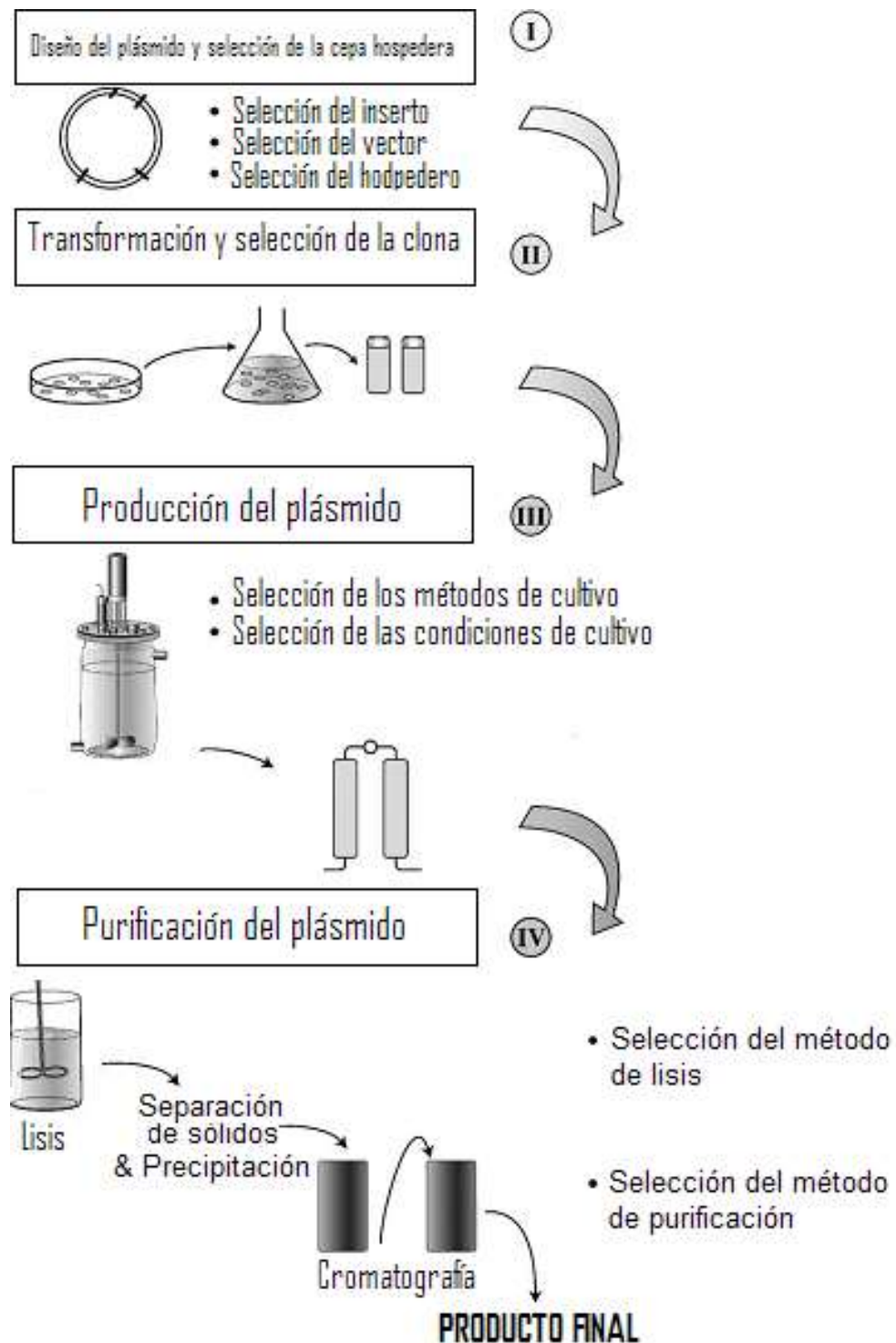


Figura 1. Proceso general para el desarrollo de una vacuna de ADNp (Modificado de Prather et al. 2003)

a) Diseño del plásmido

Se han empleado diferentes plásmidos en la producción del ADNp para asegurar que la secuencia y la estructura se mantengan durante todo el proceso de producción. Los plásmidos utilizados para las vacunas de ADNp deben incluir un promotor, un intrón, el gen que codifica para el antígeno, una secuencia de terminación de la transcripción, un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a antibiótico. La FDA ha recomendado ampliamente que los antibióticos de origen β -lactámicos deben de ser evitados, debido a la contaminación residual en el producto final ya que puede causar una reacción alérgica en pacientes sensibles (Butler, 1996), por lo que, el desarrollo de vectores de ADNp libres de genes resistentes a antibióticos es altamente deseado desde dos puntos de vista: el costo de producción y la seguridad.

b) Cepa hospedera

La cepa seleccionada para la producción debe producir un alto número de copias del plásmido de interés, poseer alta estabilidad y mantener un alto nivel de superenrollamiento del plásmido. También debe tener una baja tasa de mutación y de intercambio de información genética con el plásmido. El ADNp con fines terapéuticos es típicamente producido en cepas no patógenas de *E. coli* derivadas de su progenitora *E. coli* K-12, como la cepa DH5 α (Carnes et al., 2006); otras cepas como BL21 (Listner et al., 2006), DH1 (Cooke et al., 2004; Rozkov et al., 2004), JM108 (Mairhofer et al., 2010), SCS1-L (Singer et al., 2009), o DH10B (Lahijani et al., 1996) han sido reportadas para la producción de ADNp.

c) Medios de cultivo

Los medios de cultivo para el desarrollo de procesos de fermentación constituyen una etapa fundamental para asegurar la productividad de los

mismos. Los componentes de los medios desempeñan un papel esencial ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos, además de suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular. Los medios de cultivo pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en: medios sintéticos o medios químicamente definidos, medios semidefinidos y medios complejos.

La concentración y el tipo de ingredientes utilizados en la formulación del medio de cultivo, determinan la velocidad de crecimiento y la cantidad de biomasa producida, las cuales influyen en el rendimiento específico y volumétrico del ADNp (Danquah and Forde, 2007; Ongkudon et al., 2011). Existen evidencias que sugieren que los medios definidos pueden soportar un alto número de copias del plásmido en comparación con los medios complejos (Fleming and Patching, 1994; O’Kennedy and Patching, 1997; Shoham and Demain, 1990).

Se han reportado diversos estudios de medios de cultivo para la producción de plásmidos; desde la extrapolación de medios utilizados para la producción de proteínas recombinantes (Sanchez-Casco et al., 2013), optimización de medios de cultivo (Ongkudon et al., 2011), el diseño de medios estequiométricos (Wang et al., 2001), así como el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de plásmido (Xu et al., 2005). Por ejemplo O’Kennedy y col. demostraron que la relación óptima Carbono/Nitrógeno (C:N) de 2.78:1 fue óptima para la producción de plásmidos; observaron que al aumentar la relación C:N hasta 12.08, el rendimiento de los plásmidos disminuía (O’Kennedy et al., 2000).

La adición de sales y minerales como magnesio, fósforo, potasio y azufre son necesarias para el crecimiento y el metabolismo de la bacteria, Schmidt en el

2003 observó que altas concentraciones de magnesio (80mM) favorecen la producción de plásmido súperenrollado (Schmidt et. al., 2003).

La glucosa es la fuente de carbono utilizada por excelencia, ya que es fácil de metabolizar, por lo que es posible alcanzar altas velocidades de crecimiento, sin embargo altas velocidades de crecimiento están asociadas con la producción de acetatos, lo que provoca inestabilidad del plásmido y bajos porcentajes de plásmido súper enrollado. Con el fin de reducir la producción de acetatos se ha implementado el uso del glicerol, el cual permite obtener menores velocidades de crecimiento en *E. coli* y por lo tanto menor acumulación de acetatos (Bower et al., 2012; Ongkudon et al., 2011; Xu et al., 2005).

Para la utilización de los plásmidos en humanos, la FDA (Food and Drug Administration) recomienda que todos los componentes empleados en el medio de cultivo, deberán estar libres de componentes de origen animal (FDA, 2007; Klinman et al., 2010).

d) Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo, tales como el oxígeno disuelto (OD), la temperatura y el pH afectan la producción del plásmido, así como su grado de enrollamiento.

Oxígeno disuelto

En diversas investigaciones, se ha establecido una concentración de oxígeno disuelto del 30% para la producción de plásmido, esto es debido a que se realizó un estudio donde se evaluaron diferentes concentraciones de OD sobre la estabilidad del plásmido y se observó que manteniendo la concentración de OD entre 20 y 40% no se presentaron diferencias

significativas en la estabilidad, pero si la concentración de OD caía por debajo del 5%, esta causaba inestabilidad en el plásmido (Hopkins et al., 1987; Oliveira et al., 2009). Otro estudio evaluó el incremento del OD mediante el enriquecimiento del aire con Oxígeno puro o mediante la presurización del biorreactor y se observó que la producción y la estabilidad del plásmido fueron similares en ambos casos (Lara et al., 2011).

Temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento de *E. coli* es 37°C; sin embargo, a menores temperaturas (por ejemplo 30°C) en fermentación en lote se reduce la velocidad de crecimiento específico.

También se ha observado que la utilización de plásmidos derivados del vector pUC favorecen su producción mediante el incremento de la temperatura, esto se debe a que la secuencia RNAI presenta una mutación puntual de A/G, evitando que esta secuencia se una a la estructura secundaria de RNAII, ya que no se puede reprimir la síntesis de plásmido, esta mutación permitió incrementar el número de copias del plásmido de 20 a 50, cuando la temperatura del cultivo se incrementó típicamente en un rango de 40 a 45°C (Lin-Chao et al., 1992). Otros estudios demostraron que con vectores (pUC), el número de copias de plásmido incrementa un orden de magnitud al hacer el incremento de temperatura en el cultivo hasta 42 °C. En la literatura se reporta el efecto de la temperatura y su incremento a varias tasas de calentamiento sobre la producción de ADNp (Carnes et al., 2006; Jaén et al., 2013).

Estudios realizados por Jaén y col. (2013) con tasas de calentamiento entre 0 y 0.10 °C/min permitieron incrementar el rendimiento específico y la productividad de ADNp hasta 79 y 250%, respectivamente, siendo la mejor condición de calentamiento 0.05 °C/min, en la que el rendimiento específico

de ADNp fue de 9.29 ± 0.59 mg/g, la productividad de 0.56 ± 0.06 mg/g h y el contenido de plásmido súperenrollado de $80 \pm 5\%$ (Jaén et al., 2013).

pH

En la mayoría de los estudios realizados sobre producción de plásmidos a nivel de matraz, el pH sólo es medido al inicio y al final del cultivo en tanto que en cultivos a nivel biorreactor, el pH se controla durante todo el cultivo, en ambos casos la producción más alta de plásmido se obtuvo cuando el pH fue moderadamente alcalino (Cortés et al., 2015; Durland and Eastman, 1998; Ongkudon et al., 2011).

En el crecimiento de *E. coli*, en glucosa, glicerol y/o otros carbohidratos se ha observado que el pH disminuye debido a la producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido acético), los cuales a su vez tienen un efecto negativo sobre el crecimiento celular y la producción de plásmido (Lopes et al., 2015; Xu et al., 2005). Además la producción de ATP es reducida, por lo que las células no tienen suficiente energía para las rutas metabólicas, y por tanto la síntesis de ADN se detiene. Para evitar la caída del pH durante el cultivo, los medios de cultivo pueden ser suplementados con buffer de fosfatos, los cuales también son utilizados como fuente de fósforo. El incremento del pH durante la fermentación se debe al amonio producido por la presencia de proteínas o aminoácidos provenientes de la peptona, triptona y/o extracto de levadura (Simcikova et al., 2014). Cuando el pH no se controla, durante la fermentación en un medio semidefinido, éste es el resultado del balance entre la concentración del amonio y los ácidos orgánicos producidos y/o consumidos.

e) Tipos de cultivo

Otra forma de aumentar la productividad de los bioprocesos es aumentar al máximo la cantidad de células en el biorreactor, esto se obtiene mediante los diferentes tipos de cultivo.

- **Cultivo en lote**

Es el método de cultivo más simple, en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y de metabolitos cambia a los diferentes tiempos de fermentación.

La producción de plásmidos en *E. coli* se ha desarrollado principalmente en cultivo en lote. Sin embargo estos cultivos se ven limitados para la producción de altas concentraciones de biomasa, obteniéndose bajos rendimientos. Generalmente los rendimientos volumétricos en los cultivos en lote, van de 4 a 600 mg/L. Al aumentar la biomasa del cultivo en lote, la demanda de oxígeno aumenta, y si el cultivo presenta limitación de oxígeno, el metabolismo de *E. coli* cambia produciendo productos tóxicos (principalmente ácido acético), los cuales inhiben el crecimiento y ocasiona la muerte celular (Cherrington et al., 1990). En un estudio realizado en un cultivo en lote, utilizando glicerol como fuente de carbono y manteniendo la temperatura a 30°C, se observó la reducción de la producción de acetatos, así como velocidades de crecimiento por debajo de 0.3 h⁻¹ durante todo el cultivo. En la fermentación en lote, la velocidad de crecimiento puede ser controlada, mediante la temperatura y la fuente de carbono (Tatcher, 1999). Para la producción de plásmidos con mayor estabilidad es deseable que la velocidad de crecimiento permita una sincronía entre la división celular y la replicación del plásmido.

- **Cultivo en lote alimentado:**

Una estrategia común para obtener altas densidades celulares es la operación del cultivo en modo lote alimentado, el cual consiste en una fase lote de corta duración seguida de una fase de alimentación de sustrato a una tasa tal que se permita el crecimiento óptimo. La alimentación del sustrato puede manejarse con un perfil constante o con incremento lineal. También puede operarse una tasa de alimentación con incremento exponencial, lo que permite además controlar la velocidad específica de crecimiento de las células (Pablos et al., 2012). La conversión de sustrato a biomasa es alta, la concentración de sustrato es casi cero, por lo que se evita la inhibición por sustrato, se evita también la formación de metabolitos por la concentración de sustrato, los cuales pueden ser inhibitorios como lo es el acetato.

Los reportes que aparecen en la literatura demuestran que en los cultivos en lote alimentado se han obtenido los mayores rendimientos de ADN, como se muestra en la figura 2.

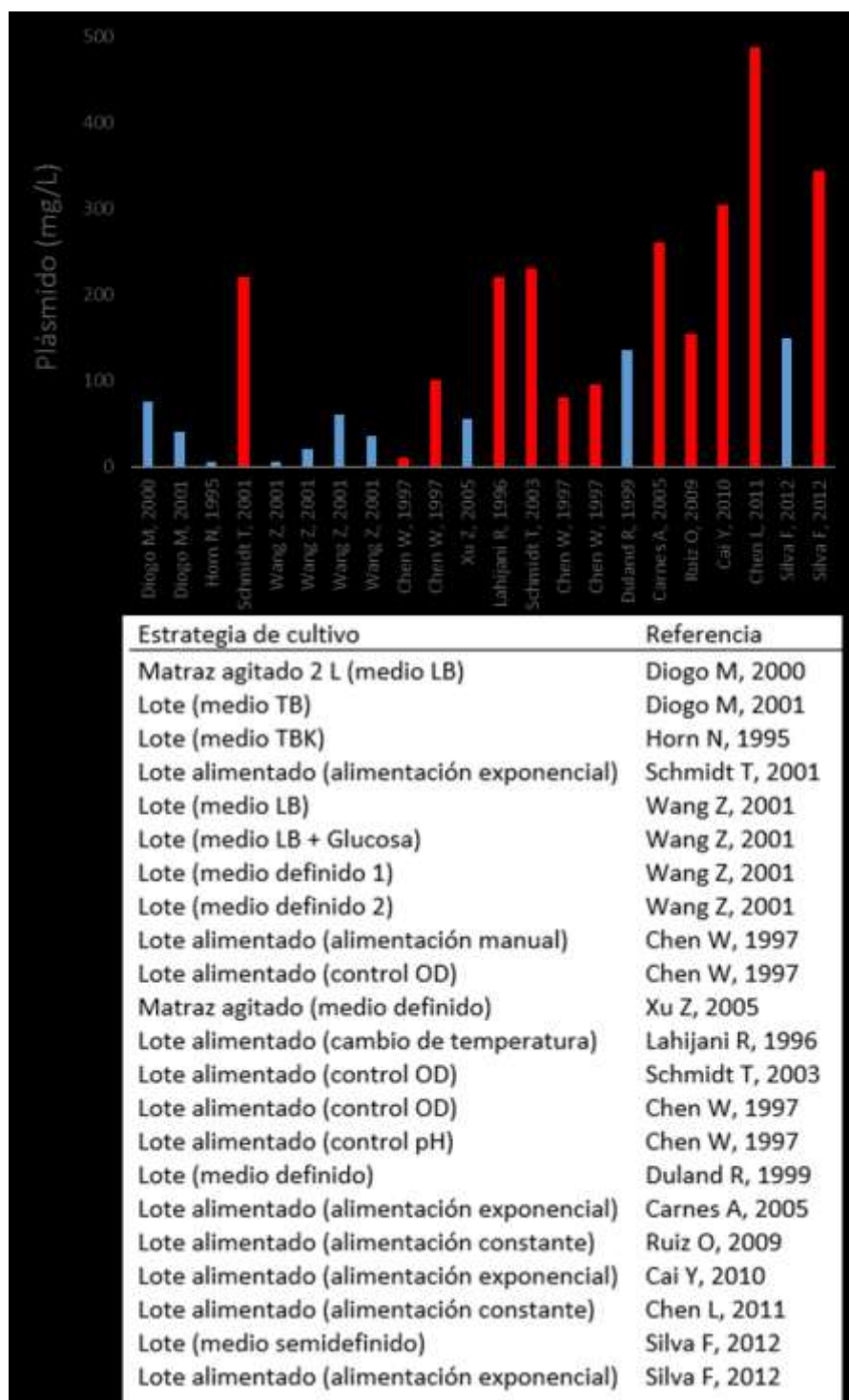


Figura 2. ADNp obtenido bajo diferentes estrategias de fermentación, modificado de (Ruiz Hernández et al., 2011).

- **Cultivo continuo**

Consiste en un sistema en donde los flujos de entrada y salida son iguales, por lo que el volumen de operación del reactor permanece constante durante todo el cultivo, además se puede controlar la velocidad de crecimiento. En este tipo de sistemas se obtienen altas productividades, ya que no se aumenta el volumen o el número de fermentaciones (Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008).

El cultivo continuo se ha utilizado para evaluar la estabilidad del plásmido en la cepa hospedera, algunos plásmidos demostraron ser estables después de cultivos continuos prolongados, mientras que otros plásmidos comunes como pBR322 y pMB9, no fueron estables. La estabilidad del plásmido también es afectada por la tasa de dilución, la pérdida del plásmido se presenta más rápidamente a bajas velocidades de dilución (Carnes, 2007).

Carnes (2007) realizó un cultivo continuo en dos etapas, la primera etapa consistió en un cultivo en lote a 30 °C hasta alcanzar una biomasa de 220 g/L. El cultivo continuo se realiza en el reactor 1 a 30°C y en el reactor 2 a 42°C, cuando se alcanza el estado estacionario se obtiene un rendimiento de plásmido de 1.02 g/L.

1.2.5 Vacunas de ADN en México

En México algunos grupos de investigación se han enfocado al estudio de antígenos contra enfermedades parasitarias como la leishmaniasis. Es la enfermedad parasítica más seria a nivel mundial, aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de adquirirla en sus diferentes formas: cutánea y visceral. En México la leishmaniasis se presenta en zonas tropicales y el tratamiento actual incluye antiparasitarios con efectos secundarios severos, por lo que las vacunas de ADNp son una buena

alternativa para su tratamiento. El agente se transmite al humano y a los animales a través de la picadura de hembras de las moscas chupadores de sangre pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, de la familia Psychodidae (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Entre los primeros plásmidos estudiados en México por el grupo del Dr. Dumonteil con actividad prometedora contra la Leishmaniasis se encuentran VR1012-GP46, VR1012-CPb y VR1012-GP6 que probados en ratones indujeron una respuesta inmunoprotectora parcial. Posteriormente en 2005, con el complejo FML (ligando mucosa-manosa) del parásito *Leishmania donovani*, fue aislada la proteína GP36, (36 kDa con actividad nucleosil-hidrolasa). La proteína demostró tener una respuesta efectiva en anticuerpos, por lo que fue considerado como un excelente candidato como vacuna de ADN (Aguilar-Be et al., 2005). El principal componente inmunológico del complejo FML y de la proteína GP36 es el fragmento NH36, el cual se clono en el vector pVAX, obteniéndose la vacuna pVAX-NH36 (Sanchez-Casco et al., 2013), que se utilizó como modelo de estudio en este trabajo con el objeto de aumentar su producción a nivel de biorreactor.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha puesto especial énfasis en la producción de ADNp, para utilizarlo como vacuna, o en terapia génica, para el tratamiento de diferentes enfermedades, como la influenza, hepatitis, malaria, leishmaniasis, etc., que cobran millones de vidas cada año y en las cuales los tratamientos son a base de compuestos químicos, que presentan efectos secundarios indeseables, además de ser tratamientos costosos.

Actualmente la demanda de vacunas de ADNp se ha incrementado, sin embargo en cuanto a su producción, los rendimientos que se obtienen no son suficientes para satisfacer la calidad y cantidad requerida para su estudio en la etapa de desarrollo clínico, por lo que es necesario modificar los procesos de producción estudiando los diversos factores que intervienen en su producción y su productividad.

3. HIPOTESIS

Mediante el estudio de las diferentes estrategias de cultivo en lote, se podrá aumentar la producción y la productividad de ADNp (pVAX-NH36) a nivel biorreactor.

4. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción de ADN plasmídico, utilizando diferentes estrategias, a nivel de biorreactor en un cultivo por lote.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1. Seleccionar y/o modificar un medio de cultivo para aumentar la producción y rendimientos de ADNp a nivel de biorreactor.

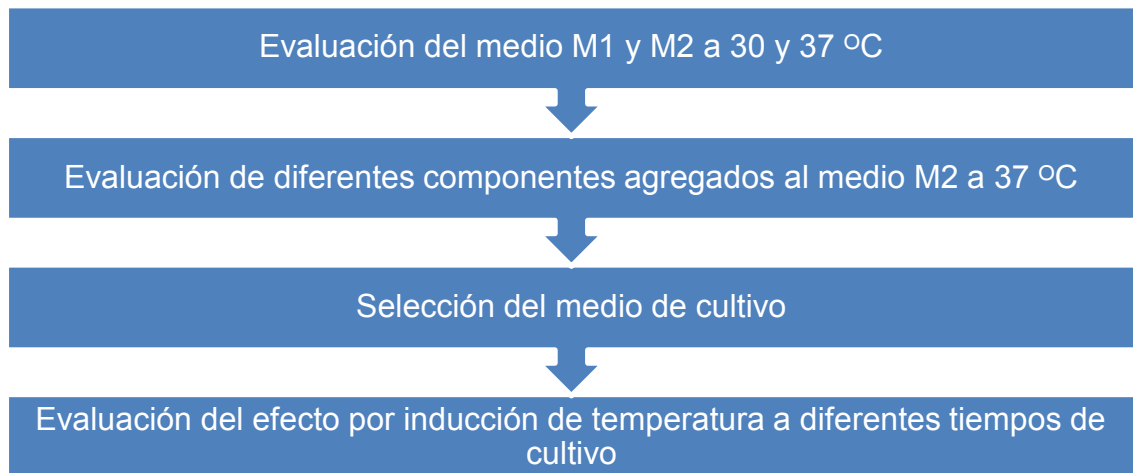
5.2. Evaluar el efecto de inducción por temperatura sobre la producción de ADNp.

5.3. Evaluar el efecto de diferentes estrategias, utilizando diferentes relaciones C/N y control de pH sobre la producción de ADNp.

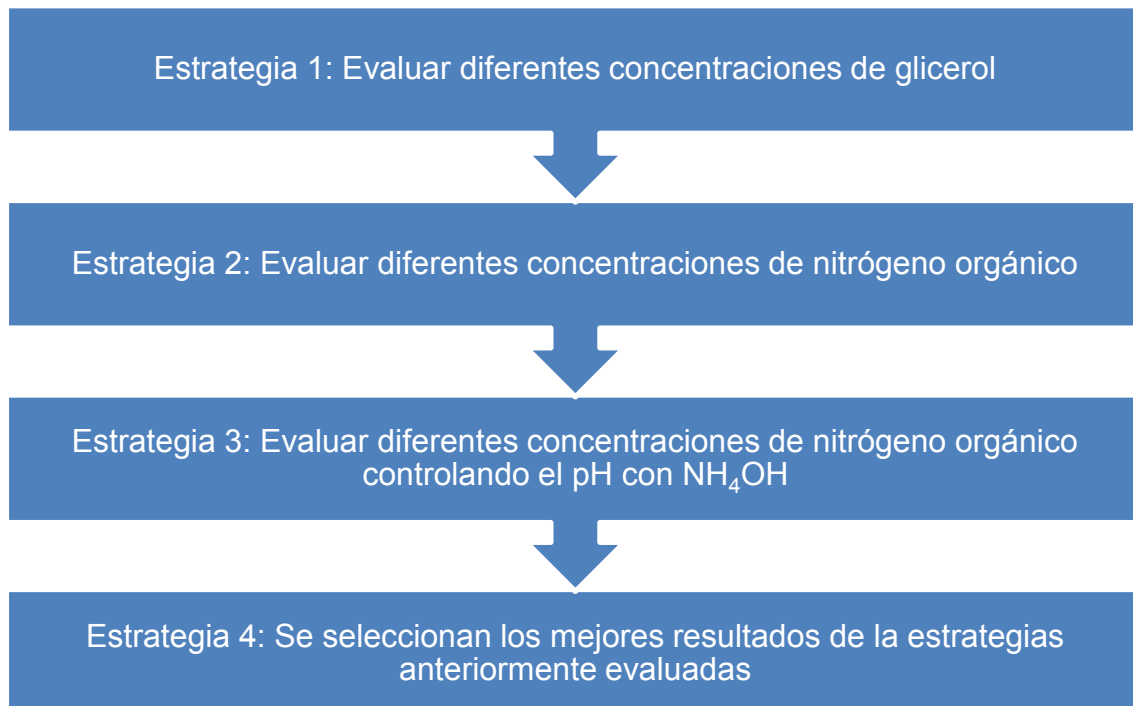
5.4. Comparar los rendimientos para seleccionar la mejor estrategia para aumentar la producción de ADNp.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

ETAPA 1



ETAPA 2



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Plásmido y cepa bacteriana

Se utilizó como cepa hospedera *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para el plásmido pVAX-NH36 (3936-pb), el cual contiene un fragmento de ADN de 936-pb que codifica para el antígeno NH36 de *Leishmania donovani* y un gen resistente a kanamicina, para propósitos de selección (Sanchez-Casco et al., 2013).

7.2 Conservación de la cepa

Se sembró 1 ml de la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pVAX-NH36 (*E. coli* DH5 α pVAX-NH36) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio LBSP (Medio LB modificado al cual se sustituyó la triptona por la peptona de soya, denominándose LBSP), el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 4M. El medio se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, después de esterilizar se le agregaron 50 μ g/ml de kanamicina. El cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 4 (OD_{600nm}). Posteriormente se agregaron al matraz 10 ml de glicerol estéril al 80% (w/v) para criopreservar las células y se repartió en alícuotas de 1 ml en viales Eppendorf de 1.5 ml, los cuales fueron congelados inmediatamente en hielo seco y almacenados a -70 °C hasta su utilización.

7.3 Preparación del inóculo

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se colocaron 50 ml de medio LBSP estéril, y 50 μ g/ml de kanamicina. Se inoculó con 1 ml de la cepa crioconservada y se incubó a 30°C y 200 rpm en una agitadora orbital (New Brunswick, USA) hasta alcanzar una densidad óptica de 4 (DO_{600nm} 4), equivalente a una biomasa de 1.5 g/L.

7.4 Medios de cultivo semidefinidos

El extracto de levadura fue adquirido por BD (MD, USA), la peptona por Dibico (México, México); la kanamicina, la tiamina y el antiespumante (antifoam 204) por Sigma-Aldrich (MO, USA); el resto de los reactivos fueron grado analítico (Sigma-Aldrich o JT Baker).

Medio 1 (M1): Medio ZMY modificado (Sanchez-Casco et al., 2013), conteniendo en (g/l): glicerol 5, glucosa 1, lactosa 5, extracto de levadura 15, N-Z-Amina 5, Na₂HPO₄ 8.954, KH₂PO₄ 3.402, NH₄Cl 2.675, Na₂SO₄ 0.710, MgSO₄ 7H₂O 1.23, adicionado con 0.2 X de solución de elementos traza. La solución de elementos traza contiene en (g/L): FeCl₃·6H₂O 6.8, CaCl₂·2H₂O 2.94, MnCl₂·4H₂O 1.98, ZnSO₄·7H₂O 2.88, CoCl₂·6H₂O 0.6, CuCl₂·2H₂O 0.34, NiCl₂·6H₂O 0.48, Na₂MoO₄·2H₂O 0.48, Na₂SeO₃ 0.35, H₃BO₃ 0.12 y HCl 2.19.

Medio 2 (M2): Medio modificado (Tatcher, 1999) conteniendo en (g/L): glicerol 50, extracto de levadura 20, peptona de soya 10, Na₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 3, (NH₄)₂SO₄ 5, MgSO₄·7H₂O 0.7, NaCl 0.5, adicionado con 0.5 ml de la siguiente solución de elementos traza, en (g/L): ZnCl₂·4H₂O 2, CoCl₂·6H₂O 2, Na₂MoO₄·2H₂O 2, CuCl₂·2H₂O 1.9, H₃BO₃ 1.6, MnSO₄·H₂O 1.6, ácido cítrico 0.6, CaCl₂·2H₂O 1.

Medio 3 (M3): Medio de trabajo diseñado, conteniendo en (g/L): glicerol 50, extracto de levadura 31.71, peptona de soya 10, Na₂HPO₄ 18.93, KH₂PO₄ 7.19, (NH₄)₂SO₄ 7.1, MgSO₄·7H₂O 2.6, NaCl 2, FeCl₃·6H₂O 0.00285, adicionado con 0.5 ml solución de elementos traza, la cual contiene en (g/L): ZnCl₂·4H₂O 2, CoCl₂·6H₂O 2, Na₂MoO₄·2H₂O 2, CuCl₂·2H₂O 1.9, H₃BO₃ 1.6, MnSO₄·H₂O 1.6, ácido cítrico 0.6, CaCl₂·2H₂O 1.

7.5 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron por duplicado en un reactor de 2 L de volumen total, el cual contenía 1 L de medio. El reactor fue inoculado con 25 ml de inóculo, el pH fue controlado automáticamente con NaOH 4M y/o H₂SO₄ 2.5 M o NH₄OH al 30% de acuerdo a la estrategia propuesta. El oxígeno disuelto (OD), se mantuvo arriba del 30% con una velocidad de agitación de 1200 rpm, 2 vvm de aire y mediante el enriquecimiento de aire con oxígeno puro. La temperatura se estableció de acuerdo a la estrategia (30 o 37°C). Se tomaron muestras a diferentes tiempos de cultivo para determinar la biomasa. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C; la pastilla celular fue congelada a -20°C para la posterior extracción y determinación de la concentración de ADNp, así como la pureza del mismo (como % de súper enrollamiento), el sobrenadante se mantuvo a 4°C para la determinación del glicerol residual por el método de Bandioli y col. (Anexo 1).

7.6 Métodos analíticos

a) Determinación de la concentración celular

La densidad óptica se midió a 600 nm (DO₆₀₀) por espectrofotometría utilizando alícuotas diluidas las cuales fueron convertidas a peso seco por medio de una curva de calibración: Biomasa (g/L) = 0.38 x DO₆₀₀, siempre que la DO₆₀₀ < 0.4. La curva de calibración se obtuvo de diferentes muestras tomadas durante el cultivo, 10 mL de cada muestra se centrifugaron (centrifuga Sorval) a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Las pastilla celulares se lavaron y se secaron en estufa a 85°C toda la noche hasta peso constante.

b) Determinación de la cantidad de plásmido

Las muestras tomadas se diluyeron 1:10 con agua destilada, y una alícuota de cada muestra equivalente a 300 mg de Biomasa se centrifugó a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Los pellets se almacenaron a -20 °C para su

posterior análisis. El ADNp fue extraído por medio del Kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADNp se midió espectrofotométricamente a DO_{260nm} y DO_{280nm} usando el espectrofotómetro NanoDrop UV ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE) y se calculó mediante la siguiente correlación: $DO_{260nm} = 1$ corresponde a 50 mg/L en una solución purificada.

c) Cuantificación del ADNp súper enrollado

El ADNp súper enrollado y el ADNp total se determinó por densitometría en geles de agarosa al 0,8% utilizando regulador TBE (45 mM Tris HCl pH = 8.0, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA pH = 8.0) por 90 min a 50 V y teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml). La concentración de ADNp fue estimada mediante un análisis de las intensidades de banda, utilizando el Software Image J 1.47 y una cantidad conocida de un 1 kb DNA Ladder calibrado (New England Biolabs, EE.UU.) como estándar.

d) Determinación de la productividad volumétrica de ADNp

La productividad volumétrica se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Productividad\ volumétrica = \frac{Concentración\ de\ plásmido}{Tiempo} = \frac{mg}{L\ h}$$

e) Determinación de glicerol

El consumo del glicerol se determinó por el método reportado por Bandioli (Bandioli et al. 2005), el cual consiste en la oxidación del glicerol con el periodato para su conversión a formaldehído, el cual a su vez, se hace reaccionar con acetilacetona en presencia de acetato de amonio para formar 3,5-diacetil-1.4-dihidrolotidina, el cual se midió por espectrofotometría a 410 nm (Anexo 3).

f) Determinación de la Relación C:N

La concentración de carbono y nitrógeno total del extracto de levadura, peptona de soya y bacto-triptona fueron calculados de los datos obtenidos del equipo Shimadzu TOC-Vcsn equipado con el módulo TNM-1 (Shimadzu, México). Las soluciones utilizadas para determinar el carbono y nitrógeno total del extracto de levadura, peptona de soya y bacto-triptona fueron preparadas a 1 g/L con agua Milli-Q. Las soluciones fueron transferidas a los viales y fueron analizadas automáticamente.

La concentración de carbono y nitrógeno total del glicerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4OH fueron calculadas mediante la división de la masa molar de cada componente, entre la masa molar del compuesto, multiplicada por 100.

Las concentraciones obtenidas de carbono y nitrógeno total fueron las siguientes: Extracto de levadura (39.95% Carbono, 10.17% Nitrógeno), peptona de soya (39.94% Carbono, 9.09 % Nitrógeno), bacto-triptona (45.88% Carbono, 11.78 % Nitrógeno), Glicerol (39% Carbono), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (21% Nitrógeno) y NH_4OH al 30% (215 g Nitrógeno/L).

La relación C:N fue calculada de acuerdo al Carbono y Nitrógeno total presente en los componentes del medio de cultivo

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Producción de ADNp en un cultivo por lote en diferentes medios de cultivo a dos diferentes temperaturas

Los medios de cultivo semidefinidos han sido ampliamente utilizados para la producción de plásmido, los cuales se componen de una porción definida (fuente de carbono, sales, elementos traza, etc.) y una porción compleja (fuente de nitrógeno). Los componentes complejos comúnmente usados son el extracto de levadura y las peptonas, los cuales además suministran factores de crecimiento, aminoácidos, purinas, etc.

Se evaluaron 2 medios de cultivos ya reportados, con el fin de obtener un tercer medio para incrementar la producción de plásmido. El medio M1, el cual contenía una mezcla de glucosa, glicerol y lactosa como fuente de carbono y NZ-Amina y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, minerales y aminoácidos; y el Medio M2, el cual contenía glicerol como fuente de carbono, extracto de levadura y peptona de soya como fuentes de nitrógeno, minerales y aminoácidos (Materiales y Métodos). Estos medios se evaluaron a dos temperaturas: 30 y 37°C, realizando los experimentos por duplicado. Se determinaron los siguientes parámetros: biomasa, producción de ADNp, el rendimiento específico y la productividad volumétrica del plásmido. Las muestras se tomaron a lo largo del cultivo, observándose que durante la fase estacionaria, se obtuvo la máxima producción de plásmido. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Biomasa, producción, rendimiento y productividad de plásmido en *E. Coli* DH5α transformada con la construcción pVAX-NH36 en un cultivo en lote

	Biomasa (g/L)	Plásmido (mg/L)	Rendimiento (mg/g)	Productividad (mg/L h)	μ (h⁻¹)
M1 30°C	8.2 ± 0.12	9.8 ± 2	1.19 ± 0.2	0.44 ± 0.07	0.28
M2 30°C	21.67 ± 1.24	30 ± 4	1.23 ± 0.31	1.78 ± 0.1	0.32
M1 37°C	8.91 ± 0.5	34.88 ± 4	3.91 ± 0.3	3.87 ± 0.6	0.57
M2 37°C	25.64 ± 0.63	73.9 ± 3.4	2.88 ± 0.18	6.72 ± 0.8	0.38

Los valores máximos de biomasa, producción de plásmido y productividad volumétrica, se obtuvieron utilizando el medio M2 a 37°C, los cuales representaron un incremento de 2.9, 2.12 y 1.74 veces más con respecto al medio M1 a la misma temperatura. Aunque los valores máximos de rendimiento y velocidad de crecimiento, se obtuvieron con el M1 a 37°C, lo cual representa un incremento de 1.4 y 1.5 veces, respectivamente, con respecto al medio M2, se seleccionó el medio M2 a 37°C para los siguientes experimentos.

8.2 Evaluación de nutrientes agregados al medio M2

El tipo y la fuente de nutrientes tienen efecto sobre la producción de plásmidos. Con el objeto de mejorar el medio de cultivo M2, se evaluó el incremento de las fuentes de nitrógeno (Extracto de levadura + (NH₄)₂SO₄), fuente de fosfatos (Na₂HPO₄+KH₂PO₄), Magnesio (MgSO₄·7H₂O) y de Hierro (FeCl₃·6H₂O) que son de suma importancia para la producción de plásmido.

Se realizó un análisis de los compuestos a evaluar de los medios de cultivo M1 y M2, la concentración de los nutrientes adicionados al M2 se calculó mediante la siguiente regla de 3.

$$x = \frac{y * 74}{35}$$

Donde:

x = Concentración del componente que se va a adicionar al M2 en g/L

y = Concentración del componente presente en el medio M1 en g/L

74 = El valor máximo de plásmido obtenido con 50 g/L de glicerol en el medio M2

35 = Es el valor máximo de plásmido obtenido en el medio M1

Las concentraciones de los compuestos a evaluar, calculados con la regla de 3 se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la concentración de los componentes a evaluar en el medio M2

	Medio	Concentración calculada (g/L)
1	Extracto de levadura	31.71
2	Na ₂ HPO ₄	18.93
3	KH ₂ PO ₄	7.19
4	(NH ₄) ₂ SO ₄	7.1*
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.6
6	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.00285

*La concentración del (NH₄)₂SO₄ se calculó tomando como base el Nitrógeno presente en el NH₄Cl del medio M1

Cabe señalar que todas las concentraciones calculadas son mayores a las iniciales en el medio M2.

Con los resultados obtenidos, se propusieron varios diseños experimentales de factor simple, los cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Experimentos propuestos para la evaluación de los nutrientes adicionados al medio M2

	Medio	N	P	Mg	Fe
1	M2	-	-	-	-
2	M2+N	+	-	-	-
3	M2+P	-	+	-	-
4	M2+Mg	-	-	+	-
5	M2+Fe	-	-	-	+
6	M2+T	+	+	+	+

Donde:

N = Extracto de levadura + (NH₄)₂SO₄

P = KH₂PO₄ + Na₂HPO₄

Mg = MgSO₄·7H₂O

Fe = FeCl₃·6H₂O

T = N + P + Mg + Fe

Los resultados de estos experimentos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Evaluación de los componentes del medio agregados al medio M2

Medio	Biomasa (g/L)	Plásmido (mg/l)	Rendimiento específico (mg/g)	Productividad volumétrica (mg/L h)
M2	25.64 ± 0.63	73.9 ± 3.4	2.88 ± 0.18	6.71 ± 0.27
M2+N	31.6 ± 1.24	115 ± 4	3.64 ± 0.31	11.5 ± 0.78
M2+P	23.84 ± 0.4	79.23 ± 3.8	3.32 ± 0.25	7.92 ± 0.86
M2+Mg	23.75 ± 0.42	185 ± 9	7.79 ± 0.6	18.5 ± 0.95
M2+F	24.24 ± 0.5	108 ± 4	4.45 ± 0.3	10.8 ± 0.62
M2+T	29.49 ± 2	295 ± 14	10.11 ± 1	15.59 ± 0.62

De estos experimentos se concluyó que la adición de Mg, tuvo una marcada influencia en la producción del plásmido, aumentando 2.5 veces su producción y prácticamente 3 veces su productividad. Sin embargo, al adicionar todos los nutrientes juntos, se presentó un aumento considerable de la producción del plásmido y el rendimiento específico, los cuales presentaron un incremento de 4 y 3.5 veces más respectivamente, que con los obtenidos con el medio M2.

A esta nueva formulación del medio de cultivo, se le denominará Medio M3 y es con el que se seguirá trabajando en los siguientes experimentos.

Se corroboró la presencia del plásmido pVAX-NH36 realizando un perfil electroforético, tomando muestras del cultivo a diferentes tiempos. Mediante el análisis, utilizando el software ImageJ versión 1.7, comparando la intensidad de las bandas con un estándar, podemos observar que más del 90% corresponde a plásmido súper enrollado.

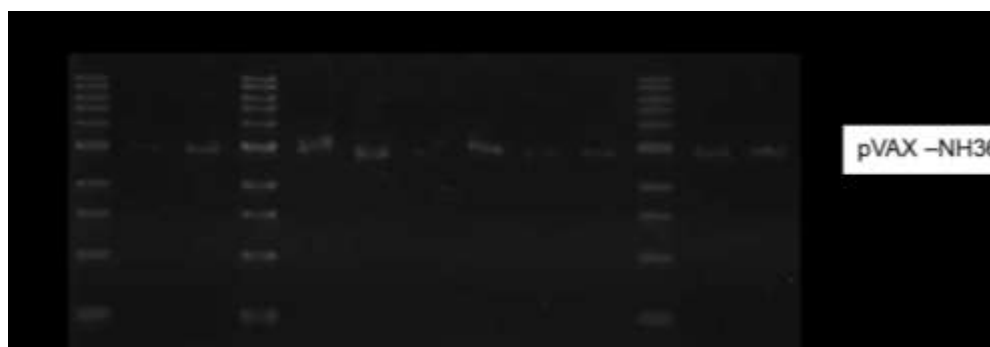


Figura 3. Perfil electroforético del plásmido pVAX-NH36, carriles 1-10: corresponden a los diferentes tiempos de cultivo (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas) en el medio M3 a 37°C, carril M marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA ladder (New England Biolabs).

Existen diferentes reportes sobre el uso de diferentes tipos de medios de cultivo y fuentes de nutrientes para la producción de ADN plasmídico, los cuales se han utilizado tanto a nivel de matraz, como de biorreactor (cultivos en lote y lote alimentado). Entre los medios más utilizados en cultivos de *E. coli*, están los medios mínimos, medios definidos y medios semidefinidos. Los medios semidefinidos contienen componentes complejos como son extracto de levadura, casaminoácidos y peptonas, los cuales son las principales fuentes de nitrógeno, además suministran carbono, minerales, factores de crecimiento, aminoácidos, purinas y pirimidinas. El uso de medios

semidefinidos presenta la ventaja de soportar altas densidades celulares, y por lo tanto alta producción de ADNp.

Con respecto a los reportes sobre medios de cultivo semidefinidos, para la producción de plásmidos, a nivel de matraz y en biorreactores. Por ejemplo, a nivel de matraz, se han obtenido producciones en el rango de 2.8 hasta 24.88 mg/L (Danquah and Forde, 2007; Ongkudon et al., 2011; Sanchez-Casco et al., 2013; Zheng et al., 2007), al igual se ha realizado la optimización de diferentes medios semidefinidos a nivel de matraz, con los cuales se han probado diferentes niveles de concentración de la fuente de nitrógeno y fosfato inorgánico, utilizando *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pCMV-AP3, con lo cual se obtuvieron producciones de ADNp de hasta 60.8 mg/L (Xu et al., 2005). Comparando con cultivos en matraz, en este trabajo se obtuvieron concentraciones 5 veces mayor. Los bajos rendimientos obtenidos a nivel de matraz, en comparación a los obtenidos en biorreactor, en este trabajo, se deben a que a nivel de biorreactor se puede realizar control de pH y además el cultivo no se limita por oxígeno.

En cultivos en biorreactor, en lote, también se han evaluado diferentes medios semidefinidos, variando la concentración de sales de amonio (Voss et al., 2004), agregando aminoácidos y nucleósidos al medio de cultivo (Wang et al., 2001), optimizando la relación C/N del medio (Danquah and Forde, 2007), al igual existen reportes de medios patentados NTC3018, optimizado en nutrientes y elementos traza, con los cuales se han alcanzado producciones de hasta 84 mg/L (Carnes et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo con el medio M3, muestran una producción de ADNp 3.5 veces mayor, con respecto a los valores máximos reportados con medios optimizados para la producción de plásmido.

En la formulación del medio M3 cabe señalar el uso de glicerol como fuente principal de carbono en lugar de la glucosa. Los cultivos, en los cuales se utiliza la glucosa como fuente de carbono, presenta velocidades de crecimiento altas, las cuales están asociadas a la producción de acetatos (Carnes, 2005). Phue et al. (Phue et al., 2008), reporto cultivos de *E. coli* DH5 α , utilizando glucosa o glicerol como fuente de carbono, y obtuvo que con 70 g/L de glucosa se produjo una concentración de acetatos de 4 g/L y con una concentración similar de glicerol la producción de acetatos es muy cercana a cero. Al igual el medio M3 fue formulado sin productos de origen animal, como son la triptona, para cumplir con las especificaciones de la FDA, por sus siglas en inglés (FDA, 2007).

La adición de sales y minerales, como son el fósforo, magnesio, hierro, azufre son necesarios para el crecimiento de la bacteria, y en algunos casos funcionan como cofactores en las reacciones enzimáticas. El carbono, el nitrógeno y el fósforo son los principales componentes del ADN.

Schmidt et al. (2003) patentaron un medio de cultivo, en el cual establecieron las concentraciones de diferentes nutrientes que favorecen la producción de ADNp súper enrollado, en cultivos en lote y lote alimentado a nivel de biorreactor. Las concentraciones reportadas para los cultivos en lote son: fuente de nitrógeno $\leq 30\%$, $MgSO_4 \leq 0.3$ g/L, $Na_2HPO_4 \leq 6$ g/L, $KH_2PO_4 \leq 3$ g/L, $FeCl_3 \leq 54$ mg/L. Comparando estas concentraciones, con las obtenidas en este trabajo, para el medio M3, podemos observar que las de este trabajo son mayores, por este motivo se observa el incremento en la producción de plásmido. Comparando los resultados obtenidos, en este trabajo se obtiene 1.5 veces mayor producción de ADNp.

El incremento de estos nutrientes favoreció la producción de ADNp, ya que el magnesio funciona como cofactor de la síntesis de material genético, los

fosfatos (fósforo) y el nitrógeno son de los principales componentes del ADNp.

Otros minerales esenciales para las reacciones enzimáticas son calcio, cobre, cobalto, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, los cuales generalmente son alimentados como trazas a los medios de cultivo, o en este caso pueden estar contenidos en las fuentes complejas de los medios semidefinidos.

8.3 Evaluación del incremento de la temperatura a diferentes tiempos de cultivo

Uno de los procedimientos más comunes, cuando se utilizan plásmidos de alto número de copias, para aumentar la producción de ADNp, es realizando una inducción, mediante un incremento de temperatura durante el cultivo, con el fin de aumentar el número de copias del plásmido, por lo que en esta etapa se realizaron experimentos, incrementando la temperatura a diferentes tiempos del cultivo (8, 10 y 12 horas) de 37°C a 42°C. El incremento se realizó con una velocidad de calentamiento de 0.08 °C/min, cuantificándose la biomasa, el ADNp y determinando el rendimiento específico y la productividad volumétrica.

Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Tabla de resultados del incremento de temperatura en el medio M3 a las 8, 10 y 12 horas de cultivo.

	M3 a 37°C	8 h	10 h	12 h
Biomasa (g/l)	34.47 \pm 1.6	24.31 \pm 0.4	25.72 \pm 1.78	25.2 \pm 1.98
Plásmido (mg/l)	229.8 \pm 13	122.29 \pm 16	127.88 \pm 8.13	192.01 \pm 17.26
Tiempo de cultivo (h)	13	13	13	15
Temperatura de toma de muestra °C	37	42	42	42
Rendimiento (mg/g)	7.02 \pm 0.38	5.08 \pm 0.7	5.02 \pm 0.67	7.71 \pm 1.29
Productividad (mg/L h)	17.66 \pm 2.69	9.4 \pm 0.6	9.84 \pm 0.5	12.8 \pm 1.2
ADNp-se (%)	90	81	91	93

Como se puede observar, cuando la temperatura se incrementó a 42°C a las 12 horas de cultivo, la producción de ADNp, el rendimiento específico, productividad y % de ADNp súper enrollado fueron más altos, cabe mencionar que aunque el cultivo se dejó hasta las 15 h, no se presentó ninguna mejoría.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el cultivo del medio M3 a 37°C, en donde no se realizó el incremento de temperatura, no se presenta incremento en la producción de ADNp, al contrario, se presenta una disminución del 20% de dicha producción, por lo que podemos concluir que bajo las condiciones que se trabajaron el incremento de la temperatura no presenta ningún efecto sobre la producción de ADNp.

Se han reportado trabajos, en donde se realizan incrementos de temperatura durante el cultivo, de acuerdo al tipo de plásmido que se esté utilizando, para aumentar la producción de plásmido (Bower et al., 2012; Carnes et al., 2006; Jaén et al., 2013). En este trabajo se está utilizando un plásmido con origen

de replicación pUC, el cual esta reportado que se aumenta la producción del plásmido al realizar un incremento de temperatura. El origen de replicación pUC presenta una mutación puntual de G por A, la cual previene el plegamiento normal de RNAI, en consecuencia se presenta una unión ineficiente entre RNAI y RNAII, lo cual incrementa la replicación del plásmido, cuando se realiza un incremento de temperatura entre 42 y 45°C. (Lin-chao et al., 1992). Bajo las condiciones de cultivo que se está trabajando, la producción de plásmido no se vio favorecida con el incremento de la temperatura de 37°C a 42°C.

En los estudios realizados se han reportado concentraciones de ADNp de hasta 250 mg/L en cultivos en biorreactor (Lahijani et al., 1996); sin embargo, cuando se realiza un incremento de temperatura durante el cultivo, generalmente de 30 a 37, 30 a 42 o 30 a 42 °C en cultivos en lote, se han reportado valores de hasta 1.5 g/L (Carnes et al., 2006). En este trabajo no se observa un aumento en la producción de ADNp al realizar la inducción por incremento de temperatura, esto se puede deber, a que la velocidad de crecimiento alcanzada en el biorreactor es alta (0.4 h⁻¹), que cuando se realiza el incremento de la temperatura, se continua con un crecimiento acelerado de la bacteria, en lugar del aumento del número de copias del plásmido. Carnes et al., 2006 reporta una μ_{\max} de 0.26 h⁻¹ antes de realizar la inducción por incremento de temperatura.

8.4 Evaluación de diferentes estrategias para incrementar la producción de ADNp en cultivos en lote

Se desarrollaron diferentes estrategias, mediante 3 diseños experimentales de factor simple, basados en el cambio de la composición del medio de

cultivo en términos de las fuentes de carbono y nitrógeno y la modificación del control de pH utilizando NaOH o NH₄OH. La última estrategia fue desarrollada con los mejores resultados obtenidos.

1) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de glicerol, manteniendo la concentración de nitrógeno orgánico constante

La producción de ADNp se evaluó en el medio mineral M3 suplementado con una concentración de nitrógeno orgánico de 42 g ELPS/L con diferentes concentraciones de glicerol (0, 30, 50 y 70 g/L) en un cultivo por lote. El pH se ajustó a 7 antes de la inoculación y durante la fermentación, se controló mediante la adición automática de NaOH 4M y H₂SO₄ 2M para mantener un valor de pH entre 6.8 y 7.5.

Para mejorar la producción de ADNp, es necesario el incremento de la biomasa, rendimiento específico y productividad volumétrica. Una alta biomasa de *E. coli* en cultivos en lote se consigue con una alta concentración de fuente de carbono. La glucosa es una de las fuentes de carbono más utilizadas; sin embargo, debido al sobre-flujo metabólico, el glicerol se puede utilizar como una alternativa, por lo general resulta en mayores producciones de plásmido por biomasa.

La biomasa, producción de plásmido, rendimiento específico y productividad volumétrica obtenidos con diferentes concentraciones de glicerol se muestran en la tabla 7.

La biomasa, el ADNp, el rendimiento específico y la productividad se incrementan con el aumento de la concentración de glicerol de 0 a 50 g/L

(relación molar C/N de 3.49 a 7.5), presentando la mayor producción de ADNp, rendimiento específico y productividad volumétrica a 50 g/L, y la mayor biomasa a 70 g/L de glicerol; sin embargo, a esta concentración ya no se presenta incremento de ADNp, rendimiento específico y productividad volumétrica, como podemos observar en la tabla 7. Al igual, el rendimiento $Y_{X/G}$ disminuyó de 0.51 a 0.48 g/g con 70 g/L de glicerol.

Los máximos valores de producción de ADNp (229.8 mg/L), rendimiento específico (7.02 mg/g), productividad (17.66 mg/L h) y ANDp-se (89.42) fueron alcanzados cuando se utilizó 50 g/L de glicerol con una relación molar C/N de 7.5 (Tabla 7C). La μ_{max} alcanzada fue similar entre 0 y 30 g glicerol/L y disminuyó linealmente con el incremento de la concentración de glicerol hasta 0.53 h⁻¹.

En todos los casos, la concentración máxima de ADNp se alcanza en la fase estacionaria, donde se presenta un incremento en el %OD y pH, cuando el glicerol es consumido completamente, el incremento del %OD se presenta ya que al terminarse la fuente de carbono, la bacteria deja de crecer y ya no requiere oxígeno.

Cuando el medio mineral fue suplementado con 42 g/L de ELPS/L sin glicerol, se obtuvo una biomasa de 8.87 g/L, lo que sugiere que la mezcla ELPS también es usada como fuente de carbono para el crecimiento celular, obteniéndose un rendimiento experimental de biomasa ($Y_{X/ELPS}$) de 0.21 g/g (Tabla 7A). Durante estos experimentos, una solución de H₂SO₄ fue necesaria para mantener el pH en 7.5. Bajo estas condiciones de cultivo, la concentración de nitrógeno total fue 5.62 g/L y considerando un rendimiento de nitrógeno de 0.15 g de Nitrógeno/ g de célula, teóricamente es posible alcanzar una biomasa de 37.5 g/L, por lo tanto los cultivos de 0 a 50 g/L de glicerol fueron diseñados sin limitaciones de nitrógeno.

En esta estrategia se estableció la concentración de 50 g/L de glicerol para los siguientes experimentos, ya que con esta se obtuvieron los valores máximos de producción de ADNp, rendimiento específico, productividad volumétrica y rendimiento experimental de biomasa ($Y_{X/ELPS}$).

Tabla 7. Tabla de resultados con diferentes concentraciones de glicerol inicial.

	A	B	C	D
Glicerol (g/L)	0	30	50	70
ELPS (g/L)	42	42	42	42
Relación C/N	3.49	5.87	7.5	9.11
Biomasa (g/L)	8.87 \pm 0.3	22.64 \pm 1.44	34.47 \pm 1.6	42.21 \pm 3.22
Plásmido (mg/L)	26.58 \pm 2.82	116.74 \pm 14	229.8 \pm 13	217.23 \pm 8.75
Rendimiento específico (mg/g)	2.99 \pm 0.22	5.35 \pm 0.46	7.02 \pm 0.38	5.15 \pm 0.62
Productividad volumétrica (mg/L h)	3.32 \pm 0.35	12.36 \pm 2.37	17.66 \pm 2.69	15.51 \pm 0.61
ADNp-se (%)	88.48 \pm 1.5	88.04 \pm 0.86	89.42 \pm 1.4	91.05 \pm 1.49
μ_{max} (h⁻¹)	0.6 \pm 0.01	0.6 \pm 0.01	0.55 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02
$Y_{X/ELPS}$ (g/g)	0.21 \pm 0.01	----	----	----
$Y_{X/G}$ (g/g)	----	0.46 \pm 0.04	0.51 \pm 0.03	0.48 \pm .03

2) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico manteniendo constante el glicerol en 50 g/L

En la estrategia 1 se estableció la concentración de 50 g/L de glicerol. La producción de ADNp se evaluó a diferentes concentraciones de ELPS (42,

35.45, 29.19, 22.94, 16.68, 8.34 y 0 g/L) en un cultivo por lote. Cuando el medio de cultivo no contenía ELPS, se agregó al cultivo, una solución de tiamina (20 mg/L) esterilizada por filtración. El pH se ajustó a 7 antes de la inoculación y durante la fermentación se controló mediante la adición automática de NaOH 4M para mantener un valor arriba de 6.8.

La producción de plásmido fue evaluada a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico de 42 a 0 g/L, con esta reducción de concentración, la relación molar de C/N se incrementó de 7.5 a 15. La biomasa, la producción de ADNp, el rendimiento específico y la productividad volumétrica con diferentes concentraciones de ELPS se muestran en la figura 4 (círculos abiertos).

La biomasa, la producción de ADNp y la productividad volumétrica disminuyen con la reducción de la concentración de ELPS de 42 a 0 g/L (Figura 4A, 4B y 4D). El rendimiento específico se incrementó solo hasta 8.3 mg/g, cuando la concentración de ELPS utilizada fue de 8.34 g/L con una relación molar C/N de 11.44 (Figura 4C círculos abiertos). Los máximos valores obtenidos con 8.34 g/L fueron: biomasa (14.57 g/L), producción de ADNp (120.7 mg/L), rendimiento específico (8.3 mg/g) y productividad volumétrica (3.7 mg pDNA/L h). El rendimiento experimental de glicerol $Y_{X/G}$ disminuye de 0.5 a 0.25 cuando la concentración de ELPS disminuye de 42 a 8.34 g/L. A diferentes concentraciones de ELPS, el máximo rendimiento fue alcanzado durante la fase estacionaria.

El cultivo sin ELPS fue suplementado con tiamina (20 mg/L) para evitar limitaciones nutricionales, debido a que *E. coli* DH5 α es dependiente de tiamina (thi-1). Los resultados obtenidos de este cultivo fueron 13.5 g/L de biomasa, 65 mg/L de ADNp, 4 mg/g de rendimiento específico y 1.77 mg/L h de productividad volumétrica (Figura 4A, B, C, D). Bajo estas condiciones, el

cultivo presenta limitación de nitrógeno, ya que solo contiene 1.49 g/L de nitrógeno, provenientes del (NH₄)₂SO₄.

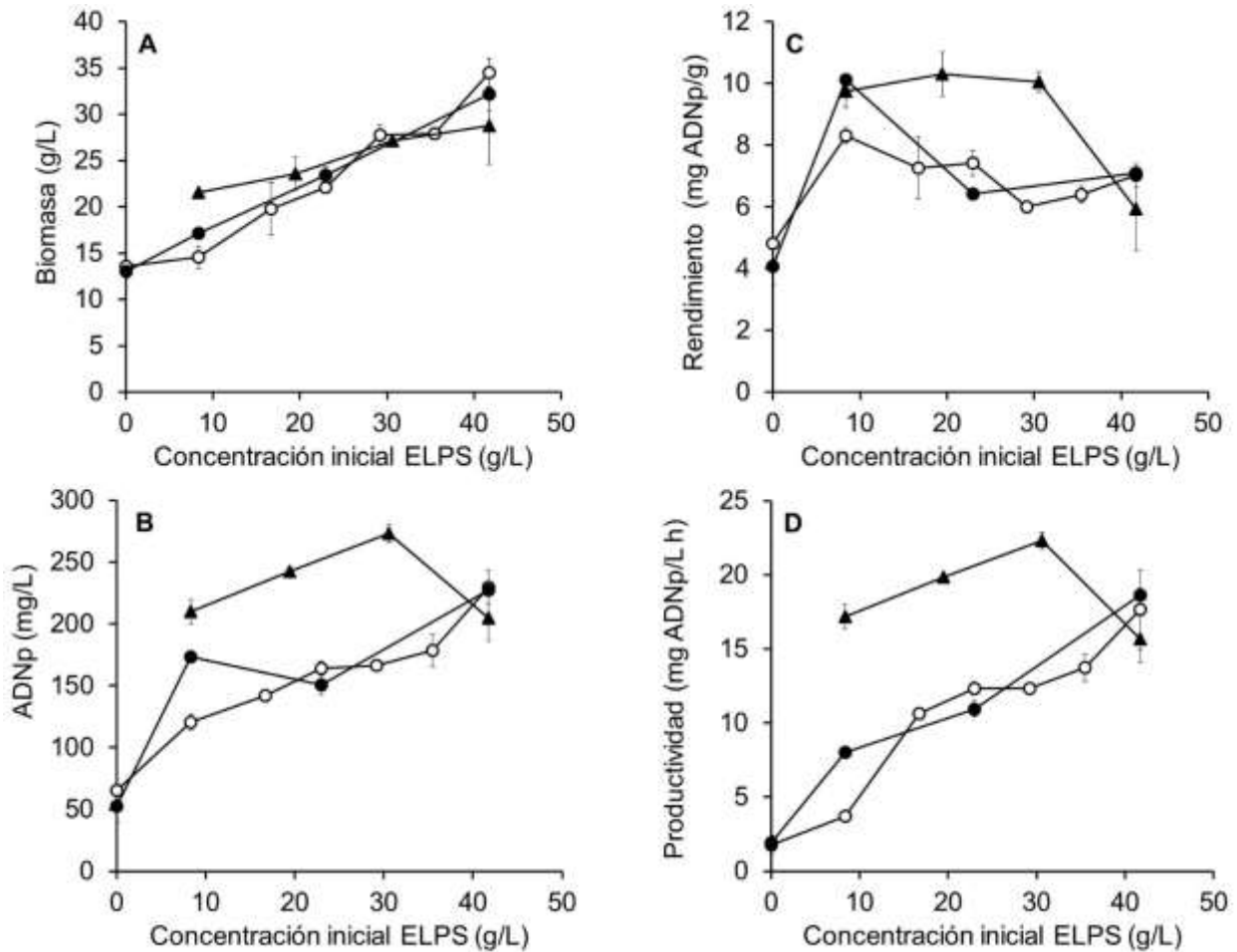


Figura 4. Efecto de la concentración inicial de ELPS: (A) Biomasa, (B) ADNp, (C) Rendimiento específico y (D) Productividad volumétrica de *E. coli* DH5 α -pVAX.NH36 en un cultivo en lote, creciendo en medio mineral M3 con 50 g/L de glicerol a 37°C, controlando el pH con NaOH (o), controlando el pH con NH₄OH (●), inicio del control del pH con NH₄OH cuando se consume la fuente de nitrógeno orgánico (▲).

3) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico, manteniendo constante el glicerol en 50 g/L y realizando el control de pH con NH₄OH

La concentración de glicerol se estableció en la estrategia 1. La producción de ADNp se evaluó a diferentes concentraciones de ELPS (42, 22.94, 16.68, 8.34 y 0 g/L) en un cultivo por lote. Cuando el medio de cultivo no contenía ELPS, se agregó al cultivo, una solución de tiamina (20 mg/L) esterilizada por filtración. El pH se ajustó a 7 antes de la inoculación y durante la fermentación, se controla mediante la adición automática de NH₄OH al 30% para mantener un valor arriba de 6.8.

La biomasa, la producción de ADNp, el rendimiento específico y la productividad volumétrica con diferentes concentraciones iniciales de ELPS, controlando el pH con NH₄OH, se muestran en la Figura 4 (círculos cerrados).

La biomasa y la productividad volumétrica disminuyeron cuando se redujo la concentración de ELPS de 42 hasta 0 g/L (Figura 4A y D), el rendimiento específico se incrementó solo hasta 8.3 mg/g cuando la concentración de ELPS utilizada fue de 8.34 g/L (relación molar C/N de 11.44).

Cuando la concentración de ELPS fue reducida en la estrategia 2, la productividad también se redujo, lo cual puede ser atribuido a la reducción de la concentración de nitrógeno. Por lo que en esta estrategia el control de pH se realizó con NH₄OH para evitar que la concentración de nitrógeno sea el factor limitante, aunque solo tuvo efecto sobre la producción de ADNp cuando la concentración de ELPS se redujo a 8.34 g/L (Figura 4 círculos

cerrados). Con esta concentración, se obtuvieron 173.2 mg/L de ADNp, 10.1 mg/g de rendimiento específico y 8 mg/L h de productividad volumétrica, las cuales representan un incremento de 43, 22 y 116% respectivamente con respecto a los resultados obtenidos en la estrategia 2, donde el control de pH se realizó con NaOH. Sin embargo, la producción de ADNp y la productividad volumétrica obtenidas, fueron más bajas con respecto a las obtenidas a concentraciones más altas de ELPS. La baja productividad no puede ser atribuida a la limitación de nitrógeno, debido a que el control de pH se llevó a cabo con amonio.

Los siguientes experimentos se suplementaron con tiamina (20 mg/L), para prevenir que la baja concentración de tiamina afecte la productividad de ADNp. El efecto de la concentración de tiamina se puede apreciar más claramente cuando se utilizó la concentración de ELPS de 8.34 g/L en experimentos adicionales.

4) Producción de ADNp a diferentes concentraciones de nitrógeno orgánico, manteniendo constante el glicerol en 50 g/L y realizando el control de pH con NH₄OH

Esta estrategia fue diseñada de acuerdo a los resultados obtenidos de las estrategias anteriores. Cuando la concentración inicial de ELPS fue reducida, algunos factores de crecimiento fueron reducidos, incluyendo la tiamina, por lo que el medio de cultivo fue complementado con tiamina (20 mg/L). Se eliminó el (NH₄)₂SO₄ del medio mineral M3, para forzar el consumo del nitrógeno orgánico provisto por la mezcla ELPS. El control del pH se inició con la adición de NH₄OH al 30% hasta alcanzar un valor de 7.5, cuando el nitrógeno orgánico fue consumido y el valor de la biomasa alcanzado corresponde con el rendimiento de nitrógeno teórico (Figura 5C). Los

resultados obtenidos utilizando esta estrategia se muestran en la Figura 4 (triángulo cerrado).

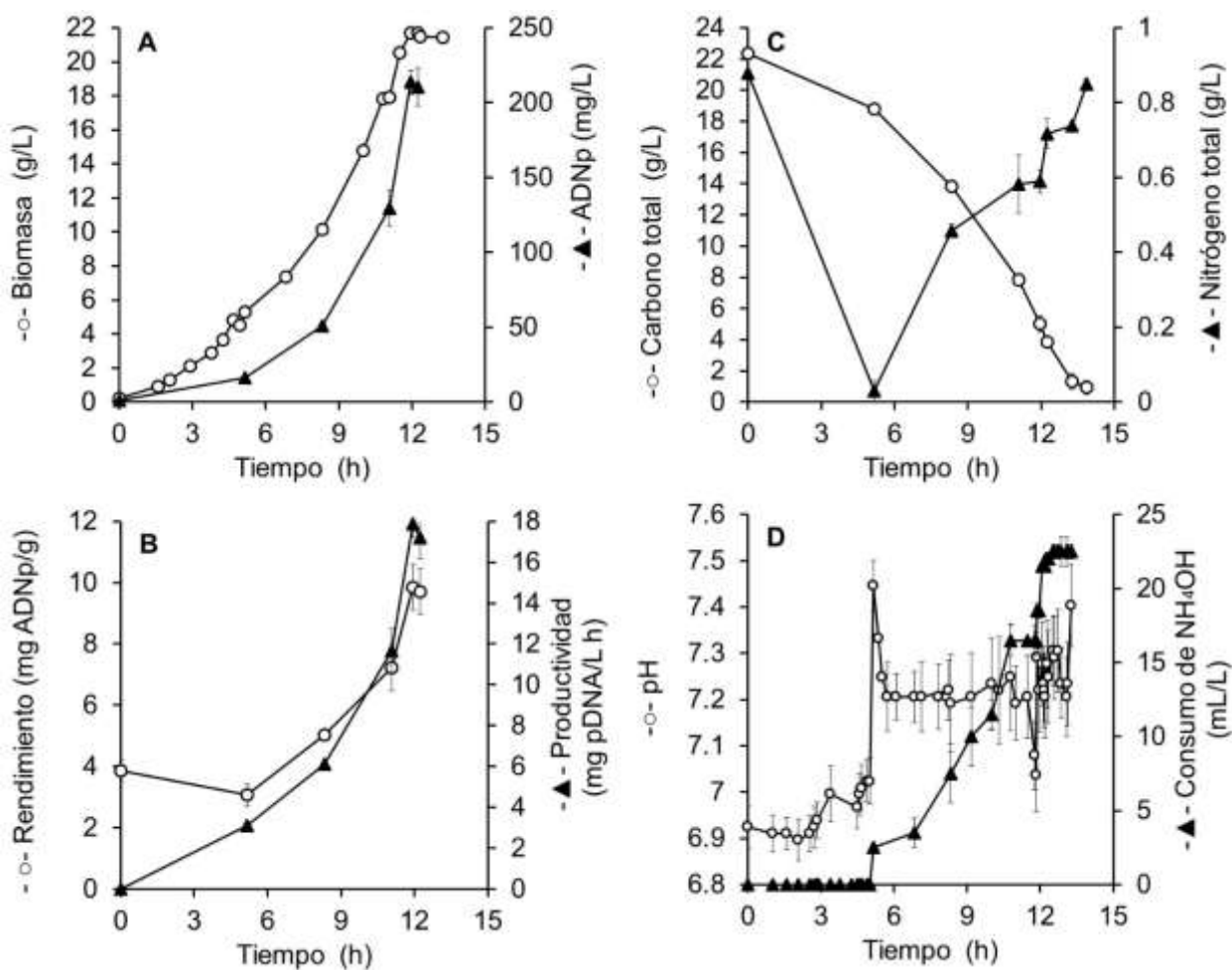


Figura 5. Producción de *E. Coli* DH5 α transformada con la construcción pVAX-NH36 en un cultivo en lote eliminando del medio mineral M3 el (NH₄)₂SO₄ con 50 g/L de glicerol, 8.34 g/L de ELPS y 20 mg/L de tiamina. Biomasa y producción de ADNp (A), Rendimiento específico y productividad volumétrica (B), Consumo de carbono y nitrógeno total (C) y pH y consumo de NH₄OH (D).

Bajo estas condiciones, se obtuvo un rendimiento experimental de sustrato de 0.4 g/g ($Y_{X/S}$), pero cuando la concentración de ELPS se incrementó de 8.34 hasta 30.6 g/L, la producción de ADNp y la productividad volumétrica se incrementaron de 210 a 273 mg/L y 17.2 a 22 mg/L h, respectivamente, y el rendimiento específico de 9.7 mg/g se mantuvo constante. Sin embargo con la concentración de ELPS de 42 g/L, estos valores disminuyeron (Figura 4B, C y D).

Cuando la concentración de ELPS se incrementó 267%, la producción de ADNp y la productividad volumétrica solo se incrementaron 30%. Por esta razón, consideramos la concentración de ELPS de 8.34 g/L como la más adecuada. Los resultados obtenidos con esta concentración se muestran en la Figura 5. La relación molar C/N inicial fue de 32.24 y se disminuyó hasta 4.24 durante el cultivo, debido a la adición de NH_4OH para el control del pH. El crecimiento muestra un crecimiento diaúxico (Figura 5A), debido a que la fuente de carbono es provista por el ELPS y el glicerol. La velocidad de crecimiento μ_{max} fue de 0.57 h^{-1} durante la primera fase exponencial hasta que se alcanzó una biomasa de 5 g/L. Después, la segunda fase de crecimiento exponencial μ_{max} fue de 0.22 h^{-1} hasta que se alcanzó la fase estacionaria (Figura 5A). Con la concentración de ELPS de 8.34 g/L en el medio de cultivo, la concentración de nitrógeno inorgánico fue 0.83 g/L y el rendimiento de biomasa $Y_{N/X}=0.15$, con lo cual se podría alcanzar una biomasa de 5.5 g/L antes de que se comience el control de pH. Por lo tanto, cuando se alcanzó esta biomasa, se agregó un pulso de NH_4OH al biorreactor hasta que se alcanzó un pH de 7.5. Después, se inició el control de pH con NH_4OH , y el consumo fue registrado (Figura 5D).

De acuerdo al análisis densitométrico, el ADNp-se alcanzado en esta estrategia fue de 92% (Figura 6).

Aunque el rendimiento específico no presenta un incremento usando una concentración de ELPS de 8.34 g/L bajo esta estrategia, la biomasa (21.56 g/L), la producción de ADNp (210 mg/L) y la productividad volumétrica (17.2 mg/L h) presentaron un incremento de 26, 22 y 214% respectivamente, comparadas con las obtenidas en la estrategia 3, y 48, 74 y 463% respectivamente, comparadas con las obtenidas en la estrategia 2. La productividad volumétrica se incrementó hasta 17.2 mg/L h, valores similares fueron alcanzados utilizando la concentración más alta de ELPS de 42 g/L.

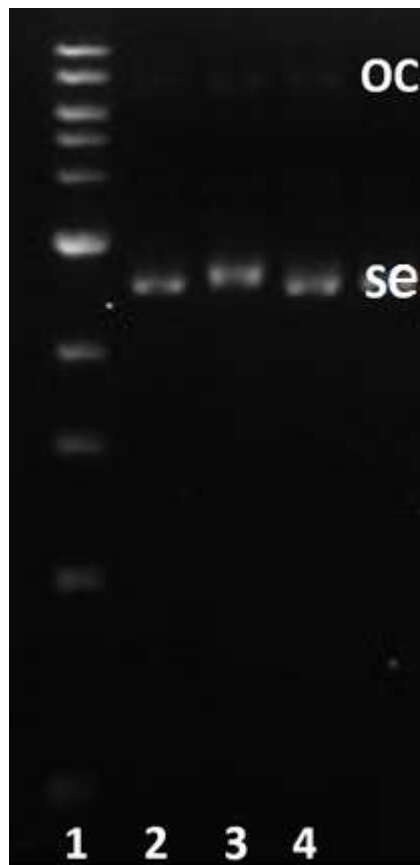


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa: Carril 1. Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladders); Carriles 2-4. Muestras; oc. ADNp circular abierto y se. ADNp súper enrollado.

En conclusión, se establecieron las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno y el control de pH en un cultivo por lote en biorreactor de *E. coli* DH5 α para incrementar la productividad de ADNp. La biomasa, la producción de ADNp, el rendimiento específico y la productividad volumétrica para cada estrategia se muestran en la figura 7. La mejor estrategia se puede seleccionar en función de lo que se requiere, si se requiere una concentración alta de ADNp (Estrategia 1), alto rendimiento específico (Estrategia 3), alta productividad volumétrica (Estrategia 4).

En la primera estrategia se incrementa la relación molar C/N aumentando la concentración de carbono (glicerol) y como resultado se obtiene una alta producción de ADNp (229.8 mg/L). Con base a estos resultados, se desarrollaron las siguientes estrategias, para lograr un alto rendimiento específico de ADNp y una alta productividad volumétrica. Con la estrategia 3, se alcanzó un alto rendimiento específico (10,1 mg/g), pero con una baja productividad (9.58 mg/L h). Por lo tanto, la estrategia 4 presentó los mejores resultados globales con un alto rendimiento específico y alta productividad volumétrica.

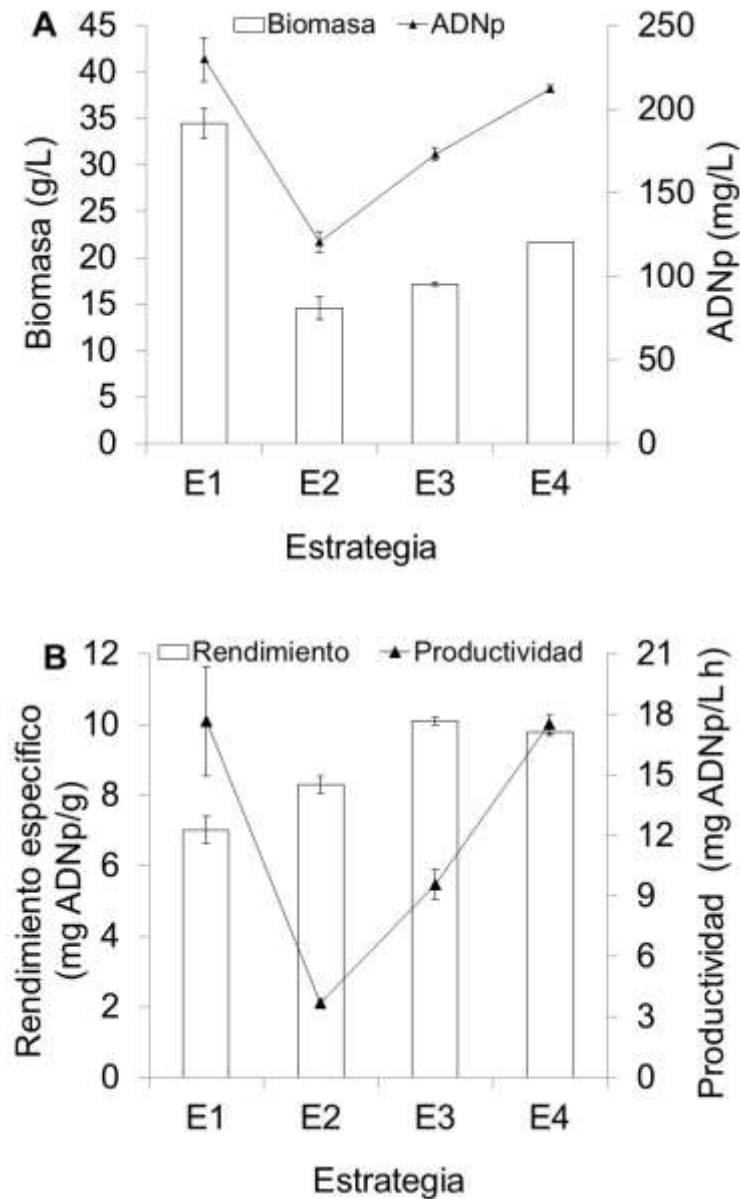


Figura 7. Efecto de diferentes estrategias en un cultivo por lote a 37°C: (A) Biomasa y concentración de ADNp; (B) Rendimiento específico y productividad de ADNp creciendo en medio mineral M3 con 50 g/L de glicerol y (E1) 42 g/L de ELPS, (E2) 8.34 g/L de ELPS controlando el pH con NaOH, (E3) 8.34 g/L de ELPS controlando el pH con NH₄OH, (E4) 8.34 g/L de ELPS con 20 mg/L de tiamina controlando el pH con NH₄OH.

El glicerol ha sido utilizado como fuente de carbono, como una alternativa a la glucosa, generalmente resultando en altos rendimientos específicos (Phue et al., 2008). En este trabajo, en la estrategia 1, cuando la relación molar C/N se incrementó de 3.49 a 7.5 (concentración de glicerol de 0 a 50 g/L), la producción de ADNp se incrementó de 26.58 a 229.8 mg/L (Tabla 7), lo cual representa un incremento de la producción de ADNp de 8.64 veces. Por otro lado, cuando la relación molar C/N se incrementó hasta 9.11 (concentración de glicerol de 70 g/L), la producción de ADNp se redujo a 217.23 mg/L. Debido a estos resultados, la concentración de glicerol seleccionada fue 50 g/L.

En la literatura, se obtuvieron resultados similares, cuando se incrementó la relación molar C/N, la producción de ADNp también presentó un incremento (Martins et al., 2015; Silva et al., 2012), sin embargo la relación C/N no fue el objetivo de estos trabajos. El uso de otros tipos de cultivo, también han sido utilizados como estrategias para incrementar la producción de ADNp (Lara et al., 2011; Silva et al., 2012). Comparado la estrategia 1 con Lara et al. (Lara et al., 2011), el cual consistió en un lote alimentado con alimentación exponencial, valores similares de ADNp fueron obtenidos (229.8 mg/L); sin embargo, con la estrategia 1, la productividad volumétrica fue mayor 2.46 veces. En el trabajo de Silva (Silva et al., 2012), se reportaron dos tipos de cultivo: un lote alimentado con alimentación constante, el cual presenta valores similares de ADNp a la estrategia 1; sin embargo, la productividad de la estrategia 1 fue más alta 2.63 veces; un lote alimentado con alimentación exponencial, en el cual la estrategia 1 fue menor 1.5 veces, pero la productividad fue 0.7 veces más alta. Otra estrategia utilizada es el uso de cepas de *E. coli* modificadas genéticamente, utilizando diferentes concentraciones de glicerol, manteniendo constante la concentración de nitrógeno, el rendimiento específico fue similar a la estrategia 1; sin embargo,

con la estrategia 1, la producción de ADNp fue 7 veces más alta (Martins et al., 2015).

En la estrategia 1, cuando la relación molar C/N se incrementó a 9.11 (concentración de nitrógeno de 70 g/L), el rendimiento de biomasa $Y_{X/S}$ se redujo de 0.51 a 0.48 g/g, esto fue debido a que se presentó una limitación de la fuente de nitrógeno, ya que ninguna otra fuente de nitrógeno fue agregada durante el experimento. Se ha reportado que una disminución de $Y_{X/S}$, cuando se incrementa la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno no es el factor limitante, se presenta debido al sobre-flujo metabólico, inhibición por sustrato, presión osmótica y/o inhibición por producto (Borja et al., 2012; Carnes et al., 2011; Gonçalves et al., 2014; Knabben et al., 2010).

La modificación de la concentración del carbono, no es la única estrategia disponible para incrementar la relación C/N. En la segunda estrategia se disminuyó la concentración de nitrógeno, para incrementar la relación C/N. En este caso, la relación molar C/N se incrementó de 7.5 a 15.15 (la concentración de ELPS se disminuyó de 42 a 8.34 g/L). Con esta estrategia, se incrementó el rendimiento específico; sin embargo, la producción de ADNp y productividad volumétrica disminuyeron (120.7 mg/g y 3.7 mg/L h, respectivamente) comparados con la estrategia 1. La baja producción de ADNp y la baja productividad fueron debido a la limitación de nitrógeno (Figura 4). También, cuando la concentración de ELPS se redujo a 8.34 g/L (relación molar C/N de 15.15), el rendimiento de biomasa $Y_{X/G}$ también se redujo, debido a la limitación de nitrógeno y a la falta de tiamina. El rendimiento de biomasa $Y_{X/G}$ se incrementó, cuando el control de pH se realizó con NH_4OH (Estrategia 3) y el medio de cultivo fue suplementado con tiamina (Estrategia 4), como se puede ver en la Figura 7. En el trabajo de Silva et al. (Silva et al., 2012), una disminución de la concentración de

nitrógeno orgánico, manteniendo constante la concentración de glicerol, se observó una disminución en la producción de ADNp.

En la tercera etapa se propuso realizar el control del pH con NH₄OH en lugar de NaOH, para evitar la limitación de nitrógeno. Con esta estrategia la relación molar C/N cambio durante la fermentación; sin embargo, se evitó la limitación por nitrógeno, por lo que la producción de ADNp (175.19 mg/L) y la productividad volumétrica (9.58 mg/L h) fueron más altas, comparadas con la estrategia 2.

La cuarta estrategia consistió en un inicio tardío de control de pH, el cual comenzó cuando el nitrógeno orgánico fue consumido (Figura 5C), el control de pH se llevó a cabo con NH₄OH. Con la estrategia 4, el rendimiento específico presentó valores similares, comparado con la estrategia 3, pero la producción de ADNp y productividad volumétrica fueron las más altas, en comparación con cualquiera de las otras estrategias.

En lo que se refiere a la máxima velocidad de crecimiento μ_{\max} 0.22 h⁻¹, obtenida con la estrategia 4, se encuentra dentro de los valores reportados (0.20 a 0.25 h⁻¹) utilizando la misma cepa (Bohle and Ross, 2011; Wunderlich et al., 2014).

9. CONCLUSIONES

- Se rediseño un medio de cultivo, medio M3, con el cual fue posible un incremento de la producción de ADNp de 4 veces.
- La mejor estrategia con la cual fue posible obtener los valores máximos de producción de ADNp, rendimiento específico y productividad volumétrica fue la estrategia 4, en la cual la productividad volumétrica alcanzada fue 60% mayor que la productividad obtenida con las otras estrategias evaluadas, y 42% mayor que las productividades reportadas por otros autores bajo condiciones similares.
- Con los resultados obtenidos se estableció la concentración de ELPS (extracto de levadura + peptona de soya), a la cual la producción de ADNp no disminuye.

10. PERSPECTIVAS

Para la aplicación del ADNp pVAX-NH36 como agente terapéutico, es necesario contar con alternativas que permitan incrementar más su producción, como obtener cepas mejoradas mediante ingeniería genética, hacer más eficientes los procesos de producción, incluyendo la optimización de medios de cultivo mediante un diseño de experimentos, implementar el estudio en cultivo en lote alimentado para obtener cultivos de alta densidad celular; así como establecer estrategias de inducción por temperatura, para aumentar el número de copias que den lugar a procesos más productivos.

11. REFERENCIAS

- Aguilar-Be, I., da Silva Zardo, R., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G.P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., García-Miss, M. del 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. *Infect. Immun.* 73, 812–819. doi:10.1128/IAI.73.2.812
- Bohle, K., Ross, A., 2011. Plasmid DNA production for pharmaceutical use: role of specific growth rate and impact on process design. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2099–106. doi:10.1002/bit.23138
- Bondioli, P., Della Bella, L., 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 153–157. doi:10.1002/ejlt.200401054
- Borja, G.M., Meza 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. *Microb. Cell Fact.* 11, 1–9. doi:10.1186/1475-2859-11-132
- Borja, G.M., Ramírez, O.T., Lara, A.R., 2013. Vacunas de ADN Plasmídico : Una Herramienta Terapéutica Emergente. *BioTecnología* 17, 87–109.
- Bower, D.M., Lee, K.S., Ram, R.J., Prather, K.L.J., 2012. Fed-batch microbioreactor platform for scale down and analysis of a plasmid DNA production process. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1976–86. doi:10.1002/bit.24498
- Butler, V.A., 1996. Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications; Availability. *Cent. Biologics Eval. Res. Food Drug Adm. Docket.*
- Carnes, A.E., 2007. Process for plasmid DNA fermentation.
- Carnes, A.E., 2005. Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA. *Bioprocess Int.*
- Carnes, A.E., Hodgson, C.P., Williams, J.A., 2006. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45, 155–66. doi:10.1042/BA20050223
- Carnes, A.E., Luke, J.M., Vincent, J.M., Schukar, A., Anderson, S., Hodgson, C.P., Williams, J. a, 2011. Plasmid DNA fermentation strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 354–63. doi:10.1002/bit.22936
- Cherrington, C. a, Hinton, M., Chopra, I., 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02550.x
- Cooke, J.R., McKie, E.A., Ward, J.M., Keshavarz-Moore, E., 2004. Impact of

- intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines. *J. Biotechnol.* 114, 239–254. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.06.011
- Corbeil, S., LaPatra, S., Anderson, E., Jones, J., Vincent, B., Hsu, Y.-L., Kurath, G., 1999. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39, 29–36.
- Cortés, J.T., Flores, N., Bolívar, F., Lara, A.R., Ramírez, O.T., 2015. Physiological effects of pH gradients on *Escherichia coli* during plasmid DNA production. *Biotechnol. Bioeng.* n/a–n/a. doi:10.1002/bit.25817
- Danquah, M.K., Forde, G.M., 2007. Growth Medium Selection and Its Economic Impact on Plasmid DNA Production. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 490–497. doi:10.1263/jbb.104.490
- Davis, B.S., Chang, G.J., Cropp, B., Roehrig, J.T., Martin, D. a, Mitchell, C.J., Bowen, R., Bunning, M.L., 2001. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75, 4040–4047. doi:10.1128/JVI.75.9.4040-4047.2001
- Donnelly, J., Berry, K., Ulmer, J.B., 2003. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33, 457–467. doi:10.1016/S0020-7519(03)00056-0
- Durland, R.H., Eastman, E.M., 1998. Manufacturing and quality control of plasmid-based gene expression systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 30, 33–48.
- FDA, C., 2007. Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. *Biotechnol. Law Rep.* 26, 641–648. doi:10.1089/blr.2007.9905
- Fleming, G.T., Patching, J.W., 1994. Plasmid instability in an industrial strain of *Bacillus subtilis* grown in chemostat culture. *J. Ind. Microbiol.* 13, 106–111.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, a, 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 18, 1151–1155. doi:10.1038/81132
- Gonçalves, G.A.L., Prather, K.L.J., Monteiro, G.A., Carnes, A.E., Prazeres, D.M.F., 2014. Plasmid DNA production with *Escherichia coli* GALG20, a *pgi*-gene knockout strain: Fermentation strategies and impact on downstream processing. *J. Biotechnol.* 186, 119–127.
- Hopkins, D.J., Betenbaugh, M.J., Dhurjatit, P., 1987. Effect of Dissolved Oxygen Shock on the Stability of Recombinant *Escherichia coli* Containing Plasmid pKN401. *Biotechnol. Bioeng.* XXIX, 85–91.
- Jaén, K.E., Lara, A.R., Ramírez, O.T., 2013. Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem. Eng. J.* 79, 230–238. doi:10.1016/j.bej.2013.08.006

- Khan, A.S., Bodles-Brakhop, A.M., Fiorotto, M.L., Draghia-Akli, R., 2010. Effects of maternal plasmid GHRH treatment on offspring growth. *Vaccine* 28, 1905–10. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.093
- Klinman, D.M., Klaschik, S., Tross, D., Shiota, H., Steinhagen, F., 2010. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine* 28, 2801–5. doi:10.1016/j.vaccine.2009.11.025
- Knabben, I., Regestein, L., Marquering, F., Steinbusch, S., Lara, A.R., Büchs, J., 2010. High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150, 73–79. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.006
- Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N.A., Marquet, M., Al, L.E.T., 1996. High-Yield Production of pBR322- Derived Plasmid Intended for Human Gene Therapy by Employing Point Mutation. *Hum. Gene Ther.* 7, 1971–1980.
- Lara, A.R., Knabben, I., Regestein, L., Sassi, J., Caspeta, L., Ramírez, O.T., Büchs, J., 2011. Comparison of oxygen enriched air vs. pressure cultivations to increase oxygen transfer and to scale-up plasmid DNA production fermentations. *Eng. Life Sci.* 11, 382–386. doi:10.1002/elsc.201000104
- Liao, J.C.F., Gregor, P., Wolchok, J.D., Orlandi, F., Craft, D., Leung, C., Houghton, A.N., Bergman, P.J., 2006. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun.* 6, 1–10. doi:060308 [pii]
- Lin-chao, S., Chen, W.-T., Wong, T.-T., 1992. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol. Microbiol.* 6, 3385–3393.
- 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. *Biotechnol. Prog.* 22, 1335–1345.
- Liu, M.A., 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 239, 62–84. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x
- Lopes, M.B., Gonçalves, G.A.L., Felício-Silva, D., Prather, K.L.J., Monteiro, G.A., Prazeres, D.M.F., Calado, C.R.C., 2015. In situ NIR spectroscopy monitoring of plasmid production processes: effect of producing strain, medium composition and the cultivation strategy. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 255–261. doi:10.1002/jctb.4431
- Mairhofer, J., Cserjan-Puschmann, M., Striedner, G., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Grabherr, R., 2010. Marker-free plasmids for gene therapeutic applications—Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process. *J. Biotechnol.* 146, 130–137. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.025
- 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. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bej.2015.02.001
- O’Kennedy, R.D., Baldwin, C., Keshavarz-Moore, E., 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J. Biotechnol.* 76, 175–183.
- 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*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 319–25.
- Oliveira, P.H., Prazeres, D.M.F., Monteiro, G. a, 2009. Deletion formation mutations in plasmid expression vectors are disfavored by runaway amplification conditions and differentially selected under kanamycin stress. *J. Biotechnol.* 143, 231–8. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.08.002
- Ongkudon, C.M., Pickering, R., Webster, D., Danquah, M.K., 2011. Cultivation of *E. coli* carrying a plasmid-based Measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimisation and pH-temperature induction techniques. *Microb. Cell Fact.* 10, 1–10. doi:10.1186/1475-2859-10-16
- Pablos, T.E., Soto, R., Meza Mora, E., Le Borgne, S., Ramírez, O.T., Gosset, G., Lara, A.R., 2012. Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J. Biotechnol.* 158, 211–4. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.04.015
- Palatnik-de-Sousa, C.B., 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709–24. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023
- Phue, J.-N., Lee, S.J., Trinh, L., Shiloach, J., 2008. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α). *Biotechnol. Bioeng.* 101, 831–6. doi:10.1002/bit.21973
- 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 Microb. Technol.* 33, 865–883. doi:10.1016/S0141-0229(03)00205-9
- Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M., Monteiro, G. a., Cooney, C.L., Cabral, J.M.S., 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: Problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol.* 17, 169–174. doi:10.1016/S0167-7799(98)01291-8
- 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. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 909–15. doi:10.1002/bit.20327
- Ruiz Hernández, O., Limonta Fernández, M., Valdes Hernández, J., Pupo Peña, M.,

- Martínez Díaz, E., 2011. Scalable Technology to Produce Pharmaceutical Grade Plasmid DNA for Gene Therapy. Cent. Genet. Eng. Biotechnol. Cuba.
- Salleras, L., 2001. Pasado, presente y futuro de las vacunas. *Vacunas* 2, 101–109.
- Sanchez-Casco, M., Dumonteil, E., Ortega-Lopez, J., 2013. Production optimisation of a DNA vaccine candidate against leishmaniasis in flask culture. *African J. Biotechnol.* 12, 4874–4880. doi:10.5897/AJB12.1360
- Schmidt, T., Friehs, K., Flaschel, E., Schleef, M., 2003. Method for the isolation of ccc plasmid DNA.
- Shoham, Y., Demain, A.L., 1990. Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*.
- Silva, F., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2012. Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2571–80. doi:10.1007/s00253-011-3668-6
- Simcikova, M., Prather, K.L.J., Prazeres, D.M.F., Monteiro, G.A., 2014. On the dual effect of glucose during production of pBAD/AraC-based minicircles. *Vaccine* 32, 2843–6. doi:10.1016/j.vaccine.2014.02.035
- Singer, A., Eiteman, M.A., Altman, E., 2009. DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 521–530. doi:10.1007/s10295-008-0522-7
- Tang, D., Devit, M., Johnston, S. a., 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152 – 154.
- Tatcher, 1999. Method of plasmid DNA production and purification.
- Tejeda-Mansir, A., Montesinos, R.M., 2008. Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 156–72.
- Ulmer, J.B., 2002. Influenza DNA vaccines. *Vaccine* 20 Suppl 2, S74–6.
- Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K., Flaschel, E., 2004. Effect of ammonium chloride on plasmid DNA production in high cell density batch culture for biopharmaceutical use. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 57–62. doi:10.1002/jctb.941
- Wang, Z., Le, G., Shi, Y., Wegrzyn, G., 2001. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem.* 36, 1085–1093.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465–8.
- Wunderlich, M., Taymaz-Nikerel, H., Gosset, G., Ramírez, O.T., Lara, A.R., 2014. Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 336–342. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.08.007

- Xu, Z.-N., Shen, W.-H., Chen, H., Cen, P.-L., 2005. Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6, 396–400. doi:10.1631/jzus.2005.B0396
- Zheng, S., Friehs, K., He, N., Deng, X., Li, Q., He, Z., Xu, C., Lu, Y., 2007. Optimization of Medium Components for plasmid production by Recombinant *E. coli* DH5 α pUK21CMV β 1.2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12, 213–221.

12. ANEXOS

ANEXO 1.- Extracción de ADNp

1.1 QIAprep Spin Miniprep Kit

Soluciones

1. Agregar la solución de RNAsa A al Buffer P1
2. Opcional: Agregar la solución LyseBlue al Buffer P1
3. Agregar etanol (96-100%) al Buffer PE
4. Checar los Buffer P2 y N3 que no presenten precipitación de sales y re-disolver a 37°C si es necesario

Procedimiento

1. Re-suspender el pellet bacteriano en 250 μ L de Buffer P1 y transferir a un tubo de microcentrifuga
2. Agregar 250 μ L de Buffer P2 y mezclar completamente por inversión del tubo (4-6 veces)(No usar vórtex)
3. Agregar 350 μ L del Buffer N3 mezclar inmediatamente por inversión del tubo (4-6 veces)
4. Centrifugar por 10 minutos a 13 000 rpm en una microcentrifuga
5. Usar el sobrenadante (del paso 4), agregarlo a la columna QIAprep spin por decantación o pipeteando
6. Centrifugar 30-60 segundos. Descartar el flujo de paso
7. Recomendado: Lavar la columna QIAprep Spin agregando 0.5 ml de Buffer PB y centrifugar 30-60 segundos. Descartar el flujo de paso
8. Lavar a columna agregando 0.75 ml de Buffer PE y centrifugar por 30 – 60 segundos
9. Descartar el flujo de paso y centrifugar 1 minuto adicional para remover el Buffer de lavado residual
10. Eluir el ADN, colocar la columna en un tubo de microcentrifuga nuevo. Agregar 50 μ L de Buffer EB o agua en el centro de cada columna, permitir un minuto de reposo y centrifugar por 1 minuto.

ANEXO 2.- Cuantificación de ADNp súper enrollado

2.1 Electroforesis con geles de agarosa:

1. Soluciones:

Solución amortiguadora TBE 5X (1 l)

- Tris 54 g
- Ácido bórico 27.5 g
- EDTA 4.7 g

2. Pesar la agarosa requerida para obtener un gel de agarosa al 0.8% el volumen final es de 30 ml
3. Disolver la agarosa en 30 ml de amortiguador TBE 0.5X
4. Calentar la agarosa a 45°C y agitar hasta que la agarosa se disuelva completamente
5. Enfriar un poco y agregar 4 μ l de solución de bromuro de etidio (Agua:Bromuro de etidio 1:1) con una concentración final de 5 μ g/mL.
6. Colocar la agarosa en la cámara para su gelificación (20 a 30 min) a temperatura ambiente
7. Cubrir el gel con el buffer TBE hasta que el gel este sumergido
8. Preparación de las muestras
2 μ l buffer de carga
5 μ l muestra
9. Colocar las muestras en el gel
10. Tapar la cámara perfectamente y conectar a la fuente de poder
11. Realizar la electroforesis 50 V, durante 90 minutos
12. Examinar bajo la lámpara de luz UV para determinar la posición de las bandas
13. Analizar los resultados obtenidos y tomar la foto
14. Analizar la intensidad de las bandas utilizando el software ImageJ versión 1.47.

2.1 Espectrofotometría

- 1) Medir a 260 y 280 nm el plásmido obtenido del anexo 1, una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de doble hebra

ANEXO 3.- Determinación de glicerol

3.1 Método espectrofotométrico (Bondioli y Della Bella 2005)

a) Soluciones

1. Solución stock de ácido acético 1.6 M
2. Solución stock de acetato de amonio 4 M
3. Solución de acetilacetona 0.2 M
200 μ L Acetilacetona
5 ml Solución de acetato de amonio 4 M
5 ml Solución de ácido acético 1.6 M
4. Solución de periodato de sodio 10 mM
21 mg m-periodato de sodio
5 ml Solución de acetato de amonio 4 M
5 ml Solución de ácido acético 1.6 M
5. Solvente de trabajo
1:1 Agua: Etanol 95%
6. Solución stock de glicerol
150 mg Glicerol
50 ml Agua

b) Procedimiento

1. Colocar la muestra problema en un tubo de ensayo. Todos los tubos deben tener un volumen final de 2 ml
2. Agregar 1.2 ml de la solución de periodato de sodio 10 mM y agitar por 30 segundos
3. Agregar 1.2 ml de la solución de acetilacetona 0.2 M, agitar manualmente
4. Colocar los tubos en un baño de agua a 70°C por 1 minuto
5. Enfriar la muestra inmediatamente, sumergiendo el tubo en un vaso de precipitados conteniendo agua fría (20-25 °C)
6. Leer las muestras a 410 nm en un espectrofotómetro

CURVA TIPO

1. Se utilizó como base el medio de cultivo el cual contiene (50 g/L de glicerol)
2. Se realizó una dilución para tener una concentración de 0.05 g/L

Tabla 8. Datos obtenidos para realizar la curva tipo

Tubo	Solución (ml)	mg	Abs 410 nm
1	0	0	0.12
2	0.2	0.01	0.306
3	0.4	0.02	0.517
4	0.6	0.03	0.755
5	0.8	0.04	0.987
6	1	0.05	1.291
7	1.2	0.06	1.471

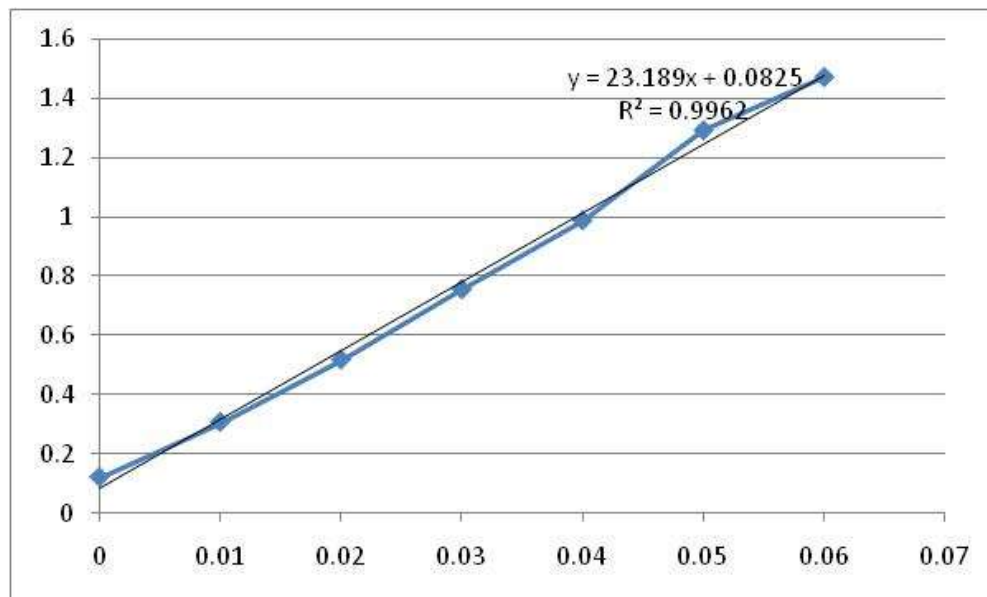


Figura 8. Curva tipo obtenida de las diferentes concentraciones de glicerol