



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA - BIOCATÁLISIS

EFFECTO DE LA TASA DE CALENTAMIENTO EN EL PROCESO DE  
PRODUCCIÓN POR TERMO-INDUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN

*Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

KARIM ENRIQUE JAÉN CHÁVEZ

TUTORES:

OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH, IBT-UNAM

ALVARO RAUL LARA RODRÍGUEZ, UAM-Cuajimalpa

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Alberto Tecante Coronel

Secretario: Dra. Carmina Montiel Pacheco

Vocal: Dr. Jaime Ortega López

1<sup>er.</sup> Suplente: Dra. Blanca Lilia Barrón Romero

2<sup>do.</sup> Suplente: Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Lugar donde se realizó la tesis: Instituto de Biotecnología.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

**TUTORES DE TESIS:**

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Dr. Alvaro Raul Lara Rodríguez

-----  
**FIRMA**

-----  
**FIRMA**

**Saber más para servir mejor**

Los estudios de esta tesis se realizaron en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de los doctores Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y Alvaro Raul Lara Rodríguez (Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa).

Se contó con financiamiento de los proyectos DGAPA IN-203212, CONACyT 183911, PROMEP 10828, además de una beca para estudios de posgrado otorgada por CONACyT (Registro CVU 99333).

El sensor de capacitancia/conductividad fue donado por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), bajo el esquema de “German public authorities allocation of technical equipment grant to Institutions of higher education abroad”.

## **Agradecimientos**

A Dios por todas las personas y acontecimientos que permite se presenten en mi caminar para mi formación.

A mis padres Enrique y María Teresa por alentarme a superarme; sus consejos y apoyo en todo momento.

A Mariana, Ismael y Marco por sus consejos, palabras de aliento, retroalimentación y apoyo en la elaboración de la tesis.

Al Dr. Octavio T. Ramírez por brindarme la oportunidad de integrarme en su grupo, facilitarme los recursos materiales e infraestructura para la realización del presente trabajo de investigación, así como sus enseñanzas.

Al Dr. Alvaro R. Lara por su tiempo, enseñanzas e instrucciones para iniciarme en el trabajo experimental, así como su guía y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A la M. en C. Vanessa Hernández y Karin Levy, y demás miembros de los equipos técnico y administrativo del grupo OTR por el soporte otorgado para la adquisición y manejo de los materiales y equipos de laboratorio empleados en este proyecto.

A los colegas estudiantes del grupo OTR por transmitirme sus conocimientos. Muy en especial al M. en C. Gheorghe M. Borja Zamfir por la instrucción brindada en las técnicas de extracción y análisis de ADNp, y al I.Q. Esteban Peguero Sánchez por el entrenamiento y asistencia técnica brindado del sistema HPLC, así como por sus recomendaciones de análisis para este trabajo.

A Gerardo Alejo Jacuinde, estudiante de ingeniería bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya, por su colaboración y apoyo en la extracción y análisis topológicos de ADNp, así como en la realización de cultivos en este trabajo.

A los colegas de los grupos EG y BG por su compañerismo y recomendaciones.

A las doctoras Carmina Montiel Pacheco y Blanca Lilia Barrón Romero, así como a los doctores Alberto Tecante Coronel y Jaime Ortega López por su disposición para la revisión de esta tesis, de la que derivaron aportaciones y comentarios críticos que contribuyeron a enriquecerla.

A la doctora Verónica Hernández y los doctores Salvador Granados Aguilar, Enrique Chávez Castellanos, Fernando Barragán Aroche, Eduardo Bárzana García, Alberto Tecante Coronel y Rogelio Rodríguez Sotres por ayudarme a profundizar con pensamiento crítico, en el conocimiento de las disciplinas pilares de la ingeniería química y la biocatálisis.

A Patricia Vargas Valencia, jefa del Departamento de Control Escolar, Gloria García Manrique, asistente de la Secretaría Académica de Investigación y Posgrado, Beatriz López, jefa del Departamento de Becas de Posgrado, y demás colaboradores administrativos del posgrado en Ingeniería Química, por su amable y eficaz atención en los trámites requeridos por el programa de posgrado.

# Nomenclatura

## Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribunucleico	GRAS	Generally recognized as safe (Generalmente reconocidos como seguros)
ACK	Acetil-CoA cinasa	HCDC	High cell-density cultivations (Cultivos de alta densidad celular)
ADNp	ADN plasmídico	HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alto desempeño)
ADP	Adenosina difosfato	IR	Índice de refracción
AFD	Arreglo de fotodiodos	IRF	Impedancia por radiofrecuencia
AMP	Adenosina monofosfato	OGM's	Organismos genéticamente modificados
ARN	Ácido ribunucleico	PAT	Process analytical technology (Tecnología analítica de proceso)
ARNr	ARN ribosomal	P5F	Pentosa-5-fosfato.
ARNt	ARN de transferencia	PI	Proporcional-integral
ATP	Adenosina trifosfato	POX	Piruvato oxidasa
CoA	Coenzima A	PTA	Fosfo-trans-acetilasa
CSE	Contenido de plásmido superenrollado	SDS	Sodium dodecil sulfato (Dodecil sulfato de sodio)
DO	Densidad óptica 600 nm	TCA	Tricarboxylic acids (Ácidos tricarbónicos)
EGA	Electroforesis en gel de agarosa	TOD	Tensión de oxígeno disuelto
FDA	Food and drug administration (Administración de medicamentos y alimentos)	UV	Ultravioleta
FFT	Filtración de flujo tangencial	UF	Ultrafiltración

## Unidades

°C	Grado Celsius	M	mol/L
F	Faradio	min	Minuto
g	Gramo	rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora	S	Siemen
Hz	Hertz	vvm	Volumen de aire por volumen de trabajo por minuto
L	Litro	Ω	Ohm
m	Metro	s	Segundo

## Prefijos

c	Centi	n	Nano
m	Mili	p	Pico
μ	Micro		

## Subíndices

crit	Crítica	o	Inicial
max	Máxima	set	Prefijada



## Simbología

$\hat{A}$	Concentración de acetato predicha (g/L)	$q_p$	Productividad específica de ADNp (mg/g h)
$A$	Concentración de acetato (g/L)	$Q_p$	Productividad de ADNp en la fase lote alimentado (mg/g h)
$C_i$	Concentración de la especie iónica $i$ (g/L)	$q_s$	Tasa de consumo específico de sustrato (g/g h)
$C_{iA}$	Concentración de la especie iónica $i$ en la solución de alimento (g/L)	$q_i$	Tasa de consumo específico de la especie iónica $i$ (g/g h)
$C_s$	Concentración de glucosa (g/L)	$R$	Resistividad ( $\Omega$ cm)
$C_{sA}$	Concentración de glucosa en la solución de alimento (g/L)	$r^2$	Coefficiente de determinación
$d/dt$	Derivada con respecto al tiempo	$t$	Tiempo de cultivo (h)
$\Delta\epsilon$	Incremento de capacitancia (pF/cm)	$T$	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
$e$	Exponencial	$t_F$	Tiempo de inicio de acumulación de glucosa (h)
$\epsilon$	Capacitancia o permitividad (pF/cm)	$t_{LA}$	Tiempo de inicio de lote alimentado (h)
$\epsilon_0$	Capacitancia o permitividad al vacío (8.854 pF/cm)	$t_p$	Tiempo en que la concentración de plásmido alcanza su valor máximo (h)
$\epsilon_r$	Capacitancia o permitividad relativa ; $\epsilon/\epsilon_0$ .	$V$	Volumen de trabajo del reactor (L)
$F_A$	Flujo volumétrico de alimentación al reactor (L/h)	$V_A$	Volumen añadido de solución de alimento (L)
$j$	Número imaginario ( $j=\sqrt{-1}$ )	$V_{NH_3}$	Volumen añadido de hidróxido de amonio (L)
$\kappa$	Conductividad específica (mS/cm)	$\omega$	Frecuencia (Hz)
$\Lambda$	Conductividad específica molar (mS L/mol cm)	$X$	Concentración de biomasa (g/L)
$\hat{\kappa}$	Conductividad específica predicha (g/L)	$\hat{X}$	Concentración de biomasa predicha (g/L)
ln	Logaritmo natural	$X_c$	Reactancia capacitiva ( $\Omega$ )
log	Logaritmo base 10	$Y_{as}$	Rendimiento acetato sobre sustrato (g/g)
$\mu$	Tasa de crecimiento específico ( $h^{-1}$ )	$Y_{px}$	Rendimiento específico de ADNp (mg/g)
$m$	Tasa de consumo específico de sustrato asociado a mantenimiento (g/g h)	$Y_{xNH_3}$	Rendimiento biomasa sobre amonio (g/g)
$P$	Concentración de plásmido (g/L)	$Y_{xs}$	Rendimiento biomasa sobre sustrato (g/g)
$q$	Tasa de calentamiento ( $^{\circ}$ C/min)	$Z$	Impedancia ( $\Omega$ )
$q_a$	Tasa de producción específica de acetato (g/L)		

## Resumen

Entre sus múltiples aplicaciones, el ADN plasmídico (ADNp) es también empleado como un vector alternativo en vacunación y terapia génica con una importante presencia y progreso en estudios clínicos. Previendo una alta demanda de ADNp en el futuro, surge la necesidad de mejorar la plataforma productiva existente. En la actualidad el ADNp se produce en cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*. Varias estrategias se han dirigido para incrementar los rendimientos de ADNp entre las cuales la termo-inducción, que consiste en incrementar la temperatura de cultivo, resulta atractiva por su efectividad y facilidad de implementación sin aumentar los costos de producción. Esta estrategia ha sido ampliamente investigada a escala de laboratorio pero sin considerar las condiciones de trabajo de reactores de escala productiva (0.1 a 100 m<sup>3</sup>). Por esta razón, en este trabajo se investigó el efecto de la tasa de calentamiento en un proceso de producción por termo-inducción de ADNp. Primero se estudió el efecto de la temperatura de cultivo sobre el desempeño fisiológico y productivo de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se encontró que las mejores temperaturas de crecimiento y producción de ADNp fueron 35 y 42 °C, respectivamente. Con este conocimiento, se definió el proceso de producción por termo-inducción a evaluar en un biorreactor de escala laboratorio, consistente en cultivos de alta densidad celular operados en modo lote alimentado con incremento lineal de temperatura de 35 a 42 °C. Se realizaron cultivos con el proceso descrito con tasas de calentamiento de 0, 0.025, 0.05, 0.10 y 0.25 °C/min, que pueden tener lugar durante el calentamiento en reactores de gran escala. 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  $9.29 \pm 0.59$  mg/g, la productividad de  $0.56 \pm 0.06$  mg/g·h y el contenido de plásmido superenrollado de  $80 \pm 5\%$ . Por otro lado, el biorreactor utilizado en este trabajo se instrumentó con un sensor de impedancia por radiofrecuencia con el que se realizaron mediciones de capacitancia y de conductividad en tiempo real de los cultivos. A partir del análisis de los datos de capacitancia y de conductividad, se generaron modelos con potencial predictivo de la concentración de biomasa y acetato, así como de la tasa de crecimiento específico. De esta manera, la capacidad dual del sensor de impedancia por radiofrecuencia puede ser aprovechada para adaptar el control y seguimiento de un bioproceso a los requerimientos regulatorios que surgen día con día.

## Abstract

Among its versatile applications, plasmid DNA (pDNA) is also used as an alternative vaccination and gene therapy vector with a remarkable place and progress in clinical trials. The advent of a high demand of pDNA requires improving the current manufacture platforms. Nowadays, pDNA is produced in high cell density cultivations of *Escherichia coli*. Several strategies have been targeted to increase pDNA yields. One that stands out for its effectiveness is thermo-induction. This strategy, which consists in a cultivation temperature up-shift, is effective, simple to implement and does not add costs to the process. There are several reports concerning pDNA thermo-induced production at lab scale. However, they do not take into account productive scale reactors' (0.1 to 100 m<sup>3</sup>) process conditions. Considering this, the effect of heating rate on thermo-induced pDNA production process was investigated in this work. First, the effect of cultivation temperature on the physiological and productive performance of *E. coli* DH5 $\alpha$  was studied. The best temperatures for growth and pDNA production were found to be 35 and 42 °C, respectively. Based on this knowledge, the thermo-induced pDNA production process to be evaluated was defined. High cell-density cultivations performed in fed-batch mode with linear temperature up-shifts from 35 to 42 °C, at heating rates of 0, 0.025, 0.05, 0.10 and 0.25 °C/min that could prevail during heating in large scale reactors, were carried out in a lab scale biorreactor. Heating rates from 0 to 0.10 °C/min increased pDNA specific yield as well as productivity up to 79 and 250%, respectively, where their highest values were attained at 0.05 °C/min. At this latter heat rate, specific pDNA yield was  $9.29 \pm 0.59$  mg/g and productivity was  $0.56 \pm 0.06$  mg/g h, with a pDNA supercoiled content of  $80 \pm 5\%$ . In addition, the biorreactor used in this work was fitted with an impedance radiofrequency sensor. From this sensor, real time measurements of capacitance and conductivity from all cultivations were made. Taking advantage of the impedance radiofrequency sensor dual capacity, accurate correlation models for biomass and acetate concentration, as well for growth specific rate were obtained through capacitance and conductivity data analysis. These correlation models have predictive potential that could fulfill bioprocess quality control and monitoring needs according to the changing regulatory requirements.

# Índice

Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1. El ADN plasmídico como principio activo en productos biofarmacéuticos. ....	3
1.2. Producción de ADN plasmídico.....	6
1.2.1. Hospederos de producción. ....	8
1.2.2. Medios de cultivo. ....	10
1.2.3. Métodos de cultivo. ....	10
1.2.3.1. Modo lote.....	10
1.2.3.2. Modo lote alimentado.....	11
1.2.4. Inducción de la replicación de ADN plasmídico.....	12
1.2.4.1. Métodos químicos para la inducción de la replicación de ADN plasmídico.....	14
1.2.4.2. Métodos físicos para la inducción de la replicación de ADN plasmídico...	16
1.3. Carga metabólica que impone la replicación del plásmido en el hospedero. ....	19
1.4. Efecto de la temperatura de cultivo sobre el hospedero. ....	21
1.5. Aplicación de la medición de impedancia por radiofrecuencia en procesos de producción biotecnológicos con <i>E. coli</i> .....	24
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	29
4.1. Objetivo general. ....	29
4.2. Objetivos específicos.....	29
5. Material y métodos.....	30
5.1. Cepa y plásmido empleado.....	30
5.1.1. Cepa.....	30
5.1.2. Plásmido.....	30

5.2. Medio de cultivo.....	31
5.2.1. Solución de alimentación.....	33
5.3. Sistemas de cultivo.....	34
5.3.1. Cultivos en matraz.....	34
5.3.2. Cultivos en biorreactor.....	34
5.3.3. Sensor de impedancia por radiofrecuencia.....	36
5.4. Métodos analíticos.....	38
5.4.1. Cuantificación de biomasa.....	38
5.4.2. Cuantificación de metabolitos.....	39
5.4.3. Purificación, cuantificación y análisis topológico de plásmido.....	41
5.5. Cálculos cinéticos y estequiométricos.....	43
5.6. Métodos y cálculos empleados en el análisis de datos y obtención de estimadores.....	44
6. Resultados y discusión.....	47
6.1. Cultivos en matraz agitado.....	47
6.1.1. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de biomasa.....	48
6.1.2. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de ADNp.....	52
6.1.3. Conclusiones parciales.....	55
6.2. Cultivos en biorreactor.....	55
6.2.1. Cultivos a 35 °C.....	56
6.2.2. Cultivos termo-inducidos.....	63
6.2.3. Conclusiones parciales.....	80
6.3. Utilidad del sensor de impedancia por radiofrecuencia.....	81
6.3.1. Modelo y parámetros para la estimación de concentración de biomasa.....	81
6.3.2. Modelo y parámetros para la estimación de concentración de acetato.....	84
6.3.3. Aplicación de estimadores.....	88

6.3.4. Conclusiones parciales. ....	100
7. Conclusiones.....	101
8. Perspectivas. ....	102
Referencias. ....	103
Apéndices. ....	112



## Índice de figuras

Figura 1.1. Topologías del ADNp .....	3
Figura 1.2. Evolución en el tiempo de los desarrollos de terapias basadas en ADNp en estudio clínico en relación con otros vectores. ....	5
Figura 1.3. Proceso de producción de ADNp.....	7
Figura 1.4. Elementos básicos que componen un plásmido terapéutico .....	12
Figura 1.5. Etapas en la iniciación e inhibición de la replicación de los plásmidos pUC ....	14
Figura 1.6. Transferencia de calor en biorreactores de escala industrial.....	18
Figura 1.7. Regulación de la respuesta de choque térmico y sus efectos en el metabolismo de <i>E. coli</i> .....	22
Figura 1.8. Datos de capacitancia a diferentes frecuencias. ....	26
Figura 1.9. Dispersiones de los materiales biológicos.....	27
Figura 5.1. Diagrama del plásmido pHN.....	31
Figura 5.2. Diagrama simplificado de tuberías e instrumentos del biorreactor empleado en los cultivos.....	37
Figura 5.3. Correlación entre la concentración de biomasa en peso húmedo y en peso seco. ....	39
Figura 5.4. Correlación entre la concentración de glucosa medida por el instrumento .....	40
Figura 5.5. Cromatogramas típicos de los estándares de acetato obtenidos con el detector de AFD a 210 nm. ....	41
Figura 5.6. Curva de calibración típica para la cuantificación de acetato. ....	41
Figura 5.7. Aplicación del método de suavización de datos a las mediciones de capacitancia y conductividad .....	45



Figura 6.1. Curvas de crecimiento, concentración de glucosa y acetato de cultivos de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ 30, 35, 37, 40, 42 y 45 °C en modo lote en matraz .....	48
Figura 6.2. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de biomasa. ....	49
Figura 6.3. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de plásmido.....	52
Figura 6.4. Gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados de los cultivos de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en matraz a diferentes temperaturas .....	53
Figura 6.5.1. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado a 35 °C .....	58
Figura 6.5.2. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado a 35 °C (Réplica) .....	59
Figura 6.5.3. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor a 35 °C.....	60
Figura 6.5.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor a 35 °C (Réplica) .....	60
Figura 6.6.1. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.025$ °C/min .....	65
Figura 6.6.2. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.025$ °C/min (Réplica).....	66
Figura 6.6.3. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.025$ °C/min.....	67
Figura 6.6.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.025$ °C/min (Réplica).....	67

Figura 6.7.1. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.05$ °C/min. ....	68
Figura 6.7.2. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.05$ °C/min (Réplica).....	69
Figura 6.7.3. Geles de agarosa al 0.8% (izquierda) y 1% (derecha) de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.05$ °C/min.....	70
Figura 6.7.4. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.05$ °C/min.....	70
Figura 6.8.1. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min. ....	71
Figura 6.8.2. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min (Réplica).....	72
Figura 6.8.3. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min.....	73
Figura 6.8.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min (Réplica).....	73
Figura 6.9.1. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min. ....	74
Figura 6.9.2. Cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.10$ °C/min (Réplica).....	75

Figura 6.9.3. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.25$ °C/min.....	76
Figura 6.9.4. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a $q = 0.25$ °C/min (Réplica).....	76
Figura 6.10. Efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción de ADNp .....	80
Figura 6.11. Correlación entre capacitancia y concentración de biomasa durante (A) crecimiento no limitado a 35 °C; (B) crecimiento limitado a 35 °C y (C) durante crecimiento no limitado a 42 °C .....	82
Figura 6.12. Efecto de la concentración de acetato sobre la conductividad.....	84
Figura 6.13. Variables importantes para el balance de masa de especies iónicas en el biorreactor.....	85
Figura 6.14. Cambio de la conductividad con el tiempo de cultivo a diferentes tasas de calentamiento.....	87
Figura 6.15. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05 °C/min.....	89
Figura 6.16. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.....	90
Figura 6.17. Comparación de la concentración de acetato estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05 °C/min.....	92

Figura 6.18. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.....	93
Figura 6.19. Comparación de $\mu$ calculada a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente, en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05 °C/min.....	95
Figura 6.20. Comparación de $\mu$ calculada a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente, en cultivos para producir ADNp por termo-inducción, a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.....	96
Figura 6.21. Comparación de $Y_{xs}$ calculado a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente y $V_A$ , en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05 °C/min.....	98
Figura 6.22. Comparación de $Y_{xs}$ calculado a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente y $V_A$ , en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.....	99
Figura A.1. Rutina de alimentación exponencial predeterminada programada en “Biocommand” en interfase gráfica .....	112
Figura A.2. Código de la función “F” programada en lenguaje Visual Basic Application. ....	113
Figura A.3. Rutina de cómputo del volumen adicionado por cada bomba .....	114
Figura A.4. Rutina de cómputo de volumen total del reactor .....	115
Figura A.5. Rutina de cómputo de cambio de temperatura en rampa .....	115



## Índice de tablas

Tabla 1.1. Descripción genotípica de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	9
Tabla 5.1. Composición del medio PD.....	32
Tabla 5.2. Composición de la solución de elementos traza 250x.....	32
Tabla 5.3. Composición de la solución de alimentación.....	33
Tabla 5.4. Concentración de glucosa de los estándares utilizados para la verificación del instrumento YSI Select 2700.....	39
Tabla 5.5. Concentración de acetato de los estándares utilizados para la calibración del método analítico. ....	41
Tabla 6.1. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la fase lote de los cultivos en biorreactor de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pHN .....	77
Tabla 6.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la fase lote alimentado de los cultivos en biorreactor de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pHN.....	77
Tabla 6.3. Factores de correlación de capacitancia y concentración de biomasa (a) y capacitancia y concentración de acetato (b) a diferentes temperaturas de cultivo .....	83
Tabla 6.4. Parámetros para la estimación de la concentración de biomasa.....	83
Tabla 6.5. Parámetros para la estimación de la concentración de acetato.....	88
Tabla 6.6. Parámetros para la estimación de la concentración de biomasa y acetato .....	94
Apéndice C. Valores de los parámetros utilizados para estimar las concentraciones de biomasa y acetato.....	124



## Introducción

El reciente progreso que han mostrado las vacunas y tratamientos para terapia génica formulados con ADNp en las evaluaciones clínicas, parece indicar que la demanda de ADNp se incrementará en los próximos años. Ante esta posibilidad, surge la necesidad de desarrollar una plataforma altamente productiva y económicamente factible de ADNp para su introducción exitosa en el mercado. Actualmente el ADNp se produce en cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*. Diversas estrategias se han dirigido para incrementar los rendimientos de ADNp que comprenden el diseño del vector, la ingeniería celular de los hospederos de producción y la ingeniería de proceso. Entre las estrategias de proceso, la adición de sustancias químicas al medio de cultivo como el cloranfenicol, es bastante efectiva pero tiene restricciones normativas e implicaciones económicas al proceso. Una estrategia alternativa, simple, efectiva y no costosa, consiste en incrementar la temperatura de cultivo y se conoce como termo-inducción. Su efectividad radica en el aumento de la frecuencia de replicación de los plásmidos tipo pUC con la elevación de la temperatura de cultivo. Esta estrategia ha sido bastante estudiada en reactores a escala de laboratorio. Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se aborda su estudio considerando las condiciones de trabajo de los reactores de gran escala (0.1 a 100 m<sup>3</sup>), en particular la creciente limitación en la transferencia de calor al aumentar la escala del biorreactor (Lara *et al*, 2006). Por lo tanto, los resultados obtenidos no son representativos de los reactores de producción dadas las diferencias en el comportamiento dinámico en los reactores y el impacto sobre la fisiología de las fábricas celulares, y por consecuencia de la productividad. De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se investigó el efecto de la tasa de calentamiento en un proceso de producción por termo-inducción de alta densidad celular de *Escherichia coli*, de un plásmido modelo de vacuna simulando las condiciones de calentamiento de los reactores de gran escala. Primero, se evaluó el efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de biomasa y ADNp en cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  en matraz a 30, 35, 37, 40, 42 y 45 °C, a fin de determinar las mejores temperaturas para su producción. Después se completó la definición del proceso de producción por termo-inducción de ADNp y se evaluó el efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción de ADNp con indicadores macroscópicos. Lo anterior fue llevado a cabo en cultivos de alta densidad celular de *E. coli*



DH5 $\alpha$  en un biorreactor instrumentado operado en modo lote alimentado, con incremento lineal de la temperatura de cultivo de 35 a 42 °C a tasas de calentamiento de 0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 °C/min.

Adicionalmente, el biorreactor utilizado se instrumentó con un sensor de impedancia por radiofrecuencia con el cual, se realizaron mediciones de capacitancia y de conductividad de los cultivos en tiempo real. Los datos de dichas mediciones fueron correlacionados con la concentración de biomasa y acetato, respectivamente. Con el análisis anterior, se generaron modelos simples y parámetros que estiman la concentración de biomasa y de acetato a partir de las mediciones de capacitancia y conductividad, respectivamente. Dado que el desempeño fisiológico del cultivo está estrechamente vinculado con la productividad y es sensible a las condiciones de proceso, se determinaron además, la tasa de crecimiento específico y el rendimiento biomasa sobre sustrato, utilizando los estimados de concentración de biomasa junto con los cálculos del volumen de trabajo del reactor y consumo de alimento.

Contar con estimaciones de variables de proceso a partir de mediciones en tiempo real de propiedades físicas del medio, permiten identificar el estado fisiológico del cultivo y constituyen una herramienta poderosa para el control y seguimiento de bioprocesos, para la cual está prevista su implementación obligatoria en la producción de biofármacos.

## 1. Antecedentes

### 1.1. El ADN plasmídico como principio activo en productos biofarmacéuticos

El ADN plasmídico (ADNp) es una molécula de ADN de doble cadena covalentemente cerrada. Es un elemento extracromosomal presente en algunas bacterias, hongos y levaduras. Estructuralmente se presenta en las isoformas superenrollada, circular relajada y lineal, pero también como concatámeros o multímeros (Figura 1.1). La importancia biológica de los plásmidos radica en conferir ventajas adaptativas a los organismos portadores, principalmente de resistencia a agentes físicos y químicos como radiación UV y antibióticos. La replicación del ADNp es autónoma e independiente del cromosoma, y emplea la maquinaria celular del hospedero. Los plásmidos pueden ser transferidos de una célula a otra durante la división celular (transferencia vertical) o mediante conjugación (transferencia horizontal), inclusive entre células de otras especies (Lara y Ramírez, 2012).

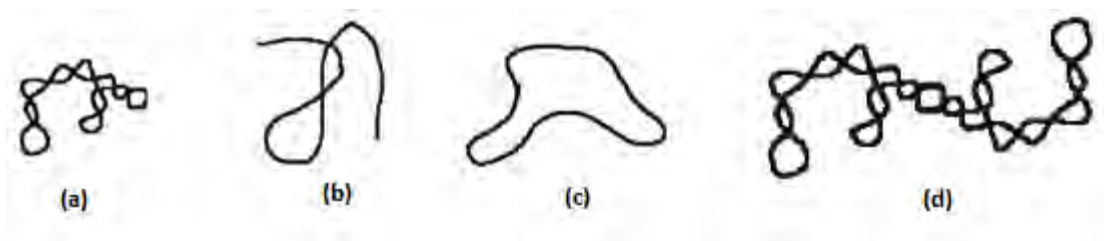


Figura 1.1. Topologías del ADNp. (a) Circular covalentemente cerrada superenrollada, (b) lineal abierta, (c) circular covalentemente cerrada relajada, y (d) circular covalentemente cerrada dimérica (Adaptado de Schleef y Blaesen, 2009).

En 1973, el trabajo de investigación de Cohen y Boyer en torno a los plásmidos y las enzimas de restricción, marcó el inicio de la tecnología del ADN recombinante considerada como uno de los desarrollos tecnológicos más revolucionarios de la biología en los últimos años. Gracias a la universalidad del código genético, esta tecnología permite el aislamiento y manipulación de genes de un organismo para transferirlos a otro (genes heterólogos) mediante un vector, siendo el ADNp el más ampliamente utilizado. Con ello, ha sido posible obtener organismos genéticamente modificados (OGM's), dotándolos de capacidades para atender las necesidades en rubros prioritarios de la sociedad como: salud, alimentación, energía, industria y medio ambiente. De hecho, una de las motivaciones principales para el desarrollo de OGM's fue la de producir proteínas idénticas a las

humanas para contender con problemas de salud, siendo la diabetes mellitus el caso más emblemático y la insulina humana la primera proteína recombinante obtenida (Bolívar, 2011).

Además de ser una herramienta imprescindible en el entorno biotecnológico para la obtención de OGM's y la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones médicas e industriales, el ADNp es también un prometedor vector no viral para inmunización y terapia génica (Goncalves *et al.*, 2012). Esta nueva generación de biofármacos consiste en la introducción en un paciente, de plásmidos que pueden contener uno o varios genes. Dichos genes codifican antígenos y péptidos terapéuticos que son expresados intracelularmente, y generan respuestas fisiológicas que confieren en ciertos casos, un nivel de protección o acción similar al de los tratamientos basados en virus o microorganismos atenuados, así como de proteínas recombinantes (Danquah y Forde, 2007).

Por sus características químicas los tratamientos basados en ADNp tienen importantes ventajas con respecto a los basados en virus atenuados y proteínas recombinantes complejas como: menor riesgo de infección secundaria (Kutzler y Weiner, 2008); reducción significativa en el tiempo de desarrollo de producto (de meses hasta unas pocas semanas) (Carnes y Williams, 2007); mayor estabilidad y prolongación de la vida de anaquel con la posibilidad de prescindir de una cadena de frío (Ongkudon *et al.*, 2011); reducción en tiempo, número de operaciones unitarias, costo de materias primas y controles de proceso al no requerir el empleo de sistemas de expresión de tercera generación que se traducen en un menor costo de producción (Lara y Ramírez, 2012), y que al mismo tiempo mejoran la capacidad de respuesta de la plataforma productiva ante una pandemia.

Hace dos décadas el ADNp demostró su potencial terapéutico al expresarse el transgén de la hormona de crecimiento humano en un ratón (Tang *et al.*, 1992). A partir de ese momento, el ADNp se ha consolidado en buena parte de los desarrollos de vacunación y terapia génica (Figura 1.2), particularmente para padecimientos en los que no han resultado efectivos los vectores tradicionales como: hepatitis C, tuberculosis y SIDA, por mencionar algunos. Sin embargo, no se ha logrado igualar el nivel de protección que brindan los

vectores virales, por lo que hasta el momento no se dispone de ningún tratamiento basado en ADNp para su uso en humanos (Listner *et al.*, 2006). No obstante, con la aprobación de 4 vacunas para uso veterinario entre 2005 y 2007 (Kutzler y Weiner 2008), la tecnología de ADNp recobró interés; gracias a las innovaciones en formulaciones y métodos de entrega, se han conseguido abatir en gran medida los problemas de expresión de genes e inmunogenicidad (Goncalves *et al.*, 2012).

Lo anterior se demuestra con el creciente número de pruebas clínicas y el progreso que han tenido los tratamientos basados en ADNp en los últimos 4 años: en fase I, pasaron de ser 72 a 146; en fase II, de 20 a 46, y en fase III, de 2 a 10 (Datos obtenidos de Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2012).

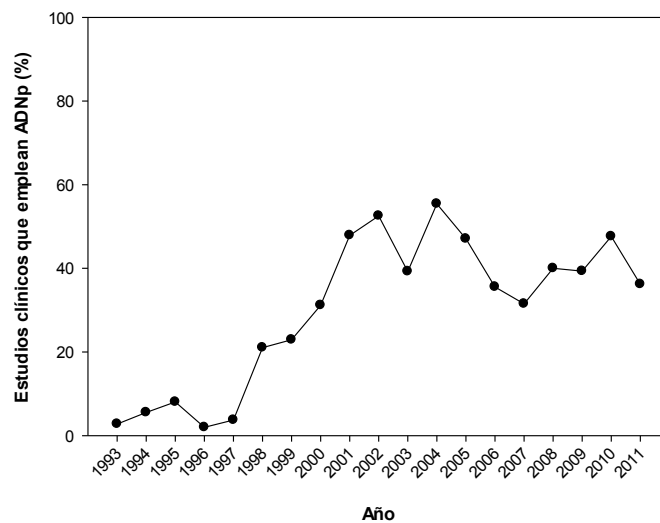


Figura 1.2. Evolución en el tiempo de los desarrollos de terapias basadas en ADNp en estudio clínico en relación con otros vectores. Basado en datos de Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2012.

Un aspecto fundamental del ADNp en vacunación y terapia génica es el topológico. Por ser más compacta que otras isoformas, la isoforma superenrollada (véase Figura 1.1) se difunde con mayor rapidez. En consecuencia, su capacidad de transfección (incorporación de material genético exógeno en células eucariotas) es superior a la de otras isoformas. También es menos susceptible a la degradación por esfuerzos de corte y endonucleasas, lo que le confiere mayor estabilidad, y tiene el menor riesgo de integración cromosomal (Schleef y Blaesens, 2009).

Dada la relevancia que tiene el ADNp como principio activo de biofármacos, y la alta probabilidad de que aparezca en el mercado el primer tratamiento basado en ADNp antes del 2020 (Han *et al.*, 2009), las agencias regulatorias han emitido recomendaciones sobre los aspectos de los productos de ADNp entre los que destaca el superenrollamiento. Por ejemplo, la administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA) establece que la fracción de plásmido en la conformación superenrollada debe ser al menos del 80% (FDA, 2007).

## **1.2. Producción de ADN plasmídico**

### ***Situación actual***

El ADNp se produce principalmente por cultivos de *Escherichia coli*. Aunque existen métodos de síntesis enzimática *in vitro*, sus altos costos y dificultades técnicas inherentes los hacen inviables para su aplicación a gran escala (Carnes y Williams, 2007). Los procesos de fermentación existentes están cimentados en las plataformas de producción de proteína recombinante (Goncalves *et al.*, 2012), y emplean cultivos de alta densidad celular con rendimientos que van desde los 500 hasta 750 mg/L en la escala de 2000 L (Listner *et al.*, 2006) hasta 2,590 mg/L (Carnes *et al.*, 2011). En general constan de 3 etapas: mantenimiento y proliferación del banco celular, cultivo y purificación (véase Figura 1.3). En el banco celular, la cepa transformada con el vector optimizado se encuentra en condiciones de almacenamiento que la mantienen viable por largos periodos. Después, en la etapa de cultivo, el inóculo se cultiva en un medio nutritivo en un reactor de tanque agitado en condiciones controladas de pH, concentración de oxígeno disuelto y temperatura, a fin de alcanzar la cantidad máxima posible de plásmido. Por último, en la etapa de purificación, el material celular se separa del medio de cultivo y se trata por métodos físicos o químicos para liberar el plásmido. El plásmido se aísla de los restos celulares, se recupera, y posteriormente se purifica por diversas técnicas (Durland y Eastman, 1998; Levy *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000).

## Retos

Puesto que la cantidad de ADNp requerida para una dosis terapéutica es del orden de varios miligramos, se requiere una capacidad de producción del proceso de 100 g hasta 1.0 Kg (Schleef y Blaesen, 2009). De no incrementarse, será insuficiente para garantizar el abasto de ADNp en los próximos años, tanto para las cuestiones de aprobación y licencia de los tratamientos en evaluaciones clínicas, como para proteger a la población mundial ante una eventual emergencia sanitaria (Hoare *et al.*, 2005).

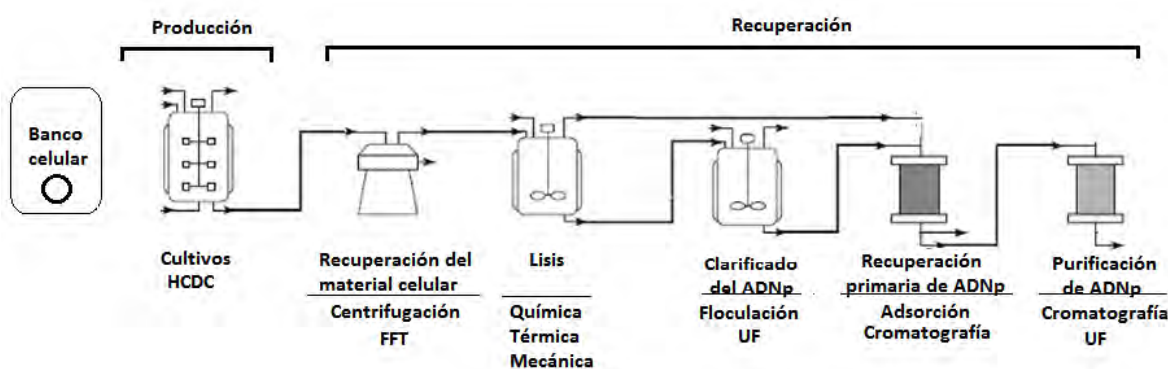


Figura 1.3. Proceso de producción de ADNp (Adaptado de Ghanem *et al.*, 2013).

Diversas estrategias se dirigen a atender esta problemática como: el diseño de nuevos vectores, la ingeniería celular y la ingeniería de procesos de cultivo y purificación. Algunos investigadores han destacado el impacto que las condiciones de cultivo tienen sobre el rendimiento y la calidad del plásmido. Por ejemplo, Prazeres y colaboradores (1999) señalan que las limitaciones de oxígeno propician la inestabilidad segregacional del plásmido, por lo que evitarlas, incrementaría el rendimiento específico de ADNp, y por consiguiente, la cantidad de plásmido en relación a otros componentes celulares (ADN genómico, ARN y proteínas). Esto último contribuye a hacer más eficiente el proceso de purificación, y ejemplifica como las mejoras en el proceso de fermentación inciden positivamente en las operaciones de recuperación de ADNp.

A pesar del estrecho vínculo que existe entre la producción de proteína recombinante y la producción de plásmido, ambos procesos exhiben diferencias importantes. El ADNp tiene una composición diferente y un peso molecular mucho mayor al de las proteínas (Wang *et*

*al.*, 2001). Por otro lado, la inducción de la expresión del gen heterólogo impone una carga metabólica superior a la que se observa por mantenimiento y replicación del plásmido (Prather *et al.*, 2003). Todo esto obliga a replantear el diseño de los procesos actuales, ajustándolos a los requerimientos de la cepa productora de modo que contribuyan a incrementar el rendimiento específico de plásmido, desde la formulación de medios de cultivo y establecimiento de condiciones de proceso, hasta los métodos de inducción de la replicación del plásmido. La optimización y validación de un sistema de cultivo a gran escala son decisivas para la introducción exitosa del ADNp en el mercado.

### **1.2.1. Hospederos de producción**

La bacteria gram negativa *E. coli*, es el hospedero más empleado en la producción de proteínas recombinantes simples (sin glicosilaciones, modificaciones postraduccionales ni puentes disulfuro), por lo que no es sorprendente encontrarla también en la producción de ADNp (Carnes y Williams, 2007). Entre sus ventajas, dicha bacteria requiere elementos simples para su cultivo; su desempeño usualmente es robusto, y se posee un amplio conocimiento y repertorio tecnológico para su manipulación. Sin embargo, componentes de su pared celular como los lipopolisacáridos, al ser contaminantes de alto riesgo en preparaciones farmacéuticas de administración parenteral, representan una dificultad adicional al proceso de purificación. Una alternativa atractiva que no tiene este problema es el empleo de bacterias gram positivas como los lactobacilos, por su estatus de generalmente reconocidos como seguros (GRAS), pero que por el momento su desarrollo es incipiente para su aplicación a escala industrial (Goncalves *et al.*, 2012). Por lo tanto, a pesar de algunos inconvenientes en su manejo, *E. coli* es el hospedero predilecto en la producción de principios activos biotecnológicos.

Varias de las cepas mutantes disponibles de *E. coli* se adaptaron para la producción de ADNp, muchas de ellas diseñadas para fines muy específicos como BL21 para la producción de proteína recombinante, y cepas de las series DH y JM para clonación. DH5 $\alpha$  es una de las cepas comúnmente utilizadas para la producción de ADNp. Su genotipo es  $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk^-, mk^+) gal^- phoA supE44 \lambda^- thi^-1 gyrA96 relA1$ . Estas mutaciones (Tabla 1.1) dotan a la cepa de marcadores para su

selección colorimétrica con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3indoil- $\beta$ -D-Galactopiranosido) e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), y mejoran la estabilidad del plásmido. No obstante, la presencia de secuencias de inserción (transposones) en el cromosoma de DH5 $\alpha$ , comprometen la integridad estructural del plásmido. Esto plantea la necesidad de diseñar una cepa específicamente para la producción de plásmido. Para ello se proponen modificaciones de genes clave del metabolismo central, de la replicación del ADNp y de la respuesta estricta que dirijan de manera más eficiente los recursos materiales y energéticos hacia la replicación del plásmido, a la vez de reducir el desperdicio de carbono como acetato. A pesar de algunas características indeseables, los rendimientos más altos de ADNp se han obtenido con *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Mutaciones que contribuyen a la estabilidad y rendimiento del plásmido		
Gen	Descripción	Referencia
F <sup>-</sup>	Factor de conjugación. Su eliminación evita la inestabilidad del plásmido por transferencia horizontal.	(Casali, 2003)
<i>recA1</i>	Codifica recombinasas. Su eliminación reduce la frecuencia de recombinación homóloga.	(Casali, 2003)
<i>endA1</i>	Codifica endonucleasas tipo 1. Su eliminación evita la degradación del plásmido.	(Casali, 2003)
<i>hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)</i>	Inactiva el sistema de restricción del hospedero protegiendo el ADN por metilación.	(Howe, 2007)
<i>gyrA96</i>	Conjunto de girasas que enrollan el plásmido	(Howe, 2007)
<i>relA1</i>	Codifica la ppGpp sintetasa I; ppGpp es un inhibidor de la RNAPol que se produce en respuesta a la limitación de aminoácidos. Su eliminación evita la activación de la respuesta estricta.	(Bachmann, 1990; Howe, 2007)

Mutaciones que permiten la selección colorimétrica de cepas		
Gen	Descripción	Referencia
$\phi$ 80 <i>lacZ</i> <i>Δ</i> <i>M15</i>	Complementación $\alpha$ de $\beta$ -tiogalactosidasa para selección de colonias blancas y azules en presencia de X-Gal e IPTG.	(Howe, 2007)
( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169</i>	Eliminación del operón <i>lac</i> que se extiende hasta el gen de la biosíntesis de arginina, indispensable para la selección de colonias blancas y azules.	(Howe, 2007)

Mutaciones diversas		
Gen	Descripción	Referencia
<i>gal</i> <sup>-</sup>	Impide la utilización de galactosa.	(Bachmann, 1990)
<i>phoA</i>	Codifica la proteína fosfatasa alcalina.	(Chang <i>et al.</i> , 1986)
<i>supE44</i> $\lambda$ <sup>-</sup>	Permite la infección por fago $\lambda$ .	(Bachmann, 1990)
<i>thi-1</i>	Auxotrofia. Requiere la suplementación de tiamina al medio de cultivo.	(Bachmann, 1990)

Tabla 1.1. Descripción genotípica de *E. coli* DH5 $\alpha$ .



### **1.2.2. Medios de cultivo**

La composición de un medio de cultivo es determinante en el rendimiento y calidad del plásmido (Carnes y Williams, 2007). Mediante modelos estequiométricos y diseños experimentales se han identificado los componentes que contribuyen a incrementar significativamente los rendimientos de ADNp, y que satisfacen tanto los requerimientos del hospedero, así como criterios de proceso, económicos y normativos (Prazeres *et al.*, 1990). La aplicación de los métodos racionales mencionados ha permitido identificar aminoácidos y nucleósidos clave de la síntesis de ácidos nucleicos (Wang *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 1990), así como las concentraciones óptimas de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo (O’Kennedy *et al.*, 2000; Danquah y Forde, 2007; Ongkudon *et al.*, 2011) de medios definidos y semi-definidos que incrementan el rendimiento específico de ADNp en *E. coli*.

### **1.2.3. Métodos de cultivo**

A nivel industrial, los cultivos de alta densidad celular (20 g/L o superiores, medida como peso seco) son la opción que permiten maximizar los rendimientos de ADNp, además de ser económicamente viables para su introducción al mercado a un costo accesible y competitivo (Lara y Ramírez, 2012). La elección de un método de cultivo para alcanzar altas densidades celulares depende en gran medida del metabolismo del hospedero (Goncalves *et al.*, 2012).

#### **1.2.3.1. Modo lote**

Por sus bajos rendimientos en biomasa y plásmido, el modo de cultivo lote solo se emplea hasta ahora en etapas tempranas del proceso de producción de ADNp. La principal limitante de este modo de cultivo radica en el sobreflujo metabólico que experimenta *E. coli* con concentraciones elevadas de glucosa (50 g/L y mayores); la excreción y acumulación resultante de ácidos orgánicos, principalmente de acetato, tienen serias consecuencias fisiológicas en el hospedero que conducen a bajos rendimientos de biomasa y ADNp (Lara *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2011).

Mediante estrategias de ingeniería celular, ha sido posible generar alternativas para reducir el sobreflujo metabólico que posibilitan el cultivo de alta densidad celular en modo lote, para la producción de ADNp en *E. coli* (Borja *et al.*, 2012).

### 1.2.3.2. Modo lote alimentado

Este modo de cultivo permite alcanzar altas densidades celulares en dos etapas. Primero en condiciones no limitantes del crecimiento, el cultivo crece a su máxima tasa de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ). Una vez agotada la fuente principal de carbono, comienza la etapa limitante del crecimiento, en la que se controla el flujo de alimentación de sustrato para mantener el crecimiento a una tasa de crecimiento específico deseada ( $\mu_{\text{set}}$ ) por debajo de la tasa de crecimiento específico crítica ( $\mu_{\text{crit}}$ ), y así evitar el sobreflujo metabólico. El flujo de alimentación puede estar predeterminado de acuerdo a una función lineal, por pulsos o exponencial, o bien, controlado mediante la retroalimentación de alguna variable de proceso como: la TOD (Cutayar y Poillon, 1989), la concentración de glucosa (Luli *et al.*, 1987), la cantidad de dióxido de carbono producido (Jenzsch *et al.*, 2007) e inclusive el calor generado por el metabolismo (Schaepe *et al.*, 2011).

Un método sencillo que no precisa de control retroalimentado, consiste en la predeterminación del flujo de sustrato por una función exponencial deducida a partir de los balances de biomasa y sustrato (Ec. 1.1) (Korz *et al.*, 1995):

$$F_A = \left( \frac{\mu_{\text{set}}}{Y_{xS}} + m \right) \frac{X(t_{LA})V(t_{LA})e^{\mu_{\text{set}}(t-t_{LA})}}{C_{SA} - C_S} \quad (1.1)$$

La adición de sustratos altamente concentrados, la disminución de la eficiencia de mezclado y la consecuente limitación de la transferencia de oxígeno en los reactores de tanque agitado convencionales, son problemas técnicos inherentes a este modo de cultivo que propician condiciones heterogéneas en el biorreactor. Dichas heterogeneidades inciden en el desempeño de la fábrica celular, y se acentúan además, al incrementar la escala del reactor (Enfors *et al.*, 2001; Fyferling *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2006).

Al igual que otros productos biotecnológicos, el ADNp se produce en cultivos de alta densidad celular en modo lote alimentado bajo diversas estrategias. Por ejemplo, en la producción de plásmidos pBR322, Lahijani y colaboradores (1996), al emplear una alimentación exponencial predeterminada de glucosa en un medio semi-definido, e incrementar la temperatura de cultivo de 37 a 42 °C, obtuvieron 220 mg/L de ADNp. Chen y colaboradores (1997), al emplear un control retroalimentado por TOD (30%) y pH (7.2), y un medio semi-definido, obtuvieron concentraciones de plásmido entre 82 y 98 mg/L. En la producción de plásmidos multicopia tipo pUC, procesos patentados como el de Merck, emplean alimentación constante de glicerol en un medio definido con glutamato monosódico y reportan un rendimiento  $Y_{px}$  de hasta 39 mg/g (Carnes *et al.*, 2006; Chartrain *et al.*, 2005). Boehringer-Ingelheim emplea alimentación exponencial ( $\mu_{set} \approx 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) seguido de alimentación lineal, además de glucosa y un medio definido suplementado con isoleucina, y reportan un rendimiento  $Y_{px}$  de 45 mg/g y una concentración de ADNp de 633 mg/L (Carnes *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2005). Por último, el proceso de Nature Technologies Corp emplea alimentación exponencial de glicerol ( $\mu_{set} = 0.12 \text{ h}^{-1}$ ) en un medio semi-definido con incremento de temperatura de 30 a 42 °C, y reportan un rendimiento  $Y_{px}$  de 43 mg/g y una concentración de ADNp de 1.5-2.0 g/L (Carnes y Williams, 2011).

#### 1.2.4. Inducción de la replicación de ADN plasmídico

Los plásmidos empleados en terapia génica contienen elementos que regulan la expresión del gen terapéutico o profiláctico en células eucariotas, así como también para su replicación y mantenimiento en hospederos bacterianos (Figura 1.4).



Figura 1.4. Elementos básicos que componen un plásmido terapéutico (Adaptado de Kutzler y Weiner, 2008).

La mayor parte de los plásmidos empleados en los desarrollos de terapia génica e inmunización son del tipo pUC (Williams *et al.*, 2009). Estos plásmidos son derivados directos de los plásmidos pBR322, los que a su vez provienen de los plásmidos pColE1 cuyo origen de replicación es *ori*. Los plásmidos pColE1, a diferencia de otros plásmidos, no requieren de la síntesis de proteínas para iniciar su replicación, sino de un transcrito, por lo que se dice que su replicación es relajada. La replicación de los plásmidos pColE1 se lleva a cabo por un mecanismo zeta ( $\theta$ ) y es bidireccional. Primero, el complejo de helicasas DnaA, DnaB y DnaC, separa y desenrolla las cadenas alrededor de *ori* dejándolo expuesto. La ARN polimerasa (RNAPol) se une al sitio de inicio de replicación y comienza a sintetizar un transcrito de 555 nucleótidos denominado RNAII. Conforme se transcribe y madura la estructura secundaria de RNAII, esta se hibrida con el ADN complementario en *ori*. El híbrido formado es roto por la enzima RNaseH, que deja libre un grupo 3'OH que es sustrato de la DNAPol1 (Figura 1.5 izquierda). La DNAPol1 comienza a replicar la cadena líder mientras que la DNAPol3 retira el fragmento de RNAII (Summers, 1996).

La replicación de los plásmidos pColE1 es regulada negativamente por un transcrito antisentido de 108 nucleótidos denominado RNAI, y una proteína represora denominada ROP (Represor del iniciador) /ROM (Modulador del RNAI) codificada en su secuencia. RNAI interactúa con RNAII y forma un complejo que es estabilizado por la proteína ROM (Tomizawa, 1990), el cual impide la hibridación de RNAII con el ADN complementario. En consecuencia, se inhibe la replicación, y una vez terminada la transcripción del iniciador inactivo, este se libera (Figura 1.5 derecha).

Los plásmidos pUC no contienen el gen *rop/rom*, y a diferencia de los plásmidos pBR322, la base que precede la secuencia de RNAI es una guanina en lugar de una adenina. La mutación puntual A/G altera la estructura secundaria del RNAII, y en consecuencia, dificulta la interacción con RNAI. Esto dio como resultado un incremento en el número de copias de plásmido de 20 a 50 en cultivos de *E. coli* a 37 °C (Lin-Chao *et al.*, 1992). A esta mutación se asocia la capacidad de amplificación del número de copias del plásmido al incrementar la temperatura en los cultivos de *E. coli*, obteniéndose entre 400-500 copias por célula a 42 °C, 10 veces más que a 37 °C (Miki *et al.*, 1987). No obstante, esta capacidad se

suprime a temperaturas de cultivo por debajo de 30 °C. Estas características distinguen a los plásmidos pUC de otros plásmidos derivados de pColE1 (Lin-Chao *et al.*, 1992).

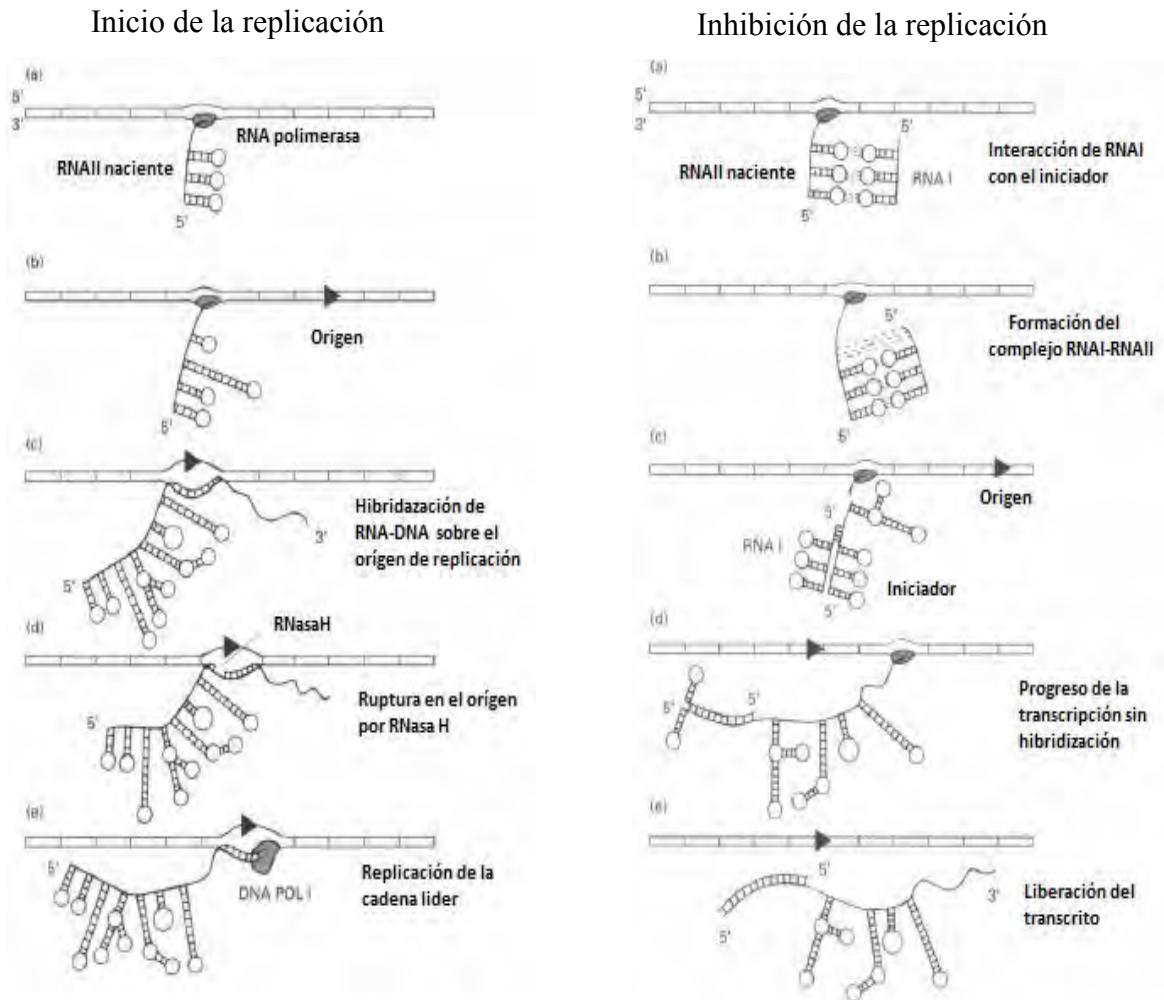


Figura 1.5. Etapas en la iniciación e inhibición de la replicación de los plásmidos pUC (Adaptado de Summers, 1996).

#### 1.2.4.1. Métodos químicos para la inducción de la replicación de ADN plasmídico

##### *Adición de cloranfenicol*

La efectividad del cloranfenicol en la amplificación de los plásmidos pColE1 fue demostrada por Clewell (1972). Dicho autor observó que posterior a la adición de cloranfenicol a un cultivo de *E. coli*, la tasa de replicación y el número de copias de plásmido por célula se incrementaron hasta 8 y 125 veces, respectivamente. También observó que la tasa de replicación del ADN cromosomal disminuyó de manera importante.

Este antibiótico detiene el crecimiento celular, ya que al unirse a los ribosomas bacterianos, inhibe la síntesis de proteínas (Reinikainen *et al.*, 1989) (Drugbank, 3.0) y por consiguiente, la replicación del cromosoma (Hoffmann y Rinas, 2001). Esto permite que el plásmido tenga un mayor número de enzimas de replicación disponibles, lo que incrementa su frecuencia de replicación (Clewell, 1972).

Aunque la adición de cloranfenicol es un método efectivo para incrementar la amplificación del ADNp, y ha sido considerada para la producción de ADNp a gran escala, su empleo, al igual que el de otros antibióticos, no es del todo recomendable, sobre todo si está destinado como biofármaco por el riesgo que representa su empleo (Lahijani *et al.*, 1996; Valdez-Cruz *et al.*, 2010), además de las implicaciones económicas.

### ***Limitación por aminoácidos***

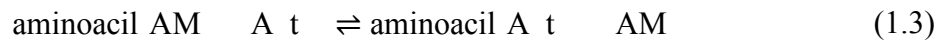
Cuando un aminoácido es limitante en el crecimiento de *E. coli*, activa lo que se denomina la respuesta estricta. El primer evento de esta respuesta consiste en el rápido incremento de la concentración del nucleótido ppGpp (guanosina 5´difosfato 3´difosfato). Este nucleótido inhibe la actividad de la RNAPol, lo que suprime la síntesis de ARNr, ARNt y ADNp. La síntesis y degradación de ppGpp es realizada por las enzimas codificadas por *relA* y *spoT*, que son ppGpp sintetasa I y ppGpp fosfohidrolasa, respectivamente (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012). Mutantes en *relA* no producen ppGpp durante la limitación de aminoácidos (Riethdorf *et al.*, 1989); ppGpp es degradado por la ppGpp fosfohidrolasa, por lo que mantiene una baja concentración intracelular de este nucleótido. A este fenotipo se le conoce como respuesta relajada (Neubauer *et al.*, 1996).

Durante la limitación de aminoácidos se acumulan ARNt no cargados. Estos previenen la formación del complejo inhibitorio RNAII-RNAI en los plásmidos pColE1, e incrementan así la replicación del plásmido (Silva *et al.*, 2012).

### ***Adición de AMP***

La adición de adenosín monofosfato (AMP), a diferencia de la de otros nucleótidos,

permite incrementar el número de copias de plásmido. Al igual que con la limitación de aminoácidos, el AMP también favorece la acumulación de ARNt no cargados. El mecanismo de acción es el siguiente: al considerar las reacciones de unión de aminoácidos a un ARNt (Ecuaciones 1.2 y 1.3), la adición de AMP revierte el equilibrio hacia los reactivos, lo que favorece la acumulación de ARNt no cargados (Wang *et al.*, 2007).



Este método solo funciona en mutantes en *relA* como DH5 $\alpha$ , ya que ppGpp inhibe la síntesis de ARNt estables. Está demostrado que la combinación de AMP con la limitación de aminoácidos ejerce un efecto sinérgico en la amplificación de ADNp. También está demostrado que la adenosina tiene un efecto similar al AMP pero de menor intensidad (Wang *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.2. Métodos físicos para la inducción de la replicación de ADN plasmídico

##### *Incremento de la temperatura (termo-inducción)*

El aumento en la frecuencia de replicación de los plásmidos pUC con el aumento de temperatura de cultivo, y la atenuación de la respuesta del choque térmico del hospedero, son la clave de la efectividad de esta estrategia. Entre sus ventajas, cuenta su facilidad de implementación y bajo costo, ya que no requiere equipos adicionales, dado que la mayoría de los reactores a gran escala disponen de servicio de vapor y de agua de enfriamiento para mantener controlada la temperatura del cultivo. Su efectividad en la producción de ADNp ha sido demostrada en varios trabajos que emplean diversos esquemas de calentamiento (temperatura constante, escalones, rampas y oscilaciones). En cultivos en matraz de *E. coli* DH5 $\alpha$  pUC a 30, 32, 37 y 40 °C, Silva y colaboradores (2009) reportaron un rendimiento  $Y_{px}$  5 veces mayor a 40 °C que a 30 °C. Ongkudon y colaboradores (2011) por su parte, estudiaron diferentes esquemas de calentamiento en cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  pcDNA3F en matraces. Primero, en cultivos a temperatura constante, obtuvieron un rendimiento de ADNp ligeramente superior a 35 que a 37 °C. En otro experimento, incrementaron la

temperatura de cultivo súbitamente de 35 a 45 °C, y el rendimiento  $Y_{px}$  fue hasta 2 veces más alto que en los experimentos a temperatura constante. En un tercer experimento, alternaron la temperatura de cultivo entre 35 y 45 °C, y obtuvieron un rendimiento  $Y_{px}$  aún mayor con respecto a los esquemas previos. En lo que respecta a cultivos en biorreactor a diferentes escalas, Lahijani y colaboradores (1996) reportaron por primera vez la aplicación del incremento de temperatura de 37 a 42 °C, en cultivos de DH10B en biorreactor de 10 L operado en modo lote y lote alimentado, para la producción de un plásmido terapéutico tipo pUC. Los rendimientos  $Y_{px}$  en dichos cultivos fueron 6.7 y 9.3 mg/g, respectivamente. El rendimiento máximo en el cultivo por lote alimentado se alcanzó a las 19.5 h. Otro proceso con incremento de temperatura de 30 a 42 °C, es el descrito por Williams y colaboradores (2009). Este proceso se aplicó en la producción de un plásmido terapéutico optimizado tipo pUC en cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor alimentado ( $\mu_{set} = 0.12 \text{ h}^{-1}$ ) de 6 L, y emplea glicerol como fuente de carbono en todas las etapas de crecimiento. En dicho proceso la temperatura se incrementa a razón de 0.5 °C/min cuando la concentración celular del cultivo se encuentra entre 40 y 60 unidades de DO. Bajo esas condiciones, fue posible alcanzar un rendimiento  $Y_{px}$  máximo de 43 mg/g en 43 h de cultivo.

Aunque existen trabajos que demuestran la efectividad del incremento de temperatura para aumentar la replicación del plásmido, la mayoría no justifica las temperaturas de crecimiento de biomasa ni de producción de plásmido empleadas mediante estudios preliminares. Típicamente los cultivos se llevan a cabo adoptando el esquema de producción de proteínas recombinantes por termo-inducción, con una temperatura inicial de 30 °C, bajo el supuesto de que la carga metabólica que impone la replicación en el hospedero a esa temperatura es baja, lo cual favorece la acumulación de biomasa. Posteriormente se eleva la temperatura de cultivo hasta 42 °C para incrementar la frecuencia de replicación del plásmido y por consecuencia el rendimiento  $Y_{px}$ .

Además, gran parte de los trabajos enfocados al mejoramiento de la producción termo-inducida de ADNp, se llevan a cabo en reactores de escala laboratorio. Sin embargo son escasos los estudios que emplean sistemas de cultivo que consideran las limitaciones de la transferencia de calor de los reactores de escala productiva. Dichas limitaciones surgen



principalmente por la reducción de la superficie de transferencia de calor por unidad de volumen de trabajo en función del volumen de los reactores de tanque agitado convencionales (Figura 1.6.), y por consiguiente, de la tasa de calentamiento (Caspeta *et al.*, 2009).

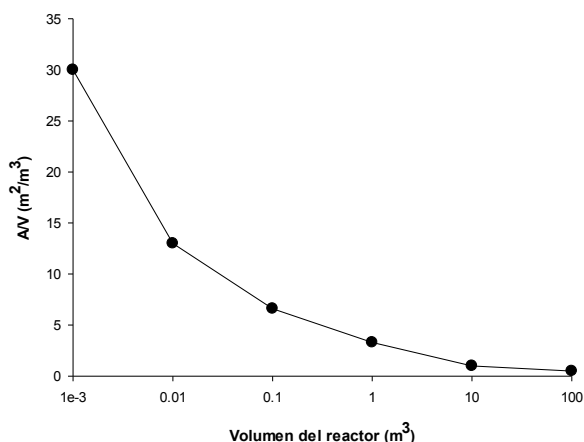


Figura 1.6. Transferencia de calor en biorreactores de escala industrial. Relación superficie de transferencia de calor y volumen del biorreactor (Adaptado de Caspeta *et al.*, 2009).

La tasa de calentamiento parece ser un parámetro relevante en bioprocesos inducidos térmicamente, tal como lo demostraron Caspeta y colaboradores (2009), al evaluar la producción de proteína recombinante termo-inducida en cultivos de *E. coli* BL21 con incremento de temperatura de 30 a 42 °C a tasas de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, típicas de fermentadores de 0.1, 5, 20 y 100 m<sup>3</sup>, respectivamente. Ellos encontraron que a medida que la tasa de calentamiento era más baja, la productividad de proteína recombinante era mayor. Además, a partir de estudios transcripcionales de los genes de la respuesta al choque térmico, maquinaria traduccional y transcripcional, observaron que el incremento en el número de transcritos de los genes de choque térmico era más bajo, mientras que los de la maquinaria traduccional eran más altos conforme la tasa de calentamiento era menor, indicando una mejor adaptación de las células al estrés térmico. Otro beneficio adicional que se observó con el empleo de bajas tasas de calentamiento, fue una menor acumulación de ácidos orgánicos por la reducción del desbalance entre las vías glicolíticas y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Con respecto a la producción de ADNp, a la fecha, el único antecedente que hace mención del efecto de la tasa de calentamiento sobre el rendimiento de ADNp es el trabajo de Carnes

y colaboradores (2011). En él se reporta un incremento de alrededor del 20% en la concentración de plásmido de un proceso de fermentación de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 30 a 42 °C a razón de 0.0125 °C/min, con respecto a otro calentado a 0.5 °C/min. Este beneficio se debió en parte a una mayor acumulación de biomasa. No obstante, resultó que en el sistema calentado a la tasa más baja, el rendimiento específico fue alrededor de 54 mg/g, mientras que en el cultivo calentado a la tasa más alta, fue alrededor de 88 mg/g. No obstante, dichos resultados están sustentados en una sola observación experimental y las condiciones de calentamiento evaluadas son insuficientes para describir el efecto de la tasa de calentamiento sobre los rendimientos de ADNp. Por otro lado, es importante considerar que la expresión tanto de genes de resistencia como de otras proteínas del hospedero, interfiere en la amplificación del plásmido. Al mismo tiempo, la disponibilidad de chaperonas, pueden estar involucradas en la estabilidad del plásmido (Hoffmann y Rinas, 2001).

Goncalves y colaboradores (2012) han señalado que los hallazgos de Caspeta y colaboradores (2009) son extrapolables a la producción termo-inducida de ADNp, dejando implícita la posible relevancia de la tasa de calentamiento en la producción de ADNp por inducción térmica, la cual tendrá que ser demostrada con evidencia suficiente y robusta estadísticamente.

### **1.3. Carga metabólica que impone la replicación del plásmido en el hospedero**

#### ***Carga metabólica***

El mantenimiento y replicación del plásmido provocan un redireccionamiento de los recursos materiales y energéticos del hospedero que se conoce como carga metabólica. Las células que contienen plásmidos experimentan cambios en su crecimiento, morfología y metabolismo, e inducen respuestas de estrés que al mismo tiempo influyen en su estabilidad (Wang *et al.*, 2001). Por el lado de crecimiento, las células con plásmido tienen tasas de crecimiento específico más bajas y periodos de adaptación más prolongados. También exhiben alteraciones morfológicas, que entre las más notables se cuenta la filamentación celular, que resulta de la interrupción de la división celular durante la elongación y

replicación del cromosoma. Estudios transcripcionales sugieren que los cambios en la actividad de las proteínas involucradas en la formación de la pared celular son responsables de este fenómeno (Silva *et al.*, 2012).

Cabe señalar que las células con plásmidos pUC, no presentan cambios importantes en el crecimiento con respecto a las células sin plásmido a temperaturas por debajo de 32 °C (Silva *et al.*, 2012; Wittmann *et al.*, 2007).

En cuanto al metabolismo y las respuestas de estrés se refiere, estudios transcripcionales y proteómicos revelan diferencias en la expresión genética entre células con y sin plásmido. Por ejemplo, en *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada, se ha reportado una menor actividad en glicólisis, síntesis de aminoácidos y nucleótidos, así como en la cadena respiratoria con respecto a *E. coli* DH5 $\alpha$  sin plásmido, además de una mayor expresión de genes de respuesta de estrés (principalmente de choque térmico) y del TCA. Sin embargo, no presentan cambios en la expresión de genes de la vía de las pentosas-5-fosfato (P5F) (Ow *et al.*, 2006).

### ***Estabilidad del plásmido***

La estabilidad del plásmido se aborda desde tres perspectivas: estructural, segregacional y topológica. Por estabilidad estructural se entiende la inmutabilidad de la secuencia del plásmido en todos los eventos de replicación (Bernal, 2007). Factores como la tasa de crecimiento, elementos genéticos del cromosoma del hospedero y el plásmido, así como las condiciones de cultivo, pueden inducir alteraciones estructurales como: inserciones, eliminaciones, mutaciones puntuales y recombinación. La falta de estabilidad estructural compromete la funcionalidad terapéutica del ADNp. Ante esta posibilidad, algunos investigadores advierten sobre la necesidad de secuenciar el plásmido como medida de control de calidad (Silva *et al.*, 2012).

Otro aspecto que influye en la estabilidad estructural es el tamaño del plásmido. Está reportado que en la producción de plásmidos de diferentes tamaños, en cepas que codifican

endonucleasas que reconocen patrones de metilación, los plásmidos de mayor tamaño fueron más susceptibles a degradación que los de menor tamaño (Yang, 2012).

La estabilidad segregacional consiste en la prevalencia del plásmido en la bacteria durante la división celular. Esta se determina a partir de la proporción del número de colonias en medios selectivos y no selectivos. La falta de estabilidad segregacional conduce a la reducción en la productividad. Las bacterias con plásmidos son inherentemente inestables por deficiencias en sus mecanismos de partición, por lo que tienden a perderlos durante la división celular.

El empleo de antibióticos es una medida para contender con la segregación de los plásmidos, ejerciendo lo que se conoce como presión de selección, pero no es del todo efectiva. La degradación del antibiótico por la actividad de las enzimas que confieren la resistencia, así como por su inestabilidad en el medio y condiciones de cultivo, disminuyen su actividad inhibitoria en células sin plásmido. En un bioproceso termo-inducido, la etapa de crecimiento a baja temperatura constituye una estrategia que minimiza la probabilidad de segregación durante la generación de biomasa.

Por otra parte, la topología del ADNp es un aspecto de gran relevancia en su aplicación como biofarmacéutico. La isoforma superenrollada es reconocida como la de mayor efecto terapéutico. El superenrollamiento del plásmido es el resultado de la actividad antagónica de las topoisomerasas I y II, esta última dependiente de ATP y la que introduce el superenrollamiento en el plásmido (Summers, 1996). Las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento y el hospedero influyen en el superenrollamiento. Por ejemplo, el incremento de la temperatura puede inducir cambios conformacionales en las moléculas de plásmido, como consecuencia de la acción de las proteínas de choque térmico sobre la actividad de las topoisomerasas (Silva *et al.*, 2012).

#### **1.4. Efecto de la temperatura de cultivo sobre el hospedero**

Como se ha señalado, incrementar la temperatura de cultivo es una estrategia efectiva en la producción de ADNp. Sin embargo, dicho incremento repercute en el desempeño

fisiológico del hospedero al desencadenar en él la respuesta de choque térmico. Esta respuesta consiste en una rápida, transitoria pero muy intensa actividad de síntesis de más de 20 proteínas de choque térmico, principalmente chaperonas y proteasas, siendo las más abundantes: DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL y GroES (Figura 1.7). Estas proteínas protegen al hospedero contra la desnaturalización térmica y controlan la homeostasis, lo que incrementa la termo-resistencia de la célula (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Su expresión se regula a nivel transcripcional por el producto del gen *rpoH*, el factor  $\sigma^{32}$ . Este se une a la RNA polimerasa para transcribir los genes del regulón de choque térmico (Arsène *et al.*, 2000). La síntesis de  $\sigma^{32}$  está fuertemente regulada a temperaturas por debajo de 32 °C, ya que el transcrito se encuentra plegado e impide el acceso a la RNAPol. Este plegamiento se desestabiliza con el aumento en la temperatura y permite la traducción de *rpoH*. Los niveles de  $\sigma^{32}$  se incrementan en un tiempo breve, luego del cual disminuyen y se estabilizan 15 min después del cambio de temperatura.  $\sigma^{32}$  es regulado por las chaperonas DnaK y DnaJ; cuando existe una mayor cantidad de proteínas mal plegadas en relación a DnaK, esta proteína se disocia de  $\sigma^{32}$ . Por el contrario, al ser escasas, DnaK/DnaJ mantienen inactivo a  $\sigma^{32}$  y dirigen su degradación por FtsH (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

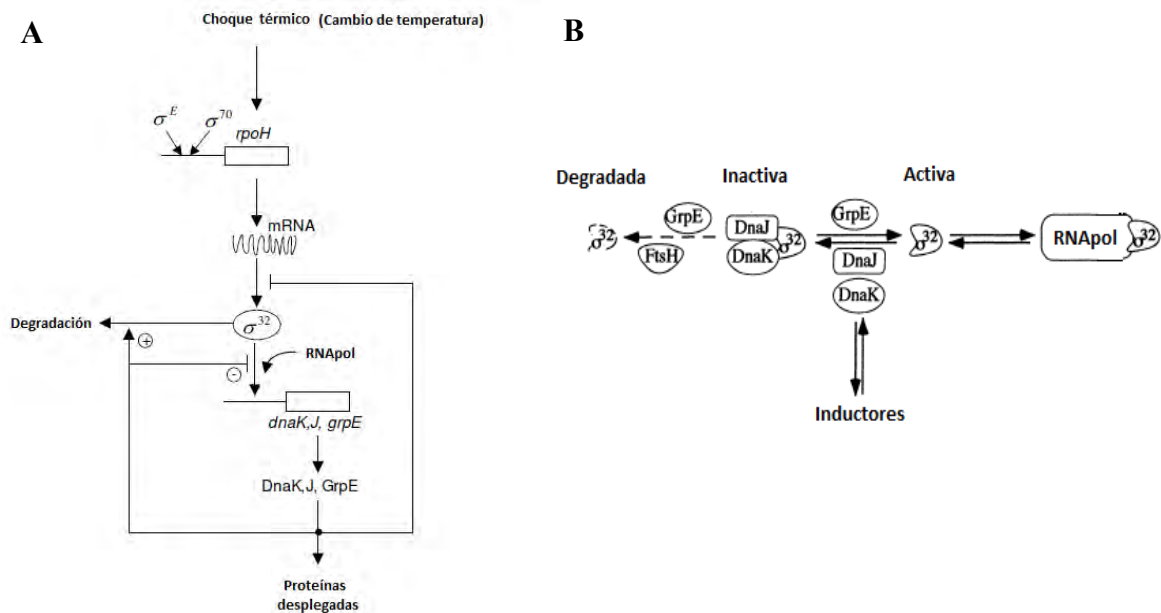


Figura 1.7. Regulación de la respuesta de choque térmico y sus efectos en el metabolismo de *E. coli*. (A) La síntesis de  $\sigma^{32}$  es mediada por la transcripción del gen *rpoH*; su inactivación y degradación es promovida por las proteínas de los sistemas DnaK/J y GrpE (Adaptado de Hasan y Shimizu, 2008). (B) Transiciones de  $\sigma^{32}$  en sus formas activa, inactiva y degradada (Adaptado de Arsène *et al.*, 2000).

Esta respuesta implica una gran carga metabólica en el hospedero, y se acentúa con la presencia del plásmido y la síntesis de proteínas codificadas en él (Hoffmann y Rinas, 2001). Esto fue demostrado por Wittmann y colaboradores (2007) en un estudio de flujo de carbono en la producción de proteína recombinante por termo-inducción. Se manifiesta en la reducción la tasa de crecimiento específico y producción de biomasa, así como en el aumento en la excreción de subproductos, principalmente acetato (Wittmann *et al.*, 2007).

A nivel de metabolismo central, el consumo específico de glucosa es mayor y presenta un flujo glicolítico más activo. Sin embargo, los flujos de carbono son menores en vías clave para el anabolismo como P5F y TCA, mientras que más de la mitad del flujo de carbono que llega al nodo de piruvato es excretado como ácidos orgánicos, reduciéndose así, el flujo de carbono hacia TCA y por consiguiente hacia la cadena respiratoria. En estas condiciones se activa la vía del glioxilato como principal vía anaplerótica. En cuanto al estado energético, los niveles de ATP son más bajos por lo que demandan una gran actividad respiratoria, denotada por el elevado consumo específico de oxígeno y de producción específica de CO<sub>2</sub> (Hasan y Shimizu, 2008), en tanto que los niveles de AMP y ADP son más altos, lo que indica una alta demanda energética, provocada principalmente por la síntesis de proteínas como GroEl y Dnak. En concordancia con estas observaciones, estudios transcripcionales muestran la represión de los genes del TCA, así como la sobreexpresión del gen *cyd* y la represión del gen *cyo*, debido a la mayor expresión del gen *arcA*. *Cyo* es un citocromo de menor afinidad por el oxígeno pero es más eficiente. Por el contrario, *Cyd* tiene mayor afinidad por el oxígeno pero es menos eficiente (Spiro y Guest, 1991). La sobreexpresión de *arcA* es un efecto indirecto del cambio de temperatura por la disminución en la solubilidad del oxígeno (Hasan y Shimizu, 2008).

Otros cambios fisiológicos que tienen lugar son: la modificación en la proporción de lípidos y proteínas de la membrana celular, la destrucción de ribosomas y la relajación del ADN. En cepas *relA*, la eventual limitación de aminoácidos activa la respuesta estricta, lo que acelera la degradación de los ribosomas y como consecuencia interrumpe la síntesis de proteínas (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

### **1.5. Aplicación de la medición de impedancia por radiofrecuencia en procesos de producción biotecnológicos con *E. coli***

Contar con información en tiempo real del crecimiento de un cultivo, representa una herramienta valiosa en el control de procesos que permite conocer el estado fisiológico de las células y tomar decisiones oportunamente ante situaciones que comprometen la producción. Para ello es necesario contar con mediciones confiables y robustas para la estimación de tasas específicas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto (Hoffmann *et al.*, 2000). Por otra parte, los análisis fuera de línea requieren tiempo e implican intervenciones que pueden poner en riesgo la producción; con base en ellos, se controla la calidad del bioproceso. A raíz de estas deficiencias, la FDA lanzó su iniciativa de tecnología analítica de proceso (PAT), la cual recomienda la implementación de herramientas de análisis y muestreo en línea, y sobre línea, para el control y seguimiento de bioprocesos (FDA 2004; Gnoth *et al.*, 2007; Kaiser *et al.*, 2008).

Existen varios métodos disponibles para el seguimiento en línea del crecimiento celular, entre los cuales, los ópticos y de actividad respiratoria, son los más comúnmente utilizados (Wechselberger y Herwig, 2012). Las mediciones de turbidez o densidad óptica, aunque son sencillas y rápidas, tienen varias limitaciones. Por ejemplo, son altamente sensibles a la presencia de burbujas, partículas y suciedad, por lo que su funcionalidad se ve mermada durante la producción (Kaiser *et al.*, 2008). Otra de sus desventajas, es que la correlación entre densidad óptica y densidad celular solo es válida en un intervalo limitado y cambia por variaciones en la morfología celular; además, no distinguen la viabilidad celular. En contraste, las mediciones de actividad respiratoria a través del análisis del gas de salida son más robustas, permiten seguir el crecimiento celular en un amplio intervalo de concentraciones y caracterizar la viabilidad del cultivo (Knabben *et al.*, 2011). No obstante, las estimaciones pueden ser imprecisas al estar basadas en los rendimientos con respecto al oxígeno, pues estos cambian bajo diferentes circunstancias, como en la inducción de genes recombinantes (Hoffmann *et al.*, 2000).

Un método alternativo y que va más allá de la estimación de biomasa, está basado en la medición de conductividad y la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  adicionado para mantener el pH del

cultivo constante. Este método propuesto por Hoffman y colaboradores (2000), contempla la estimación de la concentración de metabolitos secundarios como ácidos orgánicos. La estimación parte de considerar que el  $\text{NH}_4\text{OH}$  está dirigido a la producción de biomasa, así como a la neutralización de los ácidos orgánicos excretados, principalmente acetato, con la ventaja de que el rendimiento de biomasa con respecto al nitrógeno es prácticamente constante, aún en condiciones de inducción de genes heterólogos. Por otro lado, en ausencia de ácidos orgánicos, la conductividad tiene una tendencia lineal negativa a lo largo del cultivo; las desviaciones positivas de dicha tendencia son proporcionales al incremento en la concentración de ácidos orgánicos. Este comportamiento pone a la medición de conductividad como una alternativa atractiva para el seguimiento de la excreción de ácidos orgánicos. La medición sobre línea de ácidos orgánicos requiere de sistemas cromatográficos acoplados al fermentador mediante adaptaciones especiales para la toma de muestra y su tratamiento antes de entrar a la columna. Esto implica costos y problemas adicionales al proceso, pues los conductos de muestreo pueden bloquearse a medida que la concentración celular se incrementa (Hoffmann *et al.*, 2000), además de que la medición de dichos analitos toma varios minutos.

Los métodos descritos hasta el momento permiten estimar las concentraciones de biomasa viable y ácidos orgánicos por separado. También requieren varios dispositivos y controles para su operación (analizadores de gases, cromatógrafos). Una opción integral está dada por la espectroscopía de impedancia por radiofrecuencia (IRF), en la que gracias a las diferentes propiedades eléctricas que exhiben las células y el medio de cultivo al exponerlas a un campo eléctrico, pueden determinarse tanto la concentración celular viable, así como la concentración de ácidos orgánicos. Este método es prácticamente insensible al material no celular y a las células no viables, ya que sus propiedades eléctricas son significativamente diferentes a las de las células viables (Markx y Davey, 1999).

### ***Espectroscopía de impedancia***

La energía de un campo eléctrico puede disiparse como calor o almacenarse en la superficie de los materiales en función de dos propiedades: la conductividad ( $\kappa$ ) y la permitividad ( $\epsilon$ ). La conductividad es una medida de la capacidad de conducir la carga, mientras que la



permitividad es una medida del grado de polarización del material (Markx y Davey, 1999). Ambas propiedades se relacionan en una cantidad denominada impedancia como se indica a continuación:

$$Z = R + j\omega X_c = \frac{1}{\kappa + j\omega\epsilon_0\epsilon_r} \quad (1.4)$$

Donde “Z” es la impedancia y es una cantidad compleja cuya parte real es la resistividad “R” y su parte imaginaria la reactancia capacitiva “X<sub>c</sub>” (Dean *et al.*, 2008).

La impedancia conceptualmente refleja la pérdida de carga por los elementos resistivos, capacitivos e inductivos de un sistema. Esta similitud con la ley de Ohm permite relacionar el potencial eléctrico aplicado al material a una frecuencia  $\omega$ , con la corriente eléctrica resultante, con lo que se obtiene la magnitud y fase de la impedancia (Barsoukov y Macdonald, 2005; Xi *et al.*, 2009). De esa manera se determinan los componentes real e imaginario y se calculan la conductividad  $\kappa = K/R$ , y la permitividad relativa  $\epsilon_r = CK/\epsilon_0$ . Donde “K” es una constante de celda que considera la geometría del electrodo y “C” la capacitancia (Markx y Davey, 1999). Después de varias mediciones de permitividad a diferentes frecuencias (Figura 1.8), los datos se analizan mediante un ajuste de mínimos cuadrados no lineal de la ecuación de Cole-Cole o en un gráfico de Cole-Cole (Markx y Davey, 1999).

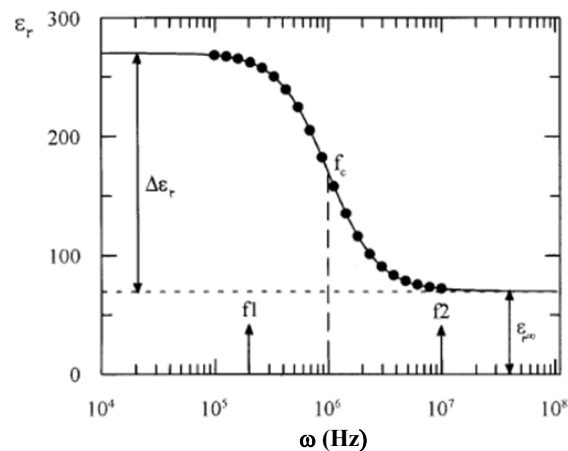


Figura 1.8. Datos de capacitancia a diferentes frecuencias. El cambio en la capacitancia ( $\Delta\epsilon_r$ ) por la dispersión  $\beta$ , está delimitado entre las frecuencias  $f_1$  y  $f_2$ .  $f_c$  es la frecuencia característica (Adaptado de Markx y Davey, 1999).

## ***Aplicación de la espectroscopía de impedancia en sistemas biológicos***

Los materiales biológicos, a diferencia de otros, exhiben cambios en la permitividad a medida que se incrementa la frecuencia. Estos cambios están asociados a las transiciones de diferentes eventos de polarización denominadas dispersiones. Por ejemplo, la dispersión  $\alpha$  se debe al flujo de iones a través de la membrana mientras que la dispersión  $\beta$  resulta de la acumulación de carga en la membrana (Davey y Kell, 1995; Markx y Davey, 1999) (Figura 1.9).

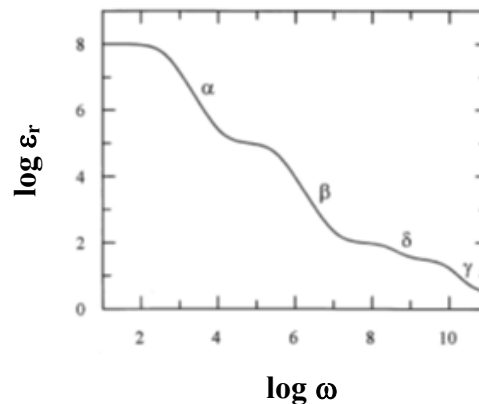


Figura 1.9. Dispersiones de los materiales biológicos (Adaptado de Markx y Davey, 1999).

La heterogeneidad estructural y química en las bacterias, específicamente de los diferentes estratos de la envoltura celular, son determinantes en sus propiedades eléctricas. Basta tomar en cuenta la carga negativa en la superficie por los grupos carboxilo y fosfato expuestos; los grupos cargados en la matriz de polisacáridos, la cual funciona como un intercambiador iónico y que está fuertemente influenciada por la concentración de iones del medio. Por último, la diferencia de potencial a través de la membrana celular y su carácter no conductor (Takashima, 1989; Grant *et al.*, 1978; Markx y Davey, 1999).

### ***Relación entre la impedancia con la concentración celular***

La relación entre la capacitancia y la concentración celular viable tiene sus cimientos en el modelo de Wagner (Wagner, 1914), el cual describe la permitividad compleja de partículas esféricas con propiedades dieléctricas homogéneas ( $\epsilon_p^*$ ), suspendidas en un medio homogéneo con permitividad ( $\epsilon_m^*$ ), y viene dada por la ecuación 1.5.

$$\varepsilon_s^* = \varepsilon_m^* \frac{\frac{1}{f_v} + 2 \left( \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \right)}{\frac{1}{f_v} - \left( \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \right)} \quad (1.5)$$

Donde “ $f_v$ ” es la concentración de esferas expresada en fracción volumétrica. El asterisco denota que se trata de una variable compleja.

En analogía con una suspensión celular, este modelo fue aplicado asumiendo que el citoplasma está envuelto por una membrana no conductora cuyo espesor es pequeño con relación al diámetro de la célula (Pauly y Schwan, 1959; Harris *et al.*, 1987). Esto permitió después de varias simplificaciones obtener una relación entre  $\Delta\varepsilon$  en la dispersión  $\beta$  y las propiedades microscópicas de la célula:

$$\Delta\varepsilon = \frac{9f_v\zeta C_m}{4\varepsilon_0} \quad (1.6)$$

Donde “ $\zeta$ ” es el radio de la célula, “ $f_v$ ” la fracción volumétrica de células (concentración celular) y “ $C_m$ ” la capacitancia de la membrana. Por lo tanto, el tamaño y la concentración de las células con su membrana íntegra, contribuyen de manera proporcional al incremento de la capacitancia relativa (Markx y Davey, 1999).

### ***Medición de capacitancia y conductividad***

Al exponer las células a un campo eléctrico por radio frecuencia, estas se comportan como capacitores microscópicos. La medición de la relación entre voltaje y corriente (impedancia) entre dos frecuencias que comprendan la dispersión  $\beta$ , permiten calcular el incremento de permitividad o capacitancia, y la conductividad. La medición de estas propiedades eléctricas a través de un sensor de impedancia por radiofrecuencia en un bioproceso, y su relación con la densidad celular y la concentración de iones, posibilitan su aplicación para el seguimiento del crecimiento celular, así como del consumo y producción de sustancias iónicas en tiempo real (Markx y Davey, 1999; Wechselberger y Herwig, 2013).

## 2. Justificación

Hasta el momento, son escasos los trabajos sobre el estudio de la producción termo-inducida de ADNp que consideran las condiciones de calentamiento de los reactores de gran escala, a pesar de estar orientados al establecimiento de una plataforma de manufactura altamente productiva. Los pocos estudios que incorporan dicha consideración presentan evaluaciones deficientes. La tasa de calentamiento es una variable que ha demostrado ser relevante en la producción de proteína recombinante por lo que es muy probable que lo sea también para la producción de ADNp.

## 3. Hipótesis

Tasas de calentamiento inferiores a 0.5 °C/min aplicadas a un cultivo de *Escherichia coli* para la producción de ADNp por termo-inducción, incrementarán el rendimiento específico y volumétrico de ADNp, además del contenido de la isoforma superenrollada.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el proceso de producción de ADNp por termo-inducción en cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli* con incremento de temperatura a diferentes tasas de calentamiento, a fin de verificar el impacto de esta variable sobre los rendimientos, productividad y topología del ADNp.

### 4.2. Objetivos específicos

- Realizar cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  en modo lote en matraz a diferentes temperaturas, para determinar las mejores temperaturas de producción de biomasa y ADNp a partir de:  $\mu$ ,  $Y_{xs}$ , concentraciones de acetato y plásmido,  $Y_{px}$ ,  $q_p$ , y CSE.
- Realizar cultivos de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en modo lote alimentado

en biorreactor, incrementando la temperatura a tasas de calentamiento representativas de reactores a gran escala, aplicando las mejores temperaturas de producción de biomasa y ADNp, para verificar su efecto sobre  $Y_{xs}$ ,  $Y_{NH_3x}$ , concentración de plásmido,  $Y_{px}$ ,  $Q_p$  y CSE.

- Dar seguimiento a los cultivos de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con un sensor de impedancia por radiofrecuencia para medir los cambios en la capacitancia y conductividad en el cultivo y posteriormente asociarlos con la producción de biomasa y la excreción de ácidos orgánicos.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Cepa y plásmido empleado

#### 5.1.1. Cepa

Como fábrica celular para la producción del plásmido pHN, se empleó la cepa comercial DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Invitrogen). Su genotipo es  $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) gal^+ phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$ . Esta cepa fue transformada con el plásmido pHN por el M. en C. Gheoghe M. Borja, quien amablemente proporcionó un inóculo criopreservado a -80 °C para la realización de este trabajo.

A partir de ese inóculo, se preparó un banco de trabajo sembrándolo en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB líquido suplementado con glucosa (5 g/L) y ampicilina (0.2 g/L), el cual se incubó a 37 °C y 200 rpm. Una vez alcanzada una concentración celular de 5 unidades de DO, el cultivo se mantuvo en hielo. Se prepararon 50 crioviales de 2 mL, cada uno con 750  $\mu$ L de caldo de cultivo y 750  $\mu$ L de glicerol al 80% (v/v) y se mantuvieron en congelación a -80 °C.

#### 5.1.2. Plásmido

El plásmido modelo de vacuna de ADN empleado en este trabajo bajo la denominación

“pH ” (Figura 5.1), es un plásmido derivado del pcDNA3.1 (Invitrogen) de 6.1 kb que contiene el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) que codifica un antígeno del virus de la parotiditis de 176 aminoácidos. El gen HN está clonado entre las secuencias del promotor del citomegalovirus humano (P<sub>CMV</sub>) y de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH pA) que controlan su expresión en células de mamífero. SV40 ori y SV40 pA son las secuencias promotora y de poliadenilación temprana del virus 40 del simio, respectivamente. Entre estas secuencias está clonado el gen de resistencia a la neomicina para la selección de células de mamífero transfectadas. Además, cuenta con origen de replicación para su replicación en *E. coli*; es tipo pUC, y contiene el gen que codifica la enzima  $\beta$ -lactamasa que confiere al hospedero resistencia a la ampicilina con fines de presión de selección (Herrera *et al.*, 2010). Este plásmido fue donado amablemente por la Dra. Blanca Lilia Barrón Romero (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional).

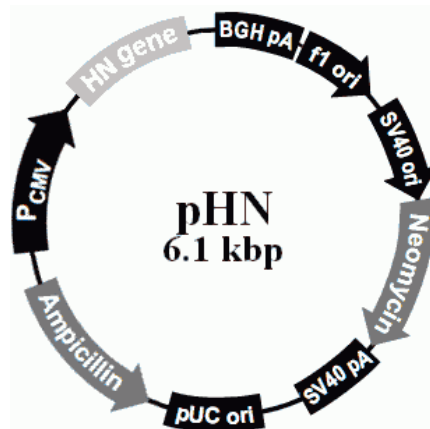


Figura 5.1. Diagrama del plásmido pHN (Tomado de Wunderlich, 2010).

## 5.2. Medio de cultivo

En todos los cultivos realizados en este trabajo, se empleó un medio químicamente definido (denominado PD) formulado para cultivos de alta densidad celular de *E. coli* (Soto *et al.*, 2011), suplementado con glucosa como fuente de carbono a una concentración de 5 y 10 g/L para matraz y biorreactor, respectivamente. Su composición se detalla en la Tabla 5.1.

El medio PD se preparó incorporando al medio mineral estéril: glucosa,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , elementos traza (Tabla 5.2), ampicilina disódica e hidrocloreuro de tiamina en las cantidades requeridas para un volumen dado a partir de soluciones estériles concentradas.

Componente	Concentración (g/L)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	17
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.3
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	2.5
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	1.0
Citrato de sodio	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
Ampicilina disódica	0.1
Tiamina-HCl	0.01
Solución de elementos traza 250x	4 ml/L

Tabla 5.1. Composición del medio PD.

Componente	Concentración (g/L)
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.5
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	3.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.625
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.75
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.375
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.525
Citrato férrico	25

Tabla 5.2. Composición de la solución de elementos traza 250x.

El medio mineral se preparó disolviendo las sales de fosfato, citrato y amonio, en agua destilada, en las cantidades requeridas para un volumen dado, ajustando el pH a 7.4 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  15% (p/p). Esta solución, contenida en un matraz o biorreactor, se esterilizó a 121 °C por 30 min por calor húmedo. De la misma forma se preparó una solución concentrada 5 veces de medio mineral (medio mineral 5x).

Por separado, se prepararon soluciones concentradas de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (500 g/L), elementos traza (Tabla 5.2) y glucosa (650 g/L) con agua destilada. Estas soluciones se esterilizaron a 121 °C por 30 min por calor húmedo.

También se prepararon soluciones concentradas de hidrócloruro de tiamina (10 g/L) y ampicilina disódica (100 g/L) con agua destilada, ambas esterilizadas por filtración con una membrana con diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ; alicuotadas en tubos para centrífuga de 1.5 mL estériles, y conservadas a -20 °C protegidas de la luz.

### 5.2.1. Solución de alimentación

Para los cultivos en biorreactor alimentado, la composición de la solución de alimentación utilizada fue la siguiente:

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	650
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	17
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.3
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	2.5
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	1.0
Citrato de sodio	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
Ampicilina disódica	0.1
Tiamina-HCl	0.01
Solución de elementos traza 250x	4 ml/L

Tabla 5.3. Composición de la solución de alimentación.

Esta solución se preparó incorporando a la solución estéril de glucosa de 650 g/L: medio mineral 5x,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , elementos traza, ampicilina y tiamina de sus respectivas soluciones estériles concentradas.



### **5.3. Sistemas de cultivo**

#### **5.3.1. Cultivos en matraz**

Para evaluar el efecto de la temperatura de cultivo sobre el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  y la producción de ADNp, se realizaron cultivos por duplicado a 30, 35, 40, 42 y 45 °C, en matraces Erlenmeyer modificados con aletas deflectoras de 500 mL con 125 mL de volumen de trabajo, y mantenidos en agitación orbital a 200 rpm en una incubadora Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Se colectaron muestras de 1 mL cada hora para la cuantificación de biomasa, metabolitos y plásmido.

Para cada cultivo, se realizó un precultivo sembrado a partir de un inóculo criopreservado a -80 °C, el cual se incubó a 37 °C y 200 rpm por 12 h. El precultivo se cosechó y centrifugó a 7,500 rpm por 3 min y 10 °C; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el material celular en medio mineral estéril. Con la suspensión resultante se inocularon los matraces para tener una concentración inicial aproximada de 0.25 unidades de DO.

#### **5.3.2. Cultivos en biorreactor**

El efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción de ADNp se verificó en cultivos de alta densidad celular en biorreactores en modo lote alimentado, incrementando la temperatura de 35 a 42 °C a tasas de calentamiento de 0, 0.025, 0.05, 0.10 y 0.25 °C/min. Los cultivos tuvieron una duración de 24 h, y cada 2 h se colectaron muestras de 10 mL para la cuantificación de la concentración de biomasa, metabolitos y plásmido, así como del contenido de la isoforma superenrollada. Cada condición se evaluó al menos por duplicado.

Para ello, se empleó un biorreactor de tanque agitado de 1.3 L de capacidad con dos impulsores Rushton de 6 álabes, dispuestos conforme a un diseño estándar. El biorreactor se instrumentó con sensores de pH (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland), TOD tipo polarográfico (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) y temperatura tipo resistencia de platino, todos ellos enlazados a un módulo de control Bioflo/Celligen 115 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) y al sistema de monitoreo y adquisición de datos Biocommand

Batch Control VC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Adicionalmente, se incorporó un sensor de IRF Futura (Aber Instruments Ltd, Averystwyth, UK) para seguir los cambios en la capacitancia y la conductividad del medio. La señal de este sensor fue procesada y transmitida al programa de adquisición de datos y monitoreo en línea Futura OPC Lite V4.0 (Aber Instruments Ltd, Averystwyth, UK). Un diagrama simplificado se muestra en la Figura 5.2.

El biorreactor se cargó en cada cultivo con 500 mL de medio mineral; una vez calibrados los sensores de pH e impedancia, se esterilizó en una autoclave con calor húmedo a una temperatura de exposición de 121 °C por 30 min. Una vez retirado el biorreactor del autoclave, se conectaron los sensores al gabinete de control y se habilitaron los servicios de aire, oxígeno, calentamiento y enfriamiento. Después de transcurrir 8 h, se calibraron las bombas de adición de las soluciones de base, antiespumante y alimento; se incorporaron la glucosa, MgSO<sub>4</sub>, ampicilina y tiamina al sistema agitado a 200 rpm y 35 °C, y se calibró el sensor de TOD. El reactor se inoculó para tener una concentración inicial de biomasa de 2 g/L. La fase lote del cultivo se desarrolló a una concentración inicial de glucosa de 10 g/L a 35 °C. El fin de la fase lote se verificó por al menos una de las siguientes cuatro condiciones: incremento drástico en la TOD; incremento sutil del pH; disminución continua y pronunciada de la capacitancia, y ausencia de glucosa en el medio.

El inicio de la alimentación se hizo siguiendo un esquema de alimentación exponencial de acuerdo a la ecuación 5.1. El algoritmo del esquema de alimentación se presenta en los apéndices A1 y A2.

$$F_A = \left( \frac{\mu_{set}}{Y_{xs}} + m \right) \frac{X(t_{LA}) V e^{\mu_{set}(t-t_{LA})}}{C_{SA}} \quad (5.1)$$

Donde:

$$\begin{array}{ll} \mu_{set}: & 0.15 \text{ h}^{-1} & Y_{xs}: & 0.47 \text{ g/g (35 °C) y } 0.27 \text{ g/g (42 °C)} \\ m: & 0.059 \text{ g/g h (Villadsen } et al., 2011) & C_{SA}: & 650 \text{ g/L} \end{array}$$

El volumen instantáneo o real de trabajo del reactor se calculó sumando al volumen inicial los volúmenes de base, antiespumante y alimento adicionados, y restando el volumen por toma de muestra (Apéndice A4). Los volúmenes de adición se estimaron considerando el tiempo e intensidad de accionamiento (0-100%) de las bombas peristálticas y un factor de calibración en unidades de mL/min (Apéndice A3).

Al mismo tiempo, se inició el cambio de temperatura de 35 a 42 °C a una tasa de calentamiento  $q$  de acuerdo con la ecuación 5.2. El algoritmo para incrementar la temperatura linealmente se presenta en el apéndice A5.

$$T = q(t - t_{LA}) + T_o \quad (5.2)$$
$$T_o = 35 \text{ °C}; T_o \leq T \leq 42 \text{ °C}$$

A lo largo de todo el cultivo, el pH se controló a 7.2 mediante la adición de NH<sub>4</sub>OH; la TOD se controló alrededor de 30% de saturación con respecto al aire mediante el incremento gradual de la velocidad de agitación entre 200 y 1200 rpm, el flujo de gasificación entre 1 y 2 vvm y el enriquecimiento del gas de aireación con O<sub>2</sub> conforme a los requerimientos del cultivo. La temperatura se controló alternando la apertura de la válvula de servicio de agua de enfriamiento y el encendido de una mantilla de calentamiento eléctrica. Todas las variables de proceso se controlaron con un algoritmo PI.

### **5.3.3. Sensor de impedancia por radiofrecuencia**

El sensor de impedancia por radiofrecuencia (IRF) Futura (Aber Instruments Ltd, Averystwyth, UK), consiste en una sonda con 4 electrodos anulares de platino a través de los cuales se genera un campo eléctrico por radiofrecuencia y que realizan las mediciones de potencial e intensidad de corriente eléctrica. El sensor tiene acoplado un cabezal que contiene un microprocesador electrónico que procesa la señal de las mediciones. Los datos del sensor son enviados a través de una interfase a una computadora en donde son almacenados y visualizados mediante el programa Futura OPC Lite V4.0 (Aber Instruments Ltd, Averystwyth, UK).

Previamente a cada cultivo, las mediciones del sensor IRF Aber se verificaron empleando simuladores de señal de capacitancia de 0 y 100 pF/cm y de conductividad de 0 y 40 mS/cm. Adicionalmente, se verificó la capacitancia y la conductividad de un estándar de KCl 0.1 N cuyos valores de capacitancia y conductividad a 25 °C deben encontrarse en  $7 \pm 10$  pF/cm y  $12.88 \pm 0.20$  mS/cm, respectivamente, según las especificaciones del fabricante.

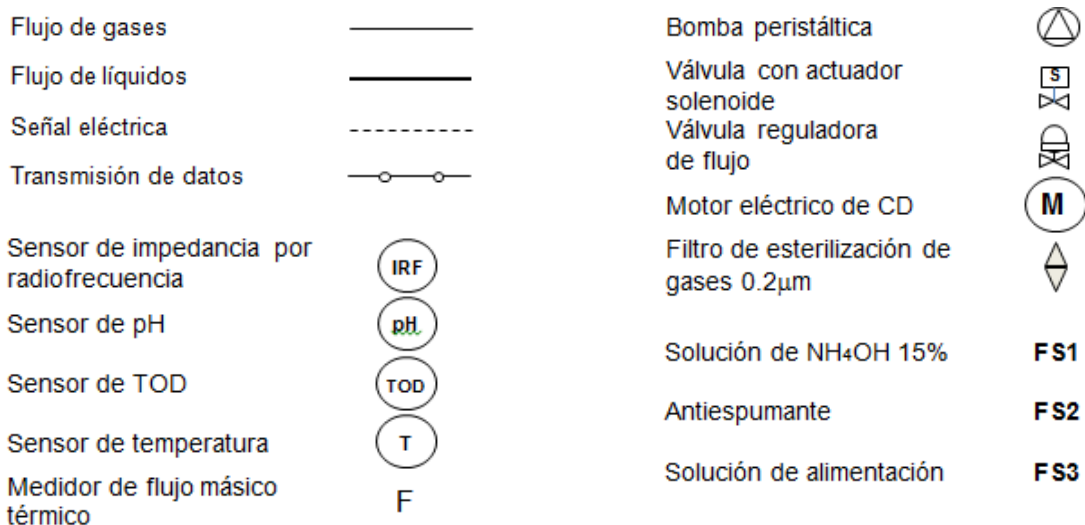
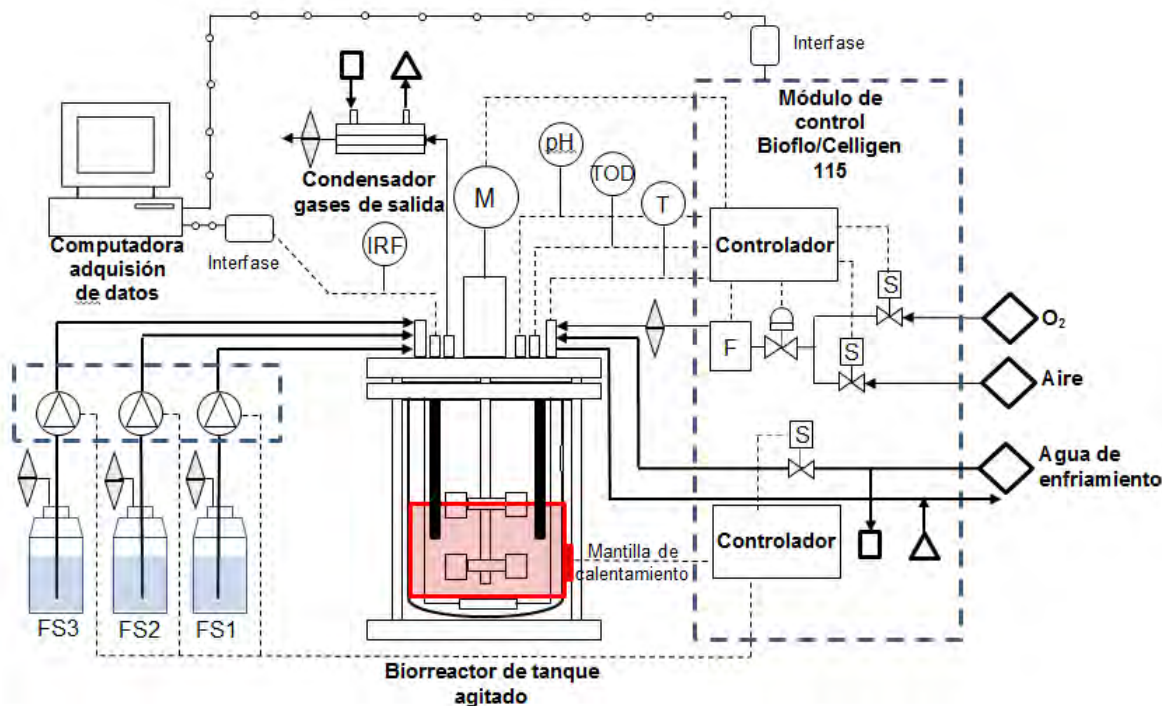


Figura 5.2. Diagrama simplificado de tuberías e instrumentos del biorreactor empleado en los cultivos. Los elementos delimitados por las líneas discontinuas gruesas están integrados en el módulo de control Bioflo/Celligen 115. La simbología se tomó de Smith y Corripio, 1997.

## **5.4. Métodos analíticos**

### **5.4.1. Cuantificación de biomasa**

Para los cultivos en matraz, la biomasa se estimó a partir de mediciones de DO de muestras de caldo de cultivo en celdas de poliestireno de 10 mm de paso de luz en un espectrofotómetro Beckman DU65 (Beckman Coulter, Atlanta GA) a una longitud de onda de 600 nm; se realizaron diluciones de las muestras con medio mineral estéril desde 1:2 hasta 1:10, para obtener las mediciones dentro del intervalo lineal de respuesta del equipo comprendido entre 0.2 y 0.6 unidades de DO. La concentración de biomasa en peso seco se determinó con un factor predeterminado de 0.40 g/L por unidad de DO.

Para los cultivos en biorreactor, la biomasa se cuantificó por peso seco a partir del material celular colectado a partir de 1.5-6 mL de caldo de cultivo en tubos para centrífuga de 2.0 mL, y centrifugado a 13,000 rpm por 10 min. Cada tubo se pesó antes y después de mantenerlo en secado en un horno a 70 °C por al menos 18 h. La concentración de biomasa por peso seco se calculó a partir de dividir la diferencia de las pesadas del tubo con material celular seco y el tubo vacío entre el volumen de muestra.

Adicionalmente, se estimó la concentración de biomasa en peso seco a partir la concentración de biomasa en peso húmedo para verificar el progreso del crecimiento celular durante el cultivo. Los tubos con material celular húmedo se pesaron antes de ponerlos a secar en el horno. La concentración celular en peso húmedo se calculó a partir de dividir la diferencia entre las pesadas del tubo con material celular húmedo y el tubo vacío entre el volumen de muestra centrifugado. Esta concentración se dividió entre un factor de 4.23 con un error estándar de 0.02, obtenido de la correlación de las concentraciones de biomasa en peso húmedo y peso seco (Figura 5.3), para estimar la concentración equivalente en peso seco.

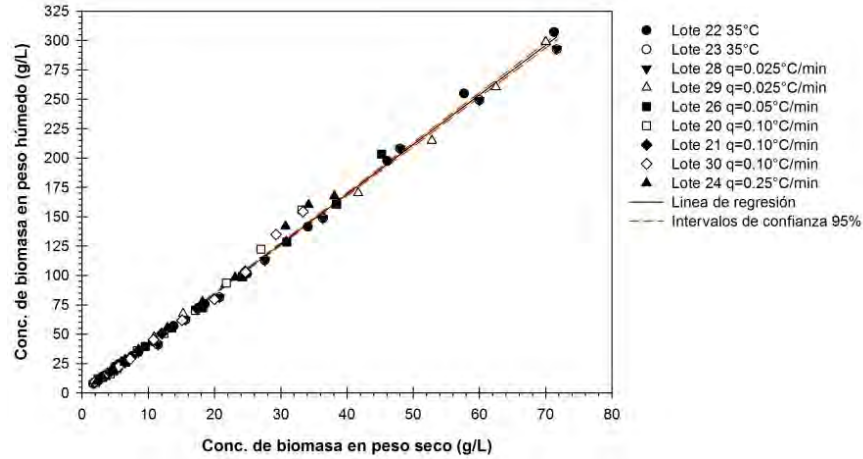


Figura 5.3. Correlación entre la concentración de biomasa en peso húmedo y en peso seco.

#### 5.4.2. Cuantificación de metabolitos

Los metabolitos que se cuantificaron en este trabajo a partir del sobrenadante de las muestras centrifugadas a 13,000 rpm y 10 min fueron glucosa y acetato.

##### *Cuantificación de glucosa*

La glucosa se cuantificó en un analizador bioquímico YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH), el cual mide la corriente aplicada a un electrodo de platino para reducir el peróxido de hidrógeno que se produce por la oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa.

Previamente al análisis de muestras, las mediciones del instrumento se verificaron con soluciones estándar de glucosa con las siguientes concentraciones:

Estándar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración de glucosa (g/L)	0	0.1	0.25	0.50	0.75	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0

Tabla 5.4. Concentración de glucosa de los estándares utilizados para la verificación del instrumento YSI Select 2700.

De esta manera se obtuvieron correlaciones entre las mediciones del instrumento y la concentración de los estándares. La calidad del ajuste permitió verificar el correcto funcionamiento del instrumento y corregir las lecturas obtenidas.

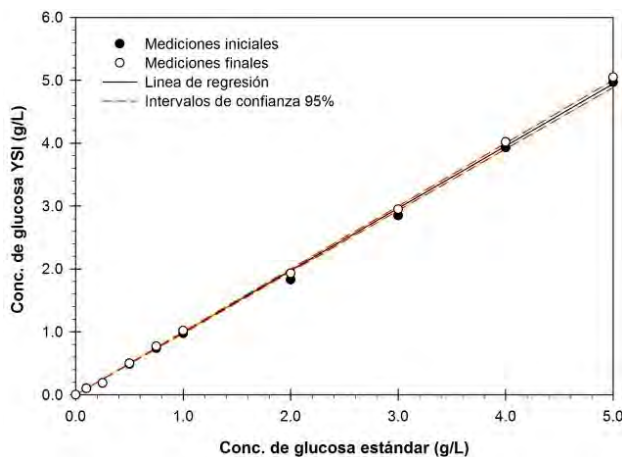


Figura 5.4. Correlación entre la concentración de glucosa medida por el instrumento y la concentración de los estándares.

### ***Cuantificación de acetato***

El acetato se cuantificó en un sistema HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) mediante espectrofotometría a 210 nm y refractometría. Para ello se empleó una columna Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm de Bio rad (Bio-rad Laboratories Inc, Hercules CA) en cuya matriz de poliestireno divinil-benceno sulfonatada con H<sup>+</sup> como contraión, tiene lugar la separación de: ácidos orgánicos, alcoholes y azúcares por mecanismos de exclusión de tamaño e intercambio de ligando.

Se utilizó como fase móvil una solución acuosa de ácido sulfúrico 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min y temperatura de 60 °C. El volumen de muestra inyectado en cada corrida fue de 20 µL. Cada muestra se procesó en 20 min empleando detectores de arreglo de fotodiodos (AFD) e índice de refracción (IR) acoplados en serie. Este último se mantuvo a una temperatura de 50 °C. Todas las muestras para el análisis en HPLC se filtraron a través de membranas con diámetro de poro de 0.2 µm.

Los estándares utilizados para la calibración del método antes de cada corrida de análisis se prepararon disolviendo acetato de sodio anhidro en agua deionizada. En la Tabla 5.5 se presenta la concentración de cada uno.

Estándar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Concentración de acetato (g/L)	0	0.1	0.25	0.50	0.75	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0

Tabla 5.5. Concentración de acetato de los estándares utilizados para la calibración del método analítico.

Mediante el software Empower II de Waters (Waters Corp, Milford, MA), se obtuvieron las curvas de calibración a partir de correlacionar el área bajo la curva con la concentración de los estándares. El tiempo de retención del acetato bajo las condiciones de análisis fue de 14.8 min.

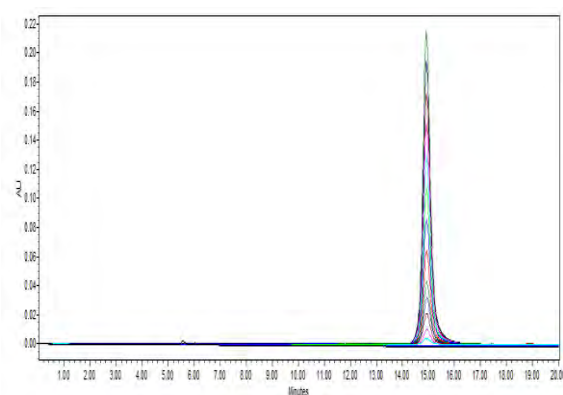


Figura 5.5. Cromatogramas típicos de los estándares de acetato obtenidos con el detector de AFD a 210 nm.

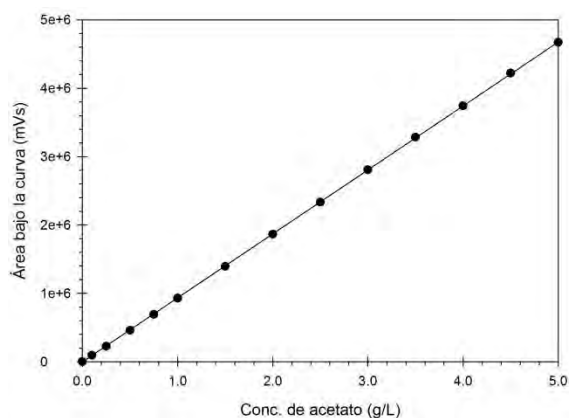


Figura 5.6. Curva de calibración típica para la cuantificación de acetato.

### 5.4.3. Purificación, cuantificación y análisis topológico de plásmido

#### *Extracción y purificación de ADN plasmídico*

El ADNp fue extraído y purificado a partir de 2 mg de biomasa empleando el paquete comercial miniprep de Quiagen, el cual brevemente, consiste en la liberación del plásmido del material celular por lisis alcalina en un tiempo optimizado; el sobrenadante se separa de los restos celulares y se transfiere a una columna de sílica gel en la que el plásmido se retiene y posteriormente se recupera por elución en condiciones de baja fuerza iónica. A diferencia de lo especificado en el protocolo del fabricante, la elución se hizo con 70  $\mu$ L de buffer EB a 70  $^{\circ}$ C en dos pasos de elución-centrifugación de 40  $\mu$ L y 30  $\mu$ L, con la finalidad de mejorar la eficiencia de recuperación.



### *Lisis alcalina*

El material celular se trata con una solución que contiene hidróxido de sodio y SDS en presencia de RNasa. Bajo condiciones de alcalinidad, la envoltura celular se lisa por la saponificación y disolución de los lípidos de membrana, y permite la liberación de los componentes intracelulares; tanto el ADN cromosomal como el ADNp se desnaturalizan. Posteriormente, al neutralizarse el lisado con una solución de acetato de potasio y cloruro de guanidina (un agente caotrópico), el ADN cromosomal se reordena a una forma insoluble de manera que precipita junto con los lípidos, proteínas y SDS, mientras que el ADN plasmídico se renaturaliza y se mantiene en la fracción soluble. El tiempo que transcurre entre lisis y neutralización, no debe ser mayor de 5 min para reducir la probabilidad de liberación y degradación del ADN cromosomal (Birnboim, 1983).

### *Adsorción y elución*

Posterior a la lisis alcalina, las fracciones solubles e insolubles del lisado se separan por centrifugación. La fracción soluble se recupera y se transfiere a tubos con una membrana de gel de sílice que separa selectivamente el ADNp en condiciones de alta salinidad. Después de aplicarse una serie de lavados a la columna para la remoción de sales y proteínas unidas al ADNp, el ADNp se recupera de la columna por elución con una solución de baja salinidad y pH ligeramente alcalino (7.5-8.5) (Birnboim, 1983).

### ***Cuantificación de ADN plasmídico***

El plásmido purificado se cuantificó a partir de la absorbancia medida a 260 nm de 2  $\mu$ L de muestra en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) bajo el modo DNA-50 para ADN de doble cadena. La pureza del plásmido se determinó a partir de las relaciones de absorbancia 260 nm/280 nm, y a 260 nm/230 nm. Esta es aceptable cuando el valor de dichas relaciones es 1.8 y 1.8-2.2, respectivamente (Desjardins y Conclin, 2011).

### ***Análisis topológico del ADN plasmídico***

El análisis topológico de los plásmidos se hizo por electroforesis en gel de agarosa con muestras de 50 ng de plásmido en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  por carril, cargadas cada una junto con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 6x (60% glicerol; 0.03% azul de bromofenol; 0.03% xileno cianol; Tris-HCL, 10 mM; EDTA, 60 mM) en un gel de agarosa al 0.8%, con 2 mg/L de bromuro de etidio (como agente intercalante y de tinción) en buffer de corrida TAE (Tris-acetato, 40 mM; EDTA, 2 mM) (Moore, 2001), a 50 V por 60 min. Los geles se revelaron exponiéndolos a 260 nm en un fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad, USA). El análisis densitométrico se realizó a partir de las intensidades de banda en cada carril mediante el software ImageLab de Bio Rad.

### **5.5. Cálculos cinéticos y estequiométricos**

A partir de los balances de materia de biomasa, sustrato y producto basados en el modelo cinético no estructurado de Monod para un biorreactor en modo lote (Villadsen *et al.*, 2011), se estableció el tratamiento adecuado de los datos obtenidos experimentalmente en la fase de crecimiento exponencial.

Tasas específicas de crecimiento, consumo específico de sustrato y formación de producto:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5.3)$$

$$q_s = -\frac{1}{X} \frac{dC_s}{dt} \quad (5.4)$$

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (5.5)$$

Rendimientos específicos:

$$Y_{xs} = -\left(\frac{dX}{dC_s}\right) \quad (5.6)$$

$$Y_{px} = \left(\frac{dP}{dX}\right) \quad (5.7)$$

Para la fase modo lote alimentado:

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} \quad (5.8)$$

$$Y_{xs} = \frac{X(t_F)V(t_F) - X(t_{LA})V(t_{LA})}{C_S(V_A(t_F) - V_A(t_{LA}))} \quad (5.9)$$

$$Y_{xNH_3} = \frac{X(t_F)V(t_F) - X(t_{LA})V(t_{LA})}{C_{NH_3}(V_B(t_F) - V_B(t_{LA}))} \quad (5.10)$$

$$Q_P = \frac{P(t_P) - P(t_{LA})}{(X(t_P) - X(t_{LA}))(t_P - t_{LA})} \quad (5.11)$$

## 5.6. Métodos y cálculos empleados en el análisis de datos y obtención de estimadores

### *Análisis de regresión*

Los análisis de regresión simple y múltiple para determinar los factores de correlación entre las variables consideradas en este trabajo, se realizaron empleando los módulos de línea de tendencia en Excel y de regresión de SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Estos módulos determinan la aproximación funcional de acuerdo al método de mínimos cuadrados (Nieves y Domínguez, 2002).

### *Suavización de datos*

La distorsión en los datos de capacitancia y de conductividad adquiridos en línea dificulta su utilización y análisis. Por esta razón, se aplicó el algoritmo de suavización de datos no-paramétrico exponencial negativo del programa SigmaPlot V12.3 (Systat Software, San Jose, CA), para obtener la tendencia de los datos crudos (con ruido) de capacitancia y de conductividad. Este método consiste en la aplicación de una función de regresión ponderada (Ecuación 5.12) con una función Gaussiana (Ecuación 5.13), a un conjunto de datos vecinos al valor a suavizar. En este trabajo, se empleó un polinomio de grado 1 con

vecindades de 10% del total de los datos (Véase Figura 5.7).

$$y_i = g(x_i) + \epsilon_i \quad (5.12)$$

$$f(x) = e^{-x^2} \quad (5.13)$$

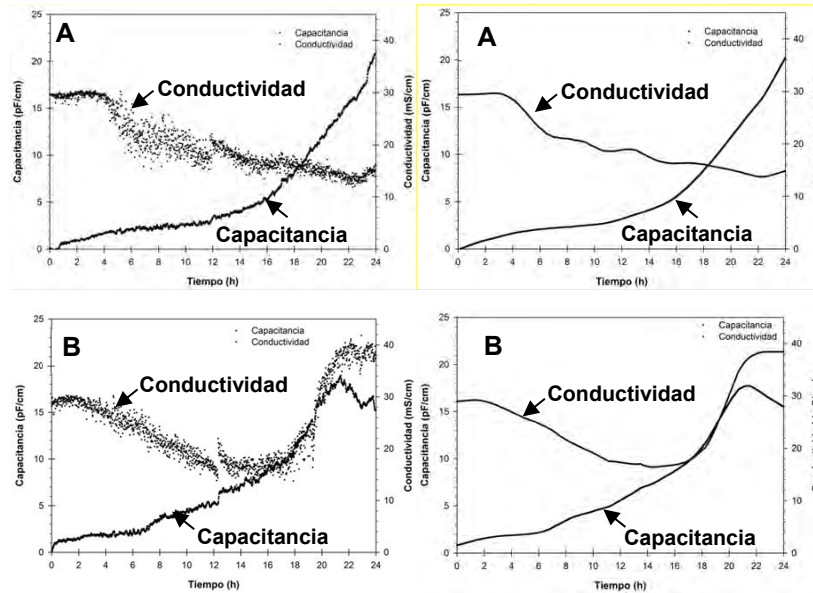


Figura 5.7. Aplicación del método de suavización de datos a las mediciones de capacitancia y conductividad. Datos crudos (A y B lado izquierdo) y datos suavizados (A y B lado derecho). El método permite obtener tendencias claras.

### ***Cálculo de la tasa de crecimiento específico***

Para considerar el efecto de la dilución del medio, la tasa de crecimiento específico se calculó con base en la cantidad de biomasa. Esta se determinó a partir del producto de los cálculos del volumen total de reactor y la concentración de biomasa como se indica en la ecuación 5.8.

La tasa de crecimiento específico instantánea,  $\mu$ , se calculó a partir de la derivada de un polinomio de Lagrange ( $p(x)$ ) de grado  $n=2$  (Ecuación 5.14), que se aplicó a los datos de cantidad de biomasa experimental. Este método se programó en una macro de Excel (Apéndice B1) de acuerdo al algoritmo presentado por Nieves y Domínguez (2002). Finalmente, al dividir la derivada numérica  $dx/dt$ , entre la cantidad de biomasa al tiempo  $t$ , se obtuvo el valor de  $\mu$  (Véase la Ecuación 5.3).

$$\frac{dx}{dt} \approx \frac{dp(x)}{dt} = \sum_{\substack{k=0 \\ i=0}}^n \left[ \frac{f(t_i)}{\prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n (t_i - t_j)} \sum_{\substack{k=0 \\ k \neq i}}^n \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq k, i}}^n (t - t_j) \right] \quad (5.14)$$

Sin embargo, para el cálculo de la tasa de crecimiento instantánea a partir de los datos de cantidad de biomasa estimados, se optó por el método de linealización de la función de crecimiento exponencial, ya que la diferenciación numérica por diferencias divididas o polinomios de Lagrange dieron resultados con alta dispersión. Mediante una macro programada en Excel (Apéndice B2), se obtuvo la pendiente de la recta de regresión aplicada a los 15 pares de datos consecutivos de logaritmo natural de la cantidad de biomasa y tiempo (Ecuación 5.15).

$$\ln XV = \mu t + \ln X_o V_o \quad (5.15)$$

### ***Cálculo del rendimiento biomasa en sustrato***

El rendimiento  $Y_{xs}$  se calculó a partir de la pendiente de la recta de regresión (Ecuación 5.16) aplicada sobre los 60 pares de datos consecutivos de cantidad de biomasa y sustrato añadido mediante una macro programada en Excel (Apéndice B3). La cantidad de sustrato añadido se determinó a partir del producto de la concentración de glucosa en la solución de alimento y el volumen adicionado de solución de alimento (obtenido del cómputo del tiempo e intensidad de operación de la bomba peristáltica).

$$XV = Y_{xs}SV + X_o V_o \quad (5.16)$$

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Cultivos en matraz

A fin de establecer las temperaturas para la producción de biomasa y ADNp en cultivos de alta densidad celular, se investigó el efecto de la temperatura de cultivo sobre el crecimiento y la producción de ADNp de DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido pHN. Para ello se realizaron cultivos en modo lote a 30, 35, 37, 40, 42 y 45 °C, en matraces agitados orbitalmente a 200 rpm, empleando el medio PD con una concentración de glucosa y pH iniciales de 5 g/L y 7.2, respectivamente. A partir de las cinéticas de crecimiento de estos cultivos, mostradas en la Figura 6.1, se calcularon los parámetros cinéticos y estequiométricos que se presentan en función de la temperatura de cultivo en las Figuras 6.2 y 6.3. La concentración de ADNp se midió en el punto de agotamiento de glucosa.

En la Figura 6.1 se muestran los cambios en el tiempo de la concentración de biomasa, glucosa y acetato para todas las condiciones de temperatura evaluadas. Como puede observarse, la concentración de biomasa aumentó monótonamente desde el inicio de cultivo y alcanzó su valor máximo cuando se agotó la glucosa. Esto ocurrió entre 9 y 10 h excepto en los cultivos a 30 y 45°C cuya duración fue de 12 h. A partir de ese momento, la concentración de biomasa se mantuvo sin cambios importantes y marcó el inicio de la fase estacionaria.

El cambio en la concentración de glucosa fue inverso al cambio de la concentración de biomasa (Figura 6.1). La concentración de acetato aumentó a la par que la concentración de biomasa, y se redujo al iniciar la fase estacionaria. Este comportamiento se puede explicar a partir de que el acetato es un producto asociado directamente al metabolismo; al agotarse la glucosa, el acetato excretado es utilizado como una fuente alterna de carbono, que aparentemente satisface los requerimientos energéticos mínimos de *E. coli* DH5 $\alpha$  pHN, al mantener la concentración celular a un valor relativamente constante.

La excreción de acetato surge del redireccionamiento del flujo de carbono a nivel de Acetil-CoA hacia la vía ACK-PTA (Chang *et al.*, 1999), pero pudo intensificarse por el medio

mínimo empleado (Avison *et al.*, 2001) o darse a través de la vía POX conforme el caldo de cultivo se acidificó (Dittrich *et al.*, 2005; Borja, 2011).

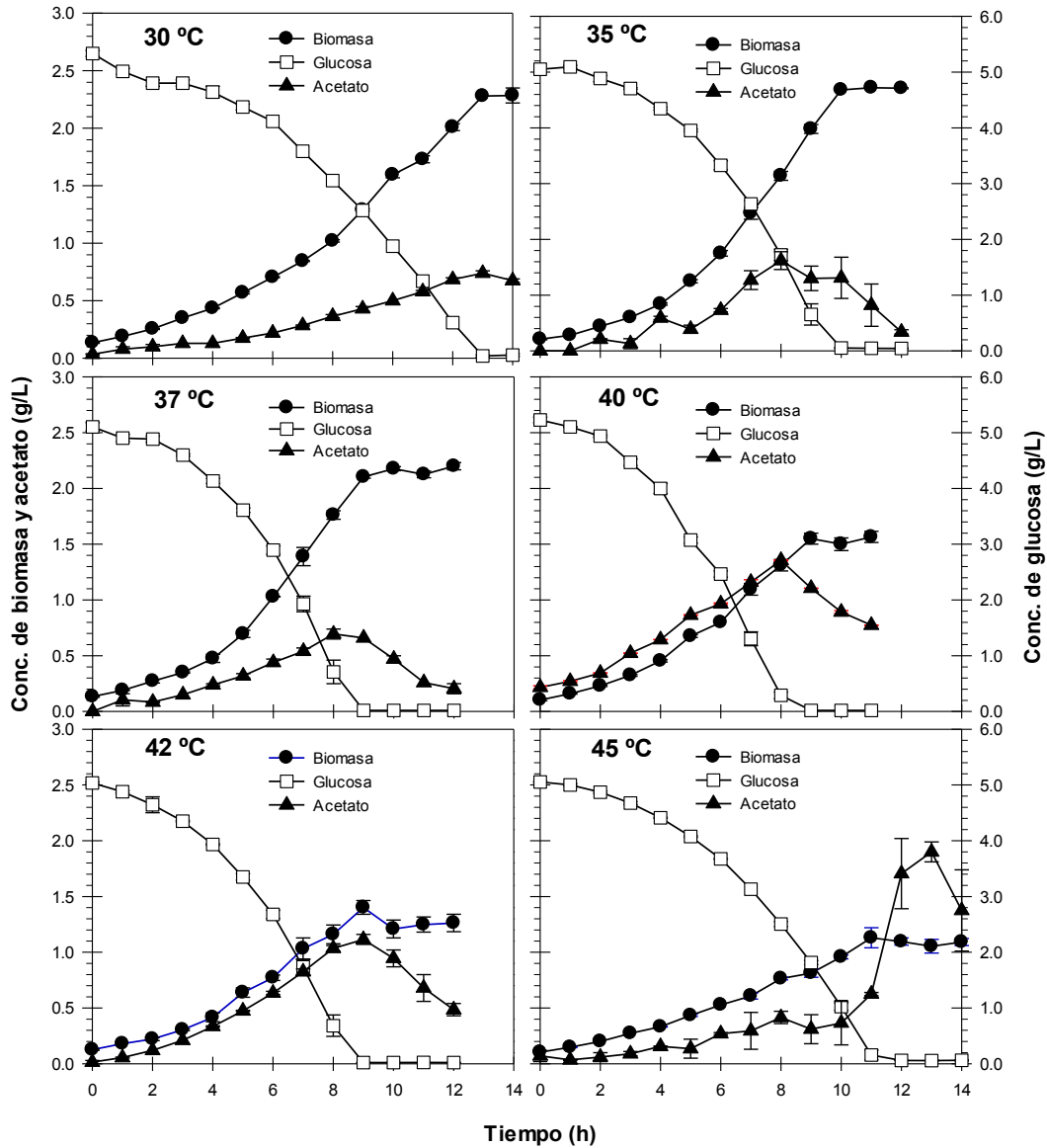


Figura 6.1. Curvas de crecimiento, concentración de glucosa y acetato de cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  30, 35, 37, 40, 42 y 45 °C en modo lote en matraz. Las barras de error representan el error estándar entre 2 experimentos.

### 6.1.1. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de biomasa

El resumen del efecto de la temperatura de cultivo sobre el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  pHN se muestra en la Figura 6.2.

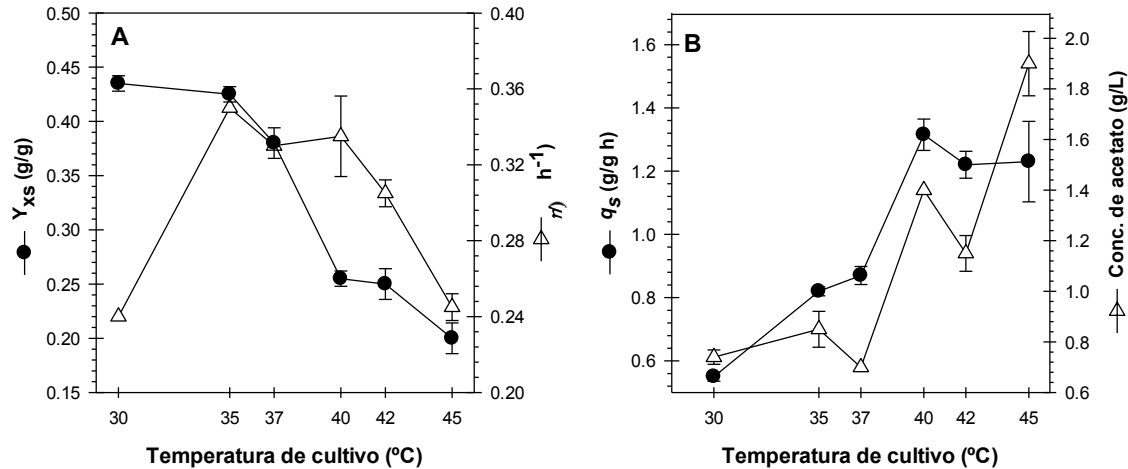


Figura 6.2. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de biomasa. (A) Rendimiento global de biomasa ( $Y_{xs}$ ) y tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ). (B) Concentración máxima acumulada y consumo específico de glucosa. Las barras de error representan el error estándar entre 2 experimentos.

En la Figura 6.2.A se puede observar que el rendimiento  $Y_{xs}$  disminuyó de manera importante con el aumento en la temperatura de cultivo. Este mismo comportamiento fue también observado en otros trabajos con cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Silva *et al.*, 2009) y *E. coli* TG1 (Wittmann *et al.*, 2007) con plásmidos multicopia a diferentes temperaturas.

En cuanto a  $\mu$ , esta presentó un incremento de hasta 1.7 veces de 30 a 35 °C a un valor alrededor de 0.33  $h^{-1}$ , y se mantuvo sin cambios importantes hasta 40 °C, donde luego disminuyó con incrementos adicionales en la temperatura de cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo a 37 °C, reprodujeron los obtenidos por Borja (2011) con DH5 $\alpha$ , aunque  $\mu$  fue 15% más baja que la reportada por él. Esta diferencia pudo estar asociada a una disminución más acentuada en el pH, al no incorporarse el agente amortiguador MOPS en el medio de cultivo de este trabajo, dada la sensibilidad de  $\mu$  a los cambios sutiles en el pH (Ongkudon *et al.*, 2011).

Por el contrario a lo observado aquí, en el trabajo de Silva y colaboradores (2009) con cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  con un plásmido pUC de 6 kpb a diferentes temperaturas,  $\mu$  disminuyó a partir de 32 °C con el incremento en la temperatura de cultivo y se mantuvo sin cambios importantes entre 37 y 40 °C. También Wittmann y colaboradores (2007)



reportaron un valor de  $\mu$  más bajo a 42 °C que a 30 °C en TG1 con un plásmido de 5 kpb derivado de pBR322 (Seeger *et al.*, 1995), pero en TG1 no transformada  $\mu$  fue más alta a 42 que a 30 °C. Estos cambios se explican al considerar que *E. coli* es una bacteria mesófila cuya tasa de crecimiento se incrementa en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Arrhenius entre 20 y 37 °C. Por debajo de los 20 °C y por encima de los 40 °C, se tienen desviaciones negativas en  $\mu$  de la tendencia predicha por el modelo de Arrhenius que indican procesos de inactivación enzimática. Estos últimos resultan principalmente de un reajuste en la actividad de las enzimas, aunque también en la cantidad de las mismas (Herendeen *et al.*, 1979). Sin embargo, esto no sucede en cepas de *E. coli* con ADN recombinante (Seo y Bailey, 1985). El aumento en el número de copias de plásmido con el incremento en la temperatura de cultivo (Figura 6.3.A) a partir de los 32 °C (Silva *et al.*, 2009) da lugar a una reducción en la tasa de crecimiento específico por la carga metabólica que impone la replicación y mantenimiento del plásmido. En consecuencia,  $\mu$  resulta del balance entre el incremento en la actividad enzimática; la inducción de la replicación del plásmido, y la expresión de proteínas del marcador de resistencia y de la respuesta de choque térmico con el aumento en la temperatura de cultivo.

La diferencia en el comportamiento de  $\mu$  con la temperatura de cultivo entre el trabajo de Silva y colaboradores (2009) y el presente trabajo, radicó principalmente en los medios de cultivo y fuentes de carbono utilizados. Ellos emplearon un medio semi-definido cuyas fuentes de carbono y nitrógeno fueron glicerol y triptona, respectivamente, mientras que en este trabajo se empleó glucosa y un medio mínimo. Se tiene conocimiento que las tasas de crecimiento empleando glicerol como fuente de carbono son más bajas que cuando se emplea glucosa, y es posible que las actividades enzimáticas también sean menores y no se observe un aumento sino una reducción en la tasa de crecimiento específico.

En la Figura 6.2 B se observa que la concentración de acetato no tuvo cambios importantes entre 30 y 37 °C, pero luego se incrementó más de 2 veces de 37 a 45 °C. El acetato es el principal subproducto de *E. coli*, el cual se excreta cuando el flujo de carbono sobrepasa la capacidad del TCA tanto en condiciones aerobias como anaerobias con glucosa en exceso (Wolfe, 2005). Este desbalance se acrecienta con la elevación en la temperatura de cultivo

dando lugar a una mayor acumulación de ácidos orgánicos, principalmente acetato.

Aunque la excreción de acetato representa una pérdida de carbono y energía en condiciones de saturación de la cadena respiratoria, la vía ACK-PTA es una fuente alterna de ATP. La activación de la vía POX significaría una menor generación de energía y por consiguiente una disminución en la rapidez de crecimiento.

Por otro lado, la tasa de consumo específico de glucosa se duplicó de 30 a 40 °C y permaneció sin cambios notables a temperaturas de cultivo por arriba de los 40 °C (Figura 6.2 B). Con el incremento en la temperatura y el consecuente aumento en las tasas de crecimiento y replicación del plásmido, y activación de la respuesta de choque térmico, la actividad del TCA disminuye considerablemente al mismo tiempo que la demanda energética aumenta (Wittmann *et al.*, 2007). En respuesta a esta situación adversa, *E. coli* necesita elevar el flujo de carbono para poder regenerar los cofactores y producir ATP en las vías de glicólisis y de metabolitos parcialmente oxidados (Wolfe, 2005). De hecho, la demanda de ATP controla el flujo de carbono en glicólisis (Soini *et al.*, 2005).

En conclusión, los cambios observados no solo se deben a la presencia del plásmido, sino al aumento en la tasa de replicación que tiene lugar a temperaturas superiores a 32 °C.

Tomando como criterio único el rendimiento  $Y_{xs}$ , es evidente que 30 °C es la temperatura a la que *E. coli* DH5 $\alpha$  tuvo la mejor utilización del sustrato en la producción de biomasa. Puesto que la finalidad es aplicar esta temperatura durante la fase lote en cultivos de alta densidad celular en modo lote alimentado, se buscó además reducir el tiempo de proceso. Para ello se incorporó  $\mu$  como criterio adicional y se consideró 35 °C como segunda opción, ya que aunque  $Y_{xs}$  fue 10% más bajo a 35 °C que a 30 °C,  $\mu$  fue hasta 70% más alta a 35 que a 30 °C. De acuerdo con los resultados obtenidos y al razonamiento anterior, se propuso 35 °C como la mejor temperatura para la producción de biomasa.

### 6.1.2. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de ADNp

El resumen del efecto de la temperatura de cultivo sobre los indicadores cuantitativos y cualitativos del ADNp producido por *E. coli* DH5 $\alpha$ , se muestra en la Figura 6.3.

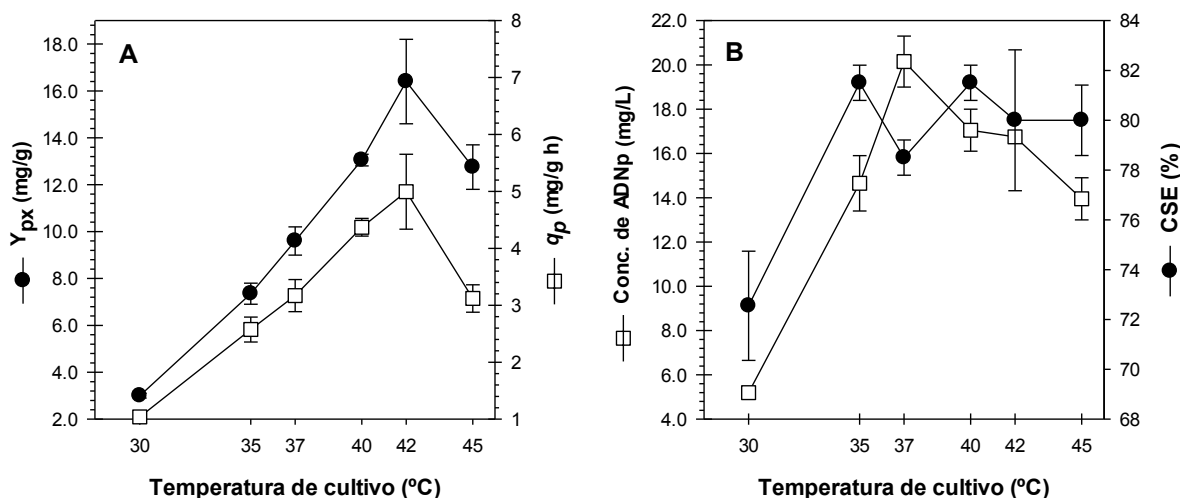


Figura 6.3. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de plásmido. (A)  $Y_{px}$  y  $q_p$ . (B) Concentración de ADNp y CSE. Los datos experimentales representan el promedio  $\pm$  error estándar de 2 experimentos independientes, y corresponden a las muestras con el rendimiento  $Y_{px}$  más alto, de un conjunto de muestras obtenidas en un periodo de 2 h antes del agotamiento de la glucosa en los cultivos.

En la Figura 6.3 A se observa que tanto el rendimiento  $Y_{px}$  como  $q_p$  se incrementaron con el aumento en la temperatura de cultivo hasta los 42 °C, donde alcanzaron sus valores más altos que fueron  $16.8 \pm 0.4$  mg/g y  $5.0 \pm 0.7$  mg/g h, respectivamente. Estos valores son hasta 5 veces mayores comparados con los obtenidos a 30 °C. En comparación con otros trabajos, Silva y colaboradores (2009) reportaron un incremento ligeramente superior en  $Y_{px}$  entre 30 y 40 °C. Esta diferencia pudo deberse a que ellos emplearon una fuente compleja de nitrógeno.

La reducción de  $Y_{px}$  y  $q_p$  entre 42 y 45 °C guarda relación directa con el aumento en la cantidad de acetato acumulada (Figura 6.2 B).

En la Figura 6.3 B se observa que la concentración de ADNp aumentó hasta 4 veces en el cultivo a 37 °C en comparación con el cultivo a 30 °C, y donde alcanzó su valor más alto que fue de  $20.6 \pm 1.6$  mg/g. Este comportamiento en la concentración de ADNp resulta de su estrecho vínculo con  $Y_{xs}$  y  $Y_{px}$ .

En cuanto al CSE (Figura 6.3 B), este no presentó cambios notables con el incremento en la temperatura de cultivo y se mantuvo alrededor del 80% excepto a 30 °C, donde disminuyó. Este comportamiento es contrario a lo esperado, ya que tanto la estructura del ADNp superenrollado como la actividad de las topoisomerasas I y II son afectadas por la temperatura (Adamčík *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos autores señalan que el superenrollamiento del plásmido puede mantenerse (aunque no al nivel original) en condiciones precarias de ATP (Balke y Gralla, 1987), y también a temperaturas elevadas con respecto a la óptima por la asistencia preferencial de la proteína de choque térmico DnaK a las topoisomerasas (Ogata *et al.*, 1996), por lo que afirman que el proceso homeostático que realizan las topoisomerasas sobre el superenrollamiento es bastante robusto (Snoep *et al.*, 2002).

La imagen de uno de los geles de agarosa con la cual se efectuaron los análisis topológicos y de restricción de los plásmidos purificados obtenidos de los cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  a diferentes temperaturas, se presenta en la Figura 6.4.



Figura 6.4. Gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados de los cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  en matraz a diferentes temperaturas. Marcador de peso molecular de ADN lineal de doble cadena (M); plásmido digerido con la enzima de restricción *EcoRI* (D) y plásmido no digerido (ND).

En la Figura 6.4 se puede apreciar que en todas las temperaturas de cultivo los carriles con plásmidos no digeridos (sin tratamiento con la enzima de restricción *EcoRI*) presentaron 3

bandas. En cada uno de estos carriles, la banda más intensa y que migró con mayor rapidez corresponde a la isoforma superenrollada. La banda tenue intermedia corresponde a la isoforma lineal abierta, y coincidió con la banda de 6 kpb del marcador de peso molecular (el peso molecular del plásmido pHN es de 6.1 kpb), así como también con la banda más intensa de los carriles con plásmido digerido. Por último, la banda de intensidad media y que migró con mayor lentitud, posiblemente corresponde a alguna forma multimérica del plásmido dado que aparece también en los carriles con plásmido digerido y no es cortada por la enzima de restricción.

Es importante señalar que el método de EGA utilizado en este trabajo, no permite separar la población de plásmido superenrollado en sus distintos grados de enrollamiento. Para ello es necesario emplear técnicas de EGA uni o bidimensionales a muy bajos potenciales eléctricos (1-3 V), utilizando cloroquina como agente intercalante del ADN. Las desventajas de estos métodos son baja resolución y alto consumo de tiempo de análisis, por lo que es recomendable considerar un método más sensible y rápido como la electroforesis capilar (Raucci *et al.*, 2000).

En suma, es posible que la temperatura de cultivo haya alterado el grado de superenrollamiento de la población de plásmidos superenrollados, pero no al nivel de reducir el contenido de ADNp superenrollado.

A fin de establecer la temperatura de producción para los cultivos de alta densidad celular, los criterios considerados fueron  $q_p$ ,  $Y_{px}$  y CSE principalmente, de manera que pueda obtenerse la mayor cantidad de ADNp superenrollado en el menor tiempo posible y con el mejor nivel de pureza que satisfaga requerimientos normativos. De acuerdo con la Figura 6.3, todos estos criterios fueron satisfechos a 42 °C. Conforme a los resultados obtenidos y al razonamiento anterior, se propuso 42 °C como la mejor temperatura para la producción de ADNp.

### 6.1.3. Conclusiones parciales

El aumento en la temperatura de cultivo fue efectivo en incrementar el rendimiento y la productividad específicos de ADNp. Con los resultados obtenidos, se establecieron las mejores temperaturas de crecimiento y producción para el proceso de producción por termo-inducción de ADNp, que fueron 35 y 42 °C, respectivamente.

## 6.2. Cultivos en biorreactor

A partir de las temperaturas de producción de biomasa y ADNp propuestas en la sección anterior que fueron 35 y 42 °C, respectivamente, se definió el proceso de producción por termo-inducción de ADNp, sobre el cual se realizó la investigación más importante de este trabajo que fue la evaluación del efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción de ADNp. Ésta consistió en la realización de cultivos de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en un biorreactor operado en modo lote alimentado, con incremento lineal de temperatura de 35 °C a 42 °C, a tasas de calentamiento de 0.025, 0.05, 0.10 y 0.25 °C/min, las cuales son representativas del calentamiento en reactores de producción de 1 hasta 100 m<sup>3</sup> (Caspeta *et al.*, 2009). Todos los cultivos se desarrollaron inicialmente en modo lote a 35 °C en medio mínimo (PD) con concentraciones iniciales de glucosa y biomasa de 10 y 2 g/L, respectivamente. Concluida la fase lote (agotamiento de glucosa), se iniciaron el incremento de temperatura y la alimentación exponencial del cultivo para mantener el crecimiento a  $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$ . A lo largo del cultivo, el pH y la TOD se controlaron a 7.2 y 30%, respectivamente. Como control de referencia, se realizaron cultivos a 35 °C ( $q = 0$  °C/min). Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

Para cada cultivo se presentan las cinéticas de crecimiento y producción de ADNp; las mediciones de capacitancia y de conductividad del sensor IRF; las condiciones de proceso (T, pH, TOD), y las imágenes de los geles de agarosa empleados en el análisis topológico de los plásmidos. Las Figuras 6.5 corresponden a los cultivos control a 35 °C; las Figuras 6.6 a 6.9 a los cultivos termo-inducidos.

Se presenta además una tabla resumen con los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en los cultivos en biorreactor, y en la Figura 6.10 se muestran los indicadores de producción de ADN<sub>p</sub> en función de la tasa de calentamiento.

### 6.2.1. Cultivos a 35 °C

En el panel “A” de las Figuras 6.5.1 y 6.5.2 se observa que la concentración de biomasa se incrementó exponencialmente con el tiempo de cultivo, y alcanzó un valor de  $65.6 \pm 5.6$  g/L. En cuanto a la concentración de glucosa, que inicialmente era de 10 g/L, se redujo hasta agotarse por completo durante la fase lote y se mantuvo prácticamente en 0 g/L a lo largo de la etapa de alimentación. Por otro lado, la concentración de acetato se incrementó durante la fase lote donde alcanzó un valor de  $0.98 \pm 0.06$  g/L. Luego se redujo en las 4 h posteriores al inicio de la alimentación, y se mantuvo prácticamente en 0 g/L hasta las 20-22 h de cultivo. La concentración de acetato al final del cultivo fue alrededor de  $1.82 \pm 0.45$  g/L.

En el panel “B” de las Figuras 6.5.1 y 6.5.2 se observa que la concentración de ADN<sub>p</sub> se incrementó exponencialmente a lo largo del cultivo hasta las 20-22 h, en donde alcanzó un valor de  $317.8 \pm 43.3$  mg/L, y luego se redujo. En cuanto al rendimiento  $Y_{px}$ , este aumentó durante la fase lote pero presentó una reducción transitoria al iniciar la etapa de alimentación, después de la cual se mantuvo sin cambios importantes con el tiempo de cultivo a un valor de  $5.20 \pm 0.00$  mg/g. En cuanto al CSE, este se mantuvo sin cambios importantes entre las 14 y 22 h. El CSE entre las 20 y 22 h fue de  $81 \pm 5\%$ .

En el panel “C” de las Figuras 6.5.1 y 6.5.2 se puede observar que la capacitancia tuvo un incremento exponencial a lo largo del cultivo. Al inicio de la etapa de alimentación, la capacitancia presentó una disminución transitoria, que en las últimas 2 h tuvo una ligera desviación positiva con respecto a la tendencia marcada previamente. Por otro lado, la conductividad no tuvo cambios notables durante la fase lote, pero al entrar en la etapa de alimentación, comenzó a disminuir siguiendo una tendencia lineal hasta las 22 h, donde alcanzó un valor de 12 mS/cm, y luego se incrementó en las 2 h restantes.

En el panel “D” de las Figuras 6.5.1 y 6.5.2 puede observarse que la temperatura y el pH estuvieron controlados a 35 °C y 7.2, respectivamente. En cuanto a la TOD, esta se mantuvo alrededor de 30%, aunque mostró perturbaciones, sobre todo al inicio de la alimentación y en las 8 h restantes del cultivo.

Por último, en las Figuras 6.5.3 y 6.5.4, al igual que en la Figura 6.4, en todos los carriles se aprecian 3 bandas principalmente, siendo las más intensas las correspondientes a la isoforma superenrollada. Las bandas intermedias tenues se asocian a la isoforma lineal abierta. Finalmente, las bandas de intensidad intermedia que migraron con mayor lentitud, posiblemente corresponden a una forma multimérica. Las bandas en los pozos pueden sugerir la presencia de fragmentos de ADN cromosomal en la fracción purificada de ADNp. No se detectaron fragmentos de ARN.

En la etapa lote el cultivo creció exponencialmente a un tasa de crecimiento de  $0.22 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y tuvo un rendimiento  $Y_{xs}$  de  $0.35 \pm 0.01 \text{ g/g}$ . La glucosa, que inicialmente tuvo una concentración de 10 g/L fue consumida a una  $q_s$  de  $0.63 \pm 0.01 \text{ g/g h}$ . El acetato se acumuló hasta alcanzar una concentración máxima de  $0.98 \pm 0.02 \text{ g/L}$  con un rendimiento  $Y_{as}$  de  $0.08 \pm 0.01 \text{ g/g}$ . Al comparar estos parámetros con los obtenidos en los cultivos en matraz a 35 °C, resultaron ser más bajos. Estas diferencias pudieron surgir principalmente por el factor empleado en la estimación de biomasa en los cultivos de matraz, que al parecer solo es válido a 37 °C. Independientemente de esta situación,  $\mu$  calculada a partir de la estimación de la concentración de biomasa a partir de la densidad óptica, es mayor a la que se obtiene con los datos de concentración de biomasa en peso seco, ya que la evolución del número de células no necesariamente es paralelo al de masa celular.

La concentración de ADNp aumentó de manera similar a la concentración de biomasa, y alcanzó un valor de  $32.7 \pm 3.5 \text{ mg/L}$ . En cuanto al rendimiento  $Y_{px}$ , que no se esperaba aumentara con el tiempo de cultivo, tuvo un valor final de  $6.8 \pm 0.6 \text{ mg/g}$ . Este mismo fenómeno ha sido señalado por otros investigadores que han observado que el número de copias se incrementa durante la etapa exponencial tardía y lo atribuyen a la reducción paulatina de la tasa de crecimiento (Namdev *et al.*, 1993; Prather *et al.*, 2003).



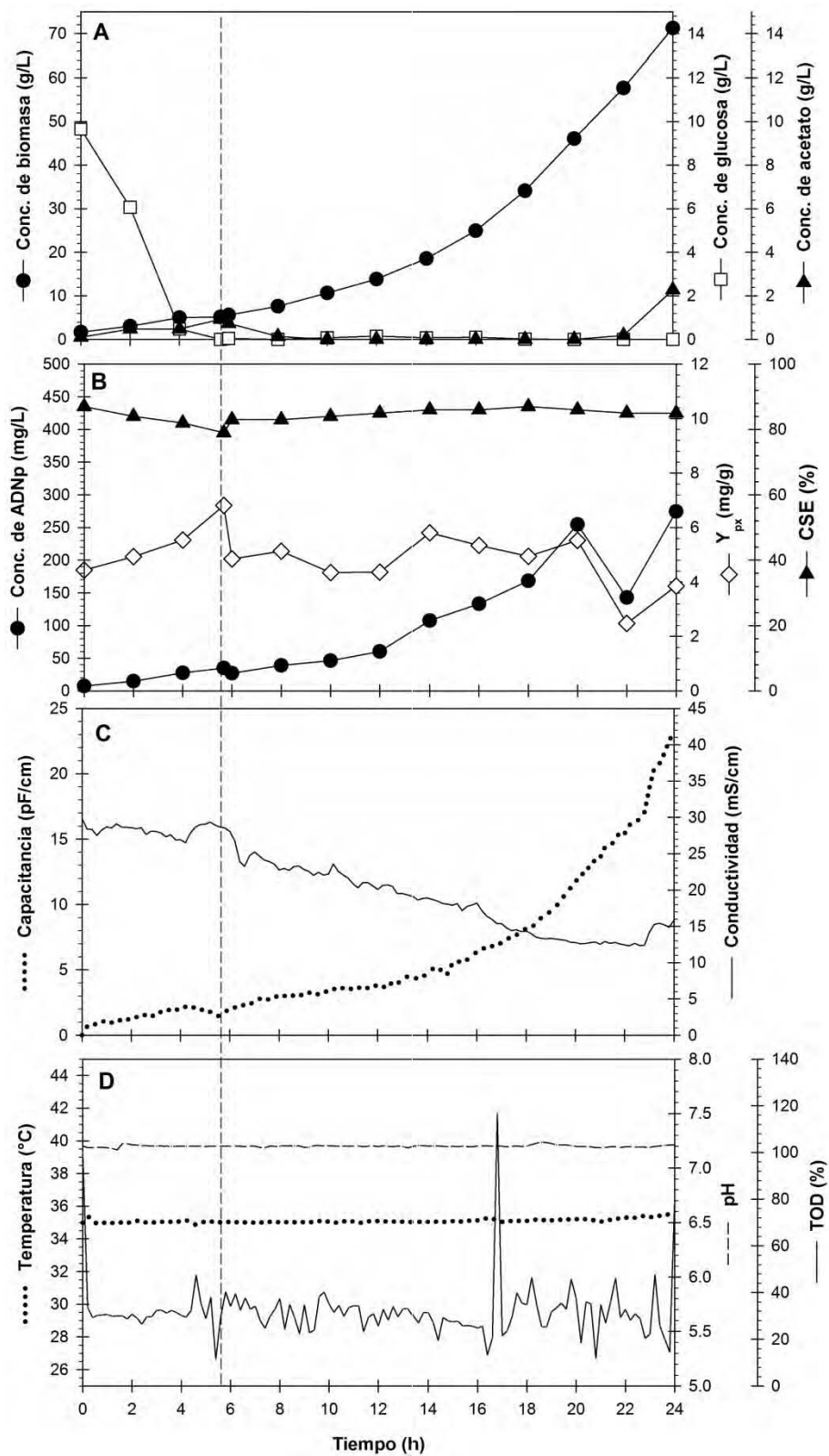


Figura 6.5.1. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado a 35 °C. (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. La línea punteada vertical indica el inicio de la alimentación.

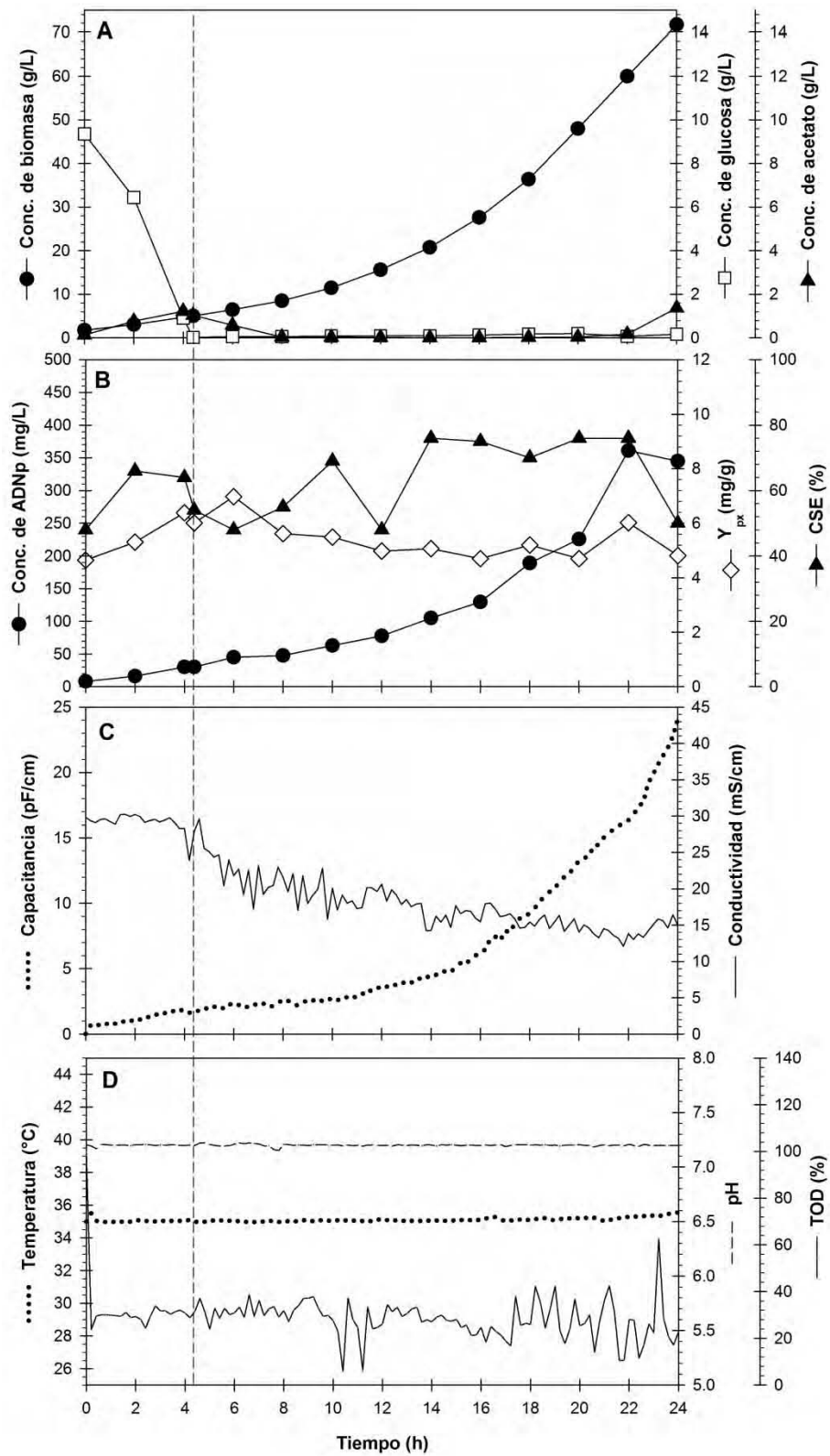


Figura 6.5.2 Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado a 35 °C (Réplica). (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. La línea punteada vertical indica el inicio de la alimentación.

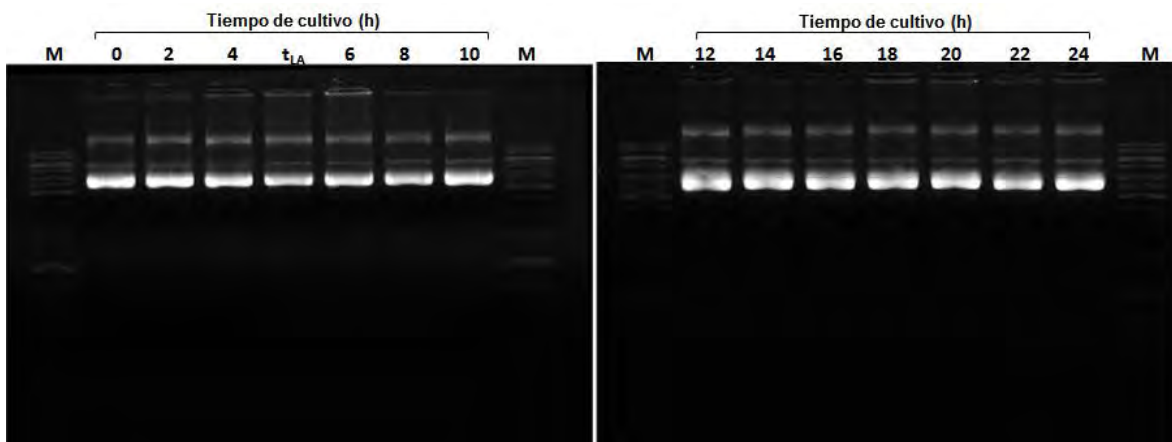


Figura 6.5.3. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor a 35 °C. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

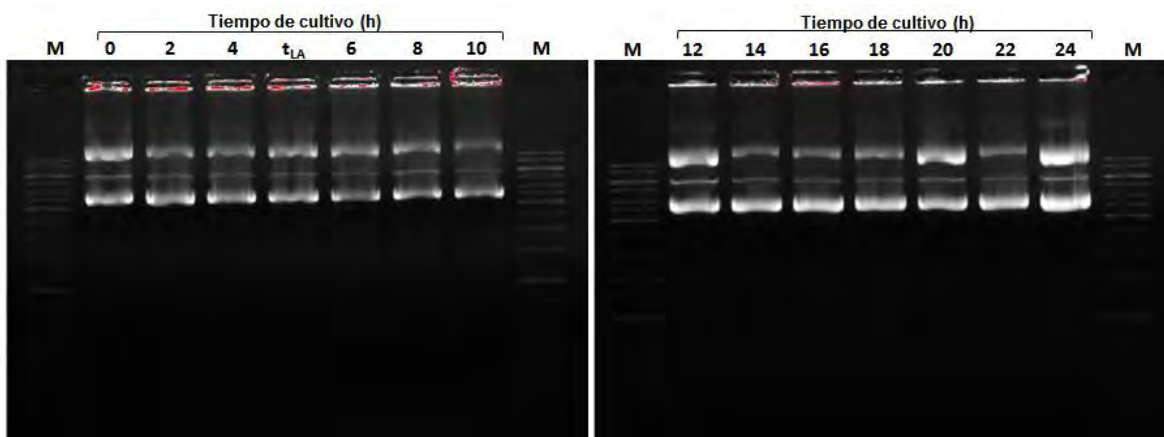


Figura 6.5.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor a 35 °C (Réplica). Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

En la etapa lote alimentado la tasa de crecimiento específico promedio fue  $0.15 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$ , y se calculó con base en la cantidad de biomasa total a fin de considerar el incremento de volumen del sistema con el tiempo.  $\mu$  observada correspondió a  $\mu_{\text{set}}$ , lo cual indica que los parámetros utilizados en la ecuación de flujo de alimentación, fueron adecuados. El valor de  $\mu_{\text{set}}$  empleado evitó el sobreflujo metabólico hasta las 22 h cultivo. El acetato excretado en las últimas 2 h del cultivo, pudo originarse por la presencia de gradientes de oxígeno disuelto; bajo las densidades celulares y condiciones de proceso observadas en dicho periodo, es muy probable que el tiempo característico de consumo de oxígeno ( $t_{\text{oc}}$ ) haya sido menor al tiempo de mezclado debido a que el volumen de trabajo en el reactor fue 1.5

veces mayor que al inicio de la alimentación, lo que redujo la potencia volumétrica y consecuentemente alargó el tiempo de mezclado (Lara *et al.*, 2006).

El rendimiento  $Y_{xs}$  global (calculado a partir de los datos de concentración de biomasa y cantidad de glucosa añadida en ausencia de acetato) fue de  $0.43 \pm 0.00$  g/g. Este rendimiento fue mayor que el observado en la fase lote. Esto se debe a que el metabolismo de *E. coli*, presentó en general un menor sobreflujo metabólico y la glucosa fue convertida con mayor eficiencia en biomasa. El rendimiento  $Y_{xNH_3}$  global (calculado a partir de los datos de concentración de biomasa y cantidad de base añadida en ausencia de acetato) fue de  $4.5 \pm 0.14$  g/g. El valor de este rendimiento es razonable si se compara con el reportado en cultivos de *E. coli* BL21 y TG1 para la producción de proteína recombinante que es de 7 g/g (Schmidt *et al.*, 1999).

La concentración de ADNp dejó de incrementarse a partir del momento en que comenzó a excretarse acetato en el medio. También el rendimiento  $Y_{px}$  tuvo una marcada disminución bajo la misma circunstancia.

Habiendo propuesto limitaciones de oxígeno como posible causa de la excreción de acetato, principalmente de la fracción de biomasa que transitó por la zona de contacto con la solución de alimentación, *E. coli* pudo cambiar su actividad respiratoria por la fermentativa. En esas condiciones, el estado energético de *E. coli* basado en la relación carga energía, es más bajo que en condiciones aerobias. Esta disminución en los niveles de ATP pudo limitar el desempeño de las vías anabólicas de las cuales participa la replicación del plásmido. En consecuencia, esto explicaría la reducción del número de copias del plásmido por célula. También se pensó en la posibilidad de que haya disminuido la concentración de biomasa viable, pero de acuerdo al crecimiento celular (Figuras 6.5.1 A y 6.5.2 A) y al incremento continuo en la capacitancia (Figuras 6.5.1 C y 6.4.2 C), no se tienen elementos que la confirmen. En cuanto al CSE, está reportado que la concentración de oxígeno puede afectar el superenrollamiento del plásmido (Durland y Eastman, 1998). Algunos investigadores señalan que en condiciones de crecimiento anaerobio, el superenrollamiento negativo del plásmido se incrementa (Dorman *et al.*, 1988). Por otro lado, los periodos en los que se

activa la represión catabólica y se reduce la tasa de crecimiento como sucede en la transición del crecimiento en modo lote y durante el tiempo en que se reasimila el acetato, así como los periodos en los que no está disponible el sustrato (como es el caso de la adición intermitente de glucosa), inducen el relajamiento del plásmido pero de manera transitoria (Balke y Gralla, 1987). En contraste con lo mencionado, existe evidencia experimental de que los niveles de la proteína chaperona DnaK, la cual asiste a la DNA girasa para mantener el superenrollamiento del plásmido, se incrementan durante un cultivo alimentado (Yoon *et al.*, 2003). Más aún, el relajamiento del plásmido puede inducir la expresión de *rpoH* (Kaneko *et al.*, 1996), lo que indica que el CSE puede mantenerse en circunstancias adversas del cultivo alimentado.

Al comparar las curvas de crecimiento (Figura 6.5.1 A y 6.5.2 A) con las mediciones de capacitancia (Figura 6.5.1 C y 6.5.2 C) se puede constatar una gran similitud. La capacitancia del medio está directamente relacionada con la concentración de biomasa viable (Knabben *et al.*, 2011; Marckx y Davey 1999). Gracias a la alta frecuencia de medición pudo obtenerse una imagen más completa de la evolución del cultivo. Con estos elementos, se puede afirmar que durante la etapa de lote alimentado, el cultivo se mantuvo viable. Resultó interesante el cambio en la tendencia de la medición de capacitancia a las 20 h (Figura 6.5.1 C) y 22 h (Figura 6.5.2 C), que coincide con la excreción de acetato en el medio. Esta situación no se esperaba por el hecho de que solo el material celular íntegro y viable es capaz de polarizarse. Una especie como el ácido acético que a pH 7.2 el 99.7% (calculado a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach) se encuentra en su forma iónica como acetato, no se polariza. Esto permite suponer dos cosas: 1) que el cambio en el estado metabólico por la excreción de acetato produce un cambio en la polarización de la célula ó 2) la presencia de acetato altera de algún modo las propiedades eléctricas de la célula. Esto podría ocurrir, ya que está descrito que la constitución química de la pared celular en las bacterias es influenciada por la concentración de especies iónicas del medio (Markx y Davey, 1999).

En cuanto a la conductividad, ésta disminuyó a lo largo de la fase lote alimentado. La conductividad del medio está influenciada principalmente por la concentración de especies

iónicas. Las sales presentes en el medio constituyen las fuentes de nitrógeno, fósforo, azufre y cofactores, por lo que es de esperarse que la disminución en la conductividad refleje el consumo de dichos sustratos. Sin embargo, tal disminución no se observó en la etapa de fase lote. Esto se debió a que en esa etapa se acumuló acetato junto con el amonio adicionado para mantener el pH constante; el balance entre el consumo y excreción de especies iónicas mantuvieron un valor de conductividad aparentemente constante. Por otro lado, el incremento en la conductividad en las últimas horas del cultivo estuvo asociado a la excreción de acetato.

### **6.2.2. Cultivos termo-inducidos**

A diferencia de los cultivos no calentados, en los cultivos con incremento de temperatura ( ane 1 “A”, Figuras 6.6-6.9) se puede observar que la concentración de biomasa alcanzada al final del cultivo fue más baja; además, dejó de incrementarse exponencialmente a edades tempranas, pero continuó haciéndolo de manera lineal hasta mantenerse sin cambios importantes en el tiempo restante del cultivo como se aprecia en la mayoría de los cultivos calentados a tasas superiores a 0.05 °C/min. Otras diferencias relevantes con respecto a los cultivos alimentados a 35 °C consistieron en la excreción de acetato y la acumulación de glucosa a edades tempranas del cultivo. Después de que el acetato alcanzó su concentración más alta en los cultivos, que fue entre 8 y 15 g/L y en casos excepcionales (Figura 6.6.1 A) hasta 25 g/L, se mantuvo sin cambios importantes en el tiempo restante de cultivo, aunque en algunos casos (Figuras 6.6.2 A, 6.7.2 A y 6.8.2 A) disminuyó entre las 20 y 24 h de cultivo. Este comportamiento puede explicarse a partir de la generación de acetato por la población celular viable, que en algunos cultivos no compensó el efecto de dilución del medio que se intensificó de manera importante entre las 20 y 24 h. Por otro lado, la acumulación de glucosa siempre estuvo precedida por la excreción de acetato, y ocurrió a concentraciones de acetato superiores a 5 g/L. La concentración final que alcanzó la glucosa en los cultivos estuvo en función de la duración del periodo de acumulación, el suministro de solución de alimento al reactor y la concentración de biomasa viable, y llegó a alcanzar concentraciones desde 15 hasta 170 g/L.

En lo que respecta a la producción de ADN<sub>p</sub>, a diferencia de los cultivos no calentados, en el panel “B” de las Figuras 6.6-6.9 se puede observar que la concentración de ADN<sub>p</sub> dejó de incrementarse exponencialmente en edades tempranas del cultivo (10-20 h); continuó incrementándose linealmente por un breve periodo después del cual, permaneció sin cambios importantes hasta el final del cultivo, con excepción de algunos casos (Figuras 6.6.2 B y 6.8.1 B) donde disminuyó por bajos niveles de TOD. En cuanto al rendimiento  $Y_{px}$ , a diferencia de los cultivos alimentados a 35 °C, presentó una reducción transitoria al iniciar la etapa de alimentación, después de la cual continuó aumentando hasta estabilizarse a un valor relativamente constante, y luego disminuyó. En cuanto al CSE, este se mantuvo sin cambios importantes en los periodos en que  $Y_{px}$  se estabilizó, y fue alrededor del 80%.

En lo pertinente a las diferencias en las tendencias de las mediciones del sensor IRF entre los cultivos calentados y no calentados, en el panel “C” de las Figuras 6.6-6.9 se puede observar que la capacitancia se incrementó exponencialmente hasta alcanzar valores máximos absolutos a edades tempranas del cultivo. El tiempo en que comenzó a disminuir la capacitancia coincidió con el inicio de la acumulación de glucosa. En cuanto a la conductividad, esta se mantuvo durante la fase lote sin cambios importantes entre los 25 y 30 mS/cm; luego disminuyó linealmente en la etapa de alimentación hasta alcanzar valores entre 7 y 10 mS/cm y posteriormente se incrementó durante el tiempo restante de cultivo a valores no mayores que 35 mS/cm. Tal incremento coincidió con el inicio de la excreción de acetato en el medio de cultivo.

En lo que toca al seguimiento de las condiciones de proceso ( panel “D”, Figuras 6.6-6.9), a diferencia de los cultivos no calentados, al inicio de la alimentación la temperatura comenzó a incrementarse linealmente hasta los 42 °C a la tasa de calentamiento especificada para cada cultivo, y se mantuvo controlada a dicho valor hasta el fin del cultivo. Las perturbaciones en la TOD, por otra parte, se incrementaron en frecuencia e intensidad en la segunda mitad de los cultivos, y en algunos casos (Figuras 6.7.2 D y 6.8.2 D) se apreció con claridad un incremento sostenido en la TOD. Estos cambios en la TOD tuvieron lugar particularmente a partir del inicio de la acumulación de glucosa y la disminución en la capacitancia.

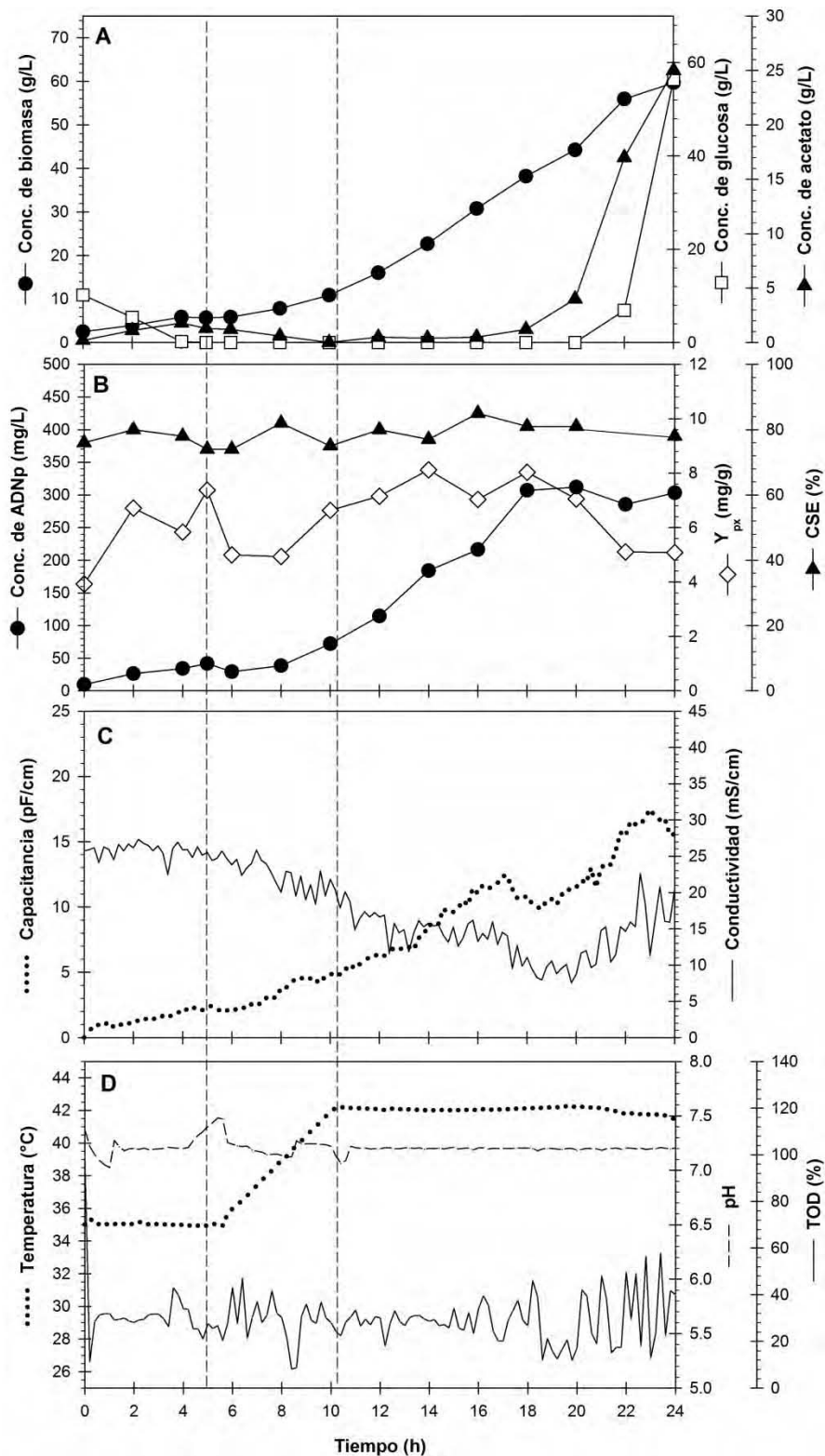


Figura 6.6.1. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.025$  °C/min. (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.



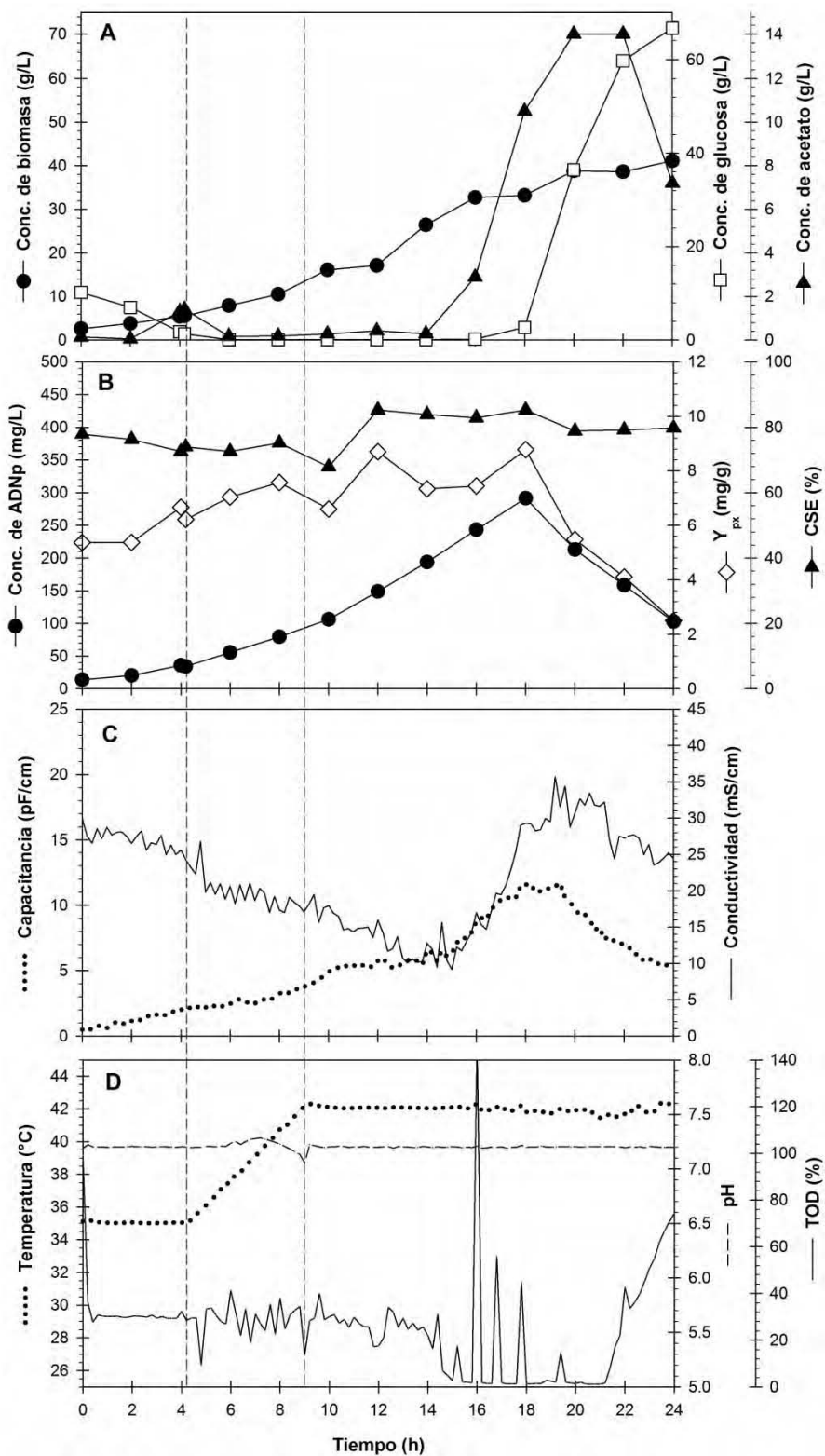


Figura 6.6.2. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.025$  °C/min (Réplica). (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

Por último, en los geles de agarosa de las Figuras 6.6 a 6.9 se aprecian en todos los carriles 3 bandas principalmente, siendo las más intensas las correspondientes a la isoforma superenrollada. Las bandas intermedias tenues se asocian a la isoforma lineal abierta. Finalmente, las bandas de intensidad intermedia que migraron con mayor lentitud, posiblemente corresponden a una forma multimérica. Las bandas en los pozos pueden sugerir la presencia de fragmentos de ADN cromosomal en la fracción purificada de ADNp. No se detectaron fragmentos de ARN.

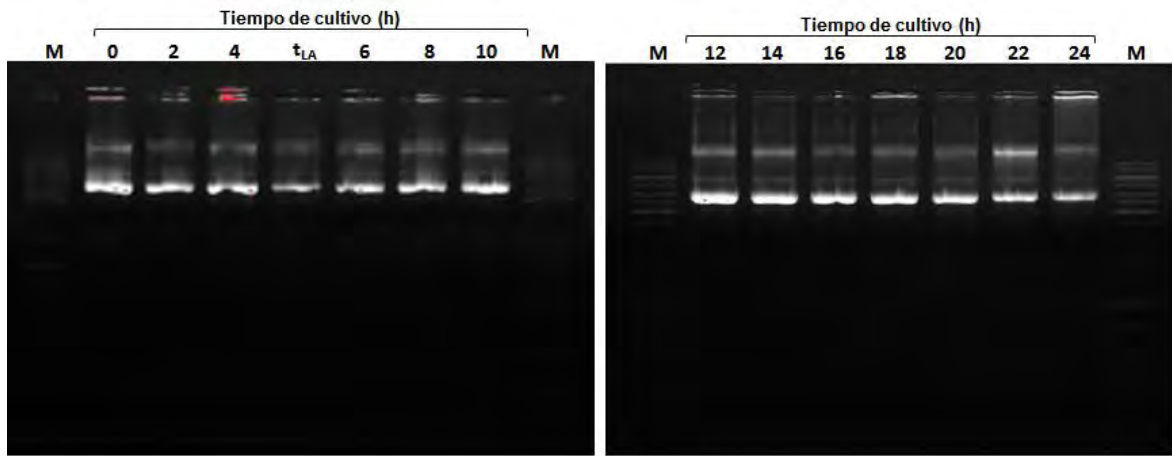


Figura 6.6.3. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.025$  °C/min. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

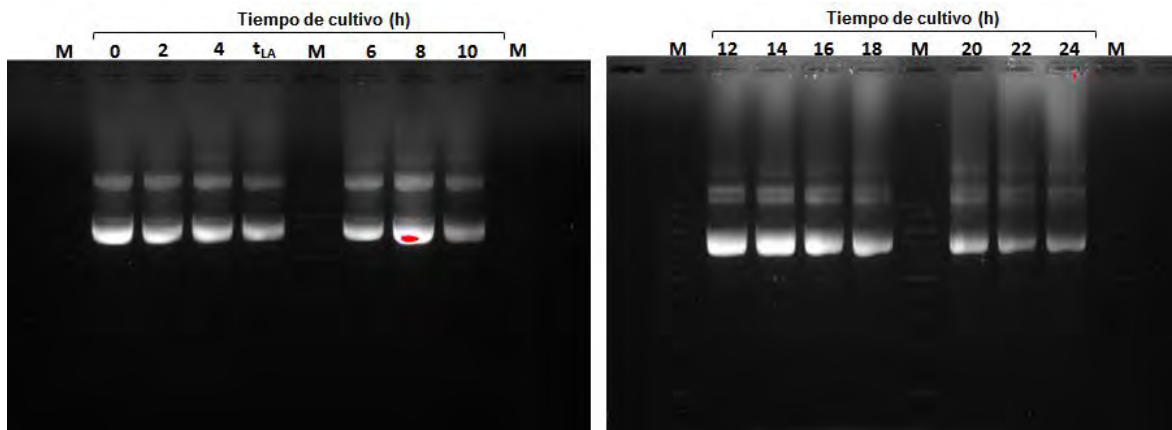


Figura 6.6.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.025$  °C/min (Réplica). Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

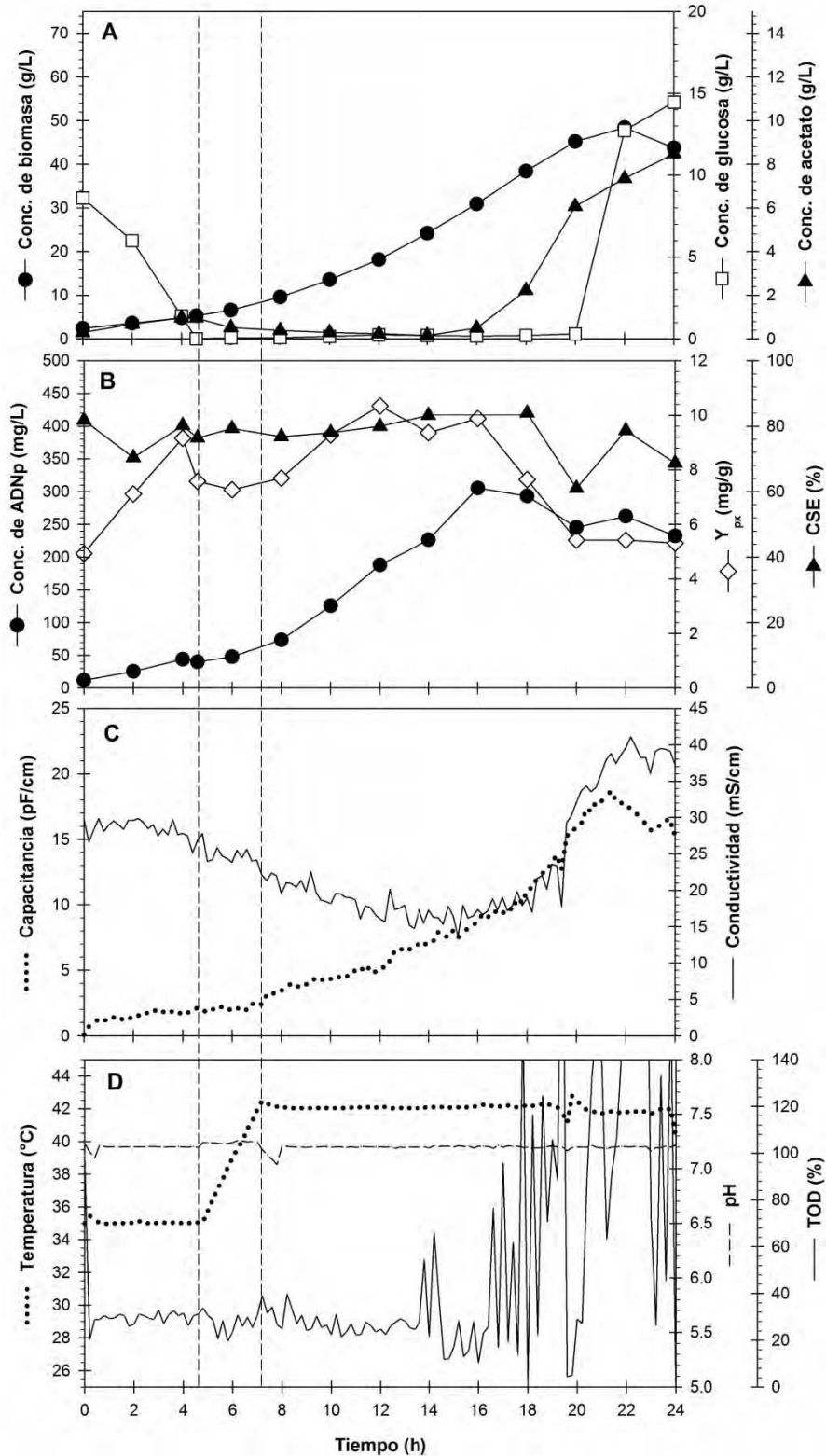


Figura 6.7.1. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.05$  °C/min. (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

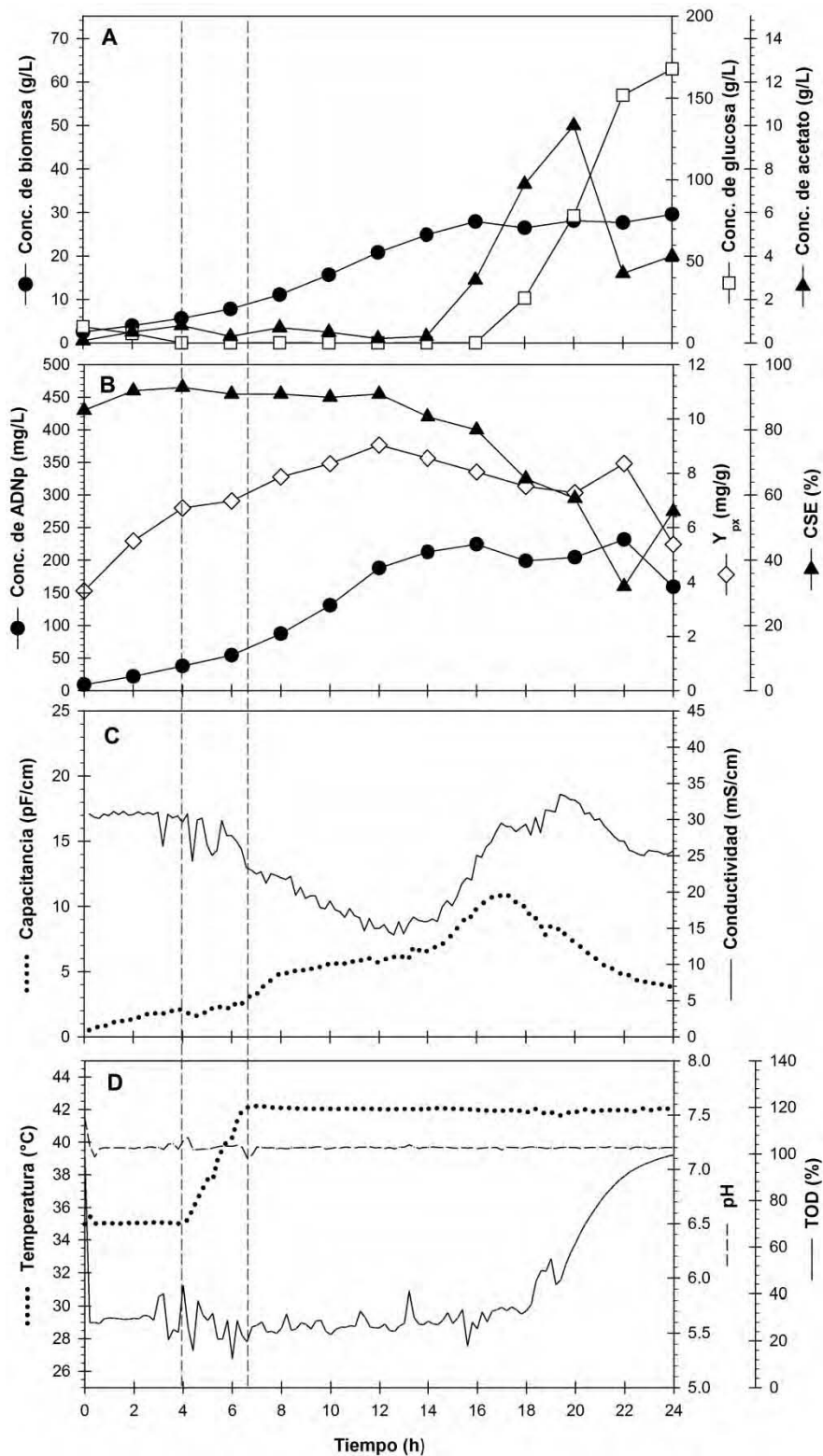


Figura 6.7.2. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.05$  °C/min (Réplica). (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

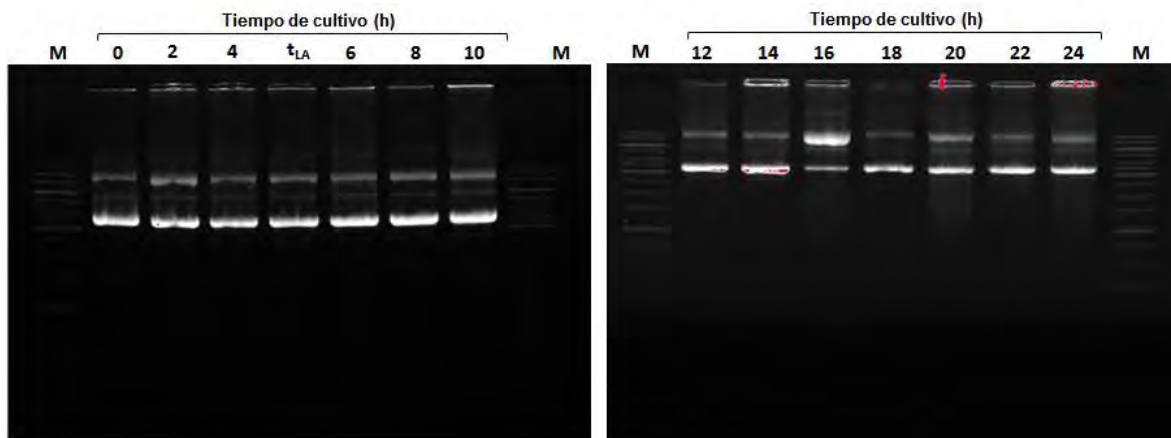


Figura 6.7.3. Geles de agarosa al 0.8% (izquierda) y 1% (derecha) de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.05$  °C/min. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

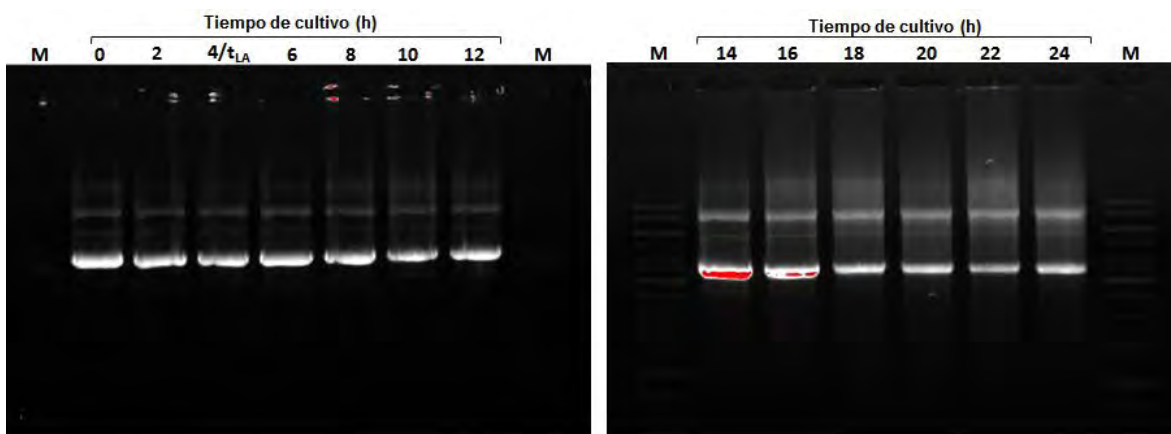


Figura 6.7.4. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.05$  °C/min. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

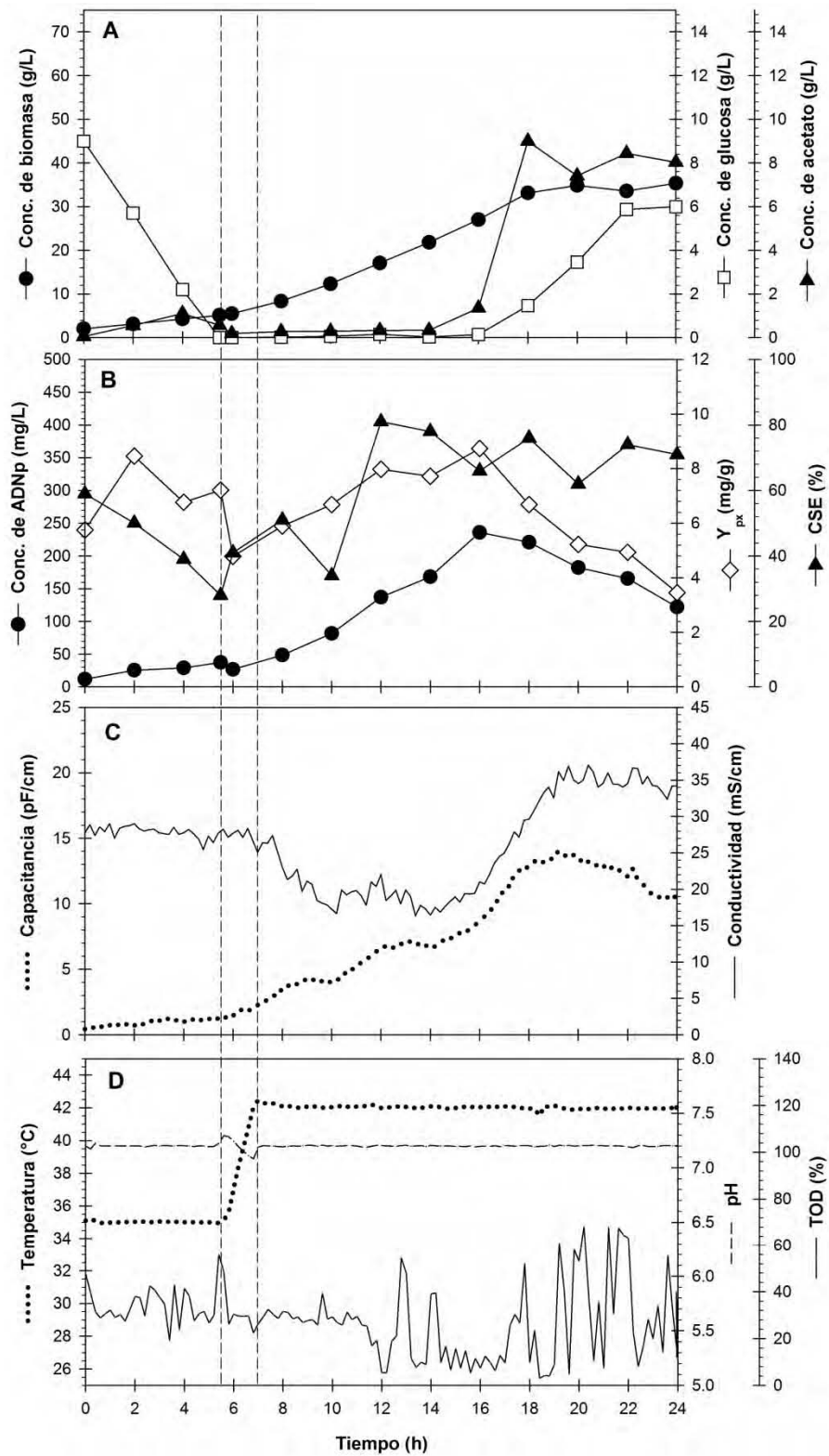


Figura 6.8.1. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min. (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNP,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

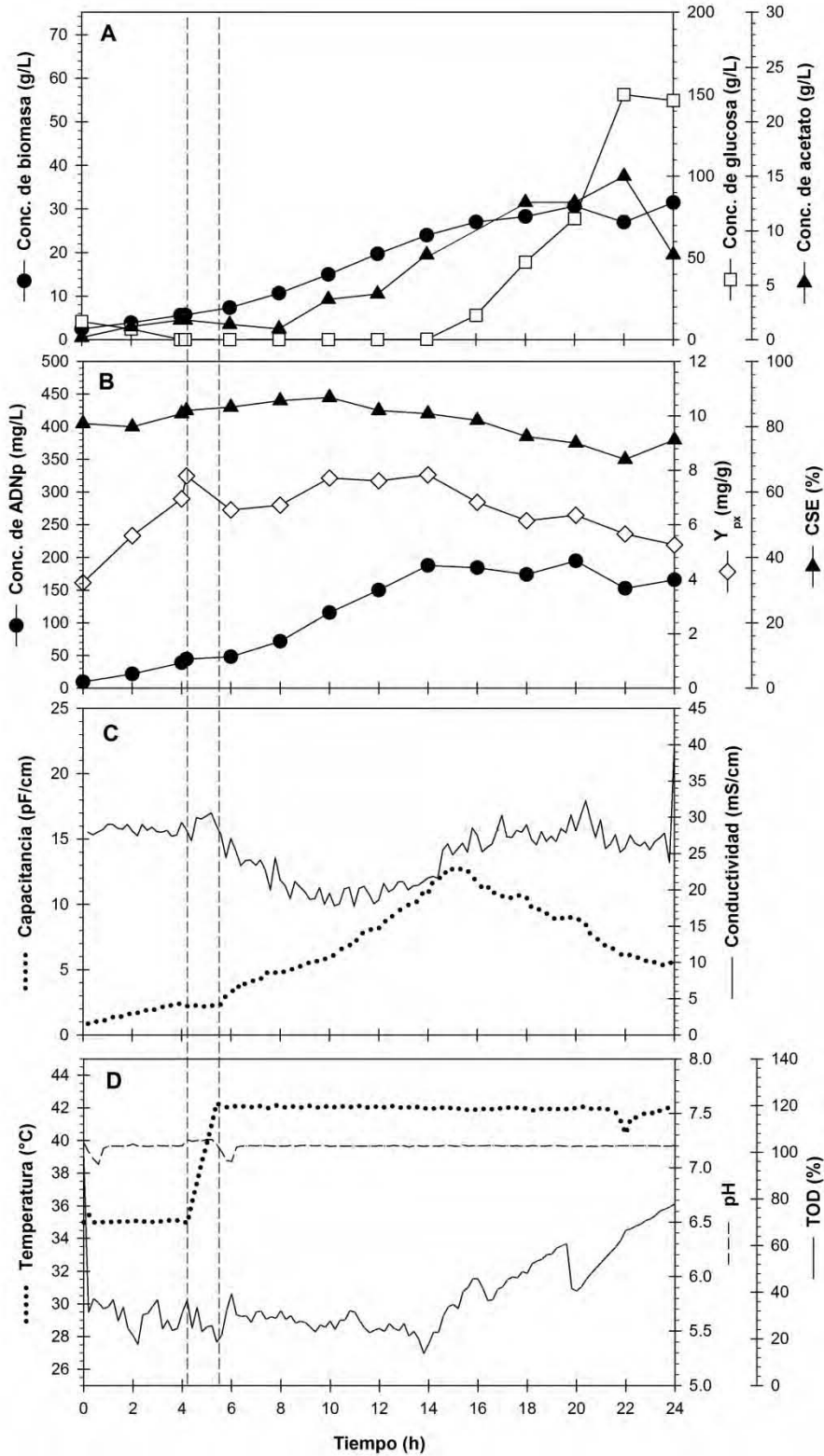


Figura 6.8.2. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min (Réplica). (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

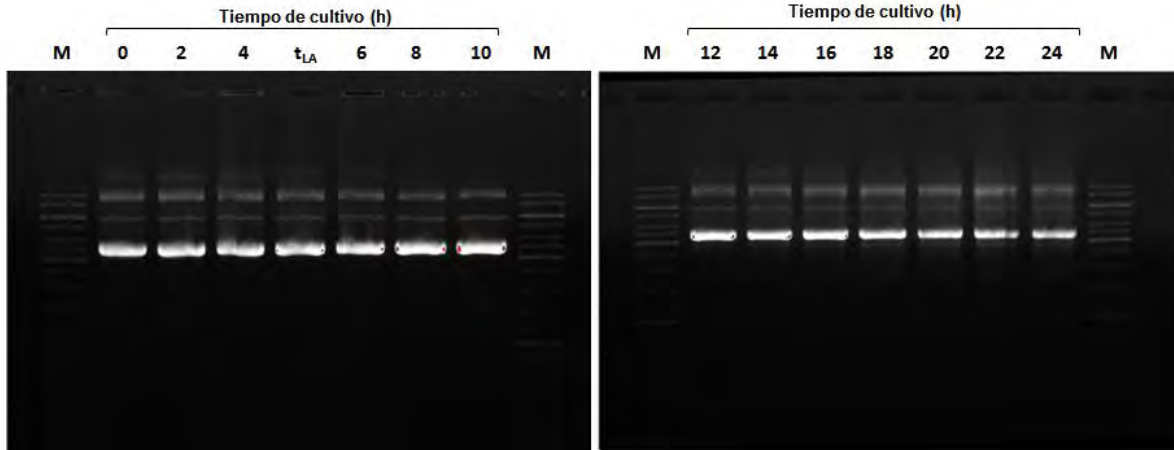


Figura 6.8.3. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

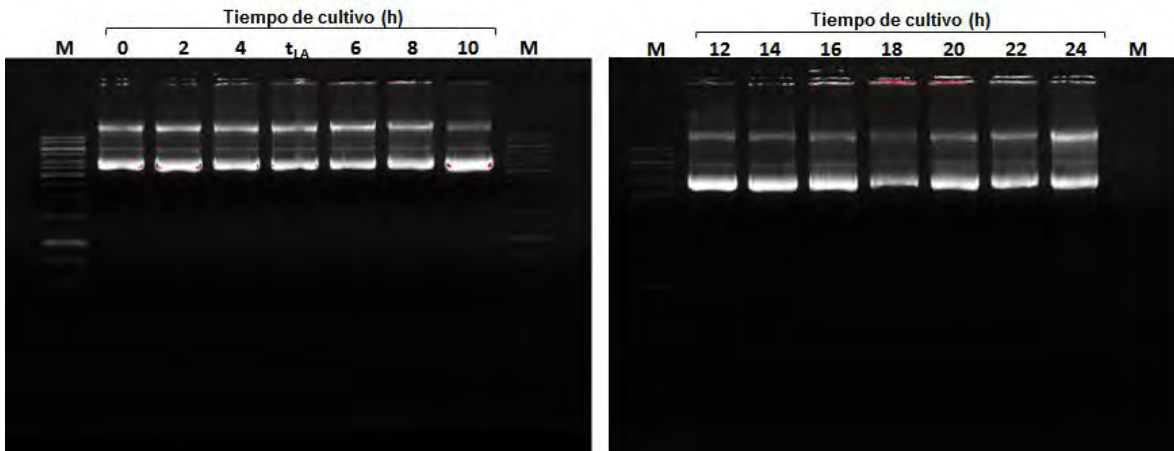


Figura 6.8.4. Geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min (Réplica). Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).



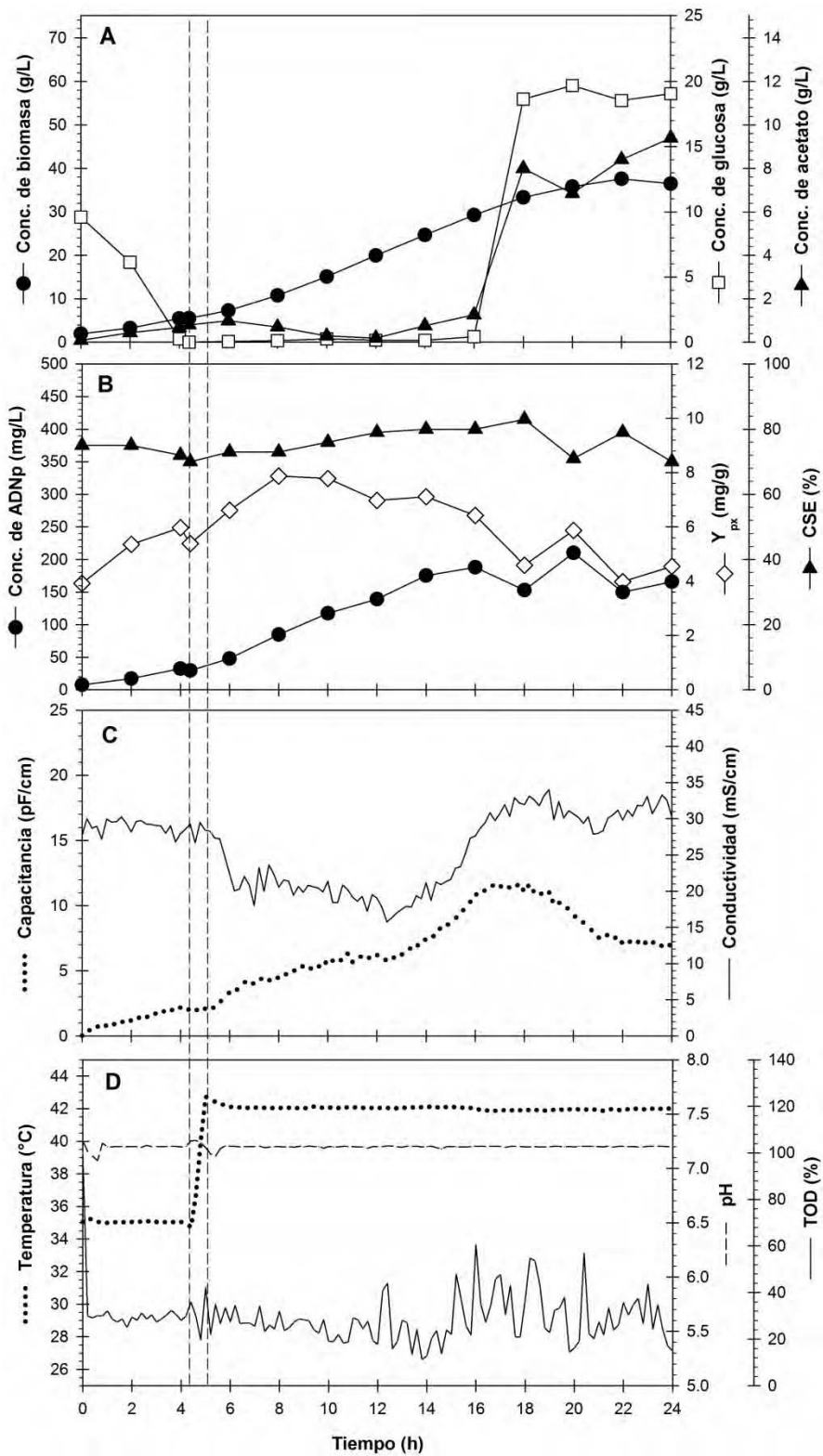


Figura 6.9.1. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min. (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

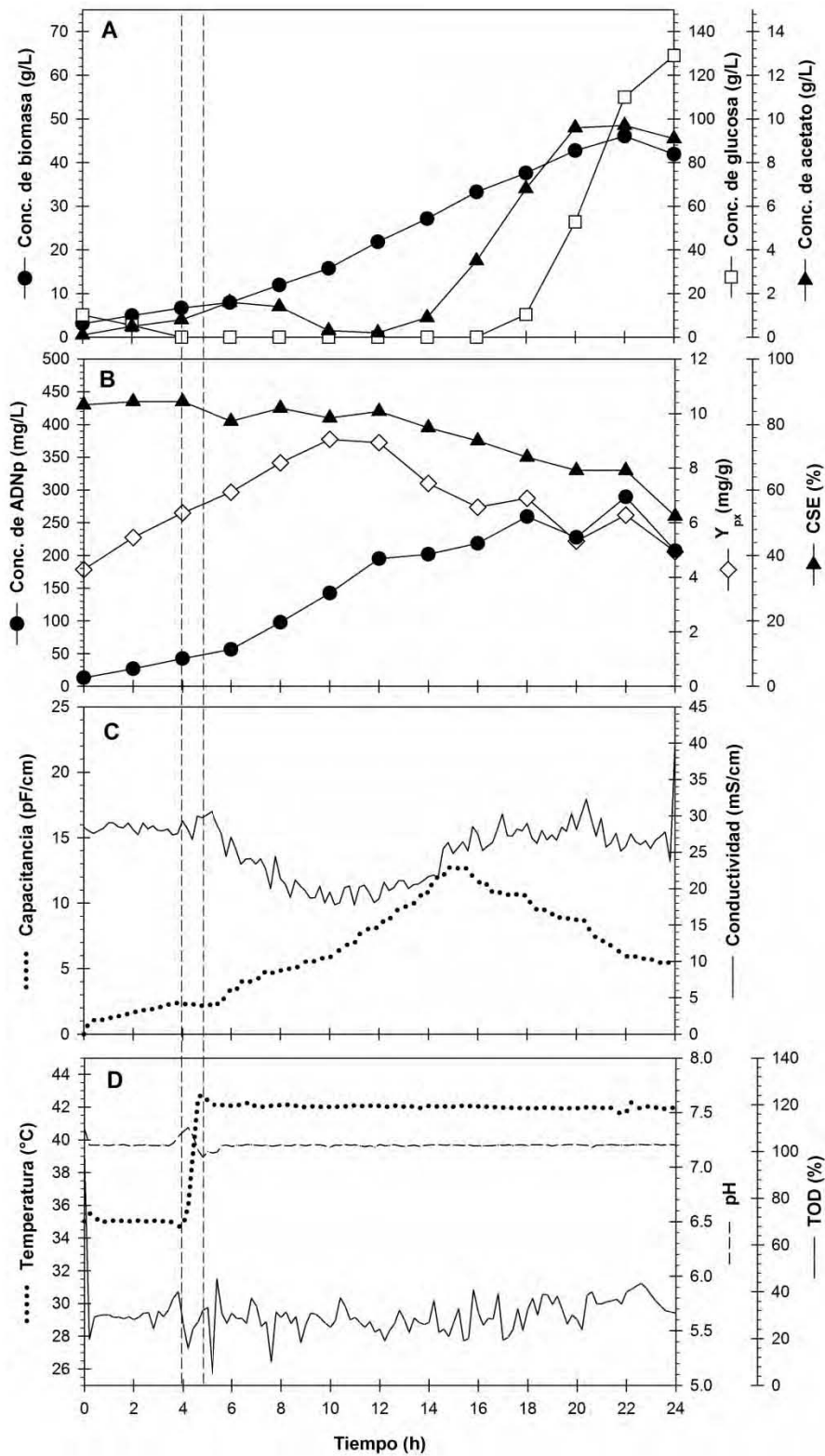


Figura 6.9.2. Cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  en biorreactor en modo lote alimentado con cambio de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.10$  °C/min (Réplica). (A) Curva de crecimiento, concentración de glucosa y acetato; (B) concentración de ADNp,  $Y_{px}$  y CSE; (C) mediciones de capacitancia y de conductividad, y (D) mediciones de T, pH y TOD. Las líneas punteadas verticales, de izquierda a derecha, indican el inicio de la alimentación y que el cultivo ha alcanzado los 42 °C, respectivamente.

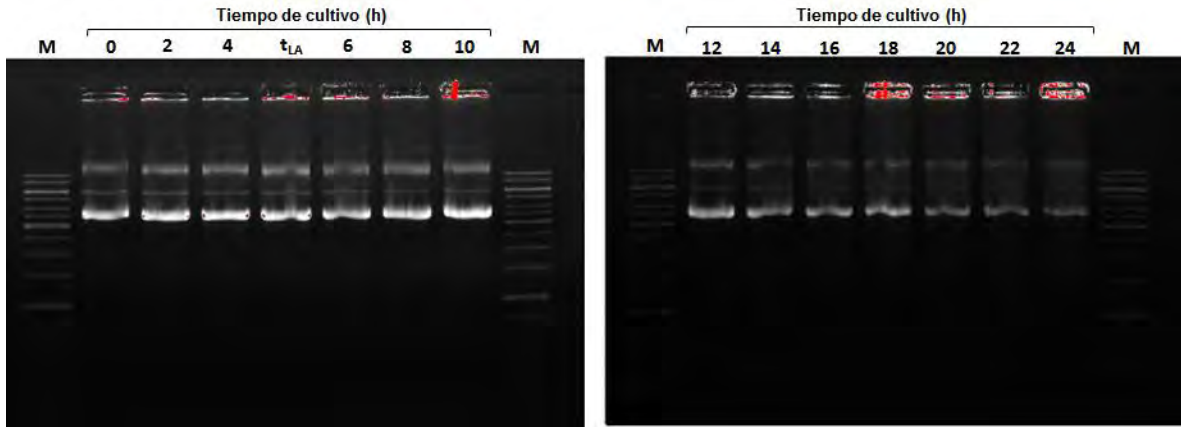


Figura 6.9.3. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.25$  °C/min. Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

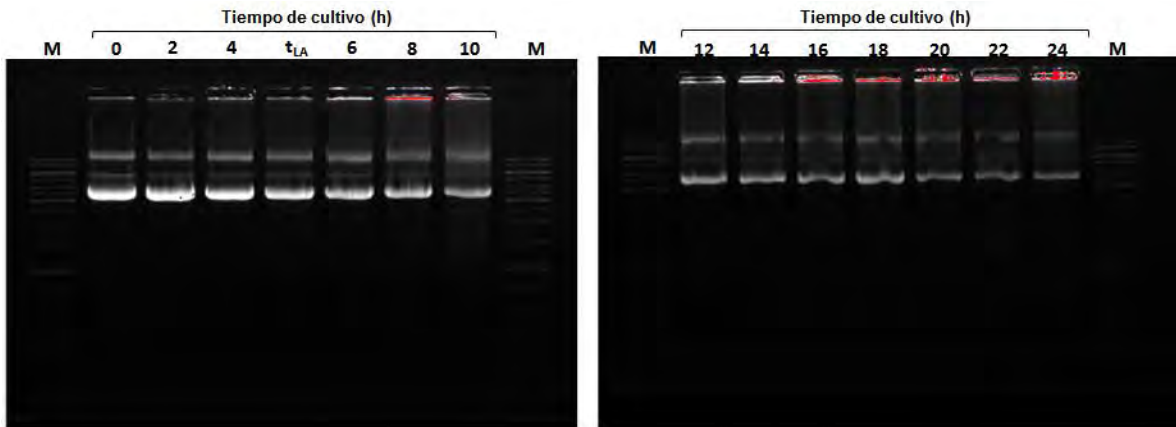


Figura 6.9.4. Geles de agarosa al 0.8% de los plásmidos purificados del cultivo de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  con incremento de temperatura de 35 a 42 °C a  $q = 0.25$  °C/min (Réplica). Marcador de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena (M).

El resumen del desempeño de *E. coli* DH5 $\alpha$  pHN en los cultivos en biorreactor se presenta en las Tablas 6.1 y 6.2.

	Tasa de calentamiento (°C/min)				
	0	0.025	0.05	0.10	0.25
$\mu$ (h <sup>-1</sup> ):	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.02
$Y_{xs}$ (g/g):	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.03
$Y_{as}$ (g/g):	0.08 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.03
$q_s$ (g/g h):	0.63 ± 0.01	0.60 ± 0.05	0.59 ± 0.06	0.58 ± 0.07	0.60 ± 0.03
$Y_{px}$ (mg/g):	6.41 ± 0.41	7.05 ± 0.35	7.90 ± 1.2	7.77 ± 0.26	6.53 ± 0.35
P (mg/L):	32.69 ± 2.49	38.95 ± 2.95	38.95 ± 1.05	39.23 ± 2.57	35.30 ± 3.80
A (g/L):	0.98 ± 0.06	1.80 ± 0.00	0.90 ± 0.10	1.30 ± 0.25	1.00 ± 0.20

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la fase lote de los cultivos en biorreactor de *E. coli* DH5 $\alpha$  pHN. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 2 datos experimentales.

	Tasa de calentamiento (°C/min)				
	0	0.025	0.05	0.10	0.25
$q$ (°C/min):	0.00 ± 0.00	0.025 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.27 ± 0.00
$\mu$ (h <sup>-1</sup> ):	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.00
$Y_{xs}$ (g/g):	0.43 ± 0.00	0.32 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.01
$Y_{xNH_3}$ (g/g):	4.4 ± 0.1	3.7 ± 0.4	3.1 ± 0.8	3.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3
P (mg/L):	317.8 ± 43.3	301.5 ± 10.5	264.9 ± 40.4	214.8 ± 14.2	222.9 ± 21.5
X (g/L):	65.6 ± 5.6	38.7 ± 5.5	29.4 ± 1.5	25.2 ± 0.9	31.1 ± 1.2
$Y_{px}$ (mg/g):	5.20 ± 0.00	7.85 ± 0.15	9.29 ± 0.59	8.57 ± 0.63	8.93 ± 0.64
$q_p$ (mg/g h):	0.78 ± 0.00	1.18 ± 0.02	1.48 ± 0.00	1.34 ± 0.07	1.40 ± 0.13
$Q_p$ (mg/g h):	0.22 ± 0.06	0.42 ± 0.07	0.56 ± 0.06	0.53 ± 0.02	0.45 ± 0.04
CSE (%)	81 ± 5	83 ± 2	82 ± 2	75 ± 9	80 ± 4
$t_{\text{acetato}}$ (h):	NA	5.6 ± 0.5	7.4 ± 0.4	5.3 ± 1.4	7.1 ± 0.2
$t_{\text{productivo}}$ (h):	NA	8.6 ± 0.5	9.4 ± 0.4	7.3 ± 0.8	9.1 ± 0.2
$t_{\text{viable}}$ (h):	NA	8.6 ± 1.5	11.4 ± 1.7	8.6 ± 0.4	11.1 ± 0.2

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la fase lote alimentado de los cultivos en biorreactor de *E. coli* DH5 $\alpha$  pHN. Tiempo que transcurre a partir de que el cultivo alcanza los 42 °C en acumular acetato ( $t_{\text{acetato}}$ ), alcanzar el mayor rendimiento  $Y_{px}$  ( $t_{\text{productivo}}$ ) y en acumular glucosa ( $t_{\text{viable}}$ ). No aplica (NA). Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 2 datos experimentales, que para X y P, se tomaron al tiempo de la acumulación de glucosa en el medio; para  $Y_{px}$ , del promedio de las últimas 4 horas antes de declinar, y para el CSE, al tiempo antes de declinar  $Y_{px}$ .

La fase lote de todos los cultivos en biorreactor de este trabajo presentó prácticamente el mismo comportamiento (Tabla 6.1). Esta se desarrolló a una tasa de crecimiento de  $0.19 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$  y con un rendimiento  $Y_{xs}$  de  $0.32 \pm 0.03 \text{ g/g}$ . La glucosa fue consumida en su totalidad a una  $q_s$  de  $0.60 \pm 0.07 \text{ g/g}$ .

El acetato se acumuló hasta alcanzar una concentración de  $1.19 \pm 0.40 \text{ g/L}$  con un rendimiento  $Y_{as}$  de  $0.13 \pm 0.05 \text{ g/g}$ . La concentración de ADNp y el rendimiento  $Y_{px}$  aumentaron durante esta fase y alcanzaron  $37.07 \pm 4.61 \text{ mg/L}$  y  $7.14 \pm 0.91 \text{ g/g}$ , respectivamente. Todas estas cantidades están expresadas en promedio  $\pm$  desviación estándar de 12 observaciones experimentales.

En la etapa de crecimiento limitado la tasa de crecimiento específica observada en los cultivos termo-inducidos fue de  $0.16 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  (Tabla 6.2). Las desviaciones positivas de  $\mu$  con respecto a  $\mu_{set}$  pudieron deberse a la sobre-estimación de la biomasa al inicio de la alimentación o de  $Y_{xs}$ , que fue de  $0.27 \text{ g/g}$  para  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ . El rendimiento  $Y_{xs}$  fue prácticamente el mismo en todas las condiciones de cambio de temperatura. Como se esperaba,  $Y_{xs}$  fue más bajo a  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  que a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tabla 6.2). Por el contrario, el rendimiento  $Y_{xNH_3}$  no tuvo diferencias importantes entre los cultivos a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  y los calentados (Tabla 6.2). Tasas de calentamiento por debajo de  $0.025 \text{ }^\circ\text{C/min}$  permitieron alcanzar una concentración de biomasa superior a los  $33 \text{ g/L}$  al momento que la concentración de ADNp comenzó a disminuir.

Cuando todos los cultivos alcanzaron los  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , alrededor de las 7 h (Tabla 6.2) comenzó a excretarse acetato en el medio y a incrementarse la conductividad del medio ( véase las “A” y “C”, Figuras 6.6-6.9). En las 2 horas posteriores el rendimiento  $Y_{px}$  comenzó a decaer. La glucosa empezó a acumularse 2 horas más tarde cuando la concentración de acetato fue superior a  $5 \text{ g/L}$ ; le sobrevino un incremento gradual en la TOD junto con la reducción en la capacitancia ( véase las “A”, “C” y “D”, Figuras 6.6-6.9). Esto sugiere que la tasa de calentamiento no evita los efectos inminentes que tienen lugar al aplicarse un cambio súbito y escalonado de temperatura a un cultivo.

Es importante resaltar que la excreción de acetato tuvo lugar cuando el rendimiento  $Y_{px}$  tenía su valor más alto. Esto pudo deberse a que la carga metabólica en ese punto rebasó los límites energéticos del hospedero, bajo una condición en la que se mantiene una elevada síntesis de proteínas de choque térmico y las vías de producción de energía más eficientes se encuentran reprimidas. En esas circunstancias la vía ACK-PTA es una fuente alternativa de generación de ATP que dirige en flujo de carbono a la excreción de acetato. La acumulación de glucosa, acompañada por el incremento de TOD y la reducción de capacitancia no indicaron más que el declive de la viabilidad celular. Esto se debió principalmente a que el acetato en el medio alcanzó concentraciones inhibitorias del crecimiento (Luli y Strohl, 1990). Observaciones similares en la producción por termo-inducción de ADNp por la presencia de acetato fueron reportadas por Carnes y colaboradores (2011).

A pesar de los diferentes comportamientos del CSE observados en los cultivos, el CSE al término del periodo estable de  $Y_{px}$  no presentó diferencias importantes con la tasa de calentamiento (Tabla 6.2), y fue de  $80 \pm 6\%$ , muy cercana al requerimiento regulatorio de la FDA.

La concentración de ADNp aparentemente muestra una tendencia a incrementarse a tasas de calentamiento por debajo de  $0.1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  (Figura 6.10 A), que por la magnitud del error experimental en  $q = 0.05 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , no permite hacer una clara distinción. Este parámetro es sensible a pequeñas diferencias en la concentración de biomasa inicial, ya que se magnifican a lo largo del tiempo e inciden directamente en el tiempo de inducción. Para homogeneizar e incrementar el rendimiento volumétrico de ADNp, el inicio de la inducción tiene que especificarse en función de una concentración celular dada y que sea lo más alta posible.

El rendimiento  $Y_{px}$  aumentó con la tasa de calentamiento y alcanzó su valor más alto que fue de  $9.29 \pm 0.59 \text{ mg/g}$  en  $q = 0.05 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Incrementos adicionales en la tasa de calentamiento no produjeron cambios importantes en  $Y_{px}$  (Figura 6.10 B).

Al igual que  $Y_{px}$ , la productividad  $Q_p$  también aumentó con la tasa de calentamiento y alcanzó su valor máximo en tasas de calentamiento entre 0.05 y 0.01 °C/min, que fue de  $0.56 \pm 0.06$  mg/g (Figura 6.10 C).

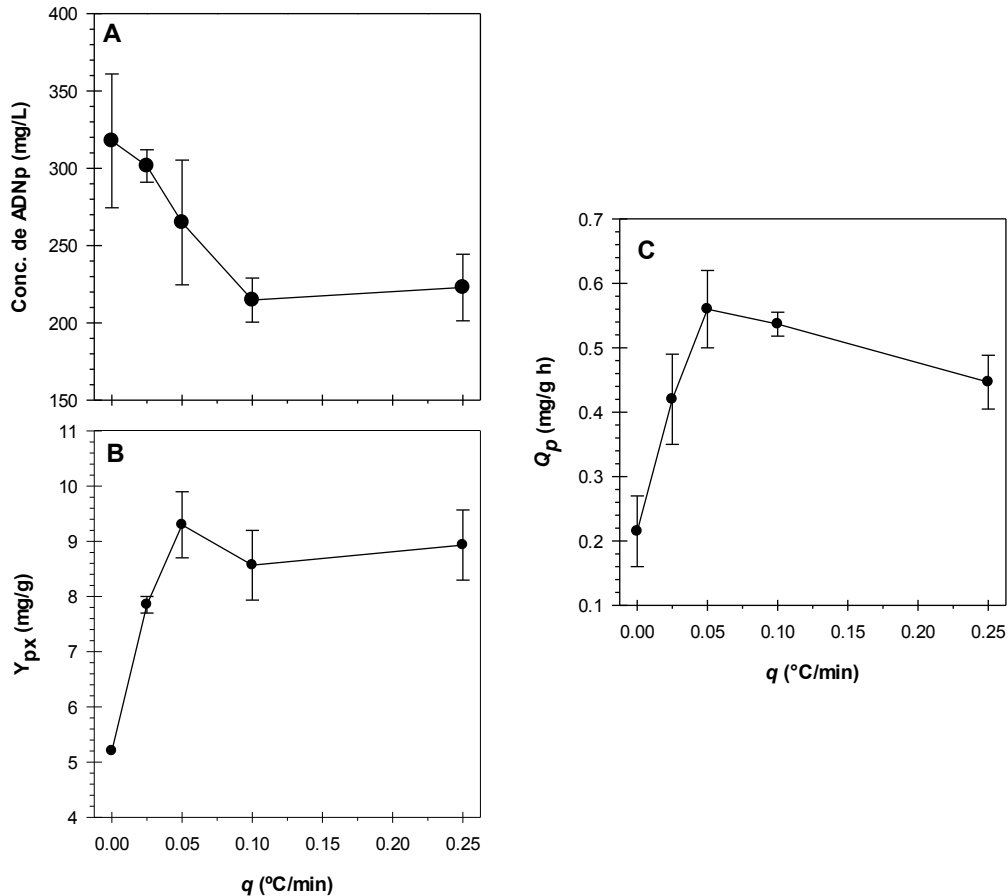


Figura 6.10. Efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción de ADNp. (A) Concentración de ADNp, (B)  $Y_{px}$  y (C)  $Q_p$ . Los datos puntuales representan el promedio de al menos 2 experimentos independientes; para la concentración de ADNp, los datos se tomaron al tiempo que inició la acumulación de glucosa;  $Y_{px}$  se tomó del promedio de las últimas 4 horas antes de declinar y  $Q_p$  es la productividad comprendida entre el inicio de la alimentación y el inicio de la acumulación de glucosa.

### 6.2.3. Conclusiones parciales

Aunque la tasa de calentamiento no demostró demorar la excreción de metabolitos de desecho como acetato ni prolongar la viabilidad del cultivo, sí incrementó el rendimiento y la productividad específica de ADNp en el proceso de producción por termo-inducción con incremento lineal de temperatura de 35 a 42 °C en tasas entre 0.025 y 0.10 °C/min, sin aparente repercusión en el CSE en los periodos de mayor rendimiento específico de ADNp, que se mantuvo alrededor del 80%.

### 6.3. Utilidad del sensor de impedancia por radiofrecuencia

El cambio en la capacitancia en los cultivos es directamente proporcional a la concentración celular viable (Sección 1.5). Por otro lado, la conductividad del medio es directamente proporcional a la concentración de especies iónicas. Sin embargo, la conductividad es ligeramente reducida por las burbujas de aire (Hoffmann *et al.*, 2000). A partir de los datos de capacitancia y de conductividad adquiridos en línea, se propusieron y validaron modelos simples y parámetros para la estimación de la concentración de biomasa y acetato. Adicionalmente se estimaron la tasa de crecimiento específico y el rendimiento  $Y_{xs}$  al integrar el cómputo del volumen total del reactor y el volumen adicionado de solución de alimento instantaneos. Contar con toda esta información en tiempo real a partir de un sensor brinda la posibilidad de tomar decisiones con mayor oportunidad sin incrementar los esfuerzos de análisis fuera de línea o de otros recursos de análisis en línea.

#### 6.3.1. Modelo y parámetros para la estimación de concentración de biomasa

Los datos de capacitancia y concentración de biomasa durante las etapas de crecimiento no limitado y limitado a 35 °C y 42 °C generados en todos los cultivos, fueron organizados y correlacionados mediante regresión lineal (Figura 6.11).

El factor de correlación obtenido a partir de 46 pares de datos de la fase lote de los cultivos en la que está presente la excreción de acetato, fue de  $0.38 \pm 0.02$  pF L cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> con una  $r^2$  de 0.81 (Figura 6.11 A). Luego, para la fase lote alimentado o de crecimiento limitado a 35 °C sin excreción de acetato, el factor de correlación obtenido a partir de 15 pares de datos fue de  $0.26 \pm 0.01$  pF L cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> con una  $r^2$  de 0.98 (Figura 6.11 B).

Por último, en la etapa de crecimiento limitado a 42 °C sin excreción de acetato, el factor de correlación obtenido a partir de 43 pares de datos fue de  $0.29 \pm 0.01$  pF L cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> con una  $r^2$  de 0.89 (Figura 6.11 C).



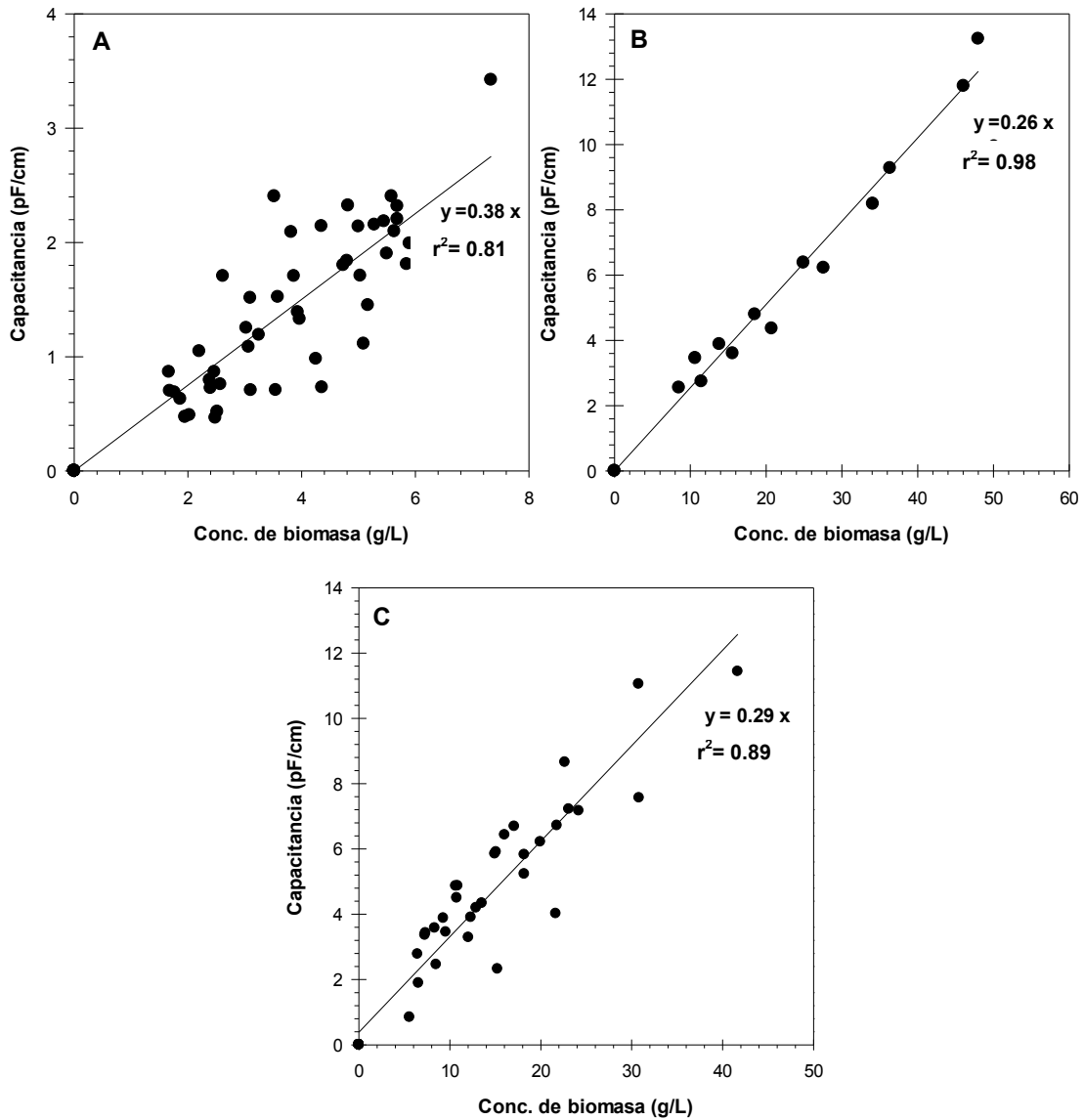


Figura 6.11. Correlación entre capacitancia y concentración de biomasa durante (A) crecimiento no limitado a 35 °C; (B) crecimiento limitado a 35 °C y (C) durante crecimiento no limitado a 42 °C.

Es interesante notar que a pesar de las diferentes temperaturas de cultivo durante el crecimiento limitado, no se tuvo una diferencia importante en los factores de correlación. Sin embargo, sí se presentó una diferencia importante en el factor de correlación en crecimiento limitado y no limitado a 35 °C, siendo en este último mayor posiblemente por la excreción de acetato.

En la sección 6.2.1 se señaló la desviación de la tendencia de los datos de capacitancia cuando comenzó a acumularse acetato en el medio. Aunque no existe relación física entre

el acetato y la capacitancia, su excreción refleja un cambio en el estado fisiológico de la célula. Bajo estas circunstancias, se sugiere que el grado de polarización de la bacteria está indirectamente asociado a la concentración de acetato (Markx y Davey, 1999).

Para incorporar el efecto de la concentración de acetato en la capacitancia, se propuso un modelo lineal de la concentración de biomasa y acetato (Ecuación 6.1). Los factores de correlación se obtuvieron mediante regresión lineal múltiple de  $\Delta\varepsilon$ ,  $X$  y  $A$  a 35 y 42 °C (Tabla 6.3).

$$\Delta\varepsilon = b^{-1}X + c^{-1}A \quad (6.1)$$

Temperatura	$b^{-1}$	$c^{-1}$	$r^2_{aj}$
35 °C	0.27 ± 0.01	2.41 ± 0.39	0.99
42 °C	0.30 ± 0.03	1.11 ± 0.18	0.91

Tabla 6.3. Factores de correlación de capacitancia y concentración de biomasa (a) y capacitancia y concentración de acetato (b) a diferentes temperaturas de cultivo. Estos factores fueron estadísticamente significativos. El valor de cada factor se reporta ± error estándar del ajuste.

Como se aprecia en la Tabla 6.3, la concentración de acetato parece contribuir a la capacitancia aunque los valores de  $c^{-1}$  presentan mayor error que los de  $b^{-1}$  y el coeficiente de determinación no fue distinto al obtenido en las regresiones lineales simples.

Los modelos y parámetros que se proponen para estimar la concentración de biomasa considerando la temperatura y el modo de cultivo a partir de los factores determinados en los análisis de regresión simple y múltiple se presentan en la Tabla 6.4:

$$\hat{X}_i = a \cdot \Delta\varepsilon_i \quad (6.2) \quad \text{Fase lote}$$

$$\hat{X}_i = b \cdot (\Delta C_i - c \cdot \hat{A}_i) \quad (6.3) \quad \text{Fase lote alimentado}$$

Parámetro	Unidades	35 °C	42 °C
$a$	g cm pF <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	2.63 ± 0.15	N/A
$b$	g cm pF <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	3.70 ± 0.13	3.33 ± 0.37
$c$	pF L g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	2.41 ± 0.40	1.11 ± 0.18

Tabla 6.4. Parámetros para la estimación de la concentración de biomasa de los modelos de las ecuaciones 6.2 y 6.3.

### 6.3.2. Modelo y parámetros para la estimación de concentración de acetato

#### *Efecto de la concentración de acetato sobre la capacitancia y la conductividad*

El primer paso consistió en verificar el efecto de la concentración de acetato sobre la conductividad y la capacitancia en soluciones de medio mineral con diferentes concentraciones de acetato a pH 7.2 (Figura 6.12).

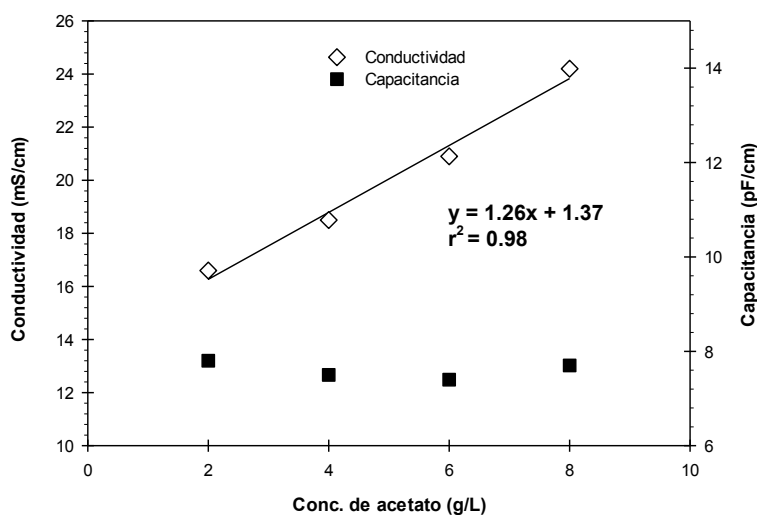


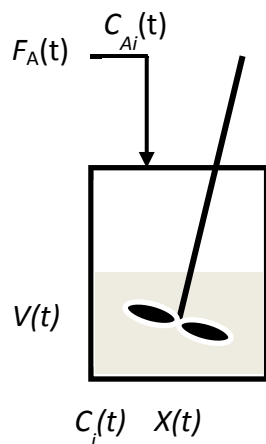
Figura 6.12. Efecto de la concentración de acetato sobre la conductividad y la capacitancia de medio mineral 0.5x a 27 °C y pH 7.2.

Como puede observarse en la Figura 6.12 la capacitancia no presentó cambios importantes con la concentración de acetato. Por otro lado, la conductividad aumentó con el incremento en la concentración de acetato de manera lineal. El cambio en la conductividad con respecto a la concentración de acetato está dada por la pendiente de la recta ajustada a los datos presentados que fue de  $1.26 \text{ mS L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Como la conductividad se incrementa con la temperatura a razón de  $2\% / ^\circ\text{C}$  (Vanýsek, 2006), dicho factor tendrá un valor aproximado de  $1.37 \text{ mS L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $35^\circ\text{C}$  y de  $2.22 \text{ mS L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $42^\circ\text{C}$ .

### **Modelo del cambio de la conductividad del medio a lo largo del tiempo de cultivo**

Todas las especies iónicas contribuyen a la conductividad específica del medio. Dado que los componentes del medio mineral son sustratos para el crecimiento celular, su consumo puede seguirse a través de la conductividad. También es posible identificar la presencia de subproductos del metabolismo de *E. coli* como acetato.

Para entender el cambio en la conductividad por el consumo de sustratos iónicos en el medio, se realizó un balance de masa de estas especies en el biorreactor (Figura 6.13). Para ello se consideró: (1) la solución de alimentación tiene la misma composición de sales minerales que el medio de cultivo inicialmente, (2) el cambio de volumen del reactor y (3) el consumo específico de cada especie iónica.



$$\frac{d(C_i V)}{dt} = F_A C_{A_i} - q_i X V \quad (6.4)$$

Desarrollando la derivada:

$$C_i \frac{dV}{dt} + V \frac{dC_i}{dt} = F_A C_{A_i} - q_i X V \quad (6.5)$$

Teniendo en cuenta que  $\frac{dV}{dt} = F_A$ :

$$C_i F_A + V \frac{dC_i}{dt} = F_A C_{A_i} - q_i X V \quad (6.6)$$

Figura 6.13. Variables importantes para el balance de masa de especies iónicas en el biorreactor.

Poniendo la ecuación diferencial en su forma estándar y reacomodando los términos:

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{F_A}{V} (C_{A_i} - C_i) - q_i X \quad (6.7)$$

Considerando la conductividad específica molar de cada especie iónica:

$$\Lambda_i \left( \frac{dC_i}{dt} = \frac{F_A}{V} (C_{A_i} - C_i) - q_i X \right) \quad (6.8)$$

Incorporando todos los componentes del medio:

$$\sum \frac{dk_i}{dt} = \frac{F_A}{V} \sum (k_{io} - k_i) - \sum q_i K_i X \quad (6.9)$$

Como  $X = X_o e^{\mu t}$ , asumiendo los términos de consumo específico de especies iónicas como constantes y reuniendo la contribución de todos ellos en el término “ $\psi$ ” junto con otros términos constantes, se obtiene:

$$\frac{dk}{dt} = \frac{F_A}{V} (k_o - k) - \Psi e^{\mu t} \quad (6.10)$$

De acuerdo con la ecuación 6.10, la conductividad del medio disminuye por los términos de dilución y consumo, pero la adición de sales atenuará dicha disminución conforme la conductividad del medio y el consumo de sales se reduzcan.

Al incorporar el término de excreción de acetato se obtiene la ecuación 6.11. Esta expresión sólo es válida durante la fase de crecimiento no limitado, donde  $F_A(t)=0$ . En esa etapa, la conductividad no presentó cambios importantes como se indicó en la sección anterior.

$$\frac{dk}{dt} = (q_a - \Psi) e^{\mu t} \approx 0 \quad (6.11)$$

Durante la etapa de crecimiento limitado, la excreción de acetato incrementará la conductividad del medio. De acuerdo con Hoffmann y colaboradores (2000), la conductividad presenta una tendencia lineal en ausencia de acetato; las desviaciones positivas de dicha tendencia son proporcionales a la concentración de acetato en el medio.

En la Figura 6.14 se verificó esta tendencia en algunos de los cultivos para la producción de ADNp. Al extrapolar dicha tendencia a lo largo de todo el cultivo, se observa que las regiones que presentan desviaciones de la tendencia lineal coinciden con la presencia de acetato.

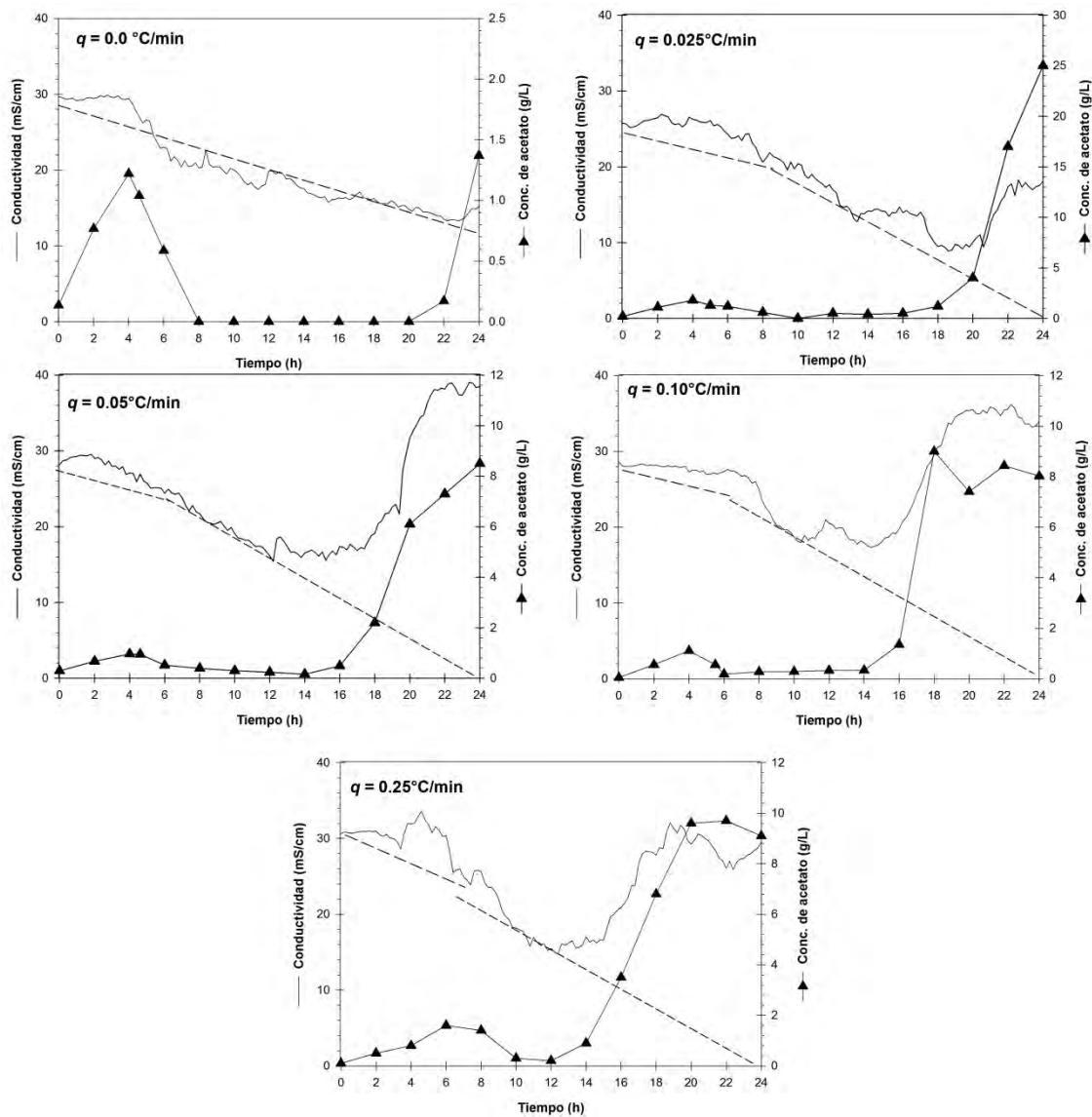


Figura 6.14. Cambio de la conductividad con el tiempo de cultivo a diferentes tasas de calentamiento. Las líneas discontinuas representan la extrapolación de la tendencia lineal de la conductividad con el tiempo que se observa en ausencia de acetato. Desviaciones positivas en la conductividad de esta tendencia se asocian con la presencia de acetato en el medio.

Para todos los cultivos se determinó la pendiente de las líneas rectas ajustadas a los datos de conductividad y tiempo en ausencia de acetato, que fueron de  $0.73 \pm 0.28$  y  $1.80 \pm 0.41$   $\text{mS cm}^{-1} \text{h}^{-1}$ , respectivamente.

A partir de estos datos, el modelo y parámetros propuestos para la estimación de la concentración de acetato que consideran el efecto de la concentración de acetato y la temperatura sobre la conductividad, se presentan en la ecuación 6.12 y la Tabla 6.5.

Concentración de acetato

$$\hat{A}_i = \delta \cdot \Delta\kappa \quad (6.12)$$

$$\Delta\kappa = \kappa_i - \hat{\kappa}_i; \Delta\kappa \geq 0 \quad (6.13)$$

$$\hat{\kappa}_i = -\frac{d\kappa}{dt} \cdot t_i + k_o \quad (6.14)$$

Parámetro	Unidades	35 °C	42 °C
$\delta$	g cm pS <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	2.63 ± 0.15	N/A
$dk/dt$	mS cm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.70 ± 0.13	3.33 ± 0.37
$k_o$	mS g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	2.41 ± 0.40	1.11 ± 0.18

Tabla 6.5. Parámetros para la estimación de la concentración de acetato de los modelos de las ecuaciones 6.12 a 6.14.

### 6.3.3. Aplicación de estimadores

Los modelos y parámetros propuestos inicialmente para la estimación de la concentración de biomasa y de acetato, desarrollados a partir del análisis de una pequeña fracción de los datos crudos de conductividad y de capacitancia de los cultivos de este trabajo, fueron aplicados a todos los datos de conductividad y capacitancia de los mismos cultivos. En este proceso, se modificaron algunos parámetros para mejorar la estimación con la ayuda de una macro programada en Excel (Apéndice B4). Los datos de conductividad y de capacitancia fueron tratados por medio de un algoritmo de suavización por regresión lineal local previamente a la aplicación de los estimadores. En las Figuras 6.15 y 6.16 se comparan la concentración de biomasa experimental con la estimada. En las Figuras 6.17 y 6.18 se comparan la concentración de acetato experimental con la estimada.

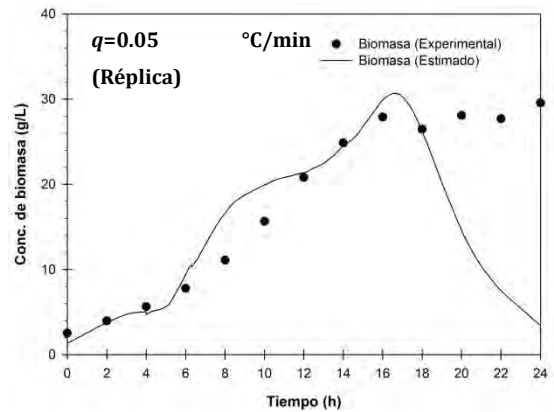
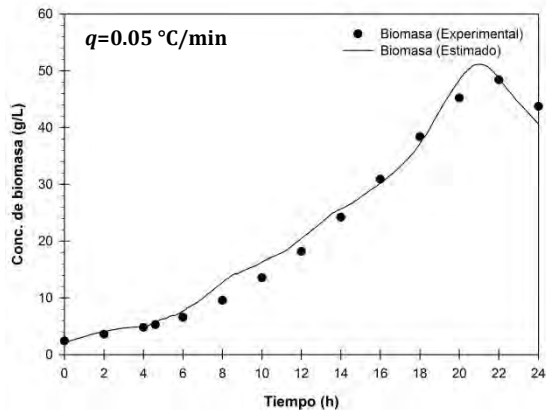
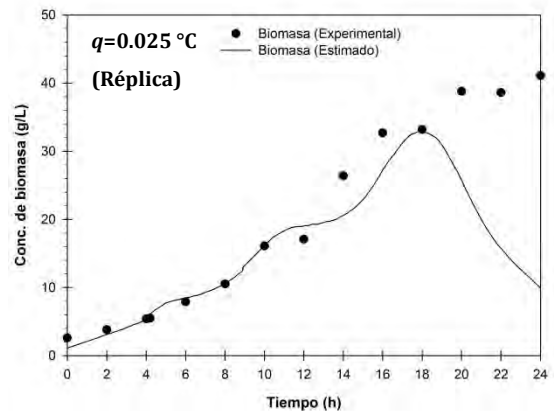
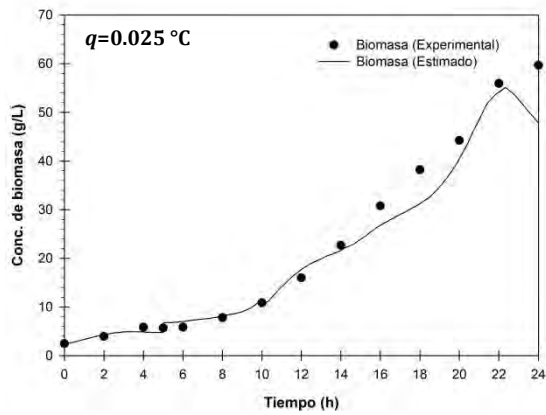
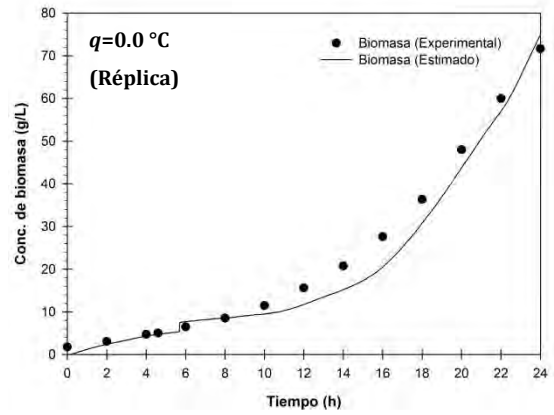
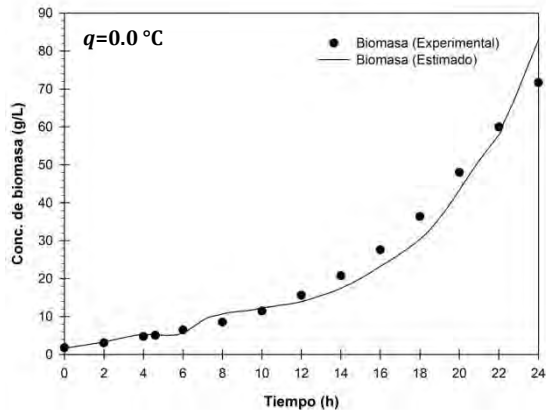


Figura 6.15. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .



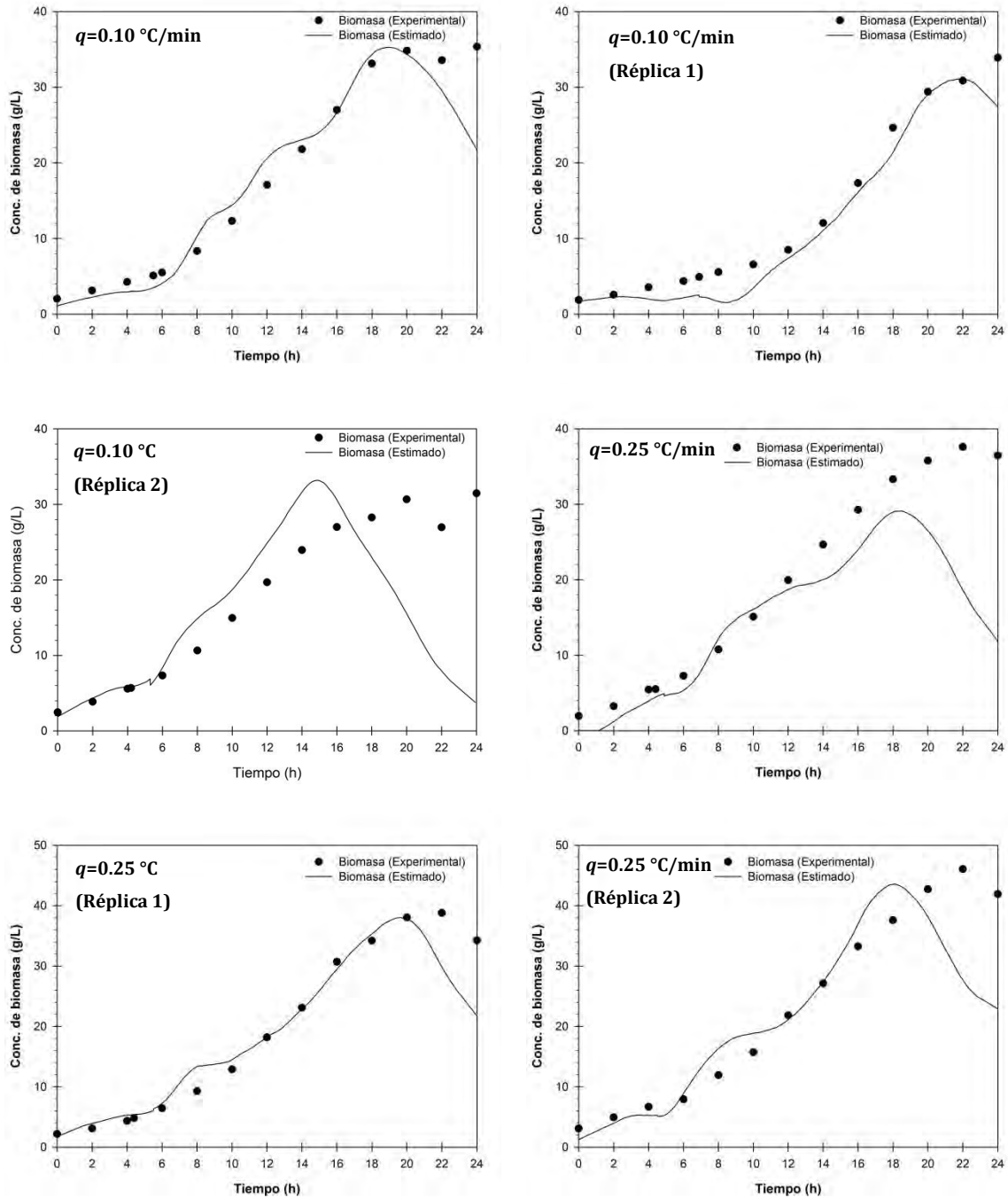


Figura 6.16. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25  $^{\circ}\text{C/min}$ .

La estimación de la concentración de biomasa cubrió satisfactoriamente la mayor parte de los puntos experimentales como puede observarse en las Figuras 6.15 y 6.16. En los cultivos calentados se aprecia una pronunciada disminución en la concentración de biomasa estimada, a partir de que la concentración de biomasa experimental dejó de cambiar de manera importante. Esto puede significar dos cosas: (1) que la concentración de células no viables aumentó y (2) que una gran parte de ellas se mantuvieron estructuralmente íntegras. En la mayoría de los cultivos calentados, entre las 6 y 14 h se observa que la concentración de biomasa estimada es mayor que la experimental, pero después ya no mostraron diferencias importantes. Esto puede constituir un patrón característico de los cultivos con incremento de temperatura y sugiere cambios en la composición de la membrana y/o pared celular (Marckx y Davey, 1999). Las diferencias positivas entre la concentración de biomasa en peso seco experimental y estimada pueden aprovecharse como un método de estimación de viabilidad alternativo al de cultivos selectivos en placa.

En cuanto a la estimación de la concentración de acetato, en las Figuras 6.17 y 6.18 se puede observar que cubrió gran parte de los puntos experimentales. Sin embargo, no alcanzó a estimar la concentración de acetato residual en las primeras horas de la etapa de alimentación. El seguimiento de la concentración de acetato desde la fase lote es muy útil ya que permite determinar el momento en que finaliza la fase de crecimiento no limitado; todavía más si se opta por iniciar la alimentación cuando la concentración de acetato en el medio se ha agotado. De esta manera, puede considerarse como un buen indicador de esta etapa de cultivo. Durante la fase de crecimiento limitado, se identificó el momento en que comenzó a excretarse acetato en el medio. Esta información puede utilizarse para tomar decisiones como: reducir el flujo de solución de alimentación, disminuir la temperatura de cultivo o simplemente iniciar la cosecha. El método simple aplicado a los datos de conductividad permitió obtener estimados precisos de la concentración de acetato en los cultivos de este trabajo. En miras de aprovechar la capacidad dual del sensor IRF y consolidarla una herramienta PAT, es necesario verificar los estimadores propuestos con datos de fuentes externas.

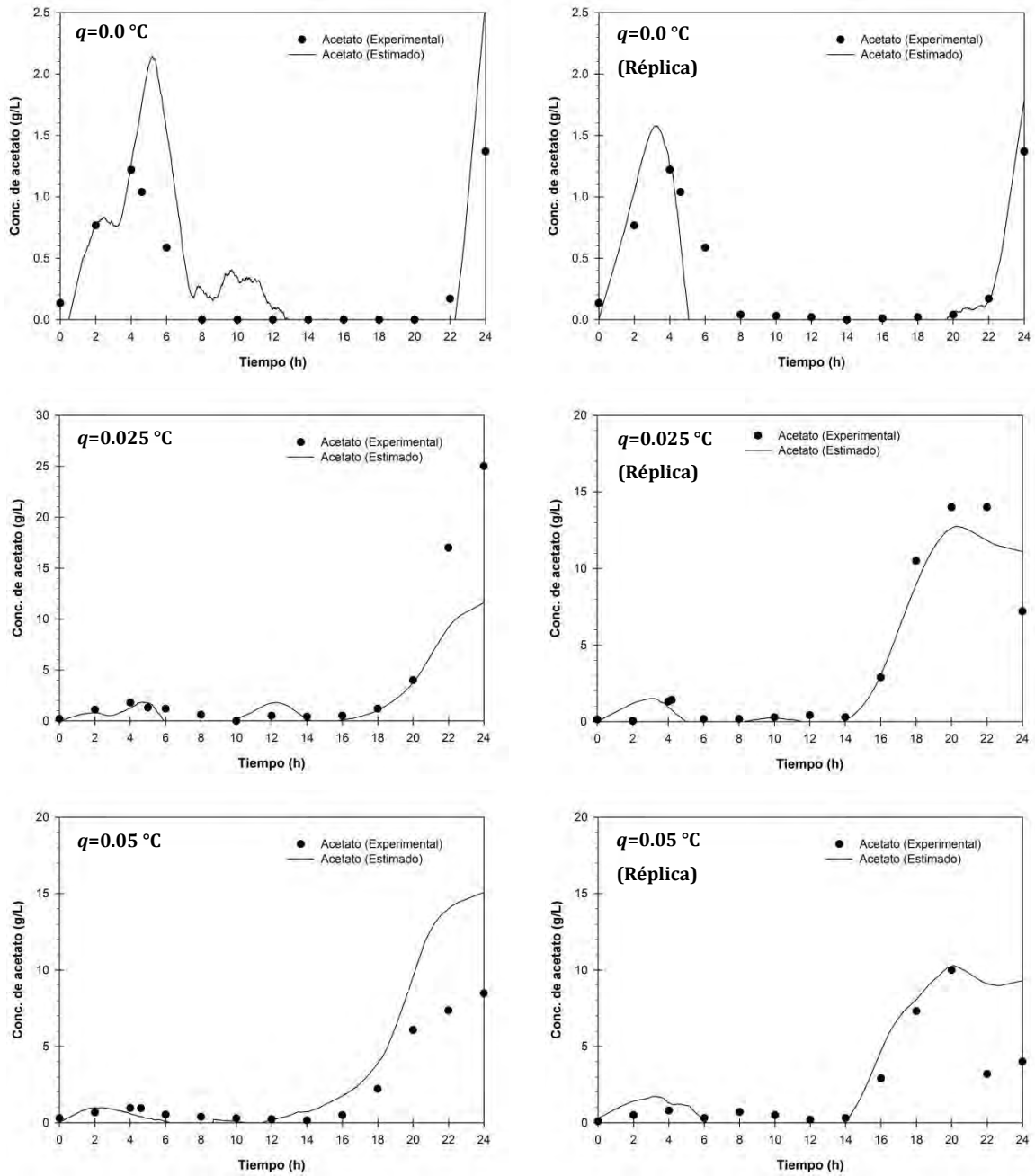


Figura 6.17. Comparación de la concentración de acetato estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05 °C/min.

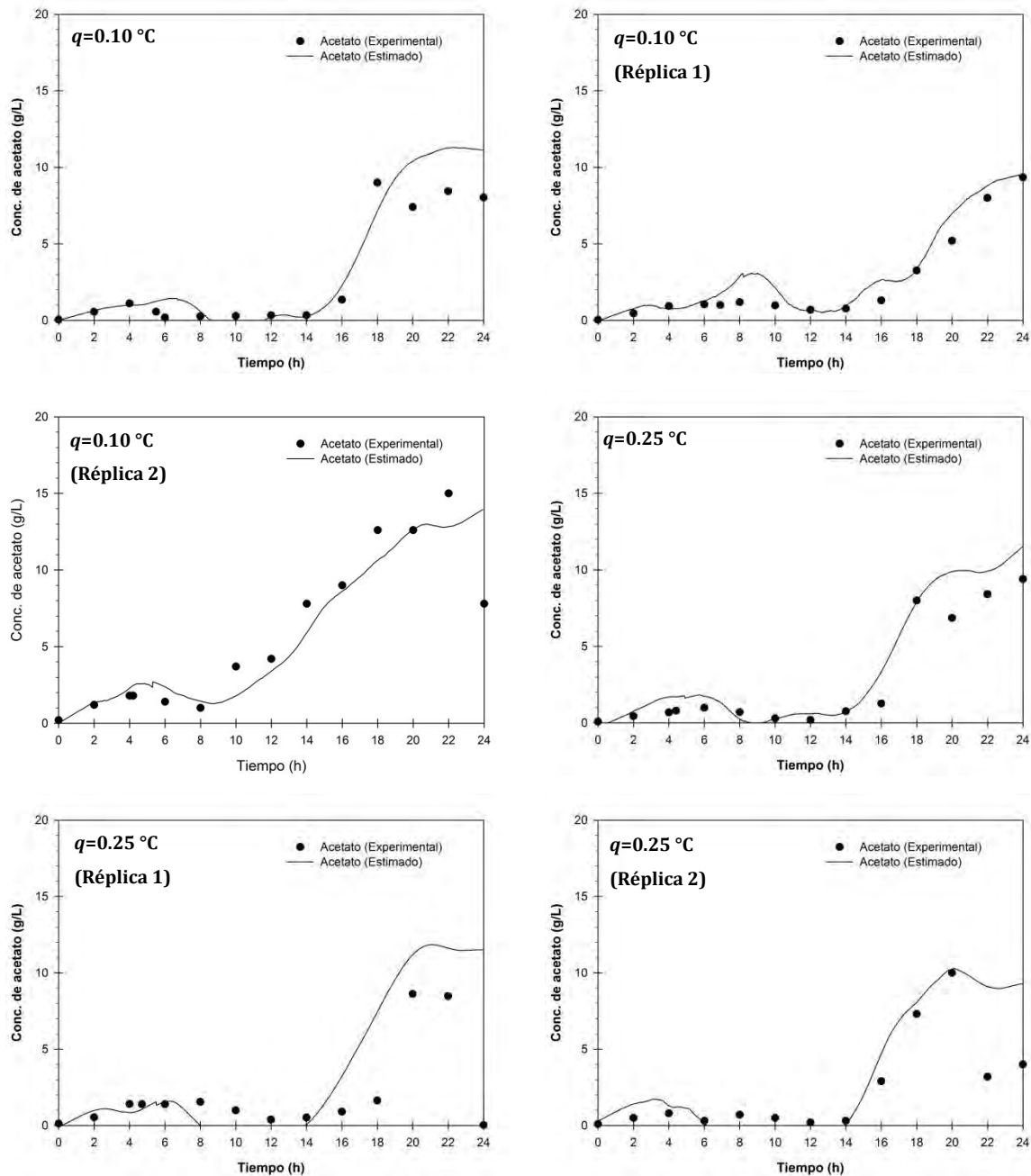


Figura 6.18. Comparación de la concentración de biomasa estimada a partir de la medición de capacitancia con la observada experimentalmente en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.

Los parámetros empleados en la estimación de la concentración de biomasa y de acetato de cada cultivo, se presentan en el apéndice A3. Los parámetros que se proponen después de verificar los iniciales (Tablas 6.4 y 6.5) se presentan en la Tabla 6.6. El único parámetro que cambió de manera importante fue el “*c*”. Este parámetro indica la contribución del

acetato en la capacitancia. Sin embargo, dicha contribución fue más débil de lo que se determinó en el análisis inicial.

Parámetro	Unidades	35 °C	42 °C
$a$	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$2.63 \pm 0.00$	$2.63 \pm 0.00$
$b$	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$3.7 \pm 0.0$	$3.39 \pm 0.14$
$c$	$\text{pF L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$0.4 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.0$
$\delta$	$\text{g cm mS}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$0.65 \pm 0.00$	$0.45 \pm 0.00$
$dk/dt$	$\text{mS cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0.71 \pm 0.07$	$1.1 \pm 0.2$
$k_o$	$\text{mS cm}^{-1}$	$30.1 \pm 2.9$	$31.3 \pm 2.9$

Tabla 6.6. Parámetros para la estimación de la concentración de biomasa y acetato. Los valores están indicados como el promedio  $\pm$  desviación estándar.

A partir de los estimados de la concentración de biomasa pueden estimarse parámetros cinéticos más representativos del estado fisiológico del cultivo como la tasa de crecimiento específico y el rendimiento biomasa en sustrato. Para ello, es preciso contar con los datos instantáneos de la cantidad de solución de alimento adicionado y del volumen del reactor a fin de considerar el efecto de dilución. En este trabajo, dichos datos fueron computados a partir del tiempo e intensidad de operación de las bombas peristálticas. La tasa de crecimiento específico se estimó a partir de la pendiente de la recta de la regresión lineal de los primeros 15 pares de datos de  $\ln x$  y  $t$ , y se comparó con la tasa de crecimiento específico calculada mediante la derivada de un polinomio de Lagrange de grado 2 de los datos de cantidad de biomasa experimental. Las tasas de crecimiento específico estimadas y experimentales de cada cultivo se comparan en las Figuras 6.19 y 6.20. Como puede observarse en estas figuras, la tasa de crecimiento estimada cubrió la mayor parte de los puntos experimentales. En algunos casos se sobreestimó la condición inicial, así como en periodos de distinta duración entre las 4 y 12 h de cultivo. Es interesante notar la reducción en la tasa de crecimiento a lo largo de la fase de crecimiento no limitado y como la tasa de crecimiento se mantuvo a un valor alrededor de  $0.15 \text{ h}^{-1}$  en los cultivos a  $35 \text{ °C}$ , pero de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  en los cultivos calentados. Luego, se observan reducciones en la tasa de crecimiento cuando se alcanzan concentraciones por arriba de  $5 \text{ g/L}$  de acetato en el medio (comparar con Figuras 6.17 y 6.18).

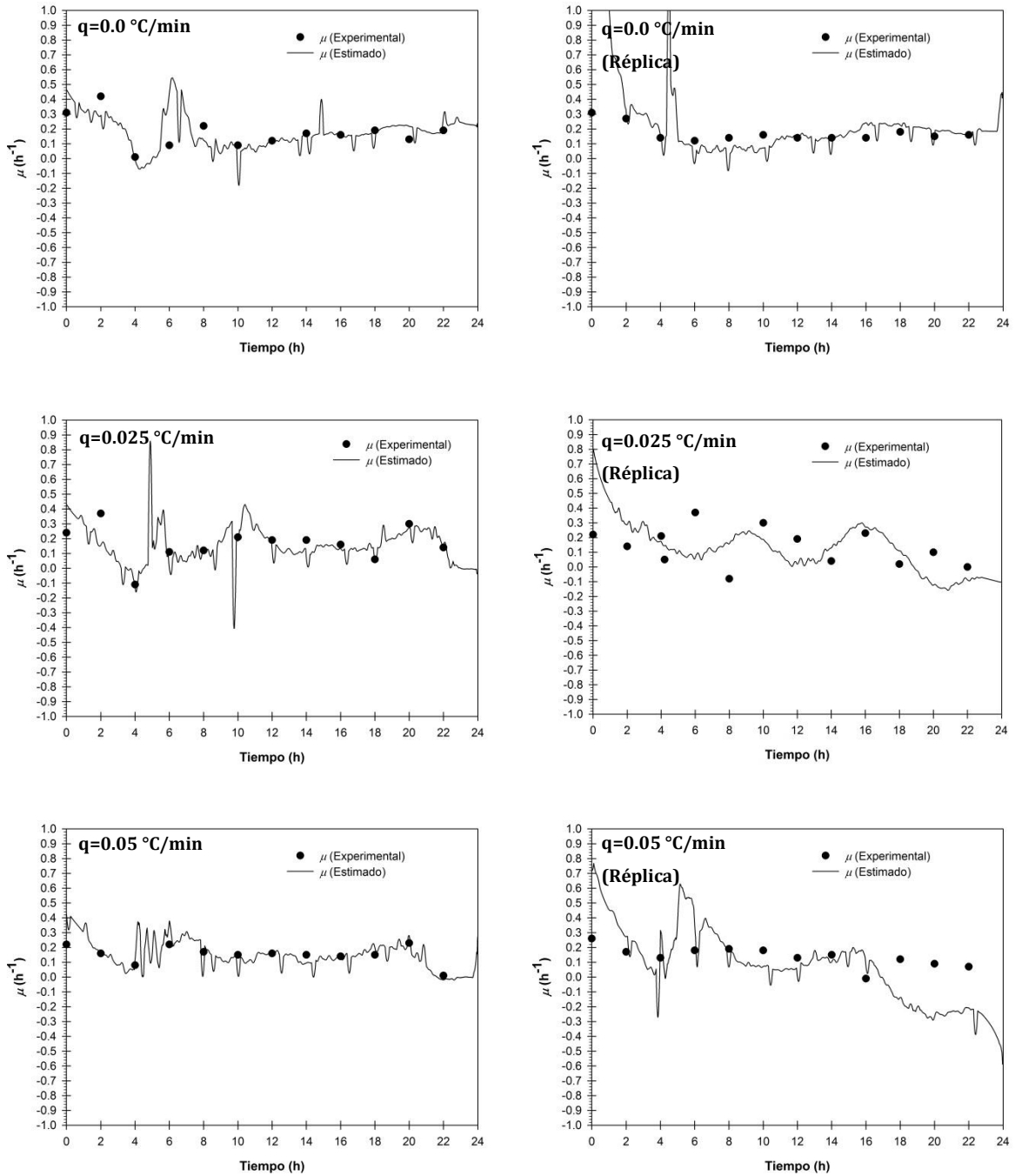


Figura 6.19. Comparación de  $\mu$  calculada a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente, en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

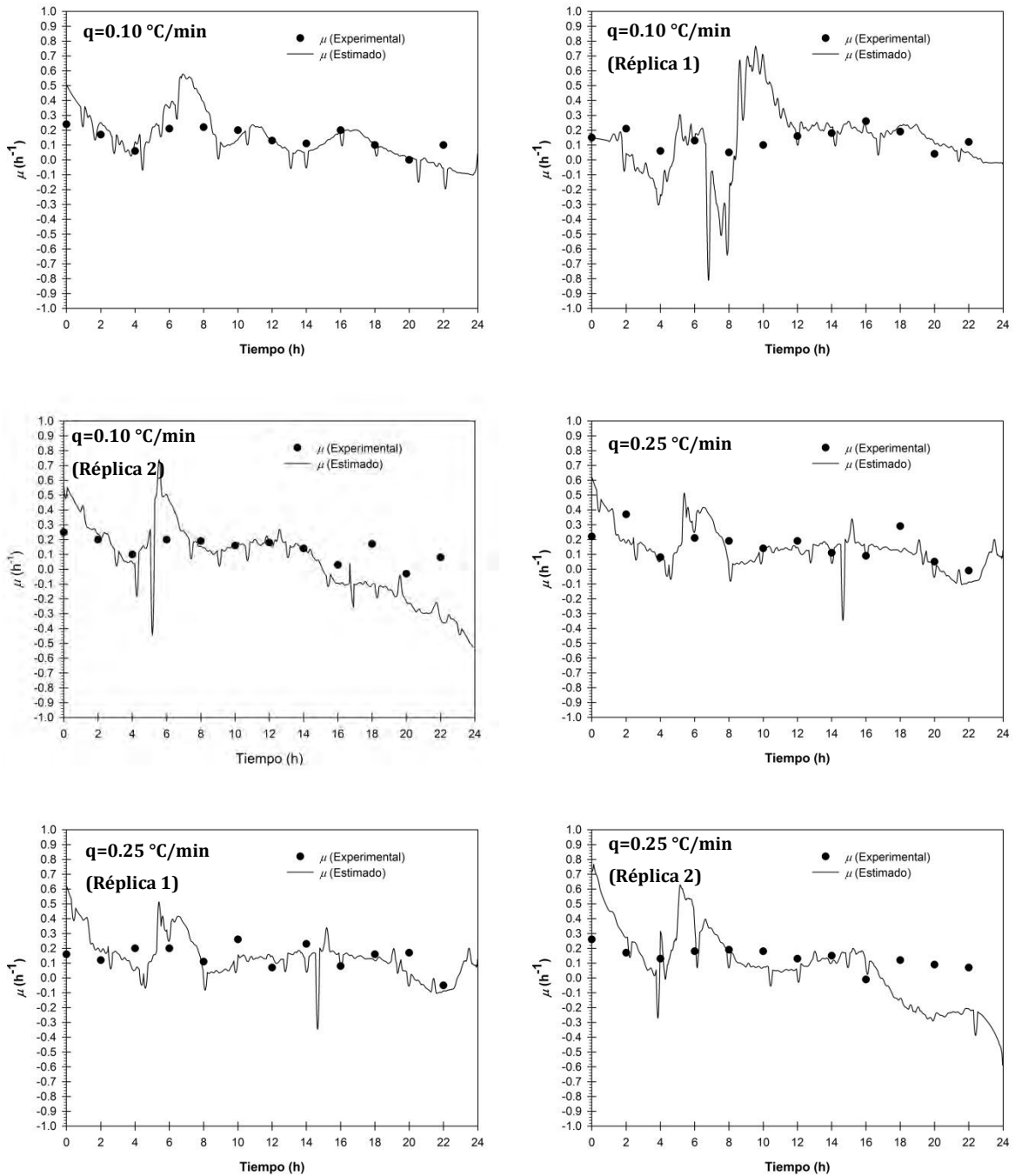


Figura 6.20. Comparación de  $\mu$  calculada a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente, en cultivos para producir ADNp por termo-inducción, a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25 °C/min.

El estimado de  $\mu$  tiene potencial como indicador adicional del fin de la fase de crecimiento no limitado y de ajuste del flujo de adición de solución de alimento, a fin de que el cultivo se mantenga en el valor de  $\mu_{set}$  durante la fase de crecimiento limitado y no sobrepase el valor de  $\mu_{crit}$  para evitar la excreción de acetato en el medio. Se puede observar que  $\mu$  durante la limitación del crecimiento en los cultivos con cambio de temperatura fue mayor a  $\mu_{set}$  y al calculado a partir de la regresión lineal de los datos de biomasa experimental y tiempo antes de declinar el crecimiento (Tabla 6.2), que se puede entender como una tasa de crecimiento aparente. Por otro lado, los picos pueden indicar perturbaciones en el estado fisiológico celular, que a juzgar por la frecuencia con que se presentan, posiblemente se debieron a la adición de antiespumante. Todo esto pone de manifiesto la importancia de contar con un estimado de la tasa de crecimiento durante el proceso de cultivo.

En cuanto al rendimiento  $Y_{xs}$  estimado, este se calculó a partir de la pendiente de la recta de la regresión lineal de los primeros 60 pares de datos de cantidad de biomasa y glucosa adicionada. Ambos rendimientos se comparan en las Figuras 6.21 y 6.22. Como puede observarse en dichas figuras, el rendimiento  $Y_{xs}$  experimental en los cultivos a 35 °C se mantuvo alrededor de 0.43 g/g. En los cultivos calentados, el rendimiento  $Y_{xs}$  experimental se mantuvo alrededor de 0.30 g/g por periodos de diferente duración y luego disminuyó paulatinamente. Sin embargo,  $Y_{xs}$  estimado tuvo poca cobertura sobre los puntos experimentales. Esto pudo deberse a la propagación del error en las numerosas operaciones implicadas en las estimaciones y a la desincronización en la adquisición de datos del sensor IRF y del reactor. A diferencia de la estimación de  $\mu$ , la estimación de  $Y_{xs}$  requiere la estimación de la cantidad de alimento a partir del cómputo de volumen adicionado por la bomba peristáltica, en el que se asume que el valor de calibración de flujo es constante.  $Y_{xs}$  es un mejor indicador del estado fisiológico del cultivo y más sensible que la tasa de crecimiento específico. La reducción en este parámetro puede reflejar la excreción de ácidos orgánicos o un incremento en la actividad respiratoria. Métodos directos adecuadamente sincronizados del seguimiento del consumo de alimento como el registro del cambio de peso del frasco de solución de alimento, pueden contribuir a mejorar su estimación.



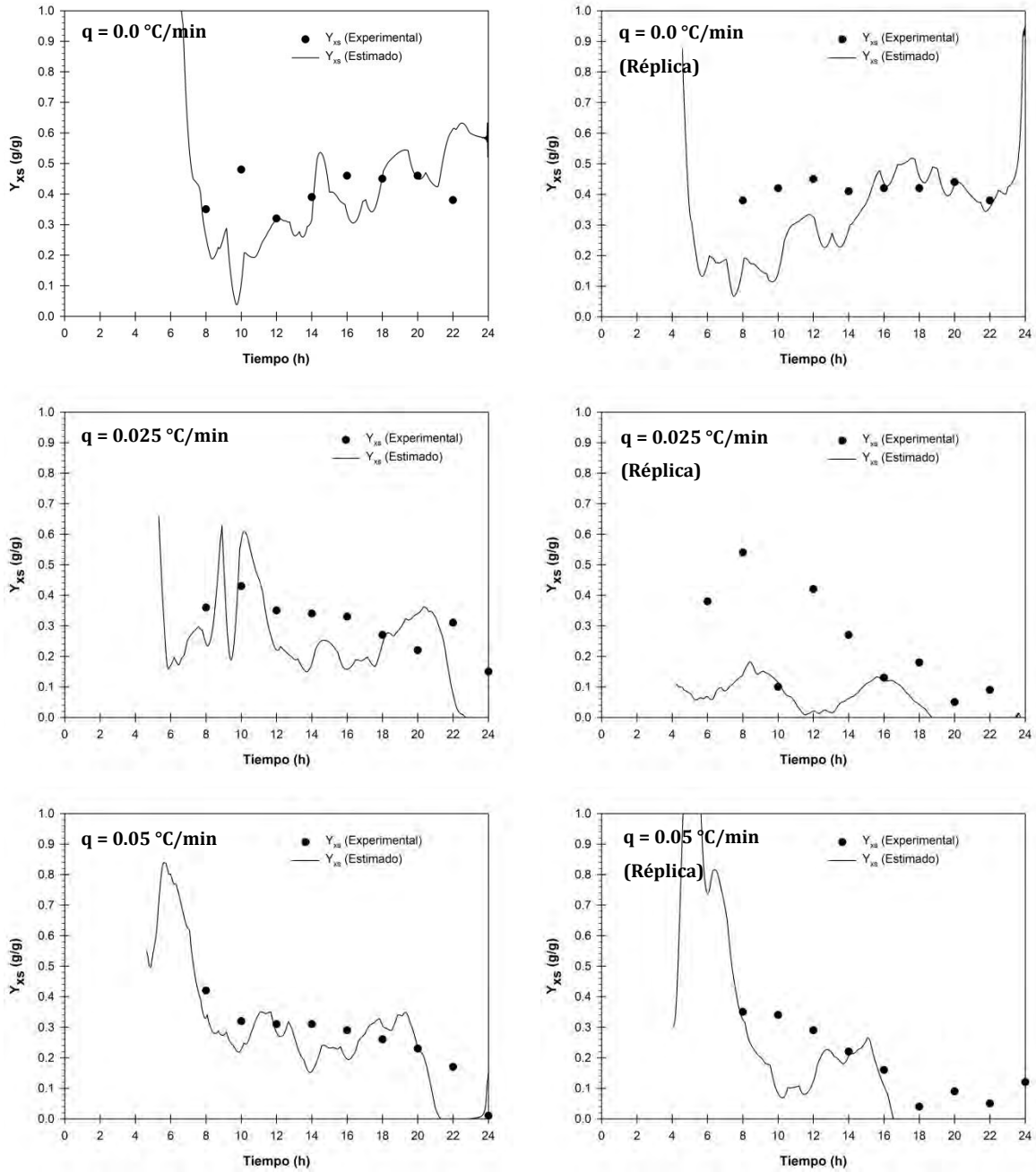


Figura 6.21. Comparación de  $Y_{xs}$  calculado a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente y  $V_A$ , en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0, 0.025 y 0.05  $^\circ\text{C}/\text{min}$ .

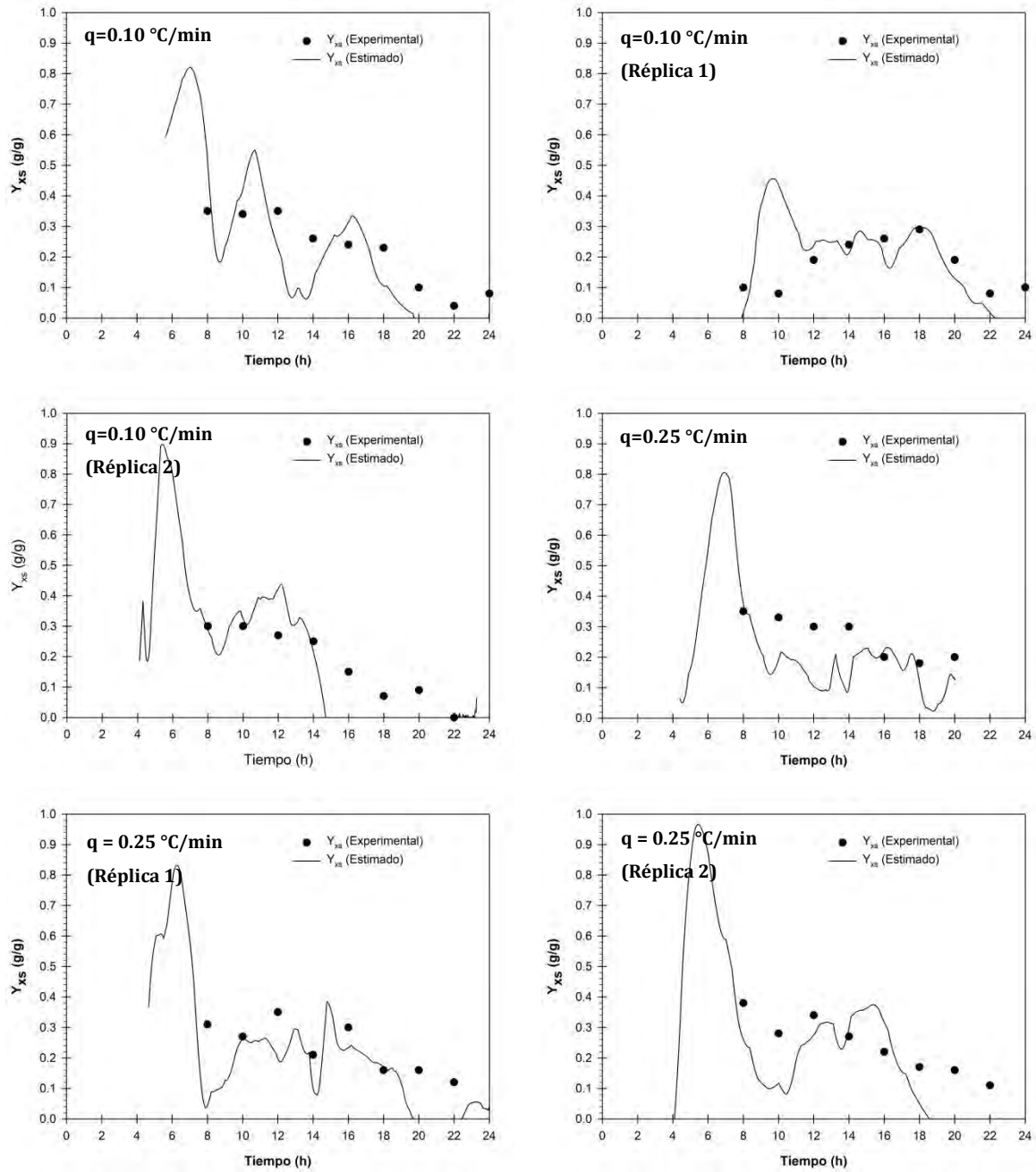


Figura 6.22. Comparación de  $Y_{xs}$  calculado a partir del peso de biomasa estimado con el observado experimentalmente y  $V_A$ , en cultivos para producir ADNp por termo-inducción a tasas de calentamiento de 0.10 y 0.25  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

#### **6.3.4. Conclusiones parciales**

Los datos de capacitancia y de conductividad adquiridos en línea a través del sensor IRF fueron tratados para eliminar el ruido de cada medición y analizados estadísticamente para verificar su correlación con la concentración de biomasa y de acetato, respectivamente. Con todo esto fue posible obtener modelos y parámetros de estimación sencillos de estas variables de proceso. Adicionalmente, a partir de los estimados de la concentración de biomasa, de los cálculos de la cantidad de alimento adicionado y del volumen total de reactor instantáneos, se obtuvieron estimados de la tasa de crecimiento específico y del rendimiento  $Y_{xs}$  que son indicadores más representativos del estado fisiológico del cultivo. Con excepción de la estimación de  $Y_{xs}$ , todas las cantidades estimadas fueron bastante precisas y posibilitan su aplicación para el seguimiento y control de bioprocesos.

A fin de ratificar el potencial predictivo de los estimadores propuestos, es necesaria su verificación previa en cultivos desvinculados de los empleados para su desarrollo, que fue esencialmente correlativo.

## 7. Conclusiones

El incremento de la temperatura de cultivo es una estrategia sencilla que permite incrementar el rendimiento específico de ADNp. La evaluación de los parámetros cinéticos y estequiométricos en función de la temperatura de cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  en la producción de un plásmido terapéutico con origen de replicación pUC, en el intervalo de 30 a 45 °C, corroboró la efectividad de esta estrategia y permitió establecer las mejores condiciones de producción de biomasa y ADNp superenrollado que fueron 35 y 42 °C respectivamente.

Considerando las condiciones que pueden prevalecer durante el calentamiento en reactores de escala industrial, se evaluó el efecto de la tasa de calentamiento sobre la producción termo-inducida de ADNp en cultivos de alta densidad celular de *E. coli* DH5 $\alpha$  a un nivel macroscópico. Tasas de calentamiento entre 0 y 0.10 °C/min fueron efectivas en incrementar el rendimiento específico y la productividad de ADNp. La tasa de calentamiento en la que se obtuvieron los valores más altos de rendimiento específico y productividad fue 0.05 °C/min. Sin embargo, no tuvo influencia en la acumulación de acetato y glucosa. Por otro lado, la tasa de calentamiento no influyó de manera importante en el contenido de isoformas superenrolladas, lo que puede significar un beneficio adicional de esta estrategia.

A partir de las mediciones de capacitancia y de conductividad del sensor de impedancia por radiofrecuencia de los cultivos de producción de ADNp y su relación directa con la concentración celular y de especies iónicas, se estableció una metodología de tratamiento y análisis de datos con la que se consiguió plantear modelos simples y parámetros que permitieron estimar con buena precisión, variables clave del proceso de fermentación como la concentración de biomasa y acetato, así como de la tasa de crecimiento específico. De esta forma, se tradujeron las mediciones de este sofisticado sensor en información funcional con potencial de aplicación en el control y seguimiento en línea de bioprocesos.

## 8. Perspectivas

La metodología seguida en este trabajo para definir y evaluar un proceso de termo-inducción constituye un ejemplo valioso de diseño racional de un bioproceso proyectado para su aplicación en gran escala. Hasta el momento, esta es la evaluación más completa del efecto de la tasa de calentamiento en un proceso de termo-inducción de ADNp de la que se tiene conocimiento.

A fin de incrementar la concentración celular en el proceso de producción termo-inducida de ADNp, se sugiere postergar la inducción térmica hasta alcanzar concentraciones de biomasa entre 20 y 30 g/L. Dada la posibilidad de agotar los recursos de oxigenación típicos de un reactor estándar en condiciones de alta densidad celular a 42 °C y el fuerte impacto que tiene la limitación de dicho sustrato en la producción de ADNp, puede implementarse una estrategia de presurización.

Resultaría importante verificar la efectividad del proceso de termo-inducción de ADNp incorporando un esquema de alimentación lineal empleando el medio PD suplementado con aminoácidos clave de la síntesis de ácidos nucleicos. Estudiar el efecto de cambios de temperatura oscilatorios sobre la producción de ADNp podría ayudar a entender el impacto del tiempo de circulación en el proceso de termo-inducción.

En cuanto al sensor de impedancia por radiofrecuencia, es necesaria la verificación de los estimadores mediante su aplicación en cultivos ajenos a este trabajo. Por otro lado, la aplicación de los estimadores de concentración de biomasa, acetato, tasa de crecimiento específico y rendimiento  $Y_{xs}$  en tiempo real en el proceso de termo-inducción de ADNp constataría su gran utilidad. El sistema de control deberá activar la bomba de adición de alimento, ajustar el flujo de alimentación para mantener la tasa de crecimiento especificada o reducirlo cuando comience a excretarse acetato en el medio hasta el punto en que el crecimiento haya cesado, sin permitir en ningún momento la acumulación de acetato o glucosa en el medio. Esta plataforma puede programarse en un paquete de cómputo especializado en adquisición de datos y control como Matlab.

## Referencias

Adamcík J, Víglaský V, Valle F, Antalík M, Podhradský D, Dietler G. 2002. Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability. *Electrophoresis* 23(19):3300-3309.

Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 55(1-3):3-9.

Avison MB, Horton RE, Walsh TR, Bennett PM. 2001. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem* 276(29):26955-26961.

Bachmann BJ. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *FEMS Microbiol Rev* 54(2):130-197.

Balke VL, Gralla JD. 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169(10):4499-506.

Barsoukov E, Macdonald JR. 2005. Impedance spectroscopy : theory, experiment, and applications. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.

Birnboim HC. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-255.

Bolívar F. 2011. Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. Mexico DF: Academia Mexicana de Ciencias.

Borja GM. 2011. Ingeniería celular para incrementar la producción de ADN plasmídico por una cepa de *Escherichia coli* con un sistema alternativo de transporte de glucosa. Cuernavaca, Morelos, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría.

Borja GM, Mora EM, Barron B, Gosset G, Ramirez OT, Lara AR. 2012. Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb Cell Fact* 11:132.

Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. 2006. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem* 45(3):155-166.

Carnes AE, Williams JA. 2007. Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Pat Biotechnol* 1(2):151-166.

Carnes AE, Luke JM, Vincent JM, Schukar A, Anderson S, Hodgson CP, Williams JA. 2011. Plasmid DNA fermentation strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression. *Biotechnol Bioeng* 108(2):354-363.

Carnes AE, Williams JA; 2011. Process for plasmid DNA fermentation. US Patent 7943377.

Casali N. 2003. *Escherichia coli* host strains In: *E. coli* Plasmid Vectors. Methods in Molecular Biology. 235(3):27-48. N. Casali y A. Preston (ed). Humana Press.

Caspeta L, Flores N, Perez NO, Bolivar F, Ramirez OT. 2009. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol Bioeng* 102(2):468-482.

Chang CN, Kuang WJ, Chen EY. 1986. Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*. *Gene* 44(1):121-125.

Chang DE, Shin S, Rhee JS, Pan JG. 1999. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol* 181(21):6656-6663.

Chartrain M, Bentley LK, Krulewickz BA, Listner KM, Sun W-j, Lee CB; 2005. Process for large scale production of plasmid DNA by *E. coli* Fermentation. US Patent 7998732.

Chen W, Graham C, Ciccarelli RB. 1997. Automated fed-batch fermentation with feedback controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18(1):43-48.

Clewell DB. 1972. Nature of Col E 1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of the chloramphenicol. *J Bacteriol* 110(2):667-676.

Cutayar JM, Poillon D. 1989. High-cell density culture of *Escherichia coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnol Lett* 11(3):155-160.

Danquah MK, Forde GM. 2007. Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *J Biosci Bioeng* 104(6):490-497.

Davey CL, Kell DB. 1995. The low-frequency dielectric properties of biological cells. En: *Bioelectrochemistry of cells and tissues*. 159-207. Waltz D, Berg H, Milazzo G (ed). Birkauser.

Dean DA, Ramanathan T, Machado D, Sundararajan R. 2008. Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. *J Electrostat* 66(3-4):165-177.

Desjardins PR, Conklin DS. 2011. Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. 93:A.3J.1-A.3J.16. John Wiley & Sons.

Dittrich CR, Bennett GN, San KY. 2005. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 21(4):1062-1067.

Dorman CJ, Barr GC, Ni Bhriain N, Higgins CF. 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of tonB gene expression. *J Bacteriol* 170(6):2816-2826.

Durland RH, Eastman EM. 1998. Manufacturing and quality control of plasmid-based gene expression systems. *Adv Drug Deliver Rev* 30(1-3):33-48.

Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jurgen B, Kruger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D and others. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol* 85(2):175-185.

FDA. 2004. Guidance for industry: PAT-a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. US Food and Drug Administration.

FDA. 2007. Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. US Food and Drug Administration.

Ferreira GN, Monteiro GA, Prazeres DM, Cabral JM. 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol* 18(9):380-388.

Fyferling M, Uribe-larrea J-L, Goma G, Molina-Jouve C. 2008. Oxygen transfer in intensive microbial culture. *Bioprocess Biosyst Eng* 31(6):595-604.

Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Consultada el 25-May-12 de [www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/)

Ghanem A, Healey R, Adly FG. 2013. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Anal Chim Acta* 760:1.15

Goncalves G, Bower D, Prazeres D, Monteiro G, Prather K. 2012. Rational engineering of *Escherichia coli* strains for plasmid biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol J* 7(2):251-261.

Gnoth S, Jenzsch M, Simutis R, Lübert A. 2007. Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *J Biotechnol* 132:180-186

Grant EH, Sheppard RJ, South GP. 1978. Dielectric behavior of biological molecules in solution. Oxford University Press. Oxford UK.

Han Y, Liu S, Ho J, Danquah MK, Forde GM. 2009. Using DNA as a drug-bioprocessing and delivery strategies. *Chem Eng Res Des* 87:343-348.

Harris CM, Todd RW, Bungard SJ, Lovitt RW, Morris JG, Kell DB. 1987. The dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme Microb Technol* 9:181-186.



- Hasan CMM, Shimizu K. 2008. Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene expressions in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 7:35.
- Herendeen SL, VanBogelen RA, Neidhardt FC. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J Bacteriol* 139(1):185-194.
- Herrera E, Barcenas P, Hernandez R, Mendez A, Perez-Ishiwara G, Barron B. 2010. A 176 amino acid polypeptide derived from the mumps virus HN ectodomain shows immunological and biological properties similar to the HN protein. *Virology* 7:195.
- Hoare M, Levy MS, Bracewell DG, Doig SD, Kong S, Titchener-Hooker N, Ward JM, Dunnill P. 2005. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m<sup>3</sup> fermentation scale for an influenza pandemic. *Biotechnol Prog* 21(6):1577-1592.
- Hoffmann F, Rinas U. 2001. Plasmid amplification in *Escherichia coli* after temperature upshift is impaired by induction of recombinant protein synthesis. *Biotechnol Lett* 23(22):1819-1825.
- Hoffmann F, Schmidt M, Rinas U. 2000. Simple technique for simultaneous on-line estimation of biomass and acetate from base consumption and conductivity measurements in high-cell density cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 70(3):358-361.
- Howe C. 2007. *Gene Cloning and Manipulation*. Cambridge University Press: New York. 266p.p.
- Huber H, Weigl G, Buchinger W; 2005. Fed-Batch Fermentation Process and Culture Medium for the Production of Plasmid DNA in *E. coli* on a Manufacturing Scale. Patent application number WO2005097990.
- Jenzsch M, Gnoth S, Kleinschmidt M, Simutis R, Luebbert A. 2007. Improving the batch-to-batch reproducibility of microbial cultures during recombinant protein production by regulation of the total carbon dioxide production. *J Biotechnol* 128(4):858-867.
- Kaiser C, Pototzki T, Ellert A, Luttmann R. 2008. Applications of PAT-process analytical technology in recombinant protein processes with *Escherichia coli*. *Eng Life Sci* 8(2):132-138.
- Kaneko T, Mizushima T, Ohtsuka Y, Kurokawa K, Kataoka K, Miki T, Sekimizu K. 1996. Co-induction of DNA relaxation and synthesis of DnaK and GroEL proteins in *Escherichia coli* by expression of LetD (CcdB) protein, an inhibitor of DNA gyrase encoded by the F factor. *Mol Gen Genet* 250(5):593-600.

Knabben I, Regestein L, Schauf J, Steinbusch S, Büchs J. 2011. Linear correlation between online capacitance and offline biomass measurement up to high cell densities in *Escherichia coli* fermentations in a pilot-scale pressurized bioreactor. *J Microbiol Biotechnol* 21(2):204-211.

Korz D, Rinas U, Hellmuth K, Sanders E, Decwer W. 1995. Simple fed-batch technique for high cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39(1):59-65.

Kutzler MA, Weiner DB. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9(10):776-788.

Lahijani R, Hulley G, Soriano G, Horn NA, Marquet M. 1996. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum Gene Ther* 7(16):1971-1980.

Lara AR, Galindo E, Ramirez OT, Palomares LA. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. *Mol Biotechnol* 34(3):355-381.

Lara A, Caspeta L, Gosset G, Bolivar F, Ramirez O. 2008. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng* 99(4):893-901.

Lara AR, Ramírez OT. 2012. Plasmid DNA production for therapeutic applications. En: *Recombinant Gene Expression. Methods in Molecular Biology* 3rd ed. 824(14):271-303. A. Lorence (ed). Humana Press.

Levy MS, O'Kennedy DR, Ayazi-Shamlou P, Dunill P. 2000. Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol.* 18(7):296-305.

Lin-Chao S, Chen WT, Wong TT. 1992. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol* 6(22):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(5):1335-1345.

Luli GW, Schlasner SM, Ordaz DE, Mason M, Strohl WR. 1987. An Automatic, On-Line Glucose Analyzer for Feed-Back Control of Fed-Batch Growth of *Escherichia coli*. *Biotechnol tech* 1(4):225-230.

Luli GW, Strohl WR. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol* 56(4):1004-1011.

Markx GH, Davey CL. 1999. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology. *Enzyme Microb Technol* 25(3-5):161-171.

Matsui T, Sato H, Sato S, Mukataka S, Takahashi J. 1990. Effects of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* 54(3):619-24.

Miki T, Yasukochi T, Nagatani H, Furuno M, Orita T, Yamada H, Imoto T, Horiuchi T. 1987. Construction of a plasmid vector for the regulatable high-level expression of eucaryotic genes in *Escherichia coli* - an application to overproduction of chicken lysozyme. *Protein Eng* 1(4):327-332.

Moore DD. 2001. Commonly Used Reagents and Equipment. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. 51(A):2.5A.1-2.5A.9. Gwen P. Taylor (ed). John Wiley & Sons.

Namdev PK, Irwin N, Thompson BG, Gray MR. 1993. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng* 41(6):666-670.

Neubauer P, Wrobel B, Wegrzyn G. 1996. DNA degradation at elevated temperatures after plasmid amplification in amino acid-starved *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Lett* 18(3):321-326.

Nieves A, Domínguez FC. 2002. *Métodos numéricos aplicados a la ingeniería*. México DF: Compañía Editorial Continental.

O'Kennedy RD, Baldwin C, Keshavarz-Moore E. 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J Biotechnol* 76(2-3):175-183.

Ogata Y, Mizushima T, Kataoka K, Kita K, Miki T, Sekimizu K. 1996. DnaK heat shock protein of *Escherichia coli* maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. *J Biol Chem* 271(46):29407-29414.

Ongkudon CM, Pickering R, Webster D, Danquah MK. 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* 10:16.

Ow DS-W, Nissom PM, Philp R, Oh SK-W, Yap MG-S. 2006. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 alpha during batch fermentation. *Enzyme Microb Technol* 39(3):391-398.

Pauly H, Schwan HP. 1959. Über die impedanz einer suspension von kugelformigen teilchen mit einer shale. *Z. Naturforschung B* 14:125-131.

Prather KJ, 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(7):865-883.

Prazeres DMF, Ferreira GNM, Monteiro GA, Cooney CL, Cabral JMS. 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol* 17(4):169-174.

Raucci G, Maggi CA, Parente D. 2000. Capillary electrophoresis of supercoiled DNA molecules: parameters governing the resolution of topoisomers and their separation from open forms. *Anal Chem* 72(4):821-826.

Reinikainen P, Korpela K, Nissinen V, Olkku J, Söderlund H, Markkanen P. 1989. *Escherichia coli* plasmid production in fermenter. *Biotechnol Bioeng* 33(4):386-393.

Riethdorf S, Schroeter A, Hecker M. 1989. RelA mutation and pBR322 plasmid amplification in amino acid-starved cells of *Escherichia coli*. *Genet Res* 54(3):167-171.

Schaepe S, Kuprijanov A, Aehle M, Simutis R, Luebbert A. 2011. Simple control of fed-batch processes for recombinant protein production with *E. coli*. *Biotechnol Lett* 33(9):1781-1788.

Schleef M, Blaesen M. 2009. Production of plasmid DNA as a pharmaceutical. *Methods Mol Biol* 542(25):471-495.

Schmidt M, Viaplana E, Hoffmann F, Marten S, Villaverde A, Rinas U. 1999. Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway. *Biotechnol Bioeng* 66(1):61-67.

Schmidt T, Friehs K, Flaschel E, Schleef M; 2003. Method for the isolation of CCC plasmid DNA. US Patent 6664078.

Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG, Deckwer W-D, Rinas U. 1995. Comparison of temperature- and isopropyl-beta-D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 17(10):947-953.

Seo JH, Bailey JE. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 27(12):1668-1674.

Silva F, Passarinha L, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC. 2009. Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production. *J Microbiol Biotechnol* 19(11):1408-1414.

Silva F, Lourenço O, Maia C, Queiroz JA, Domingues FC. 2011. Impact of plasmid induction strategy on overall plasmid DNA yield and *E. coli* physiology using flow cytometry and real-time PCR. *Process Biochem* 46(1):174-181.

Silva F, Queiroz JA, Domingues FC. 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 30(3):691-708.

Smith CA, Corripio AB. 1997. Principles and practice of automatic process control. New York: John Wiley & Sons.

Snoep JL, van der Weijden CC, Andersen HW, Westerhoff HV, Jensen PR. 2002. DNA supercoiling in *Escherichia coli* is under tight and subtle homeostatic control, involving gene-expression and metabolic regulation of both topoisomerase I and DNA gyrase. *Eur J Biochem* 269(6):1662-1669.

Soini J, Falschlehner C, Mayer C, Böhm D, Weinel S, Panula J, Vasala A, Neubauer P. 2005. Transient increase of ATP as a response to temperature up-shift in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4(1):9.

Soto R, Caspeta L, Barron B, Gosset G, Ramirez OT, Lara AR. 2011. High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem Eng J* 56(3):165-171.

Spiro S, Guest JR. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 16(8):310-314.

Summers DK. 1996. The Biology of plasmids. Oxford: Blackwell Science.

Tang DC, DeVit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nat* 356(6365):152-154.

Takashima S. 1989. Electrical properties of biopolymers and membranes. Adam Hilger. New York.

Tomizawa J. 1990. Control of ColE1 plasmid replication. Interaction of Rom protein with an unstable complex formed by RNA I and RNA II. *J Mol Biol* 212(4):695-708.

Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. 2010. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact* 9:18.

Vanýsek, P. 2006. Ionic conductivity and diffusion at infinite dilution. In: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet version. D.R. Lide (ed). Boca Raton, FL. Taylor and Francis.

Villadsen J, Nielsen JH, Lidén G. 2011. Bioreaction engineering principles. New York: Springer.

Wagner KW. 1914. The after-effect in dielectrics. *Archiv Elektrotechnik* 2:371-387.

- Wang Z, Le GW, Shi YH, Wegrzyn G. 2001. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem* 36(11):1085-1093.
- Wang Z, Xiang L, Shao J, Wegrzyn G. 2007. Adenosine monophosphate-induced amplification of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli*. *Plasmid* 57(3):265-274.
- Wechselberger P, Herwig C. 2012. Model-based analysis on the relationship of signal quality to real-time extraction of information in bioprocesses. *Biotechnol Prog* 28(1):265-275.
- Wechselberger P, Herwig C. 2013. Model-based analysis on the extractability of information from data in dynamic fed-batch experiments. *Biotechnol Prog* 29(1):285-296.
- Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv* 27(4):353-370.
- Wittmann C, Weber J, Betiku E, Krömer J, Böhm D, Rinas U. 2007. Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 132(4):375-384.
- Wolfe AJ. 2005. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1):12-50.
- Wunderlich M. 2010. Kinetic characterization of engineered *Escherichia coli* strains during plasmid DNA vaccine production in chemostats. Dresden, Germany : Technische Universität Dresden. Diploma Thesis.
- XI Z, Stoykov Z, Vladikova D, Nuncho N. 2009. Capacitive impedance spectroscopy measuring system. Properties and Applications of Dielectric Materials. IEEE 9<sup>th</sup> International Conference on Engineered Materials, Dielectrics and Plasmas. 1092-1093.
- Yang J, Yang Y. 2012. Plasmid size can affect the ability of *Escherichia coli* to produce high-quality plasmids. *Biotechnol Lett* 34(11) 2017-2022.
- Yoon SH, Han MJ, Lee SY, Jeong KJ, Yoo JS. 2003. Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnol Bioeng* 81(7):753-767.

## A1. Rutina de alimentación exponencial predeterminada

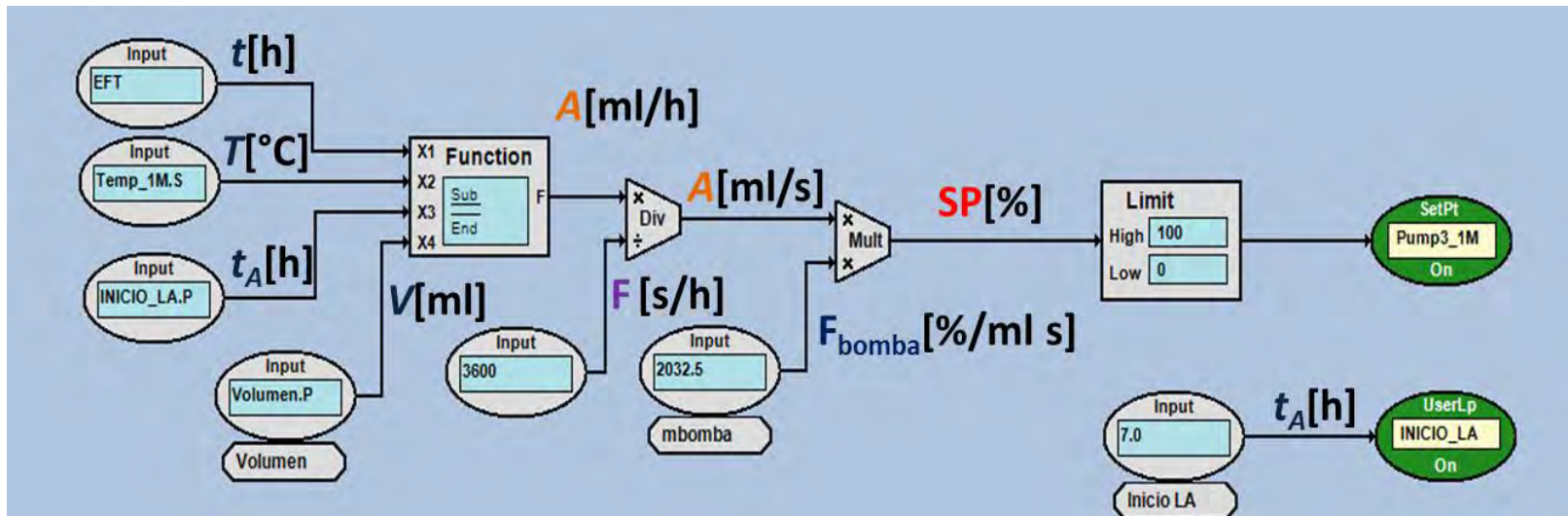


Figura A.1. Rutina de alimentación exponencial predeterminada programada en “Biocommand” en interfase gráfica. Los datos de entrada (input) son tiempo de proceso  $t$  (EFT), temperatura  $T$  (Temp\_XM.S), inicio de lote alimentado  $t_{LA}$  (Inicio\_LA.P) y volumen total de reactor  $V$  (Volumen.P). Todas estas variables se procesan en la función  $F$ , que calcula el flujo de alimentación  $A$ . En las instrucciones subsiguientes se convierten las unidades del flujo de alimentación y se aplica el factor de calibración de la bomba  $F_{bomba}$  (mbomba) para especificar el valor del punto de ajuste  $SP$  de la bomba de adición (Pump3\_XM). El tiempo de inicio de lote alimentado se especifica en InicioLA. Las unidades de cada variable se indican sobre cada flecha entre corchetes.

## A2. Código de la función F de la rutina de alimentación exponencial predeterminada

```
BioCommand Control Script Editor
12 Dim mu,xo,vo,m,yxs1,yxs2,s As Single
13
14 'Asignar valores a los parámetros del modelo
15
16 mu=0.15 'h-1
17 xo=5.1 'g/L Considerando fase lote con 10g/L de glucosa
18 yxs1=0.47 'Rendimiento biomasa sustrato a 35'C
19 yxs2=0.27 'Rendimiento biomasa sustrato a 42'C
20 s=636 'g/L Concentración de sustrato en la alimentación
21 m=0.057 'g/gh Coeficiente de mantenimiento
22
23 If X1> X3 Then
24
25     If X2<42 Then
26
27         F= ( (mu/yxs1)+m) * (xo*X4/s) *Exp(mu*(X1-X3))
28
29     ElseIf X2=42 Then
30
31         F= ( (mu/yxs2)+m) * (xo*X4/s) *Exp(mu*(X1-X3))
32
33     End If
34
35 Else
36
37     F=0
38
39 End If
40
41 End Sub
42
```

Figura A.2. Código de la función “F” programada en lenguaje Visual Basic Application. Las variables se declaran en la línea 12 y en las líneas 16 a 21 se especifican sus valores. X1,X2, X3 y X4 son las variables de entrada a la función “F” (Figura A1). Si el tiempo de proceso es mayor al tiempo de inicio de alimentación entonces empieza a calcular el flujo de alimentación en la línea 27 si la temperatura está por debajo de 42 °C o en la línea 31 si la temperatura es igual a 42 °C. Por el contrario, si el tiempo de proceso es menor al tiempo de inicio de alimentación, el flujo es cero.



### A3. Rutina de cómputo de volumen adicionado de las bombas peristálticas

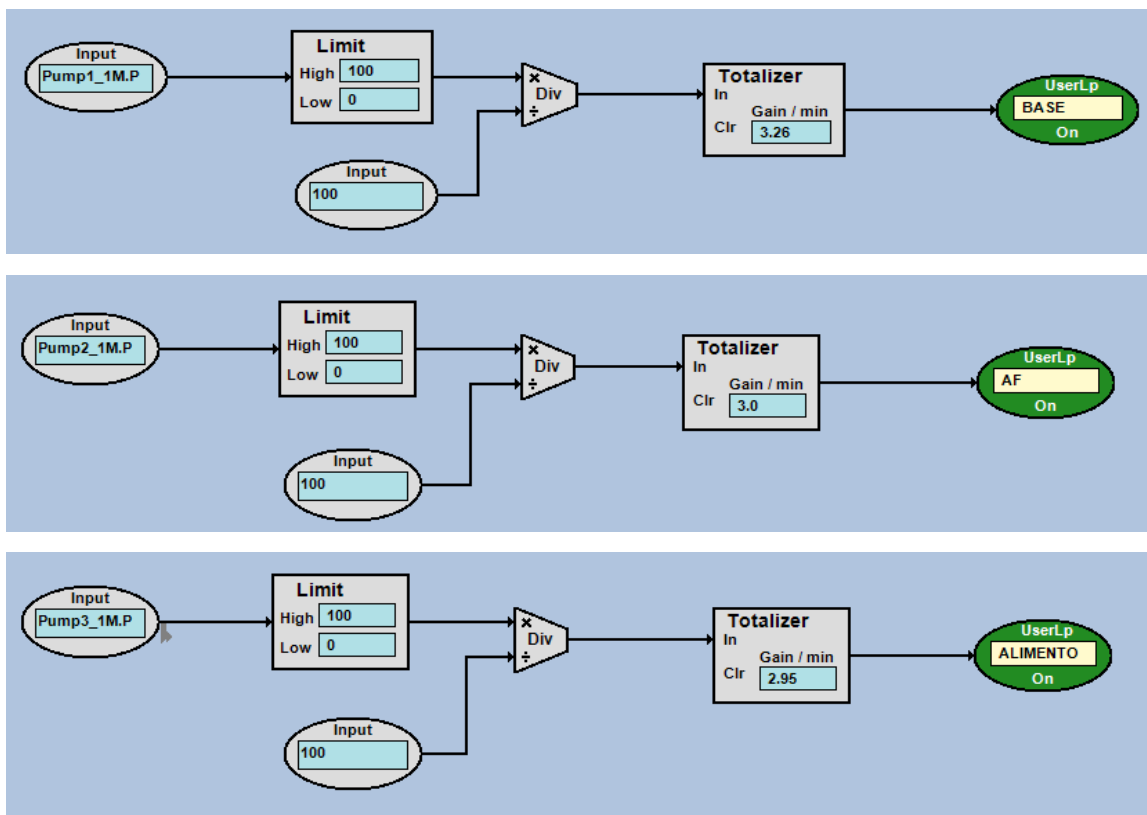


Figura A.3. Rutina de cómputo de volumen adicionado por cada bomba. El cómputo del volumen adicionado por cada bomba tiene como entrada el punto de ajuste de cada bomba (  $umpX_{YM}$  ). El operador “Limit” asegura que el valor del SP no esté fuera del intervalo 0-100. El valor del S es dividido entre 100 y entra al operador “otalizer” en el cual se especifica el flujo de calibración de cada bomba (en ml/min). Este operador calcula el volumen adicionado de acuerdo a la suma de los productos del intervalo de tiempo de operación, set point de la bomba y flujo de calibración a lo largo del tiempo de operación de la bomba. La bomba 1 se asignó para la adición de base; la bomba 2 para la adición de antiespumante y la bomba 3 para la adición de solución de alimento.

#### A4. Rutina de cómputo de volumen total del reactor

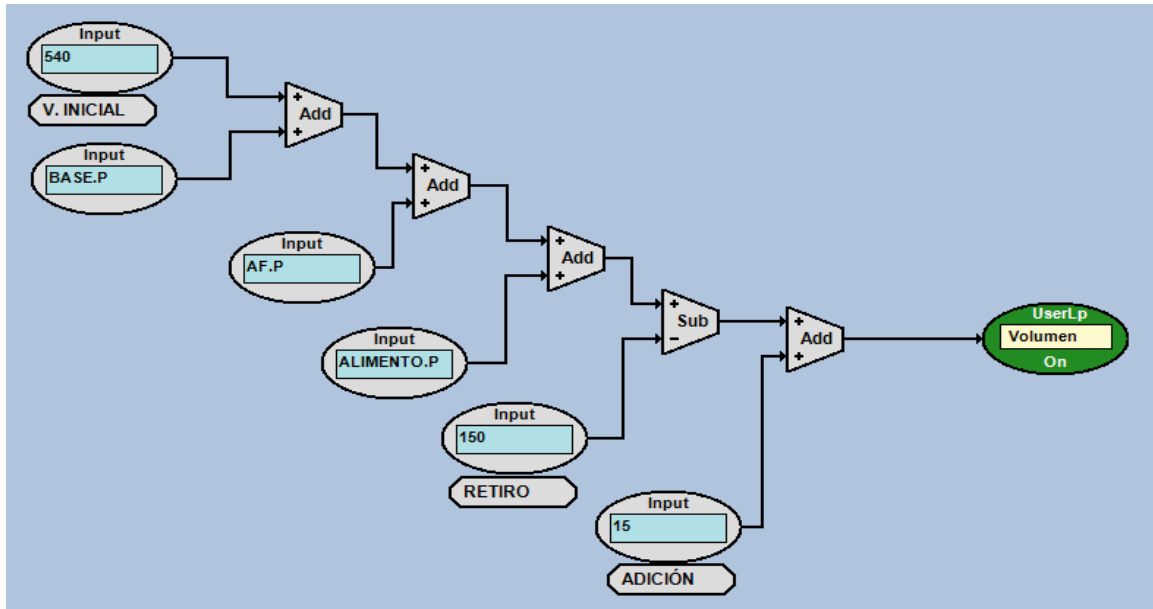


Figura A.4. Rutina de cómputo de volumen total del reactor. El volumen instantáneo del reactor es la suma del volumen añadido de base, antiespumante (AF) y alimento; el volumen inicial y volumen de reposición, menos la diferencia del volumen total de retiros por muestreo.

#### A5. Rutina de cambio de temperatura en rampa

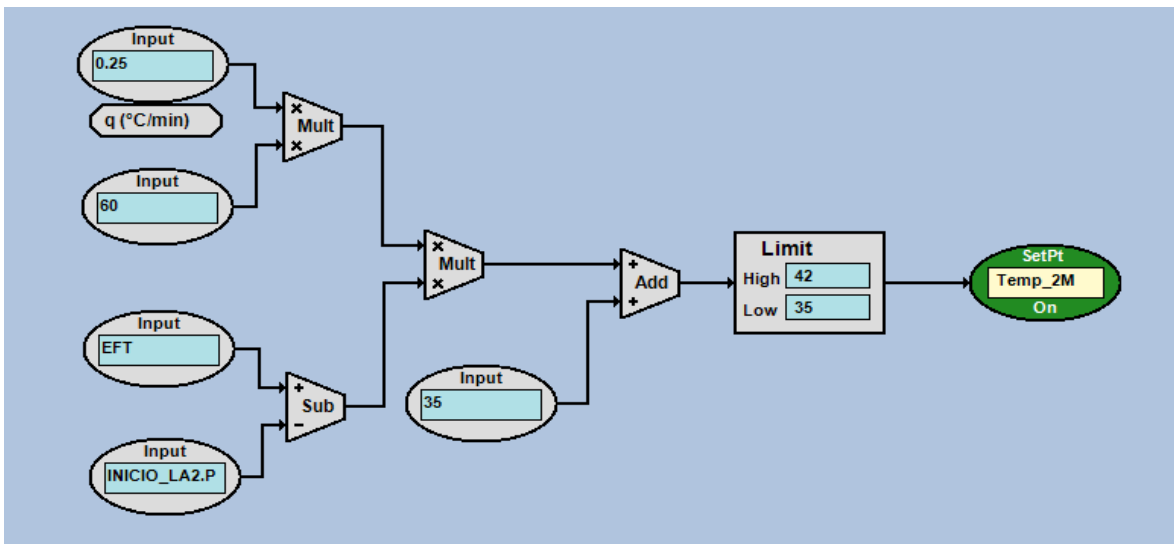


Figura A.5. Rutina de cómputo de cambio de temperatura en rampa. Se convierten las unidades de la tasa de calentamiento (q) de °C/min a °C/h. La tasa de calentamiento se multiplica por la diferencia entre el tiempo de proceso (EFT) y el inicio de la alimentación (INICIO\_LAX.P). El resultado se suma a la temperatura inicial (35 °C) para especificar el nuevo set point al control de temperatura del reactor (Temp\_XM).

## B1. Código de la macro para la estimación de la tasa de crecimiento específico con polinomios de Lagrange

```
Sub mu_Lagrange()
```

```
Dim DP, P, P1, XD, S, X1, X2, x As Single
```

```
Dim i, j, k, n, d, columnax, columnay, columnad As Integer
```

```
filai = 2  
filaf = 1440
```

```
d = filaf - filai ' Número de datos
```

```
columnax = 1 'Datos de tiempo.  
columnay = 3 'Datos de cantidad de biomasa.  
columnad = 4 'Resultados de la estimación de la derivada.
```

```
For x = 0 To d
```

```
n = 2 'Grado del polinomio de Lagrange
```

```
XD = Cells(filai + x, columnax)
```

```
DP = 0  
i = 0
```

```
For i = 0 To n
```

```
    P = 1  
    j = 0
```

```
        For j = 0 To n
```

```
            If i <> j Then
```

```
                X1 = Cells(filai + x + i, columnax)
```

```
                X2 = Cells(filai + x + j, columnax)
```

```
                P = P * (X2 - X1)
```

```
            End If
```

```
        Next j
```

```
        S = 0  
        k = 0
```

```
        For k = 0 To n
```

```
            If i <> k Then
```

```
                P1 = 1
```

```

For j = 0 To n
  If j <> i And j <> k Then
    P1 = P1 * (XD - Cells(filai + x + j, columnax))
  End If
Next j
S = S + P1
End If
Next k
DP = DP + (Cells(filai + x + i, columnay) / P) * S
Next i
'Derivada
Cells(filai + x, columnad) = DP
'mu
Cells(filai + x, columnad + 1) = DP / Cells(filai + x, columnay)
Next x
End Sub

```

## B2. Código de la macro para la estimación de la tasa de crecimiento específico a partir de los datos adquiridos en línea

```
Sub Estimar_mu()

Dim x(), y(), pendiente, correlacion As Single

Dim frecuencia, i, filai, filaf, columnnai, columnnad1, columnnad2 As Integer

frecuencia = 15

ReDim x(frecuencia - 1)
ReDim y(frecuencia - 1)

cont = 0

filai = InputBox("Fila inicial: ")

columnnai = 6 'Datos de logaritmo natural de la cantidad de biomasa.
columnnad1 = 7 'Resultados de estimación de mu.
columnnad2 = 8 'Resultados de coeficiente de regresión.

Cells(filai, 2).Select
Selection.End(xlDown).Select
filaf = ActiveCell.Row
n = filaf - filai

Do

For j = 0 To frecuencia - 1

    x(j) = Cells(filai + j + cont, 1)

    y(j) = Cells(filai + j + cont, columnnai)

Next j

    pendiente = WorksheetFunction.Slope(y, x) 'Tasa de crecimiento específico.
    correlacion = WorksheetFunction.Correl(y, x) 'Coeficiente de correlación.

    Cells(filai + cont, columnnad1) = pendiente

    Cells(filai + cont, columnnad2) = correlacion

cont = cont + 1

Loop While (cont <= n)

End Sub
```

### **B3. Código de la macro para la estimación del rendimiento específico a partir de los datos adquiridos en línea**

Sub Estimar\_yxs()

Dim x(), y(), pendiente, correlacion, s, columnax, columnav, columnaa, columnad1, columnad2 As Double

Dim frecuencia, i, filai, filaf As Integer

frecuencia = InputBox("Ingrese el número de datos para estimación: ")

s = Range("R1") ' Concentración de glucosa en la solución de alimentación

ReDim x(frecuencia - 1)

ReDim y(frecuencia - 1)

cont = 0

filai = 2 'Fila inicial.

columnax = 2 'Columna de datos de concentración de biomasa estimada.

columnav = 3 'Columna de datos de volumen .

columnaa = 4 'Columna de volumen adicionado de alimento.

columnad1 = 5 'Columna de cantidad de biomasa.

columnad2 = 6 'Resultados.

Cells(filai, 2).Select

Selection.End(xlDown).Select

filaf = ActiveCell.Row 'Fila final.

n = filaf - filai 'Número de datos.

For i = 0 To n

Cells(filai + i + j, columnad1) = Cells(filai + i + j, columnax) \* Cells(filai + i + j, columnav) / 1000

Next i

'Identificar inicio de alimentación.

For i = 0 To n

If Cells(2 + i, columnaa) <> 0 Then

filai = 2 + i

GoTo SALIDA

End If

Next i

SALIDA:

```
n = filaf - filai
```

```
For i = 0 To n
```

```
    For j = 0 To frecuencia - 1
```

```
        y(j) = Cells(filai + i + j, columnad1)
```

```
        x(j) = s * Cells(filai + i + j, columnaa) / 1000
```

```
    Next j
```

```
    Cells(filai + i, columnad2) = WorksheetFunction.Slope(y, x) 'Obtención de la pendiente Yxs.  
    Cells(filai + i, columnad2 + 1) = WorksheetFunction.Correl(y, x)
```

```
Next i
```

```
Range("R1").Select
```

```
End Sub
```

#### **B4. Código de la macro para la aplicación de estimadores de la concentración de biomasa y acetato de los datos adquiridos en línea**

Sub Aplicacion\_estimadores()

Dim ko, m, factor, prediccion, m2, t2, a, b, c, tla, t42 As Single

'Entrada de datos

```
factor = Range("Z6")
m = Range("Z7")
ko = Range("Z8")
m2 = Range("X10")
t2 = Range("X11")
```

'Capacitancia

```
a = Range("Z3")
b = Range("Z4")
c = Range("Z5")
```

```
tla = Range("X12")
t42 = Range("X13")
```

n = 1440

Dim cont As Integer

cont = 0

For i = 0 To n

If Cells(2 + i, 4) > t42 And cont = 0 Then

```
factor = Range("AB6")
m = Range("AB7")
ko = Range("AB8")
m2 = Range("X10")
t2 = Range("X11")
```

'Capacitancia

```
a = Range("Z3")
b = Range("AB4")
c = Range("AB5")
```

cont = 1

End If



If  $m_2 = 0$  Then

prediccion =  $-m * \text{Cells}(2 + i, 4) + k_0$

$\text{Cells}(2 + i, 7) = \text{prediccion}$

If  $\text{prediccion} < \text{Cells}(2 + i, 5)$  Then

$\text{Cells}(2 + i, 8) = \text{factor} * (\text{Cells}(2 + i, 5) - \text{prediccion})$

Else

$\text{Cells}(2 + i, 8) = 0$

End If

Else

If  $t_2 > \text{Cells}(2 + i, 4)$  Then

prediccion =  $-m * \text{Cells}(2 + i, 4) + k_0$

$\text{Cells}(2 + i, 7) = \text{prediccion}$

If  $\text{prediccion} < \text{Cells}(2 + i, 5)$  Then

$\text{Cells}(2 + i, 8) = \text{factor} * (\text{Cells}(2 + i, 5) - \text{prediccion})$

Else

$\text{Cells}(2 + i, 8) = 0$

End If

Else

If  $m_2 < \text{Cells}(2 + i, 5)$  Then

$\text{Cells}(2 + i, 8) = \text{factor} * (\text{Cells}(2 + i, 5) - m_2)$

Else

$\text{Cells}(2 + i, 8) = 0$

End If

End If

End If

'Capacitancia

If Cells(2 + i, 4) <= tla Then

Cells(2 + i, 9) = a \* Cells(2 + i, 6)

Else

If b \* (Cells(2 + i, 6) - c \* Cells(2 + i, 8)) > 0 Then

Cells(2 + i, 9) = b \* (Cells(2 + i, 6) - c \* Cells(2 + i, 8))

Else

Cells(2 + i, 9) = a \* Cells(2 + i, 6)

End If

End If

Next i

End Sub

**C. Valores de los parámetros utilizados para estimar las concentraciones de biomasa y acetato**

			Valores utilizados						
			$q = 0 \text{ }^\circ\text{C/min}$		$q = 0.025 \text{ }^\circ\text{C/min}$		$q = 0.05 \text{ }^\circ\text{C/min}$		
Parámetro	Unidades	Valor propuesto	Lote 22	Lote 23	Lote 28	Lote 29	Lote 26	Lote 32	
35 °C	a	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$2.63 \pm 0.15$	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63
	b	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$3.7 \pm 0.13$	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
	c	$\text{pF L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$2.41 \pm 0.40$	0.3	0.5	0.2	0	1	0.5
	$\delta$	$\text{g cm mS}^{-1} \text{ L}^{-1}$	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
	dk/dt	$\text{mS cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0.73 \pm 0.28$	0.70	0.72	0.78	0.72	0.75	0.72
	ko	$\text{mS cm}^{-1}$	30	28.7	29.4	31.7	38.5	28.9	30
42 °C	b	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$3.33 \pm 0.37$	NA	NA	3.33	3.33	3.7	3.6
	c	$\text{pF L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$1.11 \pm 0.18$	NA	NA	0.3	0.3	0.3	0.3
	$\delta$	$\text{g cm mS}^{-1} \text{ L}^{-1}$	0.45	NA	NA	0.45	0.45	0.45	0.45
	dk/dt	$\text{mS cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1.81 \pm 0.41$	NA	NA	1.2	1.3	0.9	1.2
	ko	$\text{mS cm}^{-1}$	30	NA	NA	34	38	28.9	33
tla	h	NA	5.7	4.6	5	4.2	4.6	4	
t42	h	NA	24	24	9.9	8.7	7	6.3	

			Valores utilizados						
			$q = 0.10 \text{ }^\circ\text{C/min}$			$q = 0.25 \text{ }^\circ\text{C/min}$			
Parámetro	Unidades	Valor propuesto	Lote 20	Lote 21	Lote 30	Lote 24	Lote 25	Lote 30	
35 °C	a	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$2.63 \pm 0.15$	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63
	b	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$3.7 \pm 0.13$	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
	c	$\text{pF L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$2.41 \pm 0.40$	0.3	0.2	0.3	0.3	0.5	0.3
	$\delta$	$\text{g cm mS}^{-1} \text{ L}^{-1}$	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
	dk/dt	$\text{mS cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0.73 \pm 0.28$	0.5	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
	ko	$\text{mS cm}^{-1}$	30	28.1	29	27.8	29.5	29	31
42 °C	b	$\text{g cm pF}^{-1} \text{ L}^{-1}$	$3.33 \pm 0.37$	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33
	c	$\text{pF L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$1.11 \pm 0.18$	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2
	$\delta$	$\text{g cm mS}^{-1} \text{ L}^{-1}$	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
	dk/dt	$\text{mS cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1.81 \pm 0.41$	0.9	0.9	1.4	1	1	1
	ko	$\text{mS cm}^{-1}$	30	30	29	29	30	30	31
tla	h	NA	5.5	6.9	4	4.4	4.7	4	
t42	h	NA	6.7	8.2	5.3	4.9	5.5	4.5	