



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE ALGAS PARDAS, MEDIANTE EL USO DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

*MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA*

CARMEN CECILIA LEYTON NAIN

PROFESOR GUÍA:

ÁLVARO MARÍA OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

FELIPE DÍAZ ALVARADO

BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE

2015

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: CARMEN CECILIA LEYTON NAIN
FECHA: MARZO 2015
PROFESOR GUÍA: ÁLVARO OLIVERA NAPPA

CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE ALGAS PARDAS, MEDIANTE EL USO DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Este informe presenta la memoria de título realizada en colaboración con el Consorcio BAL Chile S.A.; cuyo objetivo es evaluar las condiciones de fermentación de carbohidratos de macroalga parda para optimizar su bioconversión a etanol, mediante el uso de cepas de microorganismos genéticamente modificados, y así, contribuir al desarrollo de la industria de biocombustibles de tercera generación en Chile.

El desarrollo de este proyecto consistió, principalmente, en dos etapas: en la primera se realizaron fermentaciones aeróbicas con reactivos puros en distintas razones de alginato-manitol, de modo de simular la composición de carbohidratos presentes en las macroalgas pardas. Con estos cultivos se calculó y evaluó la velocidad de crecimiento y los rendimientos de biomasa y de producto, con la finalidad de determinar condiciones óptimas para fermentar. En una segunda etapa, realizaron fermentaciones micro-aeróbicas mediante un diseño experimental estadístico, para evaluar, principalmente, la producción de etanol. No se obtuvieron resultados favorables en esta condición, por lo que procedió a fermentar *Macrocystis pyrifera* en condiciones aeróbicas, con el objeto de verificar si los resultados con reactivos puros era reproducible al fermentar algas.

Como resultado principal se obtuvo que la razón de alginato-manitol que reporta mejor rendimiento de etanol es 5:8 en condiciones aeróbicas. No obstante, el microorganismo puede crecer y fermentar favorablemente en distintas razones de carbohidratos, lo que elimina la variable de composición química de algas pardas.

Las fermentaciones con *Macrocystis pyrifera* determinaron que no es necesario que la razón de carbohidratos se asemeje a la razón óptima determinada como óptima, sino que basta con la composición natural de la misma. Por lo tanto, esta macroalga nativa de Chile y su uso como materia prima para la producción de biocombustibles abre una oportunidad importante para la aumentar la participación de las Energías Renovables No Convencionales en la generación de energía del país, avanzando hacia la meta propuesta por el gobierno.

Tras los análisis realizados, se estima que el rol principal de manitol es entregar poder reductor a la célula, el cual puede ser utilizado tanto en el crecimiento y metabolismo del microorganismo, como para la producción de etanol. Por otro lado, alginato es consumido para la formación de biomasa y de piruvato destinado a la producción de etanol.

El estudio experimental desarrollado en esta memoria no consideró variables como la temperatura, pH o agitación. Por lo tanto se recomienda complementar este estudio añadiendo dichas variables, otorgando otras perspectivas valiosas al momento de decidir el escalamiento del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Acercándome al final de una etapa tan importante, quisiera agradecer profundamente a mi familia. Especialmente a mis padres, Marco y María, por haber hecho de mí una mujer perseverante y comprometida y por apoyarme en cada una de mis decisiones. Estoy orgullosa de ustedes, han sido, desde siempre, un ejemplo para mí. Gracias a mi hermana, por su compañía y preocupación; y a mi hermano, por haberme acercado al mundo de la ciencia.

A Felipe Díaz, por todas las conversaciones y momentos compartidos. Estoy segura de que la universidad no hubiese sido lo mismo si no me hubiera topado contigo. Gracias por confiar en mí, por ponerme tantos desafíos, por hacerme crecer como persona y como profesional, y por toda esa pasión que pones a cada cosa que haces.

A mi profesor guía, Álvaro Olivera, por todo el tiempo dedicado a pulir este trabajo. Por las largas conversaciones, la confianza, el respeto, y el aprendizaje que tuve trabajando con usted. Especialmente, quisiera agradecerle por abrirme la puerta y apoyar nuevos proyectos docentes con los que llegué un día a golpear su puerta. Gracias por soportarme tanto tiempo. Gracias por tener esa pasión por la docencia, por preocuparse de sus alumnos y por ser la gran persona que es.

A Waldo y Richard, por ser mis primeros referentes de la carrera, por su buena disposición y simpatía. Gracias por sus consejos y su enorme sabiduría. Nunca los olvidaré y sepan que tienen un pedacito especial en mi corazón.

A todos mis teatritos: Roxi, Jorge, Alicia, Fer, Edwin, Eli, Lilí, Waldo, Gaby y Daniel. Gracias por haber compartido tantas tardes y fines de semana ensayando distintas obras con la única satisfacción del aplauso final. Gracias por crear ese espacio único en la U, donde todos los problemas y el estrés quedaban atrás. Gracias por permitirme soñar con ser actriz.

A toda mi generación IQBT, por todos los momentos vividos juntos, por las risas en clases y por los asados de mentira. Los extrañaré mucho. Especialmente quisiera agradecer a Coni, Gus, y Seba por su amistad e incondicionalidad. Son los mejores amigos que puede encontrar.

A Matías, Dani, Becky, Jorge y Andrea por entenderme tan bien, por todas las conversaciones y por ser un hombro donde llorar cada vez que lo necesité.

A Xime por estar conmigo toda esta última etapa, apoyándome y levantándome la moral cuando no quería saber nada del mundo. Gracias por las conversaciones, los gruñidos, las papitas y las micheladas.

A todos los chicos del lab, por la buena onda y la disposición. Especialmente agradezco a Allison por salvarme tantas veces con el HPLC, a JM por su disposición, y por sobre todo, a Nancy.

Finalmente quisiera agradecer a mi compañero y amigo por el amor, la comprensión y paciencia que has tenido conmigo todos estos años. Gracias por hacerme reír, por abrazarme cuando más lo necesito, por darme otra perspectiva de la vida y por amarme tal cual soy. Gracias por ser parte de mi equipo Thomas, te amo.

Tabla de Contenido

Índice de Tablas.....	v
Índice de Ilustraciones	vi
Índice de Gráficos.....	vii
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Marco Teórico	11
1.2.1 Macroalgas	11
1.2.2 Microorganismo: Escherichia coli BAL 1611.....	14
1.2.3 Fermentación	17
1.3 Objetivos.....	18
1.3.1 Objetivo General.....	18
1.3.2 Objetivos Específicos	18
2. Metodología.....	19
2.1 Metodología General	20
2.2 Materiales y Equipos	23
2.2.1 Materiales	23
2.2.2 Equipos	23
2.3 Metodología Experimental	24
2.3.1 Preparación de Materiales	24
2.3.2 Preparación de Stock de Bacterias y Preinóculo	24
2.3.3 Fermentaciones Aeróbicas.....	25
2.3.4 Fermentaciones Micro-aeróbicas.....	26
2.3.5 Fermentación de Algas	27
2.3.6 Diseño Experimental Estadístico.....	29

2.3.7 Cuantificación de Datos Experimentales.....	31
2.3.8 Curva de Calibración <i>D.O</i> ₆₀₀ vs Biomasa.....	33
2.3.9 Tinción de Gram.....	33
2.3.10 Siembra en Placa.....	34
2.4 Metodología de Modelamiento.....	34
2.4.1 Balances de Masa y Planteamiento de Ecuaciones.....	36
2.4.2 Método de Resolución y Ajuste a Curvas Experimentales.....	38
3. Resultados y Discusiones.....	39
3.1 Resultados Experimentales.....	40
3.1.1 Morfología del Microorganismo.....	40
3.1.2 Fermentaciones Aeróbicas.....	43
3.1.3 Fermentaciones Micro-aeróbicas.....	62
3.1.4 Fermentaciones de Macroalga.....	66
3.2 Resultados de Modelamiento.....	73
4. Conclusiones.....	77
Bibliografía.....	80
Anexos.....	I
Anexo A1: Protocolos.....	II
Anexo A2: Curvas de Calibración.....	IX
Anexo A3: Ejemplos de Cálculos.....	X
Anexo A4: Cromatogramas.....	XIII
Anexo A5: Vía de Degradación de Carbono en BAL 1611.....	XV
Anexo A6: Datos Experimentales.....	XVI
Anexo A7: Ajustes a Curvas.....	XXI
Anexo A8: Código de Programación.....	XXIII

Índice de Tablas

Tabla 1.1: Caracterización de <i>Macrocystis pyrifera</i>	13
Tabla 2.1: Condiciones de Crecimiento % en P/V	22
Tabla 2.2: Reactivos y Proveedores	23
Tabla 2.3: Factores del Diseño	30
Tabla 2.4: Diseño Factorial Completo de 2 niveles.....	31
Tabla 3.1: Velocidades de crecimiento.....	48
Tabla 3.2: Rendimientos de Biomasa.....	50
Tabla 3.3: Rendimientos de producto.....	61
Tabla 3.4: Condiciones de fermentaciones micro-aeróbicas	63
Tabla 3.5: Masa de macroalgas después de fermentar 1[g] de alga	71
Tabla 3.6: Caracterización de <i>Macrocystis pyrifera</i> luego de la fermentación	71
Tabla 3.7: Parámetros Ajustados	74
Tabla A.1: Datos de crecimiento en cultivo 2,6% alginato	XVI
Tabla A.2: Datos de crecimiento en cultivo 2% alginato	XVI
Tabla A.3: Datos de crecimiento en cultivo 1,6% alginato	XVII
Tabla A.4: Datos de crecimiento en cultivo 1% alginato	XVII
Tabla A.5: Datos de crecimiento en cultivo 0,6% alginato	XVII
Tabla A.6: Datos de crecimiento en cultivo 2,6% manitol.....	XVIII
Tabla A.7: Consumo y Producción cultivo 2% alginato	XVIII
Tabla A.8: Consumo y Producción cultivo 1,6% alginato	XIX
Tabla A.9: Consumo y Producción cultivo 1% alginato	XX
Tabla A.10: Consumo y Producción cultivo 0,6% alginato	XX

Índice de Ilustraciones

Figura 1.1: Diferentes procesos de producción de etanol [8].....	4
Figura 1.2: Azúcares fermentables necesarios para la producción mundial de biocombustibles y químicos [12, 13].....	6
Figura 1.3: Sistemas eléctricos en Chile [17].....	7
Figura 1.4: Estado de Centros de Energías Renovables [16]	9
Figura 1.5: Evolución de la capacidad instalada ERNC [MW] al 2014 [21]	10
Figura 1.6: Diseño de la plataforma microbiana para la producción de biocombustibles y compuestos químicos a partir de macroalga [32]	15
Figura 1.7: Comparación de vías glicolíticas [38, 39].....	16
Figura 2.1: Esquema de la Metodología.....	21
Figura 2.2: Matraces con cultivos fermentados.....	25
Figura 2.3: Cultivos Micro-aeróbicos.....	26
Figura 2.4: Experimentos con <i>Macrocystis pyrifera</i>	27
Figura 2.5: Fermentaciones de <i>Macrocystis pyrifera</i>	28
Figura 2.6: Diagrama de decisión para el diseño de experimentos micro-aeróbicos	29
Figura 2.7: Esquematización de los distintos factores que afectan al proceso y la variable de respuesta	30
Figura 2.8: Cromatograma.....	32
Figura 3.1: Morfología de BAL 1611 en LB (100x)	40
Figura 3.2 Morfología de cultivos con alto contenido de Alginato (100x). A la izquierda cultivo con 2,6% de alginato. A la derecha cultivo 2% de alginato y 0,6% de manitol.....	41
Figura 3.3: Morfología de cultivos intermedios (100x). A la izquierda cultivo con 1,6% de alginato y 1% de manitol. A la derecha cultivo con 1% de alginato y 1,6% de manitol.....	41
Figura 3.4: Morfología de cultivos con alto contenido de manitol (100x). A la izquierda cultivo 0,6% de alginato y 2% de manitol. A la derecha cultivo 2,6% de manitol	42
Figura 3.5: Cromatogramas. A la izquierda, a las 10 [h] de cultivo. A la derecha, a las 18 [h] de cultivo	53
Figura A.1: Esquema de Dilución Seriada, factor 6	XII

Figura A.2: Cromatograma de estándar de M9	XIII
Figura A.3: Cromatograma para estándar de alginato y M9	XIII
Figura A.4: Cromatograma para estándar de manitol y M9	XIV
Figura A.5: Cromatograma para estándar de etanol y M9	XIV
Figura A.6: Cromatograma de alginato hidrolizado	XIV
Figura A.7: Vías de degradación de carbono	XV

Índice de Gráficos

Gráfico 3.1: Curva de calibración	43
Gráfico 3.2: Curvas de crecimiento de los cultivos en distintas razones de alginato-manitol	44
Gráfico 3.3: Velocidad de crecimiento.....	47
Gráfico 3.4: Rendimiento de Biomasa	49
Gráfico 3.5: Consumo y producción cultivo 2% de alginato y 0,6% de manitol	52
Gráfico 3.6: Consumo y producción cultivo 1,6% de alginato y 1% de manitol	54
Gráfico 3.7: Consumo y producción cultivo 1% de alginato y 1,6% de manitol	55
Gráfico 3.8: Consumo y producción cultivo 0,6% de alginato y 2% de manitol	57
Gráfico 3.9: Rendimiento de Producto	59
Gráfico 3.10: Concentración de etanol en cultivos micro-aeróbicos	64
Gráfico 3.11: Concentración de biomasa en fermentaciones de <i>Macrocystis Pyrifera</i>	67
Gráfico 3.12: Fermentaciones de <i>Macrocystis pyrifera</i> sin pretratamiento.....	68
Gráfico 3.13: Fermentación de <i>Macrocystis pyrifera</i> con pretratamiento.....	69
Gráfico 3.14: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 2% alginato.....	73
Gráfico A.1: Curva de Calibración para alginato	IX
Gráfico A.2: Curva de Calibración para manitol.....	IX
Gráfico A.3: Curva de Calibración para etanol	X

Gráfico A.4: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 1,6% alginato.....	XXI
Gráfico A.5: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 1% alginato.....	XXII
Gráfico A.6: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 0,6% alginato.....	XXII

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Actualmente los combustibles fósiles satisfacen el 80% del consumo mundial de energía. Sin embargo, la principal problemática que ha generado su uso, desde la revolución industrial, es la contaminación, producto de las técnicas clásicas de aprovechamiento energético, tales como centrales térmicas, calderas y motores de combustión interna, lo que sumado a la ausencia de procesos de tratamiento de gases o coproducción que logren emisión cero, ha generado un deterioro significativo del medio ambiente. Además, se trata de una fuente de energía no renovable, cuyo agotamiento es inminente y podría cuantificarse considerando las reservas mundiales, la tecnología utilizada para su extracción, entre otros factores [1, 2].

Expertos han estimado que de aquí al 2050 se espera un crecimiento económico de 4 veces (incluso 10 veces para países desarrollados) el valor actual, lo que implicaría un crecimiento en el consumo energético de la población [2]. El crecimiento de la población siempre ha sido y seguirá siendo uno de los principales impulsores de la demanda de energía, junto con el desarrollo económico y social. Mientras que la población mundial se ha incrementado en más de 1,5 mil millones durante las últimas dos décadas, la tasa global de crecimiento de la población ha venido disminuyendo. El número de personas sin acceso a la energía comercial se ha reducido, y la estimación más reciente del Banco Mundial indica que es de 1,2 mil millones de personas [1].

De los combustibles fósiles, el petróleo sigue siendo un recurso energético muy utilizado, con un amplio rango de aplicaciones posibles. Sin embargo, su principal uso está orientado hacia el transporte y el sector petroquímico. Se estima que el 95% del transporte mundial utiliza como fuente energética al petróleo. Se trata de un recurso que constituye una fuente de energía muy eficiente, con una tecnología madura para la extracción, transporte y uso, así como también una materia prima con la que se puede obtener una gran variedad de materiales [1,3].

Se estima que, en sólo 100 años, la humanidad ha consumido casi el 50% del petróleo disponible. La preocupación en torno al consumo energético, no sólo está ligada al suministro, sino que también a las fluctuaciones históricas que ha tenido en el precio de mercado, costo que podría ser impagable en unos cuantos años, provocando impactos importantes en la economía del mundo entero. Por otro lado, existe una creciente preocupación por la seguridad del suministro a causa de la dispersión geográfica de la oferta y demanda de los principales combustibles (no renovables) del mundo, lo cual tiene importantes implicancias geopolíticas [3, 4].

Considerando el crecimiento poblacional, el incremento de la demanda energética, la dependencia a los combustibles fósiles, particularmente del petróleo, y principalmente las políticas de estado que buscan diversificar la matriz energética, aprovechando recursos de las distintas regiones del país, es que resulta atractivo el desarrollo de Energía Renovable No Convencional (ERN-C).

A diferencia de las energías fósiles, las energías renovables se caracterizan porque en sus procesos de transformación hay una renovación permanente en una escala humana de tiempo. Entre estas fuentes de energías están: la hidráulica, la solar, la eólica, la de los océanos, además de la proveniente de la biomasa y la energía geotérmica [5].

Las energías renovables suelen clasificarse en convencionales y no convencionales, según sea el grado de desarrollo de las tecnologías para su aprovechamiento y la penetración en los mercados energéticos que presenten. En Chile, la energía proveniente de la biomasa se cataloga como ERNC.

La posibilidad de producir combustibles a partir de biomasa, ha proporcionado una alternativa real e importante para la solución de la creciente demanda energética, frente a la carencia de los combustibles fósiles y los problemas medio ambientales que han derivado de su uso.

El etanol es el biocombustible más usado en el mundo, debido principalmente a los niveles de producción en Estados Unidos y Brasil. Según la Agencia Internacional de la Energía (AIE), la producción mundial de etanol alcanzó a 21,8 millones de m^3 en el año 2002, donde el 60% corresponde a Brasil y el 37% a Estados Unidos [5]. Por esta razón, se propone al etanol como el principal biocombustible líquido, y sustituto parcial de combustibles fósiles en el mismo estado de la materia.

El uso de etanol como combustible deriva de una serie de ventajas, entre las que destaca [6, 7]:

- Reducción de hasta un 61% de las emisiones de gases invernadero en comparación con la gasolina, según estudios de la EPA. Esto se debe a que es un oxigenante de las gasolinas, mejorando su octanaje de manera considerable, lo que ayuda a descontaminar nuestras ciudades y a reducir los gases causantes del efecto invernadero.
- El etanol posee un ciclo neto neutro de carbono, pues su producción está relacionada con un ciclo de carbono concurrente, mientras que el petróleo y otros combustibles fósiles son el resultado de un ciclo de carbono no activo.
- El etanol, al ser un aditivo oxigenante, también reemplaza a aditivos nocivos para la salud humana, como el plomo y el MTBE.
- El octanaje del etanol puro es de 113 y se quema mejor a altas compresiones que la gasolina, por lo que da más poder a los motores.
- El etanol actúa como un anticongelante en los motores, mejorando el arranque del motor en frío y previniendo el congelamiento.

El etanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. De este proceso se obtiene el alcohol húmedo, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser secado se puede utilizar como combustible.

Hasta la fecha se han utilizado, principalmente, tres familias de productos para la obtención de etanol:

- Azúcares, procedentes de la caña o la remolacha, por ejemplo.
- Cereales, mediante la fermentación de los azúcares del almidón.
- Biomasa lignocelulósica, por la fermentación de los azúcares contenidos en la celulosa y hemicelulosa.

Los materiales lignocelulósicos son los que ofrecen un mayor potencial para la producción de etanol, en primera instancia, debido a la gran disponibilidad de azúcares fermentables, y en segunda instancia, porque se reutilizan residuos de industrias agrícolas y forestales [8]. Para obtener los azúcares de la biomasa, ésta debe ser tratada con ácidos o enzimas. La celulosa y hemicelulosa son hidrolizadas por enzimas o diluidas por ácidos para obtener sacarosa, que es entonces fermentada. Tres son los principales métodos para extraer estos azúcares: la hidrólisis con ácidos concentrados, la hidrólisis con ácidos diluidos y la hidrólisis enzimática [8].

En la siguiente figura se pueden ver las diferentes formas de procesar las materias primas, en función de su origen, para la obtención de sus azúcares.

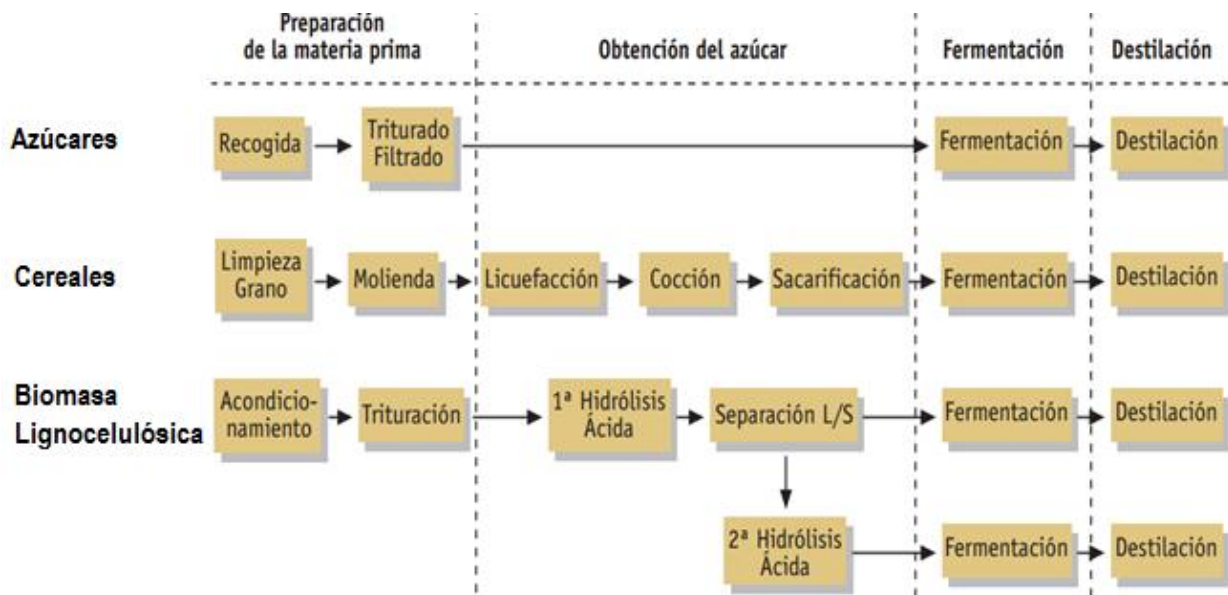


Figura 1.1: Diferentes procesos de producción de etanol [8]

La mayoría de los procesos utilizados actualmente para la producción de etanol incluyen una o varias etapas de sacarificación (hidrólisis). En ésta se produce la liberación de azúcares simples que provienen del material tratado por enzimas específicas y/o agentes químicos. En el caso de la hidrólisis enzimática, las proteínas catalíticas involucradas son: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Una vez obtenidos los monómeros de carbohidratos, se procede a fermentarlos. Es importante destacar que la sacarificación y la fermentación se realizan en etapas separadas para que cada una sea operada en sus condiciones óptimas. No obstante, existen procedimientos que las realizan simultáneamente, obteniendo concentraciones del producto superiores [9]. Finalmente, se procede a la etapa de separación líquido-líquido, enriqueciendo el producto de cabeza, es decir, el etanol.

Como se ilustra en la Figura 1.1, la preparación de la materia prima y la obtención de azúcares son etapas condicionadas al tipo biomasa utilizado. Para el procesamiento de cereales y materia lignocelulósica es necesaria la presencia de más operaciones unitarias (no detalladas en la figura) y procesos de sacarificación, ya sea química o enzimática. La decisión de qué proceso

utilizar dependerá de la tecnología disponible en las distintas plantas de producción. Las tecnologías industriales empleadas para la conversión de azúcares, almidones y celulosa en etanol se consideran maduras y disponibles, con sus propios índices de productividad por unidad de área de cultivada [10]. Además de la búsqueda de nuevas fuentes de biomasa fermentable, también está el desafío de simplificar el proceso.

Los biocombustibles pueden ser clasificados en primera, segunda o tercera generación, de acuerdo al tipo de materia prima.

Los combustibles de primera generación son aquéllos cuya materia prima proviene de cultivos agrícolas que podrían ser utilizados como alimento, con gran contenido de sacarosa y/o almidón. Además, utilizan suelos cultivables, recursos hídricos y fertilizante. La producción de etanol de primera generación consiste, principalmente, en fermentaciones y destilaciones, incluyendo una etapa de hidrólisis para el procesamiento de almidones.

Los combustibles de segunda generación son aquéllos que se elaboran a partir de materias primas ricas en celulosas. Proviene de cultivos agrícolas, pero no poseen valor alimenticio, siendo considerados como residuos. Al igual que los combustibles de primera generación, la producción de etanol implica el uso de suelos cultivables, agua y fertilizantes. Su alto contenido en materia lignocelulósica hace necesaria la inclusión de operaciones unitarias, al inicio del proceso, y de varias etapas de hidrólisis para la extracción de azúcares antes de poder ser fermentadas.

Finalmente, los combustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de biomasa no comestible y de rápido crecimiento, que pueda producir mayor rendimiento y la utilización de menos recursos (entre ellos: suelos cultivables). Dentro de ésta categoría se hallan especies que poseen alguna ventaja para su procesamiento, como árboles con bajo contenido de lignina, o bien cultivos que han sido genéticamente modificados. El procesamiento de este tipo de materia prima aún está en desarrollo. Los combustibles a partir de algas caen en esta categoría, siendo los más estudiados y desarrollados en los últimos años, e inclusive hay autores que indican que sólo estos forman parte de la tercera categoría [11].

Las algas tienen un potencial energético que puede llegar a ser 30 veces mayor que el de los cultivos energéticos en tierra, ya que absorben más energía solar y se reproducen más rápido, en comparación con los cultivos de plantas de cualquier tipo. A partir de algas se puede producir etanol y diesel, ya sea por la fermentación de los azúcares de macroalgas, o bien por la transesterificación de los ésteres de microalgas, respectivamente.

En la actualidad se considera que los carbohidratos son la principal fuente fermentable para la producción de biocombustibles. Sin embargo, la producción actual no es suficiente para abastecer la futura demanda energética. Según los reportes energéticos internacionales del 2010, se proyecta que en el 2035 la masa de azúcar necesaria para abastecer energéticamente al mundo será cercana a los 475 millones de toneladas anuales [12]. El progresivo aumento de la demanda estimada de materia prima (carbohidratos) se puede apreciar en la Figura 1.2.

La principal crítica que ha surgido frente al uso de biomasa para la producción de biocombustibles es el uso excesivo de suelos cultivables, es decir, que podrían ser destinados a la producción de alimentos como respuesta a otro problema de nivel mundial: la pobreza y la hambruna. Adicionalmente, se objeta el uso de agua dulce y fertilizantes [12, 13].

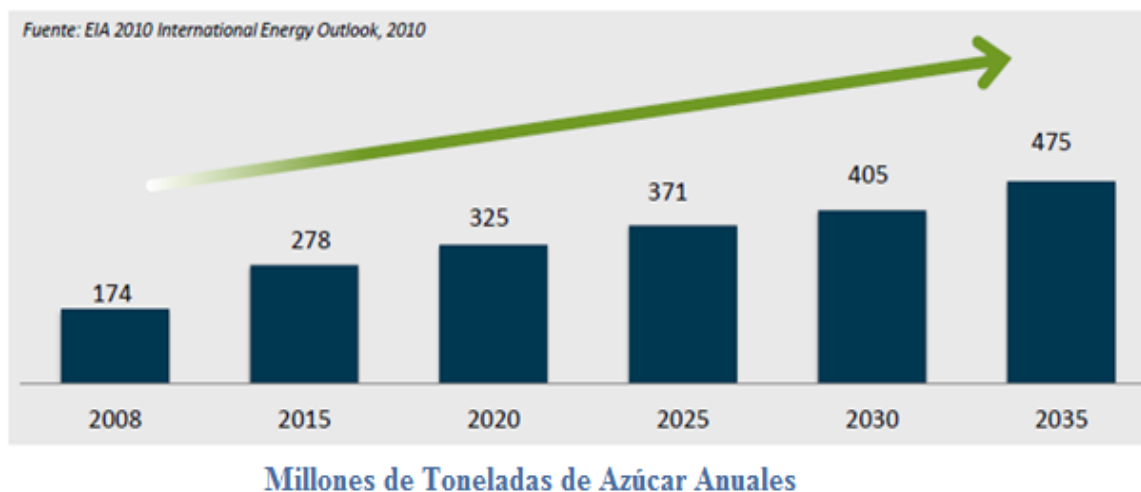


Figura 1.2: Azúcares fermentables necesarios para la producción mundial de biocombustibles y químicos [12, 13]

Considerando los últimos factores expuestos, la producción de combustibles de tercera generación es atractiva, debido a que la materia prima necesaria para la elaboración de los biocombustibles crece en el mar. De esta manera, no compite con terrenos cultivables ni necesita agua dulce para su desarrollo. Inclusive, se ha reportado que su presencia en nichos marítimos es beneficiosa para los océanos, reduciendo el exceso de nutrientes en el mismo y aportando oxígeno al medio ambiente, además de constituir micro hábitats de vertebrados e invertebrados [13, 14, 15].

Chile posee un gran potencial para el desarrollo de ERNC, principalmente para la producción de etanol a partir de macroalgas, gracias a su gran extensión marítima y al desarrollo de la industria acuícola. A pesar de esto, la matriz eléctrica chilena, hasta el año 2008, ha estado dominada por combustibles fósiles, tales como el petróleo (10,76%), el carbón mineral (15,42%) y el gas natural (35, 17%), a lo que se suman grandes represas de generación hidroeléctrica (37,21%) , según los reportes del Ministerio de Energía [4, 16].

Los principales sistemas eléctricos en Chile son el Sistema Interconectado Norte Grande (SING) que cubre las regiones de Arica, Iquique y Antofagasta, con el 23,7% de la capacidad instalada del país, y cuya generación está dominada en un 100% por centrales termoeléctricas. Por otra parte, el Sistema Interconectado Central (SIC), que cubre desde Taltal (al sur de Antofagasta) hasta Chiloé, representa el 75,2% de la capacidad instalada del país, y su composición es 50% generación térmica, 47% hidroeléctrica y solo 3% de energías renovables no convencionales. También existen 2 sistemas interconectados más pequeños en Aysén y Magallanes, que dependen en un 47% y 100%, respectivamente, de combustibles fósiles [16]. La Figura 1.3 ilustra el sistema eléctrico del país al año 2012.

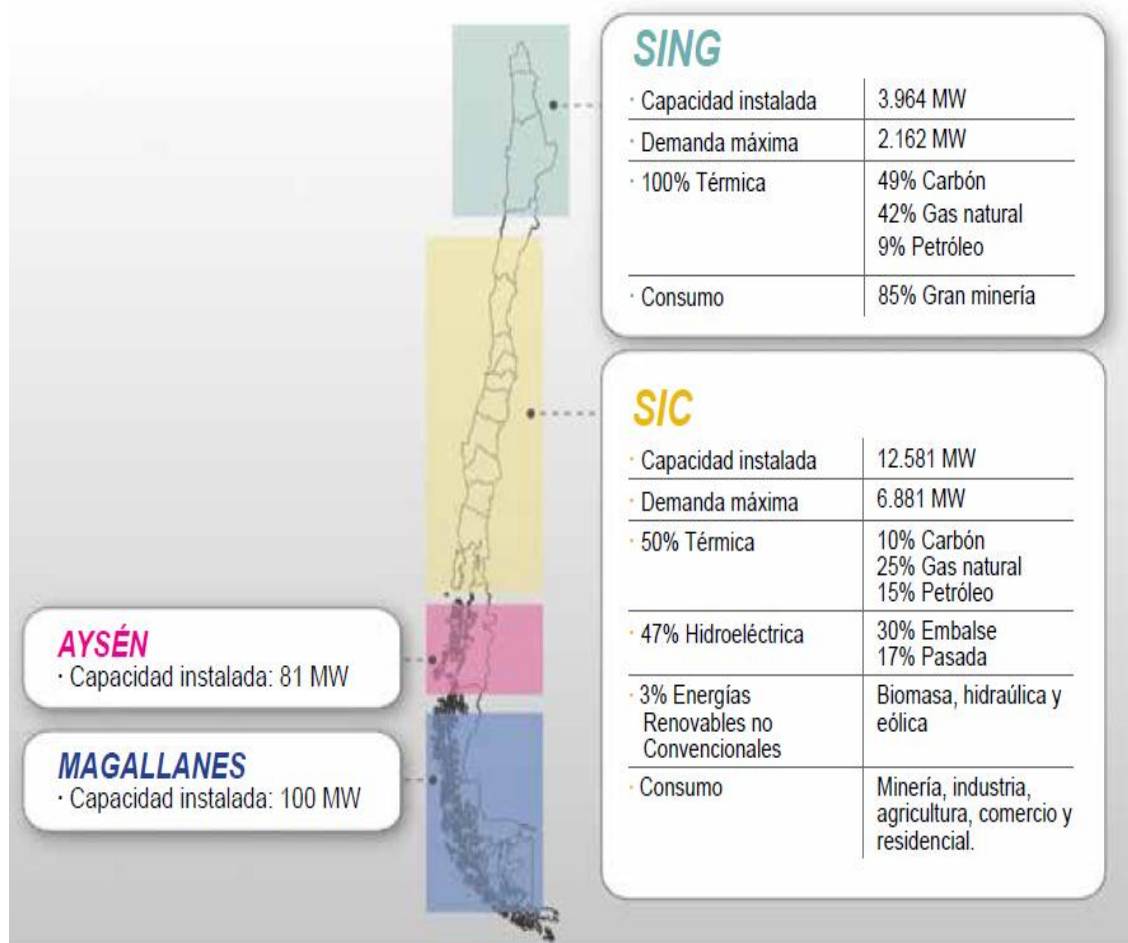


Figura 1.3: Sistemas eléctricos en Chile [17]

Durante el pasado 2011, Chile experimentó un crecimiento en la demanda del 6,8% y 5,2% en relación al año anterior (2010) en el SIC Y SING, respectivamente. Para el año 2020, se proyecta un aumento en las tasas de consumo eléctrico cercanas al 7%, lo que implica cerca de 100 mil [GWh] de demanda total de energía eléctrica a dicho año, lo que requerirá aumentar la oferta, entre los años 2012 y 2020, en más de 8.000[MW] con nuevos proyectos de generación [16].

Por otro lado, la participación de las energías renovables no convencionales en la generación eléctrica del país ha sido marginal, en contraste con el gran potencial que éstas tienen en el territorio nacional. Dicha situación se puede asociar a la baja competitividad económica que poseen respecto de las energías convencionales, y a la ausencia de un marco regulatorio que permitiese eliminar las barreras de su desarrollo en Chile. Ambos aspectos han cambiado en el país, con lo cual se prevé que este tipo de energías aumentarán su contribución a la generación eléctrica de los próximos años [18].

Entre los beneficios asociados a la inclusión de ERNC a la matriz energética de Chile, se puede citar [18]:

- Fuentes autóctonas que contribuyen a la diversificación, disminuyendo con esto la dependencia de fluidos energéticos importados.
- Costos de generación estables. Independientes de costos de derivados del petróleo. Contribuyen a disminuir la incertidumbre del precio a largo plazo de la energía.
- Suministro confiable en escalas temporales largas: Poca variabilidad interanual (eólica, biomasa, geotermia), a excepción de la pequeña hidráulica.
- Menores plazos de maduración y construcción (eólica, biomasa, pequeña hidráulica), a excepción de la geotermia.
- Proyectos pequeños o modulares y distribuidos geográficamente, lo que brinda flexibilidad para adaptarse al crecimiento de la demanda sistémica y local.
- Menor impacto ambiental en términos globales y locales.
- Pueden contribuir a diversificar los giros de negocios de diferentes actividades industriales y agropecuarias (uso de residuos de biomasa).

La política energética nacional pretende conciliar tres objetivos [18, 19]:

- Seguridad de suministro
- Eficiencia económica (precios competitivos)
- Sustentabilidad ambiental en el desarrollo del sector.

El desarrollo de las ERNC en Chile enfrenta una serie de dificultades que han impedido u obstaculizado la materialización de este tipo de proyectos de manera masiva. Entre las más comunes, destaca el alto costo que implica la inversión inicial, las limitadas posibilidades de financiamiento, dificultades en el acceso y conexión a líneas de transmisión y en la suscripción de contratos de largo plazo. Es decir, la utilización de ERNC presenta desafíos económicos y técnicos que deben ser abordados para permitir una transición exitosa de la matriz hacia el uso más intensivo de estas energías.

El Gobierno de Chile tiene el compromiso de impulsar el desarrollo de estas alternativas de suministro en el país, por medio de dos grandes líneas de acción complementarias:

- El perfeccionamiento de la Ley General de Servicios Eléctricos, mediante la inclusión de disposiciones que permitan eliminar barreras comunes que pudiesen afectar la inserción de las ERNC en el mercado eléctrico y acelerar su desarrollo en el país.
- La implementación de instrumentos de apoyo directo a iniciativas de inversión en ERNC, focalizados en la mitigación de las barreras específicas que limitan el desarrollo de cada tipo de ERNC.

Hasta el año 2009, los cambios impulsados para fomentar mejores políticas energéticas apuntaban a mejorar diversas aristas. Entre ellas la institucionalidad, mediante la creación de la Comisión Asesora Interministerial en materia de biocombustibles, cuya función es asesorar en acciones, planes políticos y medidas para el desarrollo de la cadena de valor de biocombustibles en Chile y su inclusión en el mercado nacional [20]. Además se amplió y fortaleció las capacidades de los servicios fiscalizadores de combustibles (Ley N° 20.239, misiones, capacitaciones). Finalmente, se consolidó el conocimiento y las capacidades en gestión de

proyectos en biocombustibles de los profesionales en ministerios y servicios públicos (misiones, visitas técnicas, seminarios, cursos, manuales) [2].

Por otro lado, se pretende fortalecer el Marco Regulatorio y Normativo de los biocombustibles, instaurando cambios en el Decreto Supremo N° 11/2008 que permitieron que la gasolina automotriz pueda mezclarse con biocombustibles en un 2% ó 5%, previa autorización del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Adicionalmente, mediante la circular N° 30 del 16 de mayo de 2007 del Servicio de Impuestos Internos se exime al bioetanol y biodiesel del pago de impuesto específico que afecta a la gasolina y al diesel [2, 20].

Además, la Resolución Exenta N° 746 de la Superintendencia de Electricidad y Combustibles norma técnicas para análisis y/o ensayos para bioetanol y biodiesel; la Resolución Exenta N° 142/2009 de Economía incorpora a los biocombustibles en la cadena de producción, distribución y venta de combustibles líquidos en el país; y el Decreto N° 160/2009 de Economía promueve la seguridad de instalaciones y personas que operan biocombustibles [20].

La ley 20.257 de fomento a las Energías Renovables No Convencionales establece una meta de un 10% de ERNC al 2024 (en los marcos nominales comprendidos por esa regulación jurídica). Sin embargo, se plantea avanzar en el diseño e implementación de mecanismos de promoción alternativos, al igual que en la construcción de proyectos piloto, de modo de obtener más del doble de participación de las ERNC en la matriz energética chilena en la próxima década [16].

Considerando las medidas expuestas, se consiguió para el año 2011 un aumento en los centros dedicados a la producción de ERCN, tal como lo ejemplifica la siguiente figura. En ella se puede apreciar en qué estado estaban los proyectos de generación: En calificación; con Resolución de Calificación Aprobada (RCA), pero sin construir; En construcción; y En operación.

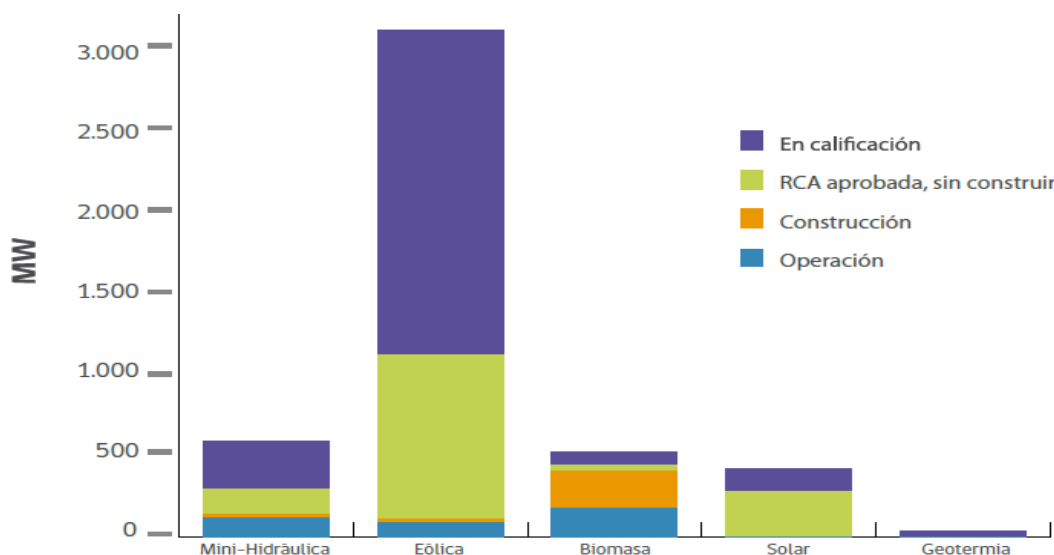


Figura 1.4: Estado de Centros de Energías Renovables [16]

La potencia energética que representan las ERNC, actualmente se distribuye en los sistemas eléctricos en un 36% de parques eólicos (572 MW), 29% de centrales a biomasa (461 MW), 21% mini hidráulicos (337 MW), 11% solar (176,4 MW) y 2,7 % a Biogás (43 MW) [21]. La evolución de la capacidad de las ERNC en Chile se muestra en la Figura 1.5, donde se aprecia que las mayores alzas en capacidad están representadas por la energía a partir de biomasa y por la energía eólica. Además, la potencia generada durante los últimos años es significativamente mayor que la producida hace 10 años.

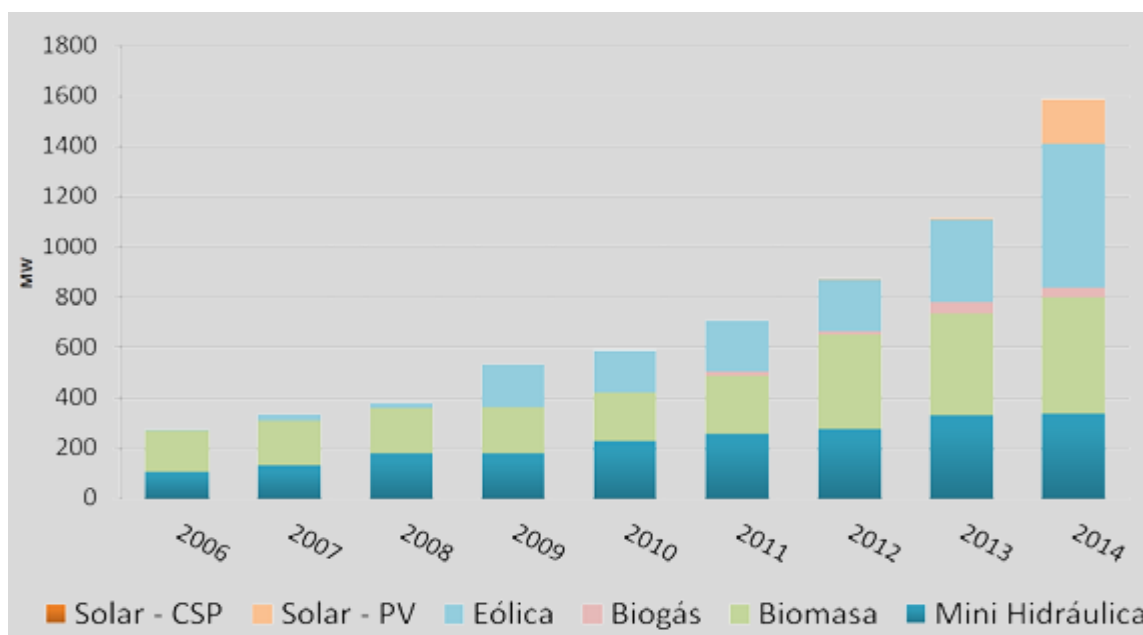


Figura 1.5: Evolución de la capacidad instalada ERNC [MW] al 2014 [21]

La figura muestra dos tipos de energía solar: la energía Solar-CSP y la Solar-PV. La primera se refiere a la energía obtenida por las Centrales Solares Termoeléctricas mediante el uso de espejos para concentrar la energía solar (*Concentrated Solar Power*), de modo de calentar un fluido generador de vapor, el cuál ingresa a turbinas. Por otro lado, la energía Solar-PV se refiere a la energía obtenida directamente de la radiación solar utilizando celdas fotovoltaicas [22].

De acuerdo con los antecedentes presentados, el estudio y desarrollo de centros dedicados a la producción de energía a partir de la biomasa son atractivos y prometedores, bajo el contexto internacional y por sobre todo nacional. Específicamente, Chile posee vastos territorios costeros para el desarrollo de granjas de algas, cuyo cultivo y cosecha son de bajo costo. Así, esta alternativa de producción de energía a partir de biomasa se ve favorecida frente a otras opciones.

Las macroalgas son una especie de algas marinas compuestas en gran medida por polisacáridos, incluso se estima que el 60% de su peso seco son carbohidratos [23]. Dentro de sus usos comerciales está la producción de productos químicos mediante procesos fermentativos. Sin embargo, la mejor forma de aprovechar su alta fracción de carbohidratos es la producción de etanol.

Una característica muy importante de las macroalgas es que no liberan compuestos nitrogenados o sulfurados al ambiente, lo que le confiere una ventaja con respecto a otras formas de producción de energía como el petróleo y sus derivados. Además, es importante mencionar que posee un bajo contenido de lignina, facilitando el pretratamiento de la biomasa, debido a que la celulosa y la hemicelulosa no presentan mayor resistencia a la hidrólisis. De esta manera, el cultivo de macroalgas y su posterior procesamiento es una opción atractiva para la producción de biocombustibles de tercera generación en Chile, razón que promueve el estudio que esta memoria presenta.

1.2 Marco Teórico

1.2.1 Macroalgas

Las macroalgas marinas son vegetales cuyo cuerpo está representado por un talo (organismos sin vascularización). Son en su mayoría bentónicas, es decir, viven adheridas a un sustrato. Son autótrofas, lo que significa que realizan fotosíntesis. Al igual que las plantas, muchas especies de macroalgas tienen una pared celular rígida basada en celulosa, y además acumulan almidón como principal compuesto de almacenamiento intracelular. Como se mencionó anteriormente, algunas algas marinas comprenden hasta un 60% de polisacáridos, entre los cuales están los carbohidratos de la pared celular, polisacáridos intracelulares y de almacenamiento [23, 24]. Éstos pueden ser convertidos en azúcares fermentables.

Aunque la glucosa, galactosa y manosa (hexosas) están presentes en muchos polisacáridos y tienen una fórmula idéntica, poseen propiedades y formas moleculares distintas, ya que la disposición espacial de sus átomos y los enlaces que forman permiten la conjugación de una gran variedad de polisacáridos. Lo mismo ocurre con las pentosas (xilosas y arabinosas) y las desoxihexosas (ramnosa y fucosa). La gran concentración de sacáridos presentes en las algas marinas corresponde sólo a variedad acotada de las posibles estructuras presentes en la naturaleza. La evolución ha permitido que dichas estructuras otorguen, a las algas, una ventaja adaptativa en el ambiente donde son encontradas. Algunas estructuras sirven como reserva de nutrientes, y otras como componentes estructurales de la pared celular, pero muchas tienen otras funciones que aún no han sido identificadas [25].

Las macroalgas se pueden clasificar en tres grandes grupos; las algas verdes (División Chlorophyta), las algas pardas (División Phaeophyta) y las algas rojas (División Rhodophyta).

Algas Verdes: Es un grupo muy heterogéneo de algas con clorofila a y b, algunas xantofilas, tales como luteína, violaxantina, neoxantina y enteroxantina; con esta composición de pigmentos el cuerpo del alga se ve verde, lo que permite una fácil identificación en terreno. Una característica biológica importante es que almacenan almidón como material de reserva en los cloroplastos. Morfológicamente son muy variadas, desde algas unicelulares a pluricelulares complejos. Se pueden reproducir en forma alternada vegetativa, asexual o sexualmente. Su pared celular está compuesta principalmente por celulosa, aunque en algunos casos se pueden identificar otros polímeros o la presencia de calcio [26]. Son muy importantes porque constituyen

el primer eslabón en la cadena alimenticia de su hábitat y contribuyen al aporte de oxígeno atmosférico. Son algas que han colonizado todos los ambientes, encontrándose el 90% de las especies en agua dulce y el 10% restante en aguas marinas, siendo en los mares fríos y templados donde se produce la mayor variedad de especies.

Algas Rojas: Estas algas son predominantemente marinas, aunque algunas especies son de agua dulce. La presencia de biliproteínas (ficoeritrina y ficocianina, principalmente) contribuye a enmascarar el color verde de la clorofila a y b, otorgándole su color rojo o rosado. La mayoría de estas algas son multicelulares y macroscópicas, aunque también hay especímenes unicelulares. Constituyen el grupo más diverso entre las algas bentónicas. Acumulan almidón como material de reserva y su pared celular posee una matriz mucilaginoso. Ésta se compone de fibrillas de celulosa, galactanos sulfatados (agar) y carrageno. No poseen flagelo en ninguna etapa de su vida y además, poseen ficobiliproteínas que les permiten absorber longitudes de onda azul y verde, los que penetran las capas más profundas del mar, propiciando su desarrollo a profundidades de más de 200 [m] [26].

Algas Pardas: La coloración parda, de tonalidad muy variable, se debe a la presencia de una gran cantidad de xantofilas, entre las que destacan flavoxantina y fucoxantina (pigmento que le da el color pardo o marrón). Además poseen clorofila a y c. Son algas eucariotas, pluricelulares y de morfología heterogénea, cuyas estructuras pueden ser filamentosas de estructura sencilla, o bien formar tejidos diversificados, por los que se hace necesario que desarrollen un sistema de transporte de los productos fotosintéticos (principalmente manitol) al interior del organismo. Se desarrollan en agua de mar y preferentemente en regiones templadas, siendo muy abundantes en costas rocosas, especialmente en aguas frías agitadas y bien aireadas. Estas algas son importantes productores primarios, formando verdaderos bosques submarinos, los que constituyen un ambiente favorable para numerosos animales marinos. Generalmente, este tipo de algas es de crecimiento rápido y de gran tamaño, pudiendo alcanzar hasta los 200 [m] de largo (algas gigantes o *kelps*). La pared de las algas pardas está compuesta de celulosa y una capa exterior de ácido algínico y el polisacárido fucoídina. Estos polisacáridos mucilaginosos son de importancia comercial. En algunas especies los alginatos pueden constituir hasta el 20-40% del peso seco del alga. Estos compuestos son químicamente complejos, por lo que no es rentable su síntesis química, y por lo tanto, se siguen extrayendo de algas recolectadas en la naturaleza [26].

La *Macrocystis pyrifera* es un tipo de macroalga parda nativa de Chile. Actualmente es foco de estudio, tanto ecológica como comercialmente, siendo la principal candidata para la producción de etanol en Chile. Geográficamente, no solo está en las costas chilenas, sino que también en las peruanas, sudafricanas y australianas. En el hemisferio norte se encuentra desde Alaska hasta California y también está presente en las costas atlánticas, es por ello que se dice que tiene distribución bipolar y antitropical [14]. Se han reportado cambios en su composición química dependiendo de la estación del año en que se desarrollen, y también si es que crecen en un sector protegido o no del oleaje [15, 27, 28, 29, 30]. Su tasa de crecimiento es aproximadamente 30-80 [toneladas de peso seco/Ha/año].

Los carbohidratos de *Macrocystis pyrifera* han sido caracterizados mediante metanólisis ácida e hidrólisis ácida (Dra. M^a Cristina Ravanal “comunicación personal”). La Tabla 1.1

muestra la caracterización de carbohidratos [mg/g de masa seca] realizado en la Universidad de Abo Akademi (Finlandia) a una muestra extraída en la Región de Los Lagos en el mes de diciembre (2013). En ésta se aprecia que alginato, glucosa, fucosa y manitol son los carbohidratos de mayor presencia en la composición química del alga. Para efectos de este estudio, el análisis se centrará en manitol y, principalmente, en alginato.

El manitol es un polialcohol, cuya función en las macroalgas es servir como osmorregulador, además de ser un monosacárido de reserva [28, 31].

Tabla 1.1: Caracterización de *Macrocystis pyrifera*

	mg/g de masa seca
Alginato	218,9 ± 27,40
Arabinosa	0,770 ± 0,130
Fucosa	16,66 ± 0,900
Fructosa	ND ± ND
Galactosa	10,73 ± 1,590
Ácido Galacturónico	0,170 ± 0,030
Glucosa	81,52 ± 10,00
Glucosa (no celulósico)	5,220 ± 1,300
Glucosa (celulósica)	76,30 ± 11,30
Ácido Glucurónico	6,570 ± 1,260
Manitol	15,99 ± 1,610
Manosa	5,960 ± 0,870
Ramnosa	0,820 ± 0,030
Xilosa	3,170 ± 0,230
Total	361,3 ± 23,82

Los alginatos son polisacáridos presentes en la pared celular de las algas pardas y se estructuran en cadenas lineales de polímeros compuestos por dos tipos de monómeros: el ácido β – D – manurónico (M) y el ácido α – L – gulurónico (G). Éstos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4). La configuración de dichos bloques otorga una geometría molecular que confiere al polímero propiedades de hidrocoloide y reactividad frente al calcio, que permite ser utilizado como espesante y gelificante en industrias alimenticias, farmacéuticas, textiles, entre otras [31].

1.2.2 Microorganismo: *Escherichia coli* BAL 1611

Las macroalgas tienen un alto porcentaje de carbohidratos que no son fermentables directamente, los alginatos. Desarrollar tecnologías que permitan la utilización de dicha masa, permite que el proceso de producción de etanol sea mucho más atractivo y conveniente de realizar en Chile. Bajo este contexto es que Wargacki y su equipo emprendió la búsqueda y diseño ingenieril de un microorganismo capaz de metabolizar este polímero, sin la necesidad de pretratamientos químicos, ni términos, además de eliminar etapas de sacarificación previas a la fermentación [32]. De esta manera, el proceso disminuiría sus costos de producción y se simplificaría, siendo fructífero para el desarrollo de biocombustibles.

En la naturaleza existen microorganismos capaces de metabolizar el alginato, como *Sphingomonas sp.*, u otros que pueden ser aislados de cultivos con algas [32]. Sin embargo, las cepas nativas obstaculizan el desarrollo optimizado de la ingeniería genética, debido a que se desconocen su metabolismo, condiciones de fermentación, entre otras. Eludiendo dichas limitaciones y enfocándose en el potencial de las macroalgas, es que se decidió utilizar un microorganismo bien caracterizado como lo es *Escherichia coli*. Ésta es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes [33, 34]. Adicionalmente, *E. coli* tiene la capacidad natural de metabolizar manitol y glucosa [32].

La enzima alginato liasa, es responsable de la despolimerización del alginato en oligómeros. El primer paso es generar una vía eficiente de secreción de dichas enzimas para la rápida degradación del polímero. Para ello se utilizó una enzima proveniente de *Pseudoalteromonas sp.* Luego se diseñó un sistema para el transporte y metabolismo de alginato a partir de uno encontrado en *Sphingomonas sp.* Finalmente se introdujo una vía heteróloga para la producción de etanol, a partir de dos enzimas de *Zymomonas mobilis* [32].

Con este microorganismo modificado es posible fermentar alginato, manitol y glucosa simultáneamente, ya que el consumo de alginato revierte el desbalance redox que ocasiona el catabolismo de manitol (exceso de equivalentes reductores).

La siguiente figura muestra una representación esquemática del diseño ingenieril realizado en *E. coli* para la captación y degradación de alginatos [32].

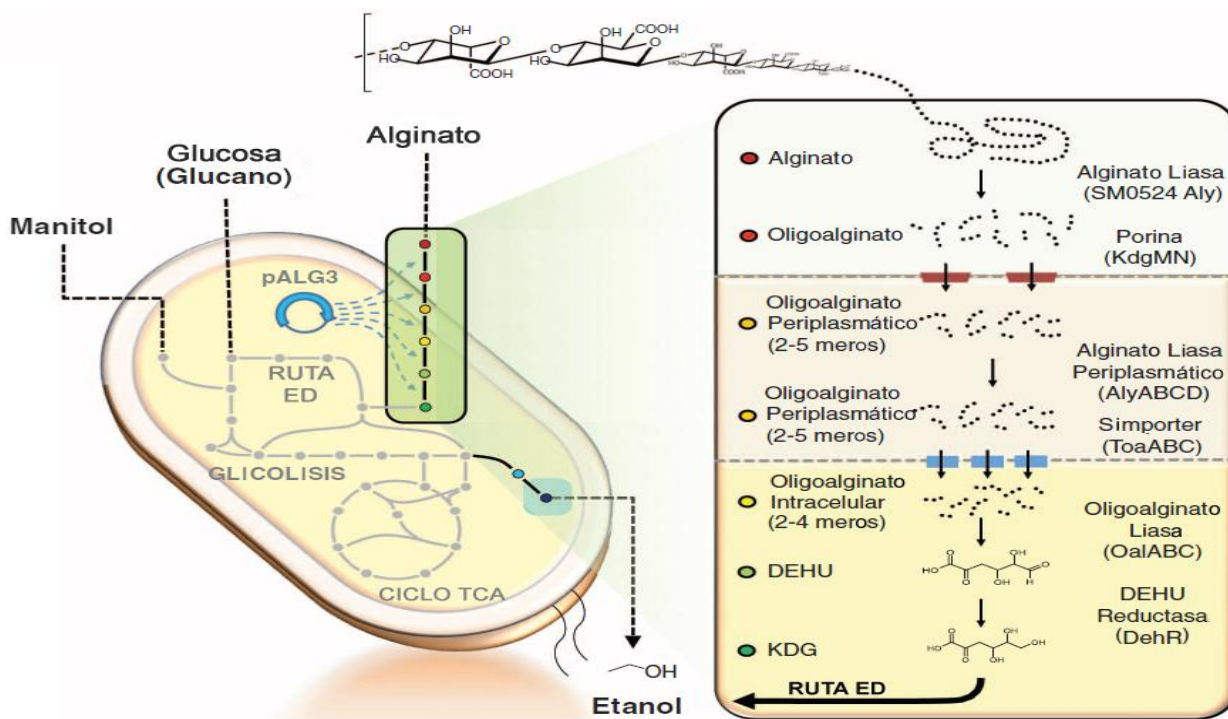


Figura 1.6: Diseño de la plataforma microbiana para la producción de biocombustibles y compuestos químicos a partir de macroalga [32]

El polímero de alginato es catalizado por la enzima alginato liasa en oligómeros, éstos son transportados mediante porinas al espacio periplásmico de las células, donde los oligómeros con un grado de polimerización (DP) > 3 son degradados hasta di-, tri-, y tetrámeros por alginato liasas periplásmicas (AlyABCD). Posteriormente son transportados al citoplasma a través de los transportadores de membrana (To aABC). A continuación, las oligoalginato liasas degradan los oligómeros a la unidad monomérica (DEHU). DEHU es convertido por DEHU reductasa (DehR) a 2-ceto-3-desoxi-D-fosfogluconato (KDG), que entra en la ruta de *Entner-Doudoroff* [32]. Las vías de degradación de carbohidratos del microorganismo BAL 1611 están detalladas en el Anexo A5.

La ruta de *Entner-Doudoroff* (ED) es una vía alternativa que cataliza glucosa a piruvato. Está presente en un número reducido de microorganismos procariontes, carentes de la ruta de *Embden-Meyerhoff* (EM). Ésta última está presente en eucariontes y procariontes, metabolizando la glucosa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, a diferencia de la primera que es utilizada sólo por aerobios. Las vías glucolíticas varían en su secuencia de reacción y en la cantidad de ATP que producen por unidad de glucosa metabolizada [35].

Las vías de EMP y ED son las vías glucolíticas bacterianas más comunes, y sus esquemas generales son muy similares, tal como lo muestra la Figura 1.7 [36, 37].

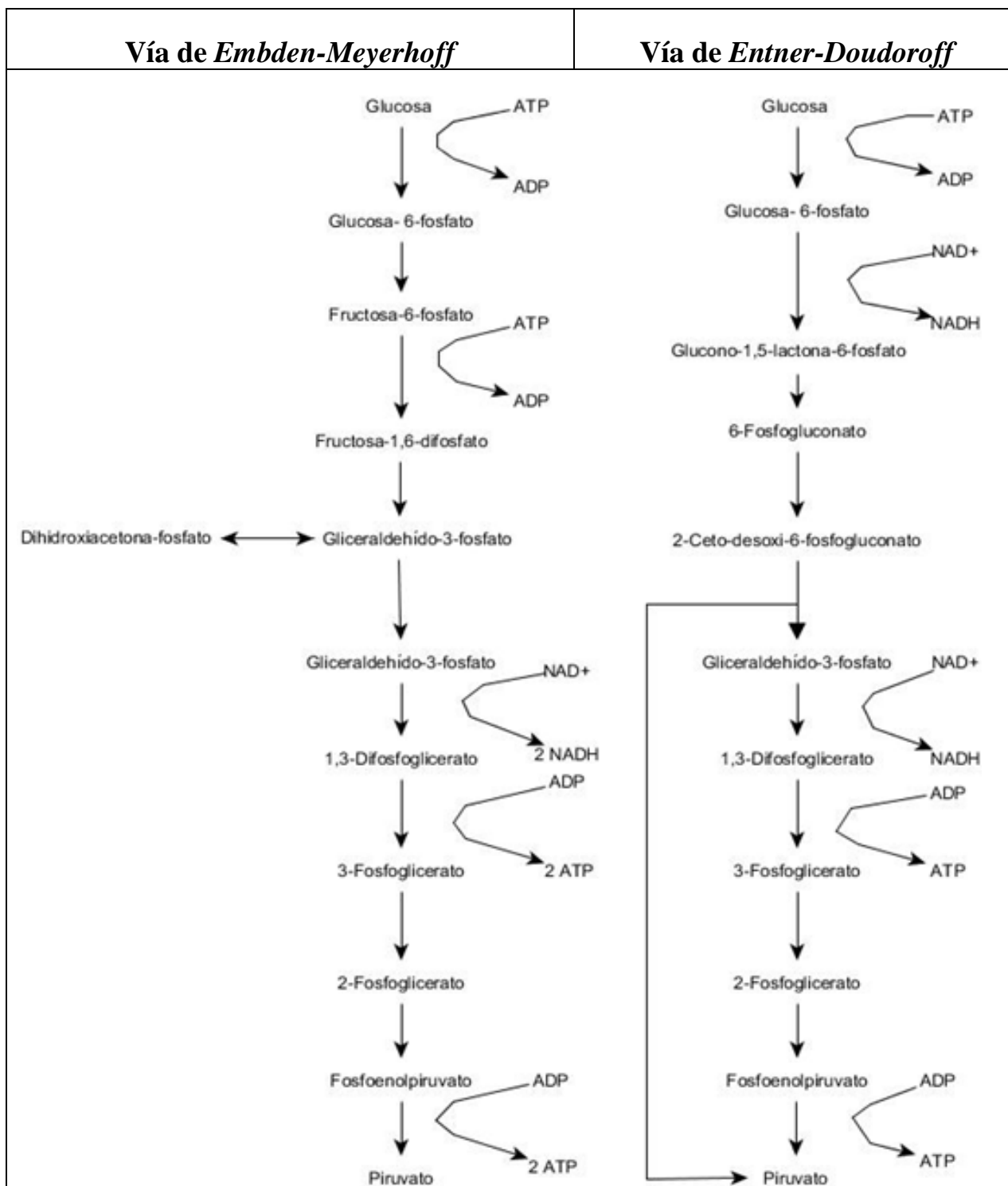


Figura 1.7: Comparación de vías glicolíticas [38, 39]

Autores han planteado que la prevalencia de la ruta ED, se debe a una compensación entre el rendimiento de la vía energética (producción de ATP) y las enzimas necesarias para la catálisis

del flujo de glucosa en la vía. El número de enzimas empleadas en la vía ED es considerablemente menor al número de enzimas usadas para alcanzar la misma tasa de conversión en la vía EM [35, 36, 37].

1.2.3 Fermentación

El proceso principal para la producción de etanol es la fermentación [40]. Este proceso consiste en una serie de reacciones que permiten degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión global se representa mediante la reacción (1):



Este proceso catabólico de oxidación incompleta es realizado principalmente por microorganismos, con el fin de producir energía a partir de un compuesto carbonado.

En términos estequiométricos parece ser una transformación simple, pero la secuencia de reacciones para degradar la glucosa es un proceso complejo, pues al mismo tiempo el microorganismo utiliza el sustrato y nutrientes adicionales para su mantención y reproducción. Una manera eficiente de evaluar el proceso es mediante el rendimiento biomasa/sustrato y el rendimiento producto/ sustrato.

- Rendimiento biomasa/substrato ($Y_{x/s}$): masa de microorganismo generado por unidad másica de sustrato consumido
- Rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$): masa de producto sintetizado por unidad másica de sustrato consumido.

El rendimiento teórico de etanol y CO_2 es de 0,511 [g] y 0,489 [g], respectivamente por 1 [g] de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, el microorganismo utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico [40]. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico [40]. Otro parámetro importante es la productividad [g/h/l], la cual se define como la masa de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen.

Para poder obtener un buen rendimiento en la fermentación es necesario analizar algunos parámetros del microorganismo, tales como tasa de fermentación, tolerancia al etanol, tolerancia a la temperatura, temperatura óptima de operación, pH óptimo de operación, posible inhibición por producto, etc. De esta manera, el proceso se puede operar en condiciones que favorezcan la producción de etanol [41].

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo de título es evaluar las condiciones de fermentación de carbohidratos de macroalgas pardas para optimizar su bioconversión a etanol, mediante el uso de cepas de microorganismos genéticamente modificados.

Se busca determinar máximos experimentales, por medio de fermentaciones con reactivos comerciales, que puedan ser comparados e implementados en procesos de producción de biocombustible de tercera generación, buscando productividades rentables para el desarrollo de la industria.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar diferentes razones entre alginato y manitol (carbohidratos de interés) que representen el rango en que podría variar la composición de macroalgas pardas.
- Realizar fermentaciones con reactivos comerciales que simulen la composición química de macroalgas pardas.
- Evaluar la velocidad de crecimiento del microorganismo genéticamente modificado (BAL 1611), rendimiento de biomasa y de producto en distintas razones de alginato-manitol.
- Evaluar parámetros biológicos y rendimientos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.
- Desarrollar un modelo fenomenológico, basado en balances de masa y realizar un ajuste de parámetros a partir de los datos experimentales.
- Verificar y analizar la factibilidad de fermentar algas pardas.
- Diseñar un protocolo de fermentación.

2. Metodología

2.1 Metodología General

Para la realización de este estudio fue necesaria una primera etapa exploratoria, en la cual se analizó el crecimiento y comportamiento del microorganismo. Para ello, se tomó una muestra del stock congelado a -80°C de la cepa BAL 1611 y se cultivó durante la noche en tubos de ensayo con medio enriquecido LB (*Luria-Bertani*) a 37°C y con una agitación de 250 [rpm]. De éste se amplió el stock para los estudios sucesivos y se inocularon matraces de Erlenmeyer de 500 [ml] que contenían el mismo medio suplementado con las distintas fuentes de carbono de interés (glucosa, alginato y manitol) para estudiar el comportamiento del microorganismo. Una vez finalizado el experimento, se calculó que el tiempo de crecimiento de la bacteria en un medio rico, 250 [rpm] de agitación y a 37°C era, aproximadamente, de 8 [h].

Según los protocolos de Wargacki, las fermentaciones se realizaron en medio mínimo M9 (ver Anexo A1) por lo que la segunda etapa exploratoria consistió en observar el crecimiento en el mismo, suplementado con glucosa y con la razón de alginato-manitol propuesta en la misma publicación [32]. Con estos ensayos, se pudo determinar que el tiempo de crecimiento es alrededor de 12 [h], permitiendo la planificación, en términos de tiempo de fermentación, de la fase experimental necesaria para concluir la investigación.

La fase experimental consistió en dos etapas, cultivos aeróbicos y micro-aeróbicos, cuyo análisis de datos deriva en una fase computacional y estadística, tal como lo esquematiza la Figura 2.1. Al igual que en la segunda fase exploratoria, ambos cultivos se realizaron en medio mínimo M9, el cual contiene sales (ver Anexo A1) que proporcionan a las bacterias elementos esenciales como magnesio, nitrógeno, azufre y fósforo para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Éste debe ser suplementado con una fuente de carbono, para este estudio: alginato y manitol. Al tratarse de un medio que provee los nutrientes mínimos indispensables para el microorganismo, se puede visualizar directamente el efecto de las fuentes de carbono utilizadas en el crecimiento celular, puesto que en ausencia de ésta el microorganismo no proliferaría, a diferencia de lo que ocurre en medios enriquecidos, en los cuales la fuente de carbono es dispensable.

Inicialmente se realizaron cultivos aeróbicos para estudiar el crecimiento del microorganismo, el consumo de alginato y manitol, y la producción de etanol. No obstante, dado la condición facultativa de *E. coli*, se decidió analizar la factibilidad de realizar estas fermentaciones en condiciones anaeróbicas. Ésta última condición es difícil de ejecutar, en términos estrictos, por lo que se realizaron fermentaciones en condiciones micro-aeróbicas. Otras justificaciones para estudiar fermentaciones en ausencia de oxígeno se detallan en la sección 2.3.4.

Las fermentaciones realizadas utilizaron reactivos comerciales (alginato de sodio y D-manitol), de grado analítico, estableciendo, de esta manera, un máximo experimental en los comportamientos de consumo y producción de la bacteria. Al tratarse de sustratos puros y siendo los únicos presentes en el medio, se puede apreciar el desarrollo del microorganismo sólo en base a éstos, dejando de lado otros factores relacionados a sustratos complejos, como las macroalgas. Además, permite relacionar libremente ambos carbohidratos, lo cual no necesariamente se puede

observar en la composición de algas pardas, puesto que cada especie de macroalga posee alginato, manitol y otros carbohidratos en proporciones fijas. Al trabajar con reactivos comerciales se puede determinar qué proporción de alginato y manitol es necesaria para obtener la óptima producción de etanol, independiente de si esta relación se puede encontrar en la composición natural de las algas.

Adicionalmente, se realizaron fermentaciones sobre *Macrocystis pyrifera* (alga parda), en condiciones aeróbicas, con la finalidad de cuantificar la producción de etanol y compararla con el máximo experimental medido sobre sustratos puros, y así estudiar, *grosso modo*, la factibilidad de que una planta productiva realice, efectivamente, la bioconversión de carbohidratos de alga parda a etanol a escala industrial.

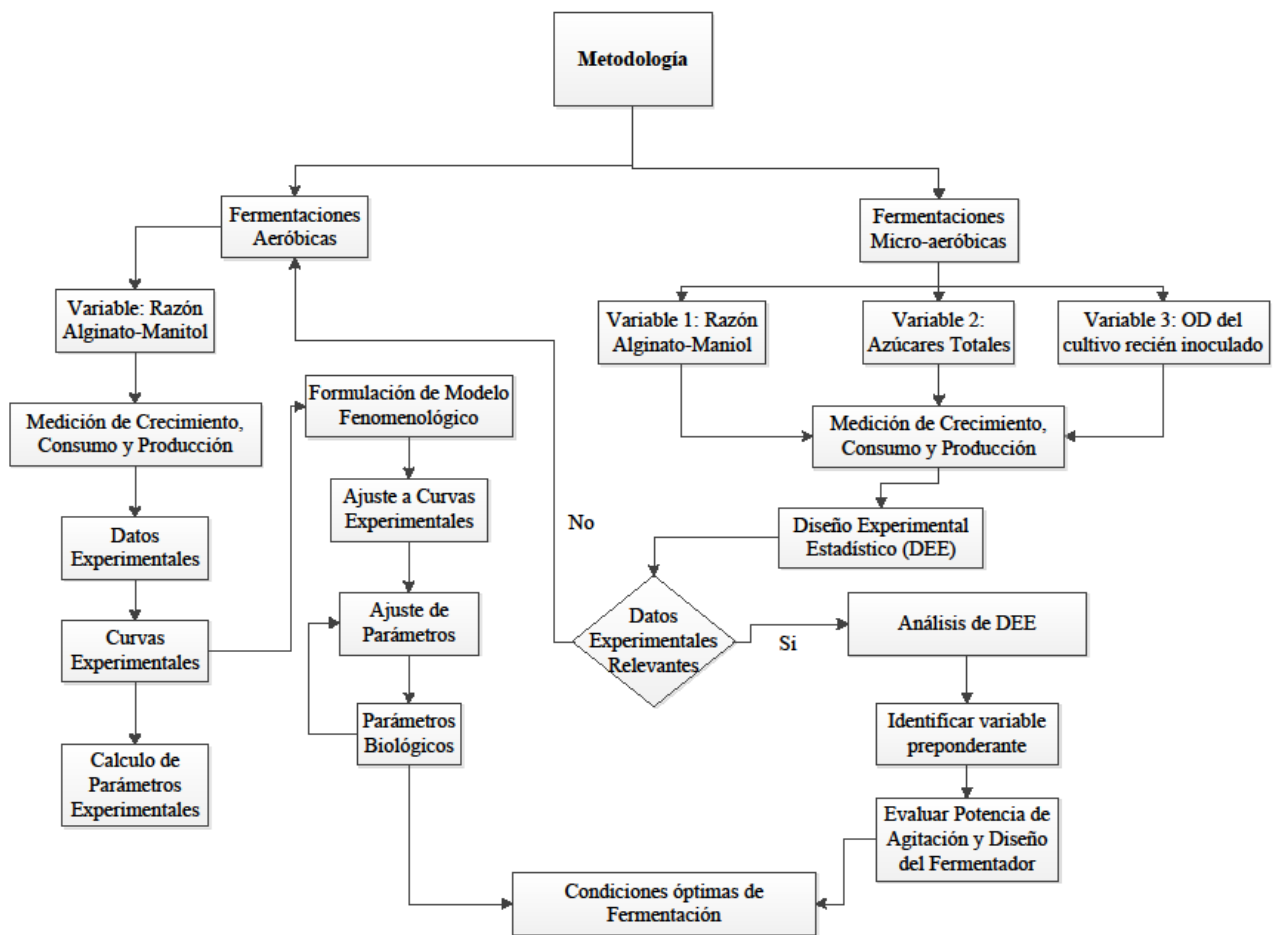


Figura 2.1: Esquema de la Metodología

Es importante destacar que la temperatura de fermentación, la agitación y el pH inicial del cultivo no se consideraron como variables, fijando su valor para todos los experimentos presentados en esta memoria. Con ello, no se analizaron los procesos de transferencia de calor, ni de oxígeno. Esta medida se adoptó de modo de simplificar el análisis, ya que disminuye las

variables en estudio. Además, las fermentaciones se realizaron a escala de laboratorio, en matraces de 500 [ml], los que se incubaron y agitaron en condiciones óptimas para el crecimiento de *E. coli*, es decir a 37 [°C] y 250 [rpm], respectivamente. Con la agitación, el cultivo se mantiene homogéneo, a igual temperatura y bien oxigenado, por lo que la transferencia de calor y de oxígeno no son limitantes. Si se deseara escalar el proceso, entonces las transferencias de masa y energía sí son importantes.

Los protocolos para las fermentaciones en matraces de 500 [ml], se adaptaron de los enunciados por Wargacki, manteniendo constante la masa de carbohidratos totales en el caso de las fermentaciones aeróbicas, mientras que para los cultivos micro-aeróbicos la concentración de carbohidratos total se modificó se modificaron, según el diseño experimental estadístico (ver sección 2.3.6 [32]. La densidad óptica de las fermentaciones fue medida durante 12 [h], tomando muestras del cultivo en intervalos de 1[h].El muestreo podría aumentar o disminuir su frecuencia, de acuerdo a la velocidad de crecimiento de los cultivos, siendo el intervalo inferior a 1[h] si la velocidad de crecimiento observada es mayor. De igual manera, se adaptaron los protocolos a las fermentaciones con algas, considerando el contenido de carbohidratos en peso seco.

Los protocolos utilizados para la preparación de medio mínimo, medio enriquecido, fase móvil para la cuantificación mediante *High-performance liquid chromatography* (HPLC) y el método de medición de azúcares (ver Anexo A1) fueron facilitados por estudiantes de doctorado del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), lugar dónde se realizó este estudio, y no fueron modificados, puesto que se adaptaban perfectamente a lo que se necesitaba preparar y medir.

Las razones de alginato y manitol escogidas para realizar esta investigación se muestran en la Tabla 2.1. Éstas fueron escogidas con la finalidad de cubrir, de manera discreta, el rango en que estos carbohidratos pueden variar en distintas especies de algas pardas, incluyendo los puntos extremos no reportados en caracterizaciones de las mismas [42].

Tabla 2.1: Condiciones de Crecimiento % en P/V

Proporción	100%	10:3	8:5	5:8	3:10	0%
Alginato	2,6%	2%	1,6%	1%	0,6 %	0%
Manitol	0%	0,6%	1%	1,6%	2%	2,6 %

En consecuencia, trabajar con distintas razones de alginato-manitol permite comparar y encontrar un óptimo en el cual fermentar y comprobar la factibilidad de producir a mayor escala. Además estas condiciones permiten verificar si es necesario suplementar el cultivo y cuánto alginato es realmente procesado. Finalmente, en estudios anteriores (Wargacki et al., 2012) se indica que es posible obtener etanol fermentando una razón 5:8 de alginato-manitol, no especificando el porqué, ni dando indicios de haber probado con otras combinaciones. De esta manera, el estudio realizado complementa y da nuevas perspectivas a lo reportado.

2.2 Materiales y Equipos

A continuación se enuncian los materiales y equipos más relevantes durante la ejecución de este trabajo. Otros reactivos y materiales de laboratorio utilizados se detallan en el Anexo A1, junto a los protocolos empleados.

2.2.1 Materiales

- **Cepa Bacteriana:** Se utilizó una cepa de *E. coli* (BAL 1611) genéticamente modificada para procesar alginato y manito, y producir etanol. Ésta es de propiedad de BAL Chile S.A.
- **Medio Mínimo:** Se utilizó un medio compuesto por las siguientes sales:

Tabla 2.2: Reactivos y Proveedores

Reactivo	Proveedor
Fosfato de potasio mono básico (KH_2PO_4)	MERCK
Fosfato de disodio (Na_2HPO_4)	MERCK
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	MERCK
Cloruro de sodio ($NaCl$)	MERCK
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)	WINKLER
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	MERCK

- **Fuentes de Carbono:** Se utilizó alginato de sodio, D-Manitol y D-(+)-Glucosa, todos reactivos comerciales distribuidos por Sigma-Aldrich.
- **Columna Cromatográfica AMINEX® HPX-87H:** Columna para el análisis de hidratos de carbono en solución con ácidos carboxílicos, ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, cetonas, y metabolitos neutros. El fabricante es BIO-RAD.
- **Software de Análisis:** Para el análisis de datos y ajuste del modelo fenomenológico se utilizó los *softwares* MATLAB y Excel.

2.2.2 Equipos

- **Cromatografía HPLC (*High pressure liquid chromatography*):** El equipo que se utiliza es de SHIMADZU y es un sistema moderno que optimiza los resultados de un sistema HPLC convencional. Posee un sistema de cuatro bombas peristálticas (LC-20AB), de las cuales se utiliza sólo una; un horno con ventilador (CTO-20AC) para mantener la temperatura de la columna constante; un detector de índice de refracción (RID-10A), y además posee un muestreador automático (SIL-20AC) con una bandeja temperada a 4°C para poner un máximo de 70 muestras. Las distintas partes del equipo son dirigidas por un

controlador (CBM-20A). La comunicación entre el equipo y el usuario se realiza mediante el *software LCsolution Workstation*.

- **Espectrofotómetro *Ultrospec 3000***: El equipo es de PHARMACIA BIOTECH y es un equipo de alta gama para luz visible y UV. Posee un rango de medición de 190 a 1100 [nm] en intervalos de 0,1 [nm]. Dispone de 6 carriles dispuestos en forma de carrusel para cubetas transparentes de plástico, vidrio o cuarzo. En este equipo se midió la densidad óptica a 600 [nm].

2.3 Metodología Experimental

2.3.1 Preparación de Materiales

Los medios, ya sea enriquecido o mínimo, se prepararon en agua destilada, de acuerdo a los protocolos detallados en el Anexo A1. De igual manera, se preparó *stocks* concentrados de glucosa, alginato, manitol y de las sales con las que se debía suplementar el medio M9. Una vez preparadas las soluciones se esterilizaron en el autoclave a 121[°C] y a una presión de 101 [KPa] sobre la presión atmosférica durante 40 [min] (el ciclo total de esterilización dura 60 [min]). Junto con las soluciones, también se esterilizó el material de vidrio a usar, en este caso: matraces de Erlenmeyer de 500 [ml], tubos de ensayo y puntas para pipetas de 10, 200, 1000, 5000 [µl].

2.3.2 Preparación de Stock de Bacterias y Preinóculo

Se partió con un *stock* en un tubo *Eppendorf* de 1,5 [ml] con 1[ml] de la bacteria BAL1611 congelada a -80[°C], propiedad de BAL Chile S.A., para fines investigativos. Con este *stock* se realizó un primer cultivo de 5 [ml] en un tubo de ensayo que contenía medio LB estéril. Bajo mechero se tomó el *stock* de células y con una pipeta p200 se raspó el medio congelado hasta asegurarse que la punta estuviera impregnada y se inoculó el tubo. Luego se deja crecer durante la noche a 37 [°C] y con una agitación de 250 [rpm]. Al día siguiente, en condiciones de esterilidad, se toma 700 [µl] del medio y se depositan en un tubo *Eppendorf* de 1,5 [ml]. Posteriormente, se le agrega 300 [µl] de glicerol al 100% p/v y se agita suavemente con la mano. Finalmente, se guarda a -80[°C]. Se puede realizar más de un *stock* de células, según se estime conveniente, en este caso se congelaron 3 tubos con células.

La metodología descrita para el cultivo en el tubo de ensayo sirve para preparar un preinóculo, adecuando el medio en el que se crecerá el microorganismo y suplementando con lo que sea necesario. En este caso era preciso adicionar la fuente de carbono en distintas razones de alginato-manitol, dependiendo del cultivo que se estudiaría, puesto de que esta manera, la bacteria se adapta simultáneamente al cambio de estado (de reposo congelada a activo en suspensión) y a la condición en la que está creciendo, disminuyendo los tiempos *lag* del cultivo en matraz.

2.3.3 Fermentaciones Aeróbicas

Las fermentaciones en condiciones aeróbicas se realizaron a 37[°C] y con una agitación de 250 [rpm] en matraces de Erlenmeyer de 500 [ml] con medio mínimo y suplementado con las distintas razones de alginato-manitol (ver Anexo A3), tal como se puede apreciar en la Figura 2.2. Es importante destacar que la capacidad del matraz se escoge de acuerdo al volumen del cultivo con el que se desea trabajar, considerando que éste debe ocupar un quinto de la capacidad del matraz para permitir un buen intercambio de gases.



Figura 2.2: Matraces con cultivos fermentados

Para cada una de las razones de alginato-manitol enunciadas en la Tabla 2.1, se realizó fermentaciones en triplicado, en las que se siguió el crecimiento del microorganismo, midiendo la densidad óptica de cada cultivo a 600 [nm] (D_{600}) con periodicidad durante 12 [h]. Cada punto medido fue graficado en el tiempo, obteniéndose curvas experimentales con las que luego se pudo determinar parámetros experimentales para la velocidad de crecimiento (μ), rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$), rendimiento de producto ($Y_{y/s}$) y un error asociado. Los gráficos obtenidos se pueden consultar en el siguiente capítulo y los datos en el Anexo A6. La metodología utilizada para el cálculo de parámetros experimentales se detalla en el Anexo A3.

Durante la fermentación, se tomó 2 [ml] del medio para cuantificar el consumo y la producción. Al finalizar los cultivos, se tomó una muestra de 5 [ml] para poder medir el consumo y producción al tiempo $t=12$ [h]. Todas las muestras fueron centrifugadas a 3.000 [G -Force] durante 5 [min]. A continuación se extrajo el sobrenadante y se congelaron a -20 [°C], para luego procesarlas.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento se midió durante 12 [h], tiempo en que se llega al estado estacionario. Sin embargo las curvas de consumo y de producción quedan incompletas en dicho tiempo. Por esta razón, se realizó cultivos que fermentaron durante 48 [h], midiendo principalmente entre $t=12$ [h] y $t=48$ [h].

2.3.4 Fermentaciones Micro-aeróbicas

Tal como se indicó en la metodología general, se realizaron fermentaciones en condiciones micro-aeróbicas, por las razones que se enunciarán a continuación. Lo primero que se debe aclarar es que la interrogante a dilucidar era el comportamiento de los cultivos en condiciones anaeróbicas, puesto que estudios previos (Wargacki *et al.*, 2012) habían indicado, dentro de su metodología de fermentación, que luego de 5 [h] de crecimiento de la bacteria en condiciones aeróbicas, el cultivo se debía mantener bajo condiciones anaeróbicas [32]. Sin embargo, para tener cultivos estrictamente anaeróbicos es necesario extraer todo el oxígeno dentro del cultivo, tanto gaseoso como disuelto en el medio, y mantenerlo en las mismas condiciones durante toda la fermentación. Particularmente, para el último punto es necesario saturar con nitrógeno el medio, desplazando el oxígeno disuelto del mismo. Esto último se hubiese podido lograr con los equipos disponibles en el laboratorio en que se trabajó. No obstante, al tomar muestras para cuantificar el estado del cultivo, era altamente probable que se perdieran las condiciones anaeróbicas, por lo que se decidió trabajar con cultivos micro-aeróbicos (ver Figura 2.3), cuya diferencia radica en que disponen del oxígeno disuelto en el medio, relajando las condiciones de anaerobiosis estricta.



Figura 2.3: Cultivos Micro-aeróbicos

Dado el carácter facultativo del microorganismo, es que no se debería tener mayor problema al cambiar las condiciones de cultivo. Inclusive, se podría esperar que en estas condiciones la producción de etanol se viese favorecida, ya que las enterobacterias, como la *E. coli*, en ausencia de oxígeno llevan a cabo procesos fermentativos [43, 44]

Por otro lado, obtener resultados favorables en cultivos micro-aeróbicos permitiría disminuir la potencia de agitación a tal punto de garantizar que sólo las condiciones se mantengan homogéneas dentro del reactor y que los procesos de transporte no se vean afectados. Esto, en términos económicos, se traduce en un potencial ahorro al momento de pensar el proceso a escala industrial. Finalmente, y bajo este mismo contexto, dependiendo de los resultados obtenidos, se podría evaluar la fermentación como composición de dos reactores, uno enfocado principalmente al aumento de la biomasa (*Fed-Batch*) y otro a la producción de etanol (Continuo).

Estas fermentaciones se llevaron a cabo en viales de 150 [ml] sellados herméticamente, tal como lo muestra la Figura 2.3. Las condiciones de los cultivos se determinaron mediante un diseño experimental estadístico (ver sección 2.3.6). Todos los experimentos se realizaron en medio mínimo a 37[°C] y con una agitación de 250 [rpm], durante 96 [h]. Se decidió operar bajo dichas condiciones, ya que así se hacen comparables con las fermentaciones aeróbicas, aunque se podría haber agitado menos; y porque así el tiempo de cultivo más largo considera la disminución de velocidad del metabolismo en condiciones micro-aeróbicas.

Los viales fueron esterilizados previamente, y bajo mechero se les adicionó el medio y se inocularon, siendo posteriormente sellados. Se tomaron muestras para medir crecimiento, consumo y producción cada 3 [h] el primer día; cada 5 [h] el segundo día y cada 8 [h] el tercer y cuarto día, utilizando jeringas estériles de 3 [ml]. El crecimiento y tratamiento de muestras es análogo al mencionado en la sección anterior.

2.3.5 Fermentación de Algas

Como se planteó anteriormente, esta investigación tiene como fin último encontrar condiciones óptimas para la bioconversión de carbohidratos de algas pardas en etanol. Hasta ahora se ha estudiado el comportamiento del microorganismo en condiciones experimentales favorables, dado que la fuente de carbono ha sido dada por reactivos de análisis, cuyas moléculas y polímeros son relativamente accesibles a la acción bacteriana. Sin embargo, el sustrato de las fermentaciones a gran escala son las algas pardas, cuyos carbohidratos no están tan expuestos y su composición varía de acuerdo a la estación del año [27, 28, 29, 30]. Bajo este contexto, se hace fundamental analizar el comportamiento fermentativo a escala de laboratorio, como primer indicio de lo que podría suceder a escala piloto e industrial, disminuyendo la incertidumbre del proceso.

Los experimentos realizados con alga se detallan a continuación:

Algas con Pretratamiento	Algas sin pretratamiento
<ul style="list-style-type: none"> • Sólo alga • Con enzimas (alginato liasas y oligoalginato liasas) • Con enzimas y suplementada con manitol comercial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo alga • Con enzimas (alginato liasas y oligoalginato liasas) • Con enzimas y suplementada con manitol comercial • Suplementada con manitol comercial

Figura 2.4: Experimentos con *Macrocystis pyrifera*

Se fermentó 1[g] de *Macrocystis pyrifera* (cosechadas en diciembre de 2013) en condiciones aeróbicas, a 37[°C] y con una agitación de 250 [rpm]. El preinóculo se desarrolló en un tubo de ensayo, tal como en caso de las fermentaciones aeróbicas. Los cultivos se mantuvieron durante 72 [h] y se realizaron en duplicado.

Las algas sin pretratamiento son directamente extraídas del mar, cuyo único tratamiento previo fue el secado, mientras que el pretratamiento permite una exposición de los carbohidratos del alga para facilitar su procesamiento. Para ello el alga fue tratada con una solución de ácido sulfúrico al 2%, tal como lo indica el protocolo en el Anexo A1.

Es importante destacar que en cultivos a los que se les adicionó enzimas, en este caso alginato liasas y oligoalginato liasas, se produjo el proceso de sacarificación y fermentación simultánea, ya reportada para el aprovechamiento de biomasa en la bioconversión a etanol [9].



Figura 2.5: Fermentaciones de *Macrocystis pyrifera*

De acuerdo a la caracterización de *Macrocystis pyrifera* realizado por la Dra. M^a Cristina Ravanal (ver Tabla 1.1), se sabe que la cantidad de manitol presente en el alga es baja, si se compara proporcionalmente con el alginato, y dada su importancia en la fermentación (contribución de poder reductor), es que se decidió suplementar los medios con manitol comercial hasta alcanzar una razón similar a las que se trabajaron en las fermentaciones con reactivos comerciales.

Las diferentes condiciones en las que se fermentaron las algas podrían simplificar o complejizar la etapa de bioconversión de carbohidratos, quitando o agregando etapas en pos de una mayor productividad.

Se tomó muestras a las 0, 3, 6, 10, 18, 24, 48 y 72 [h] de cultivo. El crecimiento no se pudo cuantificar mediante absorbancia, debido a la turbiedad que las partículas de alga

suspendidas le daban al cultivo, teniendo que recurrir a la siembra y conteo en placa. La cuantificación de consumo y producción se realizó mediante HPLC.

Una vez finalizadas las fermentaciones, se colectaron los restos de alga. Éstos fueron secados a 100[°C] por 12 [h] y luego fueron masados.

2.3.6 Diseño Experimental Estadístico

Esta metodología se utilizó para diseñar el set de experimentos necesarios para estudiar la producción de etanol en condiciones micro-aeróbicas. A diferencia de los cultivos aeróbicos, en los que la única variable era la razón de alginato-manitol, en las fermentaciones micro-aeróbicas hay más de una variable a considerar. Lo primero es saber si el microorganismo es capaz de crecer en dichas condiciones. Si puede hacerlo, entonces el problema es análogo a las fermentaciones aeróbicas y basta con cuantificar la masa de etanol producida para tomar una decisión.

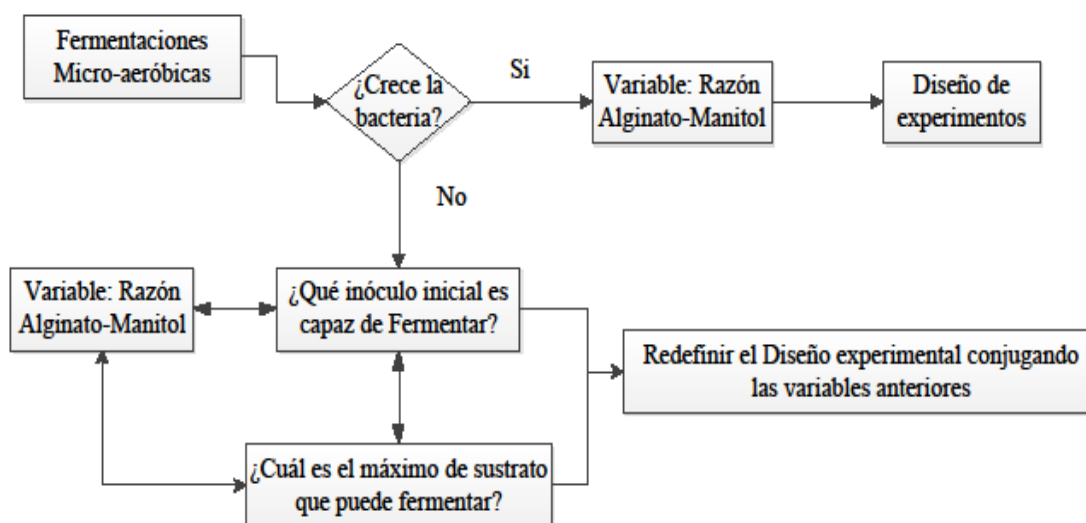


Figura 2.6: Diagrama de decisión para el diseño de experimentos micro-aeróbicos

No obstante, si la bacteria no es capaz de crecer, entonces aparecen nuevas interrogantes, tal como lo esquematiza la Figura 2.6. Cada una de estas variables puede no solo influir en la variable de respuesta (etanol), sino que también tener un efecto significativo en las demás variables de entrada. Para conocer dicho efecto sería necesario definir para cada variable una serie de condiciones y combinarlas factorialmente, lo cual se traduce en una gran cantidad de experimentos. El diseño experimental estadístico es un procedimiento eficaz para la planificación de experimentos que maximiza la información que se puede obtener a partir de una determinada cantidad de pruebas, cuyos datos experimentales se someten a estudios estadísticos para dar validez a las conclusiones.

El primer paso es identificar los factores (variables de entradas), nivel de los factores, los factores fijos (cofactores), los factores de ruido y la respuesta deseada.

Los factores son las variables de entrada al sistema controladas por el experimentador. Éstos se encuentran en un rango, que él mismo define, dentro del que pueden variar. Para el diseño experimental es necesario definir los niveles (dentro del rango) en el que variará el factor. En este caso se escogió un diseño de dos niveles: alto (+1) y bajo (-1).

Los factores fijos son variables de entradas fijas y controladas, mientras que los factores de ruido son entradas no controladas al sistema. La siguiente figura esquematiza el proceso y las variables mencionadas.

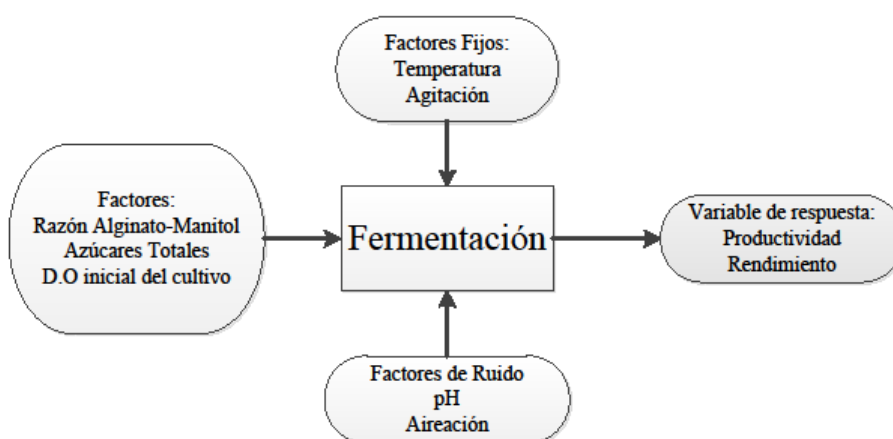


Figura 2.7: Esquemización de los distintos factores que afectan al proceso y la variable de respuesta

Una vez definido los factores y el nivel, se determina el tipo de diseño que se ocupará. Esta decisión dependerá de la cantidad de factores y del objetivo del diseño. En este caso el número de factores es 3 (ver Figura 2.7) y el objetivo es identificar qué factor es el más importante, por lo cual se desarrolló un diseño factorial completo de dos niveles. Esto significa $2^3 = 8$ experimentos, que al realizarlos en duplicado (para disminuir el error) e incluir 3 puntos centrales (para obtener la curvatura entre los distintos niveles), da un total de 19 experimentos. Es importante mencionar que, es estricto rigor, el número de repeticiones, en este caso 2, está condicionado a la varianza observada en los experimentos. Si ésta resulta ser grande, entonces el número de repeticiones aumenta, conforme se avanza con la experimentación. La siguiente tabla resume los factores utilizados, sus valores superiores, inferiores y centrales.

Tabla 2.3: Factores del Diseño

Factores		Valor inferior (-1)	Valor superior (+1)	Valor central (0)	Unidad
D.O inicial	X_1	5%	50%	25%	% V/V
Azúcares Totales	X_2	0,50%	2%	1%	% P/V
Razón Alginato-Manitol	X_3	3:10	10:3	5:8	A:M

Los valores mostrados en la Tabla 2.3, no corresponden exactamente a los valores extremos de las variables, ya que no tendría sentido analizarlos. Por ejemplo, no se observaría mucho si se define un 0% [p/v] de azúcares totales. Es por ello que los valores extremos fueron establecidos según los criterios del experimentador y para darle sentido a la experimentación.

Para generar el diseño factorial de 2 niveles se completa la primera columna (de izquierda a derecha) comenzando con un (-1) y se alterna el signo hasta completar todo el set de experimentos. Para la segunda columna se completa con un (-1) en la primera y segunda posición, y luego se alterna el signo con las dos corridas siguientes hasta completar el set de experimentos. La regla general es completar la columna i -ésima con repeticiones de 2^{i-1} de (-1), seguida por las mismas repeticiones de (+1).

Tabla 2.4: Diseño Factorial Completo de 2 niveles

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Luego de ejecutar el diseño y de cuantificar los datos, se analiza e interpreta los datos, mediante el modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + \beta_{123} \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 + \epsilon \quad (1)$$

El análisis estadístico se puede realizar con ayuda de un *software*, como por ejemplo *Statgraphics 5.1*. Este programa sirve para determinar la significancia de los factores y para desarrollar un modelo ajustado a los datos obtenidos mediante la experimentación, el cual, al ser optimizado, permite determinar las condiciones óptimas para las variables de salida.

2.3.7 Cuantificación de Datos Experimentales

Los datos experimentales fueron registrados en el *software* Excel. Éste permitió graficarlos en el tiempo, y así obtener las curvas experimentales. Para los datos de crecimiento, este proceso fue directo. Teniendo los datos de densidad óptica y la curva de calibración de absorbancia vs biomasa, se obtiene la biomasa en el tiempo.

Los parámetros experimentales asociados a la biomasa fueron obtenidos mediante una regresión lineal y estimando la biomasa en estado estacionario por gramo de sustrato para la velocidad de crecimiento y rendimiento de biomasa, respectivamente. Dado que los cultivos se realizaron en triplicado, se obtuvieron distintos valores para el mismo parámetro, por lo que para obtener un valor representativo, se calculó el promedio y la desviación estándar para cada razón de alginato manitol en la que se midió el parámetro. Los valores obtenidos se graficaron con su error asociado (desviación estándar) para visualizar cualitativamente la razón de carbohidratos en que el parámetro era óptimo. Este procedimiento fue realizado para la velocidad de crecimiento, rendimiento de biomasa y rendimiento de etanol.

Para la cuantificación de datos asociados al consumo y a la producción, fue necesario procesar las muestras tomadas de los cultivos mediante cromatografía, específicamente *high performance liquid chromatography* (HPLC). Esta técnica permite cuantificar la concentración de compuestos orgánicos, en este caso azúcares y alcoholes, mediante el índice de refracción de la muestra, reflejando dicha magnitud en un pico cromatográfico (ver Figura 2.8). Para ello, se usó una columna AMINEX® HPX-87H de BIO-RAD y un detector de índice de refracción (RID-10A de SHIMADZU).

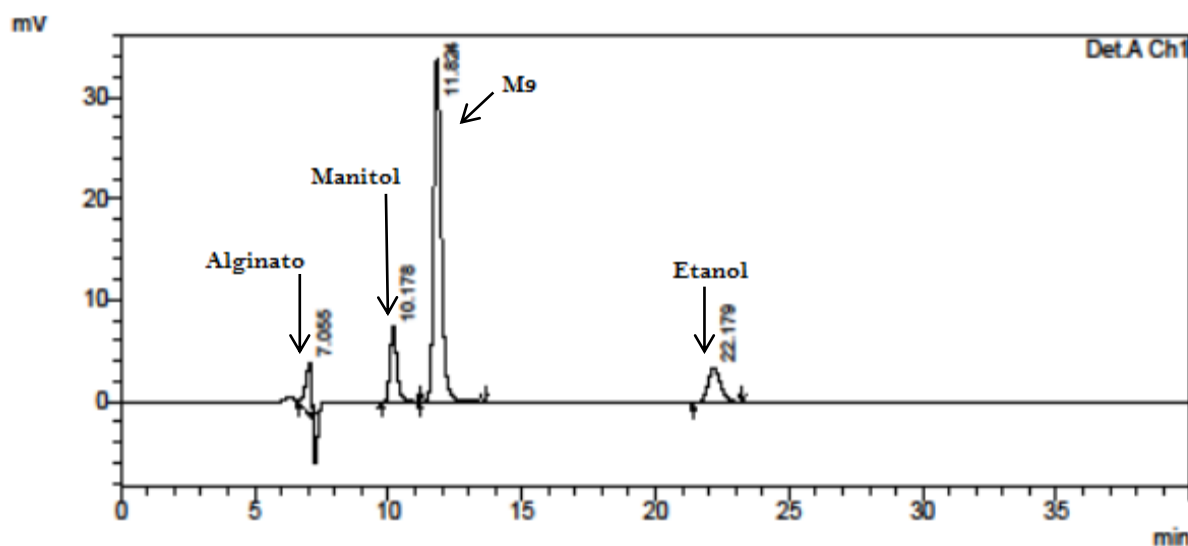


Figura 2.8: Cromatograma

El análisis de las muestras se lleva a cabo en forma automatizada por el equipo de HPLC, para lo cual sólo es necesario preparar las muestras a medir. Se debe escoger un máximo de 70 muestras por *batch* que se deben retirar del congelador a -20 [°C] para ser descongeladas, filtradas y puestas en viales con sus respectivas tapas y septas. Cada vial es puesto en la bandeja del muestreador del equipo y se define en su *software* el programa para el orden y volumen de muestreo a inyectar. Las condiciones de operación del HPLC son las siguientes:

- Fase móvil: Ácido Sulfúrico 5 [mM]
- Velocidad del flujo: 0,5[ml/min]

- Temperatura: 45 [°C]
- Volumen inyectado: 10 [μl] por muestra
- Tiempo de inicio: 0 [min]
- Tiempo de detención: 45[min]

Antes inyectar las muestras es necesario realizar una curva de calibración para asociar el área del pico medido por el HPLC con concentraciones conocidas de alginato, manitol y etanol. Esta transformación permite saber la concentración de azúcares y alcohol en las muestras tomadas a distintos tiempos. Estos valores se tabulan en *Excel*, y son graficados para obtener las curvas experimentales y los parámetros asociados.

Para mejorar la resolución de los picos cromatográficos, particularmente para el caso de alginato, fue necesario diluir las muestras con agua ultra pura en un factor 5 antes de filtrarlas y ponerlas en los viales. Luego, la concentración obtenida para cierta muestra debe ser ponderada por el factor de dilución, de modo de obtener la concentración real de la misma.

2.3.8 Curva de Calibración *D.O*₆₀₀ vs Biomasa

Se realizó una curva de calibración que relaciona la biomasa del cultivo con la densidad óptica medida, con la finalidad de obtener un valor aproximado de la masa de las bacterias a medida que iban duplicándose. Para ello se realizó un cultivo aeróbico con una razón 5:8 de alginato-manitol, en las condiciones antes especificadas.

Durante la fermentación (12 [h]) se tomaron 5 puntos. A cada uno de ellos se les midió la densidad óptica a 600 [nm] y se centrifugaron 5 [ml] de cultivo en tubos *Eppendorf* de 1,5 [ml] secados durante 12 [h] en una estufa a 60[°C]. En un tubo Falcon de 15 [ml] se depositó una alícuota de 5 [ml], correspondiente al punto medido; luego con una pipeta p1000 se deposita en el tubo *Eppendorf*, previamente secado, rotulado y masado, 1[ml] de la muestra. Se centrifuga a 3000 [*G-Force*] por 5 [min] y luego se descarta el sobrenadante. Posteriormente, se alícuotó otro [ml] y se repitió el procedimiento hasta tener el pellet concentrado de los 5 [ml]. Éste se lava 2 veces con agua ultra pura para removerle las sales del medio, se centrifuga nuevamente, descartando el sobrenadante y se puso a secar hasta que su masa fuera constata, es decir por aproximadamente 24 [h].

Finalmente los tubos con biomasa fueron masados, restándoseles el valor del tubo seco, obteniéndose la biomasa en gramos de masa seca por mililitro. Con estos datos y la absorbancia se construyó la curva de calibración.

2.3.9 Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram para observar la morfología de las bacterias en las distintas razones de alginato-manitol en cultivos aeróbicos. Para ello, se dejó crecer a los

microorganismos en tubos de ensayo durante la noche, se tomó una muestra y se aplicó el protocolo de tinción detallado en el Anexo A1.

2.3.10 Siembra en Placa

Como se mencionó en la sección 2.3.5, no fue posible medir el crecimiento de las bacterias en los cultivos con algas pardas. Dentro de la investigación, es sumamente importante poder definir hacia dónde se dirige el flujo de masa consumida (biomasa, mantenimiento o producto), por lo que no se puede dejar de medir esta variable. Frente a la dificultad, se recurrió al método de siembra en placa.

Como primer paso, se preparó el medio, mezclando LB con agar-agar (ver protocolo en Anexo A1). Luego de esterilizarlo y antes de que solidifique, se deposita en placas Petri en una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación. Con las placas listas, se puede sembrar tomando un volumen de 50 [μl] de la muestra y esparciéndolo suavemente por toda la superficie de la placa con un rastrillo estéril. Luego, se incuba en una estufa a 37[°C] durante 12 [h]. Es importante para esta metodología que las unidades formadoras de colonias (UFC) estén en el rango de 30-300 por placa. Por esta razón es que se realizaron diluciones seriadas y de éstas se tomó el volumen que se desea sembrar.

Para saber qué dilución se debe ocupar en cada punto, se utilizó la curva de calibración desarrollada para la cepa *E. coli α-Select Gold Standard* de *Bioline* [45] que relaciona la densidad óptica con las [UFC/ml]:

$$y \left[\frac{UFC}{ml} \right] = 10^8 \cdot x [D.O_{600}] \quad (2)$$

Suponiendo que la absorbancia de la muestra es similar a la $D.O_{600}$ de un cultivo aeróbico en el mismo tiempo, se calcula la cantidad de colonias presentes en 1[ml] y se estima el factor de dilución necesario para que en la placa haya de 30 a 300 [UFC]. El ejemplo de cálculo está en el Anexo A3.

2.4 Metodología de Modelamiento

Se utilizó un modelo semifísico de base fenomenológica para abordar el problema. Mediante un conjunto de ecuaciones se expresa las características esenciales del proceso en términos matemáticos. La descripción cualitativa del proceso está dada por un conjunto de hipótesis que dan forma a las ecuaciones, mientras que los parámetros asociados a éstas permiten que la forma básica de las mismas se ajuste al comportamiento observado en la realidad. Dicho esto, es claro que el modelo es una representación de la realidad.

Por lo general, en procesos químicos y biotecnológicos se pueden obtener y relacionar las variables más significativas mediante balances de masa, energía y moméntum.

En una fermentación, los comportamientos a modelar son: la biomasa, el sustrato limitante (puede ser más de uno), el producto, el oxígeno y el calor, fundamentalmente. La modelación incluye la descripción cinética del microorganismo y del biorreactor.

La ecuación general de conservación aplicada a un sistema dinámico, tiene la siguiente expresión para cada entidad dentro del biorreactor:

$$\left(\text{Velocidad de acumulación} \right) = \left(\text{Velocidad de transporte} \right) + \left(\text{Velocidad neta de conversión} \right) \quad (3)$$

La microcinética del proceso está representada por el último término, el cual incluye el consumo y la producción dentro del sistema. El crecimiento del microorganismo puede ser modelado con distintos niveles de complejidad. En este caso, se empleó un modelo no estructurado, en el que la velocidad específica de crecimiento (μ) representa el estado fisiológico de la población microbiana [46].

El objetivo de este modelo es predecir el comportamiento dinámico de las concentraciones de biomasa, sustrato y producto en un cultivo por lote, considerando las cinéticas de reacción, que se asumen como etapa limitante, y excluyendo los fenómenos de transferencia de calor y masa. Posteriormente, la conducta del modelo se ajusta y compara con los datos experimentales, de modo de obtener los parámetros del modelo.

Para la realización de este modelo, se tomaron los siguientes supuestos:

- Se considerará un sistema homogéneo (una fase, líquida)
- La fase líquida se considera continua.
- El equilibrio térmico del sistema es inmediato y no se considerará la transferencia de calor dentro del reactor.
- La agitación es suficiente para mantener el sistema homogéneo y la transferencia gases.
- El oxígeno y su transferencia no son limitantes.
- El pH variará dentro de rangos adecuados para el desarrollo de *E. coli* [47]
- No se considerarán los cambios en la composición de la biomasa.
- La velocidad de crecimiento es de tipo *Monod*.
- Los parámetros son constantes en el modelo.
- La producción de etanol estará asociada al crecimiento del microorganismo y seguirá la forma del modelo de *Luedeking-Piret* [48].
- El balance de energía dentro del microorganismo está resumido en el parámetro de mantenimiento.
- El sistema opera de forma discontinua (Cultivo por lotes).

Tomando las consideraciones anteriores, se puede plantear los balances de masa y las ecuaciones diferenciales del modelo.

2.4.1 Balances de Masa y Planteamiento de Ecuaciones

Balance de Masa Global:

$$\begin{aligned} \left[\begin{array}{l} \text{Acumulación de Masa} \\ \text{en el sistema} \end{array} \right] &= \left[\begin{array}{l} \text{Masa que entra} \\ \text{al sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Masa que sale} \\ \text{del sistema} \end{array} \right] \\ \frac{d(\rho \cdot V)}{dt} &= F_e \cdot \rho_e - F_s \cdot \rho_s \end{aligned} \quad (4)$$

Dado que se trata de un cultivo batch, no existen entradas, ni salidas. Si además se considera la densidad (ρ) constante, entonces se tiene:

$$\frac{d(\rho \cdot V)}{dt} = 0 \Rightarrow V = cte.$$

Balance de Biomasa

$$\begin{aligned} \left[\begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de Biomasa} \\ \text{en el sistema} \end{array} \right] &= \left[\begin{array}{l} \text{Biomasa} \\ \text{que entra} \\ \text{al sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Biomasa} \\ \text{que sale} \\ \text{del sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Crecimiento} \\ \text{Celular} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Muerte} \\ \text{Celular} \end{array} \right] \\ \frac{d(x \cdot V)}{dt} &= F_e \cdot x_e - F_s \cdot x_s + \mu \cdot x \cdot V - \alpha \cdot x \cdot V \end{aligned} \quad (5)$$

La cinética de crecimiento del microorganismo es de tipo *Monod*, por lo que

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (6)$$

La ecuación muestra una clara dependencia de la velocidad de crecimiento respecto al sustrato limitante (S). Si hubiese más de un sustrato limitante, el término que acompaña a μ_{max} debe estar tantas veces como sustratos limitantes haya, adecuado a cada uno de ellos.

Si se considera que la tasa de muerte celular (α) es despreciable frente al crecimiento y que no hay entradas ni salidas de biomasa, se tiene:

$$\frac{d(x \cdot V)}{dt} = \mu \cdot x \cdot V$$

Balance de Sustrato

$$\left[\begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de Sustrato} \\ \text{en el sistema} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Sustrato} \\ \text{que entra} \\ \text{al sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Sustrato} \\ \text{que sale} \\ \text{del sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Sustrato} \\ \text{consumido} \\ \text{para crecer} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Sustrato} \\ \text{consumido} \\ \text{para} \\ \text{mantenimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Sustrato} \\ \text{para} \\ \text{formación} \\ \text{de producto} \end{array} \right]$$

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F_e \cdot S_e - F_s \cdot S_s - \frac{\mu \cdot x \cdot V}{Y_{X/S}} - m_s \cdot x \cdot V - \frac{q_P \cdot x \cdot V}{Y_{P/S}} \quad (7)$$

La ecuación se puede simplificar a la siguiente expresión, si se considera que no existen entradas ni salidas:

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = -x \cdot V \cdot \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s + \frac{q_P}{Y_{P/S}} \right)$$

Esta ecuación considera un sustrato limitante (S), sin embargo en este análisis se considera como sustrato limitante a alginato y manitol, por lo que es necesario incluir otra ecuación con los mismos términos provenientes de balance, pero con parámetros diferentes.

Balance de producto

$$\left[\begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de Producto} \\ \text{en el sistema} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Producto} \\ \text{que entra} \\ \text{al sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Producto} \\ \text{que sale} \\ \text{del sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Formación} \\ \text{de Producto} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Degradación} \\ \text{de Producto} \end{array} \right]$$

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = F_e \cdot P_e - F_s \cdot P_s + q_P \cdot x \cdot V - K_{dp} \cdot P \cdot V \quad (8)$$

La velocidad de formación de producto (q_P) está asociada al crecimiento del microorganismo y al mantenimiento, por lo que se utiliza la ecuación de *Luedeking-Piret* para describirlo [48]:

$$q_P = Y_{P/X} \cdot \mu + m_P \quad (9)$$

Si se considera que no hay entradas ni salidas y que la degradación del producto es despreciable, entonces la ecuación queda reducida a:

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = q_P \cdot x \cdot V$$

Con este set de ecuaciones y las condiciones iniciales que se dieron a cada cultivo, se puede resolver numéricamente el sistema y realizar un ajuste de parámetros.

2.4.2 Método de Resolución y Ajuste a Curvas Experimentales

El sistema de ecuaciones se resolvió en el *software* MATLAB, mediante el uso del método *ode45*. Éste es un método de solución de sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, basado en aproximaciones en serie de *Taylor* de orden 4, sobre una malla de paso variable. Es un método explícito, es decir que el tiempo futuro se construye sobre tiempo pasado. Además, al ser este un sistema no rígido, no es necesario usar métodos implícitos o que lidien con sistemas rígidos, como *ode23s*, por ejemplo. Su sintaxis es la siguiente:

$$[t, x]=ode45(odefun,tspan,x0, options, params)$$

- x es una matriz donde cada columna corresponde a las variables dependientes y t es el vector tiempo.
- *odefun* es el nombre de la función,
- *tspan* especifica el intervalo de tiempo, un vector de dos números $tspan=[ti,tf]$, tiempo inicial y final. Para obtener valores de las variables dependientes en instantes concretos $t_0, t_1, t_2, \dots t_n$. se escribe $tspan=[t0,t1\dots tn]$;
- $x0$ es un vector que contiene los valores iniciales.
- *options* es una estructura que se crea con la función *odeset*.
- *params* son parámetros que se quiere pasar a la función *odefun*

Los dos últimos puntos son opcionales para la resolución del problema. Particularmente, se pueden definir los parámetros en el mismo archivo que contiene el set de ecuaciones diferenciales.

La resolución numérica puede ser graficada, e incluso se pueden exportar los datos experimentales de otros archivos, con extensión de *Excel*, por ejemplo. Utilizando los comandos adecuados para exportar los datos experimentales y graficar en una misma interface, se puede ajustar las curvas obtenidas a las curvas experimentales, modificando los valores de los parámetros. Así, se puede tener un modelo teórico con valores iniciales para los parámetros, de modo de tener una referencia para ejecutar el ajuste de parámetros y obtener, finalmente, los parámetros ajustados. El código de programación en MATLAB está en el Anexo A8.

El ajuste se realizó mediante el método de mínimos cuadrados, el cual minimiza el error cuadrático entre los datos experimentales y la curva continua que modela el problema.

3. Resultados y Discusiones

3.1 Resultados Experimentales

A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos de los procedimientos experimentales explicados en el capítulo anterior.

3.1.1 Morfología del Microorganismo

Se realizaron cultivos aeróbicos en tubos de ensayo durante 12[h]. Luego se aplicó el protocolo de la tinción de Gram para analizar la morfología de las bacterias en las distintas condiciones de cultivo.

Las siguientes figuras muestran las tinciones de los distintos cultivos al microscopio. La cámara utilizada no era la indicada para la toma de fotografías al microscopio, por lo que la resolución de las mismas no es la mejor. Sin embargo se puede apreciar diferencias.

E. coli es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción, es decir es Gram negativo. Cuando crece en un medio rico, como lo es LB, las bacterias muestran su morfología alargada y no forman agregados. Las células se pueden apreciar como unidades individuales separadas, tal como lo muestra la Figura 3.1. Si éstas se cultivan en medio mínimo, pero con glucosa como fuente de carbono, el resultado es similar. Ambos cultivos se consideran como controles de morfología y referencia para el crecimiento celular óptimo.

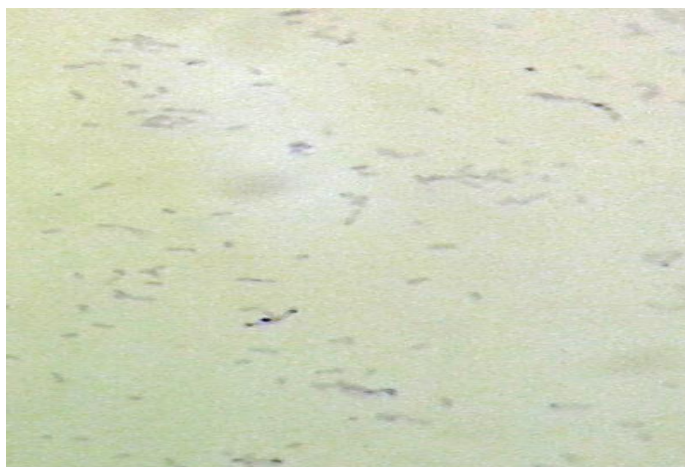


Figura 3.1: Morfología de BAL 1611 en LB (100x)

Al crecerlas en un medio mínimo con fuentes de carbono poco convencionales, se observa que éstas cambian su morfología, disminuyendo su tamaño y longitud, e incluso adoptando una forma más ovalada. Además, en las imágenes se aprecia la formación de conglomerados celulares, especialmente en los cultivos con mayor proporción de alginato (ver Figura 3.2). Estos complejos podrían ser reflejo de cooperación entre células, sobre todo para la degradación de alginatos, la que despliega toda la maquinaria enzimática (externa e interna), tanto para su degradación a oligómeros, como para incorporarlos a la célula. El metabolismo de alginato podría

considerarse como una condición de estrés, a pesar de tratarse de un organismo genéticamente modificado (el metabolismo de glucosa es más inherente), puesto que la expresión de enzimas es constitutiva, forzando a la célula a redistribuir los flujos energéticos para compensar la carga metabólica. Por ello, las bacterias disminuyen su tamaño, cambian su forma y se reproducen menos, de modo que la célula sea lo más eficiente posible, en términos energéticos.

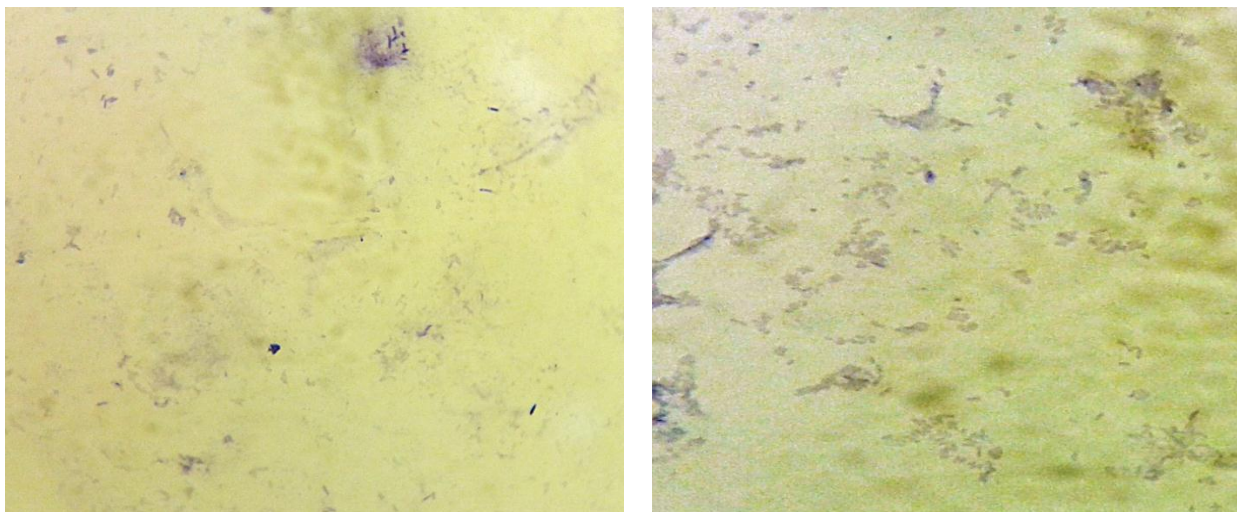


Figura 3.2 Morfología de cultivos con alto contenido de Alginato (100x). A la izquierda cultivo con 2,6% de alginato. A la derecha cultivo 2% de alginato y 0,6% de manitol.

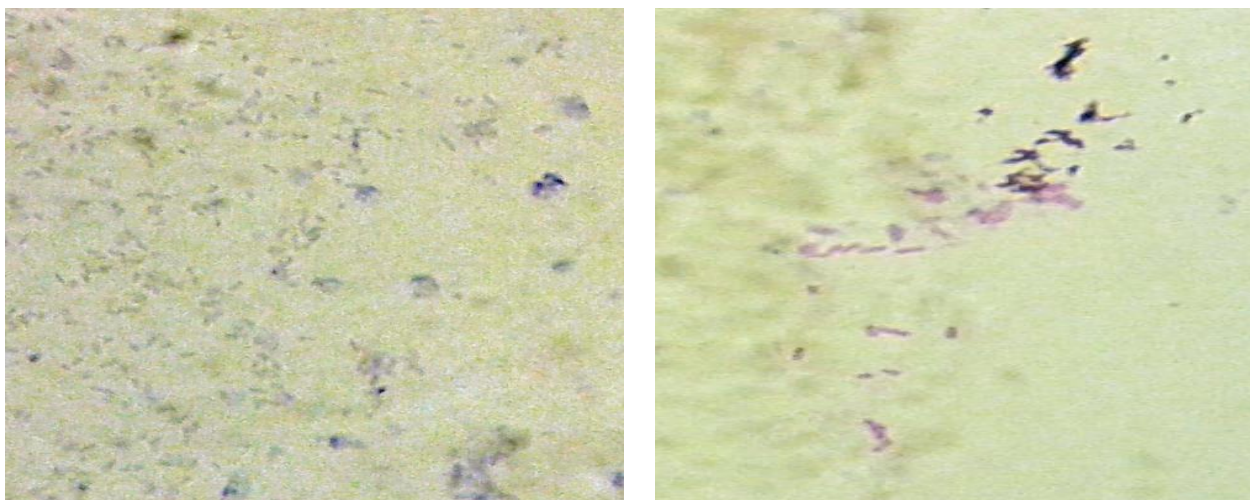


Figura 3.3: Morfología de cultivos intermedios (100x). A la izquierda cultivo con 1,6% de alginato y 1% de manitol. A la derecha cultivo con 1% de alginato y 1,6% de manitol

A medida que la proporción de manitol aumenta en los cultivos, se observa que los complejos celulares van desapareciendo y las células vuelven a su individualidad (ver Figura

3.4). El manitol, es un carbohidrato que puede ser metabolizado por la cepa nativa de *E. coli*, por lo tanto se presume que la carga metabólica es menor que al degradar alginato.

La Figura 3.3 ilustra el cambio de tamaño y forma al variar los porcentajes peso-volumen de alginato y manitol.

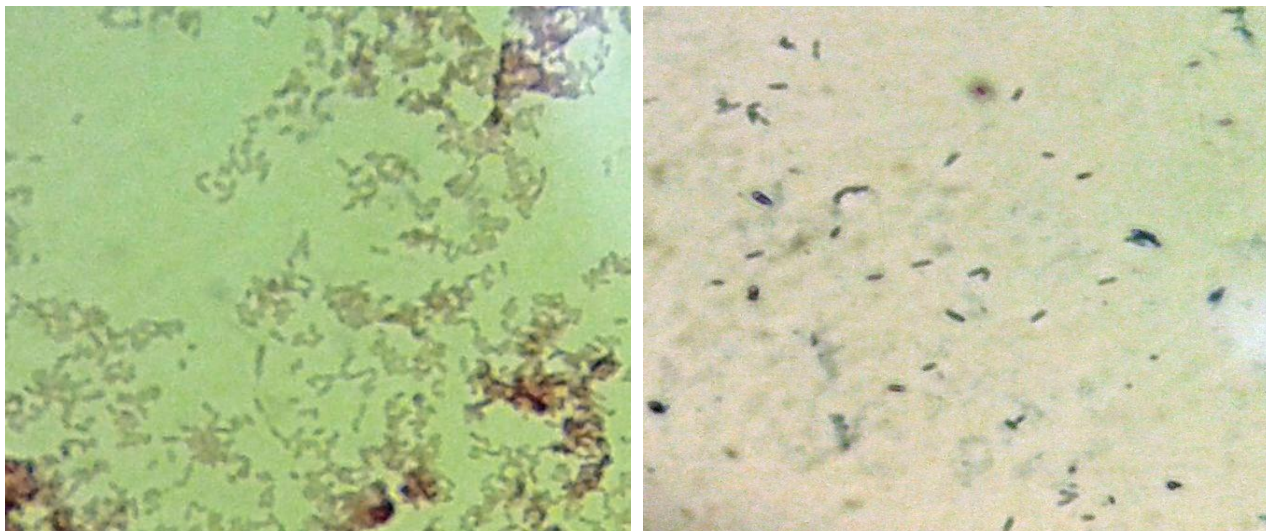


Figura 3.4: Morfología de cultivos con alto contenido de manitol (100x). A la izquierda cultivo 0,6% de alginato y 2% de manitol. A la derecha cultivo 2,6% de manitol

Es importante destacar que la densidad celular de los cultivos, luego de 12 [h], y previo a la tinción, era visiblemente distinta. El cultivo con 2,6% de alginato (sin manitol) resultó ser el que tenía, considerablemente, menos células por unidad de volumen, mientras que el cultivo en medio rico (LB) presentó la mayor densidad celular. Los cultivos intermedios tuvieron en general densidades celulares altas, aunque los cultivos con mayor porcentaje de manitol resultaron ligeramente más concentrados. Los cambios de morfología y rendimientos de biomasa (ver en la sección 3.1.2.3) abren una incógnita a nivel microbiológico, ya que con los experimentos realizados no es posible saber si dada una medida de biomasa, ésta corresponde a un mayor número de células por unidad de volumen, pero de menor tamaño, o bien a menos células por unidad de volumen, pero de mayor tamaño.

3.1.2 Fermentaciones Aeróbicas

Todos los cultivos aeróbicos se realizaron en matraces de 500 [ml] utilizando un quinto de su capacidad, es decir el volumen del medio de cultivo, con células incluidas, fue de 125 [ml]. Las fermentaciones se realizaron como se indica en la metodología (sección 2.3.3). Es importante recordar que todas las fermentaciones (aeróbicas, micro-aeróbicas y con algas) se realizaron en medio mínimo para visualizar directamente el efecto de las fuentes de carbono utilizadas en el crecimiento celular.

3.1.2.1 Crecimiento Celular

Para medir el crecimiento celular de los distintos cultivos se utilizó un espectrofotómetro. Los datos medidos corresponden a la concentración de los cultivos en unidades de absorbancia. Es fundamental para el cálculo de los rendimientos de biomasa y los balances de masa tener la concentración celular en unidades de masa/volumen. Es por esto, que se realizó una curva de calibración de calibración entre $D. O_{600}$ vs Biomasa, la que se presenta a continuación:

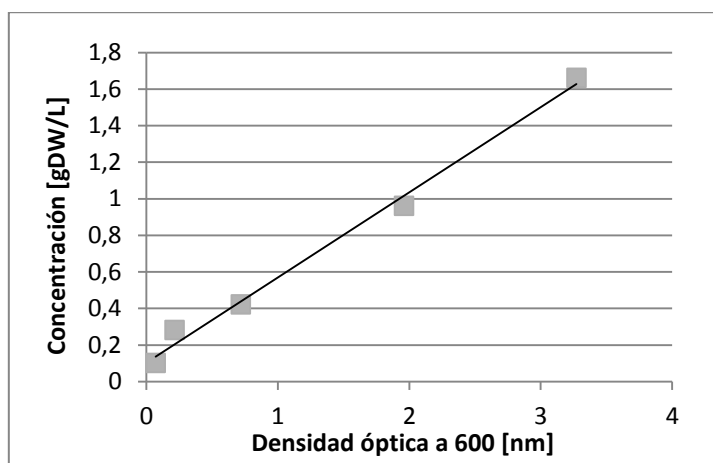


Gráfico 3.1: Curva de calibración

La regresión lineal tuvo un coeficiente de correlación de 0,99 y está dada por la siguiente ecuación:

$$y \left[\frac{gDW}{L} \right] = 0,466 \cdot x [D.O] + 0,103 \quad (10)$$

Mediante el uso de la ecuación (10) todos los datos obtenidos en unidades de absorbancia se expresaron en gramos de masa seca por unidad de volumen.

Los datos obtenidos se graficaron y se presentan a continuación:

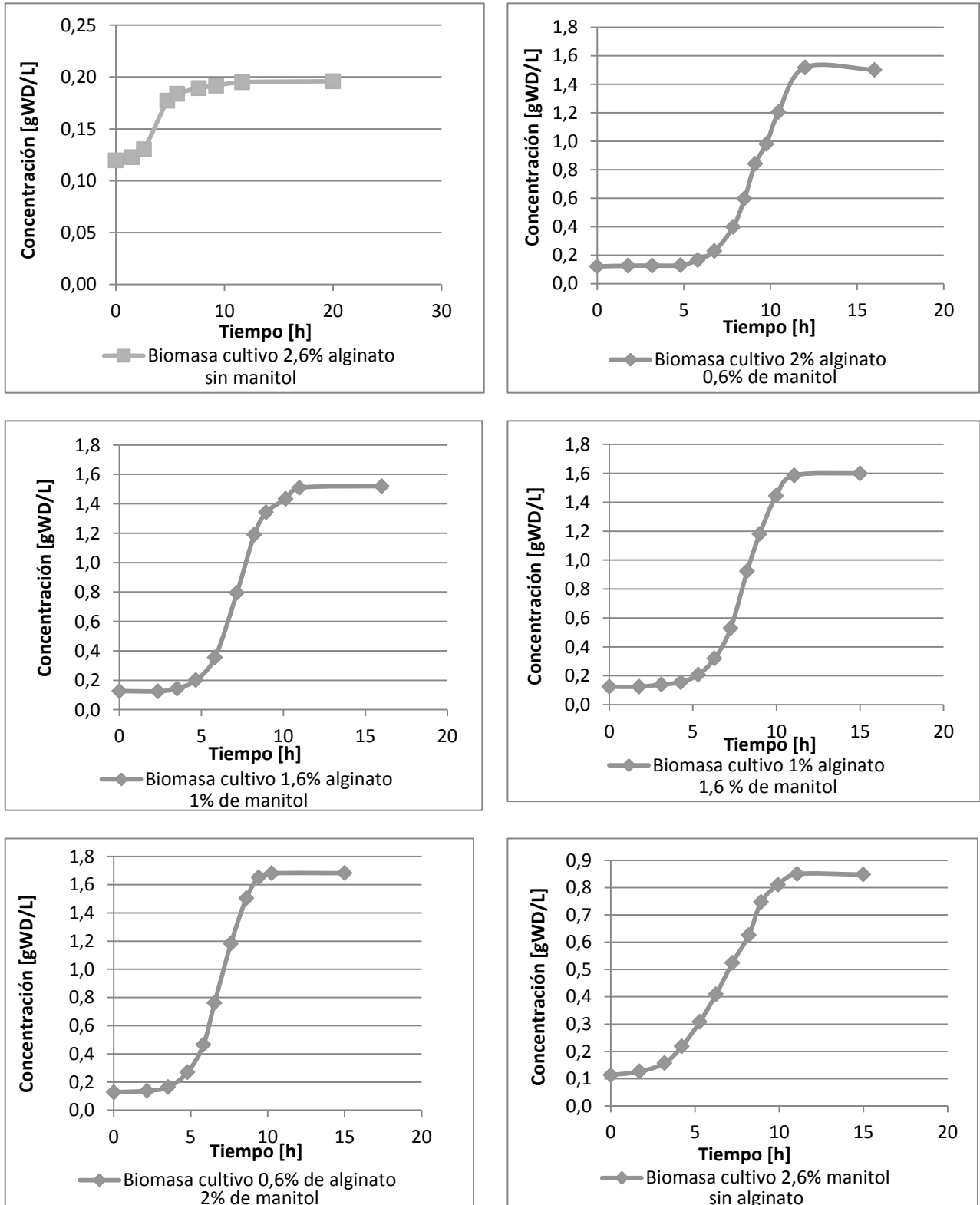


Gráfico 3.2: Curvas de crecimiento de los cultivos en distintas razones de alginato-manitol

El Gráfico 3.2 muestra las curvas de crecimiento de las fermentaciones realizadas en las razones de alginato-manitol expuestas. Éstas son fundamentales en el cálculo de las velocidades de crecimiento y rendimientos de biomasa, que se presentarán luego. Cada cultivo se efectuó en triplicado para cuantificar el error experimental asociado. Es importante mencionar que para cada razón de alginato-manitol, cada triplicado alcanzó una concentración celular en estado estacionario considerablemente diferente, a pesar de ser ejecutados en las mismas condiciones de agitación, temperatura y con los mismos reactivos. Incluso, algunas de estas concentraciones podrían ser comparables con las alcanzadas en otras razones de alginato-manitol. Durante el estudio no se halló una explicación plausible para este hecho.

Todas las curvas obtenidas, independiente de la razón de alginato-manitol, mostraron el comportamiento típico del crecimiento bacteriano, es decir que poseen distintas fases de crecimiento (*lag* y exponencial) hasta alcanzar el estado estacionario. Esta tendencia puede ser descrita por la ecuación de *Monod*.

Los cultivos que alcanzaron la menor concentración de biomasa son los cultivos extremos, es decir el cultivo con 2,6% de alginato (sin manitol) y el cultivo con 2,6% de manitol (sin alginato). Particularmente, se observa que el primero apenas crece y es dentro de las primeras 5 horas, donde su concentración presenta el mayor aumento, pasando de 0,12 [g/l] a 0,17 [g/l]. El cultivo se mantiene constante en 0,2 [g/l] durante más de 80 [h] (no se muestra en el gráfico) no mostrando mayores cambios. Inicialmente se pensó que el cultivo había muerto, sin embargo se realizaron cultivos en placas, donde se pudo comprobar que las células estaban vivas y su tamaño había disminuido considerablemente, si se las compara con células crecidas en glucosa. Adicionalmente, se realizaron cultivos aumentando el inóculo inicial y el % p/v de alginato, obteniendo los mismos resultados. Analizando las vías de degradación de alginato que tiene el microorganismo (ver Anexo A5), se observa que es necesario poder reductor dentro de los primeros pasos, es decir que el microorganismo necesita un flujo de NADH para el consumo de alginato y la formación de biomasa. Esto explicaría por qué el cultivo no prolifera, ya que la única fuente de carbono de la cual dispone es alginato, que resta equivalentes reductores que la célula pueda obtener de otras vías, por ejemplo del ciclo de Krebs.

En el caso de los cultivos que tienen como fuente de carbono al manitol, se observa un crecimiento sostenido con una pequeña fase *lag*. No obstante, la concentración de biomasa alcanzada es casi la mitad que la exhibida en los otros cultivos. A diferencia del alginato, manitol es un carbohidrato cuyo catabolismo entrega equivalentes reductores a la célula. Cuando este polialcohol es la única fuente de carbono, se produce un exceso de poder reductor que causa un desequilibrio redox al interior de la célula durante la fermentación, provocando cambios en el metabolismo y en las reacciones de biosíntesis. Este desequilibrio podría afectar el crecimiento del cultivo, y con ello la concentración celular final alcanzada. La presencia de alginato revierte el desbalance redox, eliminando este impedimento en la proliferación celular y permite que la concentración celular, al llegar a estado estacionario, sea mayor que cuando se fermenta sólo manitol.

Los cultivos de menor concentración celular, mostrarían una baja factibilidad proliferativa en dichas condiciones, dando indicios, además, de que ambos carbohidratos podrían ser

complementarios por su rol (a nivel de equivalentes reductores) en la célula. El organismo diseñado por Wargacki, para la producción de etanol utilizando como sustrato macroalgas pardas, es capaz de metabolizar alginato, sugiriendo que este carbohidrato es suficiente para la producción de biocombustibles. No obstante, los experimentos que él y su equipo desarrollaron incluyen manitol, de modo de simular la composición algal, pero no cuantificaron la importancia de éste en la fermentación y producción de etanol [32]. Dichos experimentos coinciden con el hecho que alginato y manitol podrían ser complementarios, pero no abordaron cómo se deben relacionar entre sí (en qué proporción) para tener condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo del microorganismo y para una mayor productividad de etanol, interrogante que trata de responder este estudio.

Gracias a las razones de alginato-manitol definidas, se pudo observar que las bacterias presentan un comportamiento proliferativo similar independiente de la proporción de carbohidratos con la que se esté experimentando, puesto que la duración de la fase *lag*, concentración celular final y el tiempo en llegar a estado estacionario son, a grandes rasgos, parecidos; siempre y cuando ambos carbohidratos estén presentes en el medio de cultivo. Por lo tanto, el microorganismo tiene un crecimiento análogo si dispone de concentraciones mínimas de alginato o manitol, como es el caso de las razones 3:10 y 10:3, o bien si las proporciones entre ambos carbohidratos son relativamente similares, como en el caso de las razones 5:8 y 8:5.

El cultivo con 2% de alginato (razón 10:3) presenta una fase *lag* considerable, de aproximadamente 7 [h], después de las cuáles el cultivo crece rápidamente hasta alcanzar el estado estacionario tras las 12 [h], siendo éste el cultivo que más demora en alcanzar dicho estado. Esto se puede asociar a la maquinaria de degradación del alginato, ya que se necesita secretar alginato liasas para luego transportar los oligoalginatos al interior de la célula. Por tanto, el tiempo de adaptación de la célula aumenta. *A priori*, se podría pensar que la tasa de consumo es más lenta, lo que prolongaría el sustrato en el medio y con ello, la posibilidad de aumentar la masa celular. Este punto se retomará luego.

Los cultivos de razones alginato-manitol 5:8 y 8:5, manifiestan un comportamiento similar, en cuanto a la fase *lag* (5 [h]), tiempo de cultivo en alcanzar el estado estacionario (10 [h]) y concentración celular final (aproximadamente 1,6 [g/l]). Los tiempos de adaptación de los cultivos parecen ser similares para cultivos con un porcentaje p/v menor o igual a 1,6% de alginato, indicando que éste es el tiempo necesario para la expresión, secreción y acción de las enzimas encargadas de degradar alginato, y que el período de adaptación está ligado a la concentración de alginato liasas capaces de degradar el sustrato. Es importante destacar que se realizaron experimentos adicionales en los que el preinóculo crecido en un tubo de ensayo se utilizó para inocular un cultivo menor para aumentar el volumen de preinóculo a utilizar en las fermentaciones posteriores, a las que se les mediría el crecimiento. En consecuencia, las bacterias estuvieron en actividad durante 24 [h] antes de ser inoculadas. Como resultado se obtuvo que la fase *lag* de estas fermentaciones disminuyó casi a la mitad. Esto se puede asociar a que la producción de enzimas de la vía degradativa está activa y funcionando eficientemente, mientras más tiempo sea expuesto el microorganismo al sustrato, evitando el cambio abrupto de un estado inactivo a uno activo.

3.1.2.2 Velocidad de Crecimiento

Con las curvas de biomasa de los diferentes cultivos, considerando especialmente el segmento de crecimiento exponencial, se obtuvo las velocidades de crecimiento del microorganismo. Los cultivos efectuados en triplicado permitieron el cálculo del error experimental asociado, dado por la desviación estándar entre ellos, y se presenta en el Gráfico 3.3 por las barras.

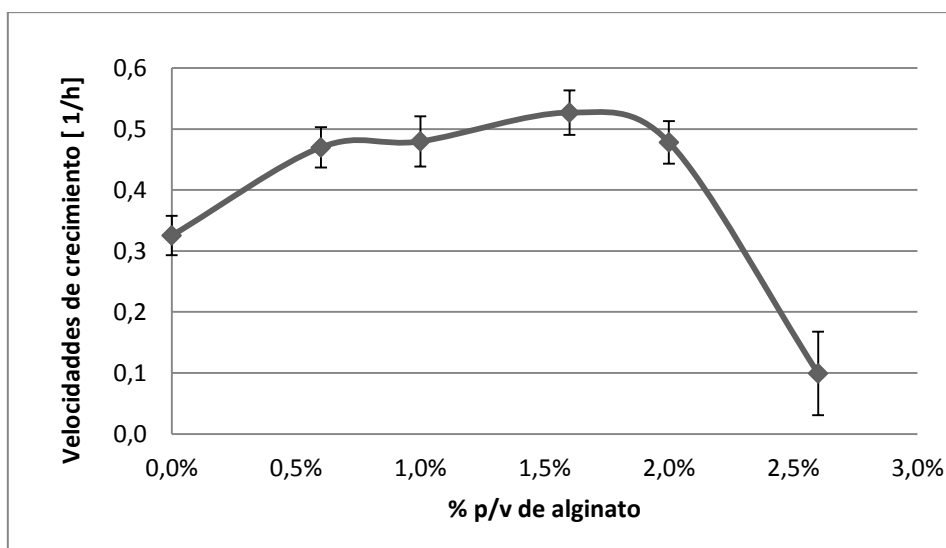


Gráfico 3.3: Velocidad de crecimiento

Con un análisis crudo se puede decir que el óptimo de velocidad se obtuvo en el cultivo con la razón 5:8 de alginato-manitol (1,6% p/v de alginato). Sin embargo, los valores obtenidos en las distintas razones de alginato-manitol, no distan mucho entre sí, e incluso algunos valores están dentro del rango de variabilidad de los otros puntos (ver Tabla 3.1). Bajo este contexto, es que no se puede determinar a ninguno de los valores como óptimo, sino más bien se puede decir que el microorganismo tiene un comportamiento similar, independiente de la razón de alginato-manitol en la que crezcan, siempre y cuando ambos carbohidratos estén presentes en el medio de cultivo.

El Gráfico 3.3 muestra que las velocidades de crecimiento tienen una leve tendencia ascendente hacia mayores porcentajes de alginato. Esto, junto a los tiempos de lactencia, indicaría que una vez activadas las vías de degradación de alginato, éste sería procesado eficientemente, otorgándole a la célula lo necesario para multiplicarse en menos tiempo. Anteriormente, se había supuesto que la tasa de consumo de alginato podría ser menor a medida que éste aumentaba su concentración en los cultivos. Contrariamente, la velocidad de crecimiento indicaría que a medida que dicho polímero tiene más presencia en el cultivo, las enzimas se mantienen constantemente en acción para la degradación del mismo, e incluso se puede especular acerca de un aumento en el número de proteínas catalíticas actuando. Si bien, el cultivo con 2% de alginato y 0,6% de manitol es el que más demora en alcanzar el estado estacionario, también es el que tiene mayor tiempo de adaptación, tras el cual crece a una velocidad similar a los otros

cultivos. Por lo tanto, con la información adicional que entrega la velocidad de crecimiento, se podría concluir que es el tiempo de latencia el causante de la llegada tardía al estado estacionario. Para concluir de manera más fehaciente al respecto, habría que analizar las pendientes de consumo, lo que se hará en la siguiente sección.

Por otro lado, las velocidades obtenidas en los distintos cultivos revelan que la composición variante de las macroalgas no afectaría la velocidad de crecimiento del microorganismo, eliminando esta variable de momento, sin considerar aún los rendimientos [27, 28, 29, 30]. Esto es particularmente favorable para el tratamiento de *Macrocystis pyrifera* que tiene un alto contenido de alginato.

Los cultivos extremos, es decir, con 2,6% de alginato y 2,6% de manitol puros, reportan las menores velocidades de crecimiento, por lo tanto no resultan ser condiciones interesantes en las que fermentar, desde el punto de vista del desarrollo del microorganismo. El cultivo con alginato como única fuente de carbono, reporta baja proliferación y tasa de crecimiento, siendo una condición poco factible para el crecimiento fermentativo. Aun así, es necesario verificar si la biomasa que se mantiene en estado vegetativo (no crecimiento) transforma, en algún grado, el alginato en etanol.

Los errores asociados son menores al 10%, excepto en el caso del cultivo con 2,6% de alginato, cuyo error porcentual es 65%. Además, fue difícil determinar una velocidad de crecimiento para este cultivo, ya que, como se mostró en la sección anterior, existe un instante en que la biomasa aumenta, y este cambio varió muchísimo en todos los cultivos efectuados. Por lo tanto, el valor reportado no es fiable para representar la velocidad de crecimiento de dicho cultivo.

Los valores obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3.1: Velocidades de crecimiento

% p/v de Alginato	Velocidad de crecimiento [1/h]
2,6 %	0,099 ± 0,068
2%	0,478 ± 0,035
1,6%	0,527 ± 0,036
1%	0,480 ± 0,041
0,6%	0,470 ± 0,033
0%	0,325 ± 0,032

Los valores obtenidos en los experimentos efectuados están dentro del rango reportado de velocidades de crecimiento de *E. coli* [49, 50]. Estos valores han sido influenciados por las

condiciones en las que se desarrolla la célula [51]. En este caso, es particularmente influyente la fuente de carbono utilizada y el tipo de medio en que se hizo crecer al microorganismo.

3.1.2.3 Rendimiento de Biomasa ($Y_{x/s}$)

El siguiente parámetro a evaluar es el rendimiento de biomasa. Éste, al igual que las velocidades de crecimiento, se obtuvo de las curvas de crecimiento, particularmente de los máximos de concentración de cada cultivo. Cada rendimiento fue graficado junto a su error en el Gráfico 3.4. Vale mencionar que los rendimientos fueron calculados con la masa total de carbohidratos y no para cada uno de ellos.

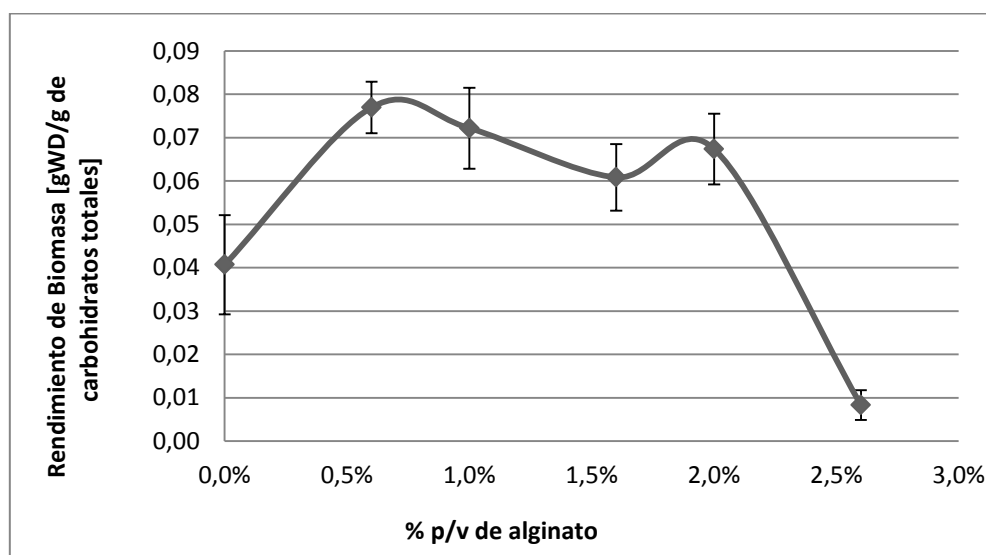


Gráfico 3.4: Rendimiento de Biomasa

Del gráfico se puede apreciar que los rendimientos de biomasa son similares entre sí, repitiéndose así la situación observada en las velocidades de crecimiento, ya que no es posible determinar certeramente un óptimo. En este caso los errores asociados son mayores a los presentados en las velocidades de crecimiento, siendo cercanos al 15%. Este error refleja las diferencias de concentración de biomasa al final de las fermentaciones. A pesar de tratarse de cultivos en triplicado, éstos resultaron ser relativamente variables, e incluso comparables con cultivos crecidos en otras condiciones, tal como se mencionó al analizar el Gráfico 3.2. Los únicos cultivos en triplicado que se comportaron de forma similar, fueron los cultivos extremos. El experimento con 2,6% de alginato prácticamente no creció, mientras que el experimento con 2,6% de manitol no superó los 0,8 [gDW/L]. Si lo relevante para tomar decisiones respecto a fermentar en una u otra condición fuera la conversión del sustrato a biomasa, entonces los puntos extremos no son viables, pues presentan los rendimientos más bajos. Excluyendo estos puntos, se podría decidir fermentar en cualquiera de las razones de alginato-manitol, obteniendo rendimientos similares. Así, se refuerza la conclusión de que la composición de las algas no es un factor obstaculizante al momento de generar biomasa.

Los rendimientos de biomasa en los cultivos con razones intermedias de alginato-manitol tienden a formar una meseta levemente inclinada hacia condiciones de cultivo con mayor presencia de manitol, contrario a la tendencia que mostraron las velocidades de crecimiento. Esto indica que mientras mayor es la velocidad de crecimiento, menor es el porcentaje de sustrato que se está convirtiendo a biomasa. Por lo tanto, es posible que exista un *bypass* en el metabolismo de la célula durante su crecimiento, diferente a la vía de producción de etanol, que estaría frenando la producción de futura biomasa. Este flujo de consumo adicional se conoce como mantenimiento celular. Este concepto indica que a medida que el cultivo crece (más o menos rápido), el flujo de sustrato no sólo se convierte en biomasa, sino que también se utiliza para mantener a las células ya existentes, lo que limita el flujo hacia el aumento de células. En este caso particular, se observa que los cultivos con mayor presencia de alginato crecen más rápido, pero su tasa de mantenimiento es mayor, obteniéndose una menor concentración celular al final del cultivo.

Tiene sentido que las tasas de mantenimiento sean mayores para los microorganismos que crecen con alginato como principal fuente de carbono, puesto que necesitan expresar y secretar enzimas para su catabolismo, es decir que la carga metabólica asociada es mayor. Adicionalmente, el alginato no aporta equivalentes reductores al pasar a piruvato, lo que implica que debe introducirse mayor flujo al ciclo de Krebs para mantener el nivel de cofactores reducidos en la célula, sin formar biomasa.

Tabla 3.2: Rendimientos de Biomasa

% p/v de Alginato	Rendimiento Biomasa [g de biomasa/ g de sustrato]
2,6 %	0,008 ± 0,003
2%	0,067 ± 0,008
1,6%	0,061 ± 0,008
1%	0,072 ± 0,009
0,6%	0,077 ± 0,006
0%	0,041 ± 0,011

La Tabla 3.2, muestra los valores de los rendimientos de biomasa para cada cultivo. Se observa que los valores obtenidos son bastante bajos, es decir que menos del 10% del sustrato consumido se transformó a biomasa. Generalmente, los microorganismos que crecen fermentando tienen menores rendimientos de biomasa que si utilizaran un metabolismo oxidativo [51]. Particularmente, se está trabajando con un microorganismo que ha sido diseñado y optimizado para la producción de etanol. El alginato y manitol entran a la vía ED, donde son transformados a piruvato. Hasta este punto no existe ningún indicio que respalde los bajos rendimientos de biomasa. Sin embargo, el microorganismo expresa constitutivamente dos enzimas, que en condiciones normales, encauzan eficientemente el flujo de piruvato a etanol,

limitando su entrada al ciclo de Krebs. Se trata de las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. La primera es una enzima irreversible, mientras que la segunda es reversible, con alta afinidad por el etanol [39, 52]. Bajo este contexto, es claro que la formación de biomasa se vea disminuida.

Inicialmente se podría pensar que las altas tasas de mantenimiento podrían ser un punto en contra para la producción de etanol, ya que un flujo importante de sustrato estaría siendo destinado para dichos fines. No obstante, dado que la concentración de biomasa en los distintos cultivos es baja, según los rendimientos obtenidos, el flujo consumido para mantenimiento no debería ser significativo frente al flujo transformado en etanol, sobre todo si se cuenta con vías eficientes para su producción.

3.1.2.4 Consumo y Producción

Tal como se explicó en la metodología, los datos del consumo de carbohidratos y producción de etanol, se cuantificaron mediante el método de HPLC, que entregó un área de integración asociada a cada concentración. Para obtener esta última, fue necesario realizar curvas de calibración que relacionaran ambas magnitudes. Las curvas de calibración utilizadas se encuentran en el Anexo A2.

Los siguientes gráficos muestran simultáneamente las curvas de consumo de alginato y manitol en los distintos cultivos, además de las curvas de producción de biomasa y etanol. Cabe mencionar que los cultivos extremos no se muestran, ya que se tomaron muestras al finalizar los cultivos utilizados para construir las curvas de crecimiento, y no se registró producción de etanol, a diferencia de los cultivos con distintas razones de alginato-manitol.

El metabolismo de manitol al interior de la célula genera poder reductor. Éste es fundamental para permitir la proliferación de microorganismos en un cultivo, y además juega un rol importante en la producción de etanol, ya que su vía de producción integrada a BAL 1611, consume poder reductor (ver Anexo A5) [38, 39, 40]. Por lo tanto, en ausencia de manitol, se hace difícil producir etanol, tal como ocurrió con el cultivo con 2,6% de alginato.

El Gráfico 3.5 muestra el comportamiento del cultivo con 2% de alginato (razón 10:3). En éste se aprecia que la producción de etanol comienza en la fase tardía del crecimiento exponencial, justo antes de llegar al estado estacionario. Por lo tanto, pareciera que la maquinaria celular funciona de tal manera que es necesario alcanzar cierta concentración celular para producir la masa de enzimas suficientes, de modo de aprovechar el sustrato disponible y transformarlo en etanol. Como se mencionó anteriormente, las vías de producción de etanol están optimizadas, por lo que una vez derivado el flujo hacia la producción de etanol, las vías para la producción de biomasa poseen un flujo bajo, con dos resultados: se frena la producción de biomasa y, en consecuencia, etanol aumenta a una tasa menor hasta llegar a su concentración final. Este último efecto se observa en la curva de etanol, ya que inicialmente la producción muestra una pendiente pronunciada, la cual decae a la mitad de su trayecto hasta llegar al estado estacionario, con lo que la producción es más acelerada dentro de las primeras 5 [h] y luego se

estabiliza. El máximo de etanol se alcanza aproximadamente a las 20 [h] de cultivo, llegando a un valor alrededor de los 3,9 [g/l]. Vale mencionar que en este trabajo las pérdidas de etanol por evaporación no se consideraron, pues es difícil medirlas y se cree que son menores.

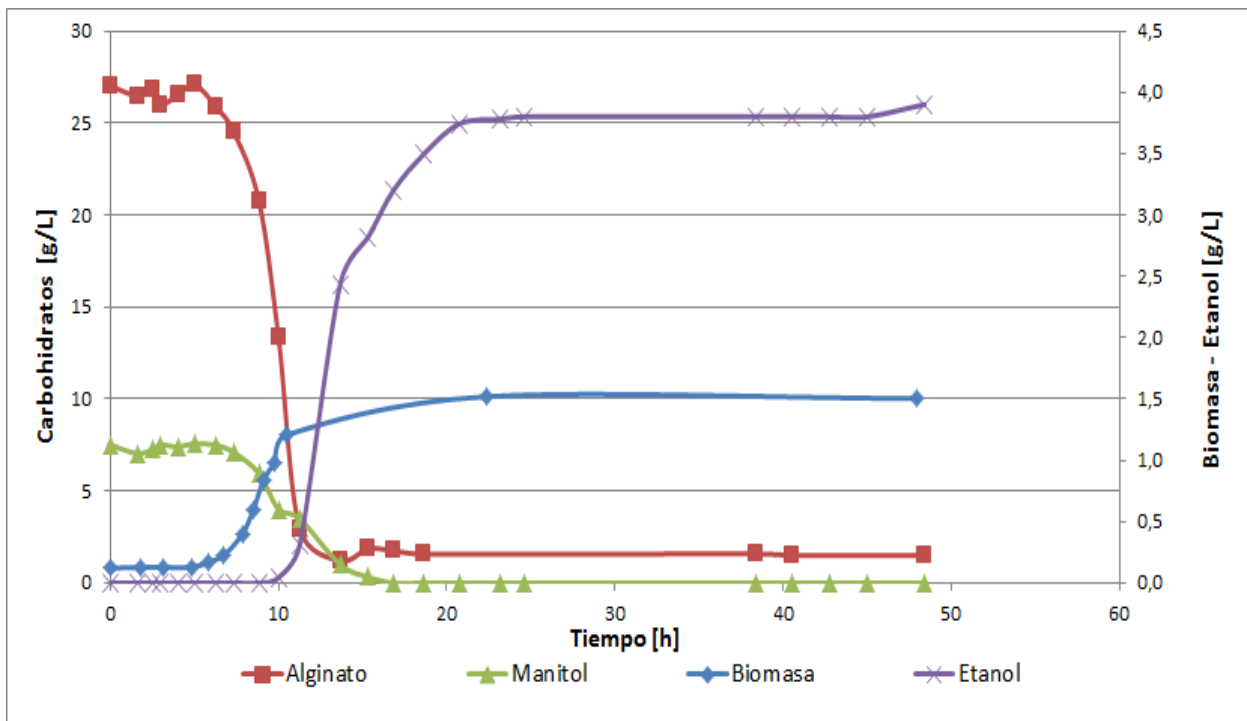


Gráfico 3.5: Consumo y producción cultivo 2% de alginato y 0,6% de manitol

A pesar de que el cultivo dispuso de una baja masa de manitol (0,6% p/v), las células fueron capaces de fermentar. Esta situación abre la incógnita de cuán mínima es la proporción de manitol suficiente para obtener etanol, ya que como se dijo anteriormente es fundamental para la producción del mismo. El manitol puede ser metabolizado por las vías glicolíticas de *E. coli*, aunque el rendimiento de producción de etanol, es muy bajo [32]. En este estudio no se observó producción de etanol en los cultivos que tenían como fuente de carbono únicamente al manitol. Por lo tanto, la importancia de la presencia de este carbohidrato no radicaría en su conversión a piruvato (y luego a etanol), sino más bien se puede asociar a que entrega poder reductor a la célula para la producción de etanol. Esto puede verse en los gráficos, específicamente en las curvas de consumo de manitol. Durante el crecimiento celular, la concentración de manitol varía poco, pero presenta un descenso cuando la concentración de etanol aumenta en el cultivo, consumiéndose completamente.

Si bien el flujo de sustrato destinado a la producción de biomasa podría respaldar los mínimos cambios en la concentración de manitol, contradiciendo la observación de que éste solo aportaría poder reductor, se debe apreciar que la curva de alginato comienza a descender junto con el aumento de la biomasa, y que ésta última se estabiliza al agotarse el alginato. Por lo tanto, el pequeño flujo destinado a biomasa provendría del consumo de alginato y no de manitol, por lo

menos en esta situación, reforzando la importancia del manitol como proveedor de equivalentes reductores.

La concentración de alginato disminuye abruptamente hasta la aparición de etanol en el medio, llegando casi a cero. Esto indica que la metabolización de alginato a piruvato estaría funcionando eficientemente, sobre todo porque las enzimas necesarias estarían activas, tanto intra como extracelularmente. Por lo tanto, las tasas de consumo no serían lentas como antes se había comentado. El cambio radical de alginato y el hecho de que aumente la concentración de etanol, a pesar de que los carbohidratos se hayan agotado, puede deberse a que el HPLC detecta alginato y no oligómeros, ni ácidos manurónico o gulurónico. Éstos son los que persisten en el medio luego de las 12 [h] y siguen siendo degradados para la producción de etanol. Esto se puede apreciar en la Figura 3.5, que contiene los cromatogramas de muestras previas y posteriores a las 12[h].

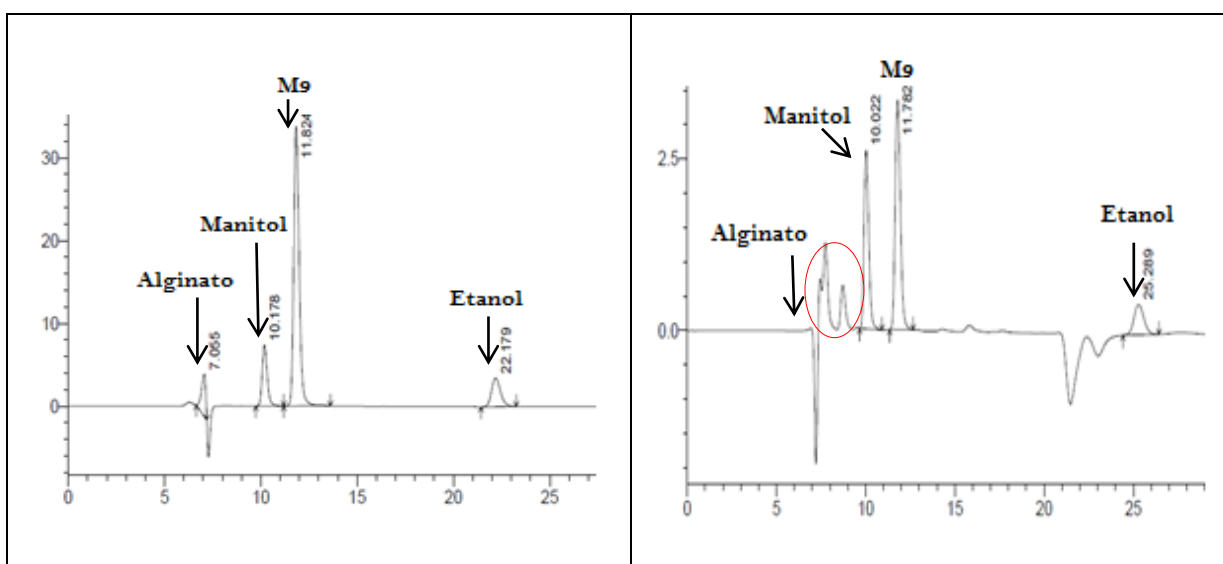


Figura 3.5: Cromatogramas. A la izquierda, a las 10 [h] de cultivo. A la derecha, a las 18 [h] de cultivo

Los tiempos de retención de alginato, manitol y M9 corresponden a 7, 10, 11 [min], respectivamente. En el cromatograma de la derecha aparecen 3 picos que no corresponden a ninguno de los reactivos cuantificados previamente (ver Anexo A4). Éstos están localizados justo atrás del pico de alginato, por lo que el tamaño del polímero es inferior a dicho carbohidrato. Además, se observó que estos picos van cambiando (disminuyendo en magnitud) a medida que progresa la fermentación. Por lo tanto, se presume que se trataría de oligómeros de alginato.

El Gráfico 3.6 muestra las curvas de consumo de alginato y manitol, la curva de producción de etanol y la curva de crecimiento para los cultivos con 1,6% de alginato (razón 8:5).

Las curvas de crecimiento y de etanol exhiben el mismo comportamiento anterior, es decir que la producción de etanol se hace presente pocas horas antes que el cultivo alcance su máxima concentración de biomasa. Una diferencia importante es que la pendiente de la curva de etanol es menor que la obtenida en el cultivo anterior (2% alginato), e incluso parece haber tres o más segmentos de producción a tasas distintas.

Por otro lado, se observa que a medida que los microorganismos van creciendo, hay un consumo importante de alginato y de manitol, sugiriendo que ambos carbohidratos estarían siendo procesados para aumentar la biomasa en el cultivo. Es decir que, al disponer de menor concentración de alginato, el microorganismo recurriría al uso de manitol, en menor medida, y ya no sólo lo utilizaría como generador de poder reductor.

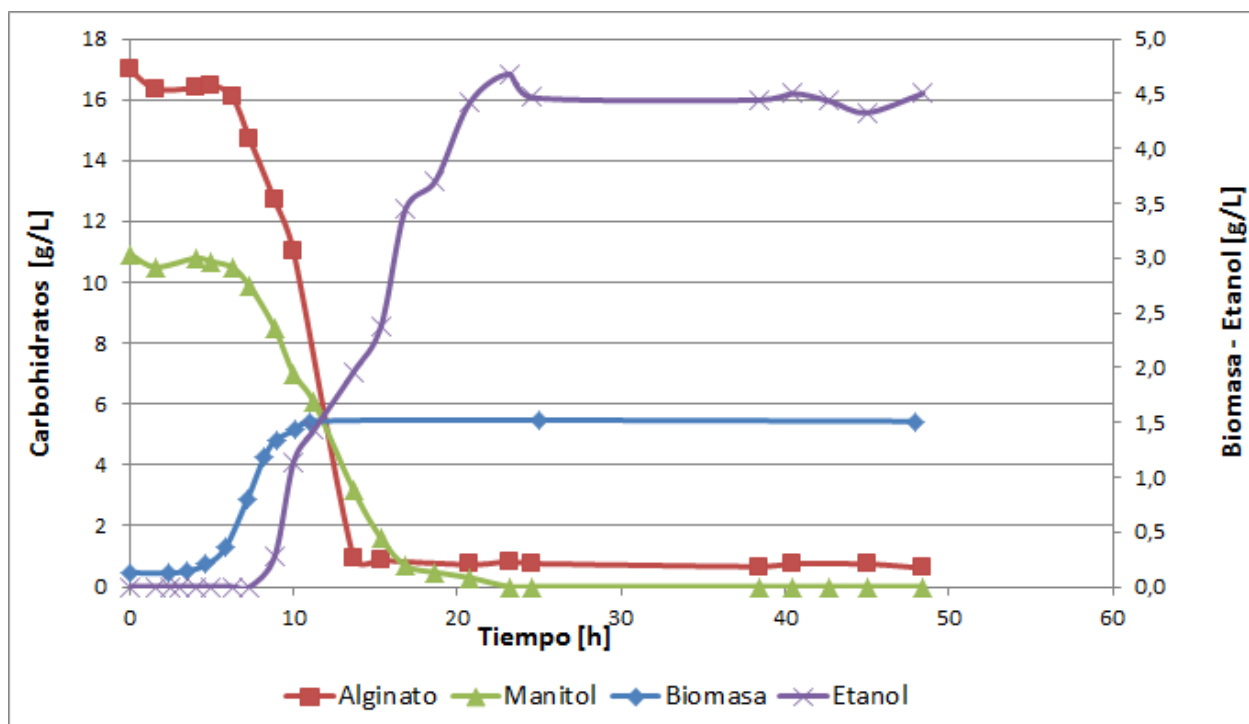


Gráfico 3.6: Consumo y producción cultivo 1,6% de alginato y 1% de manitol

Las tasas de consumo (pendientes) que se exhiben son menores a las observadas en el cultivo anterior (2% de alginato y 0,6% de manitol), lo que podría ser causal de la menor tasa de producción de etanol. No obstante, la aparición de etanol en el cultivo afecta directamente al consumo de los carbohidratos presentes, ya que éstos caen rápidamente a cero, mostrando que la cinética de consumo y producción no cambió, a pesar de crecer en condiciones distintas. Vale mencionar que la producción de etanol comenzó antes que en el cultivo anterior y llegó a su máxima concentración alrededor de las 20 [h], igual que en caso previo. Esto indica que, en efecto, hubo mayor tiempo de fermentación logrando una concentración final de etanol mayor, de 4,5 [g/l].

Metabólicamente, pareciera que al disponer de menos masa de alginato, el microorganismo recurre a manitol para la formación de piruvato, lo que sumado a menores tasas de mantenimiento resultaría en una mayor concentración de etanol. Además, la degradación enzimática de alginato podría haber aumentado su eficiencia, debido a que la masa a procesar es menor. Esto tendría un impacto directo en el flujo que entra a las vías de degradación y, posteriormente a la ruta de formación del producto. Para este caso se esperaría que un mayor flujo de alginato sea transformado a etanol.

El Gráfico 3.7 muestra los cambios de concentración de alginato, manitol, etanol y biomasa durante 48 [h] en un cultivo con 1% de alginato (razón 5:8). Los cambios de concentración en el tiempo de dichas entidades está ilustrado en las curvas de consumo y producción, siendo de gran importancia, puesto que fue en este punto donde Wargacki y su equipo decidieron fermentar, justificando su decisión en que esta composición es similar a la de las algas pardas [32]. Se debe recordar que dicha proporción (razón 5:8 de alginato-manitol) no se cumple en *Macrocystis pyrifera* (ver Tabla 1.1), lo cual vuelve más interesante el análisis.

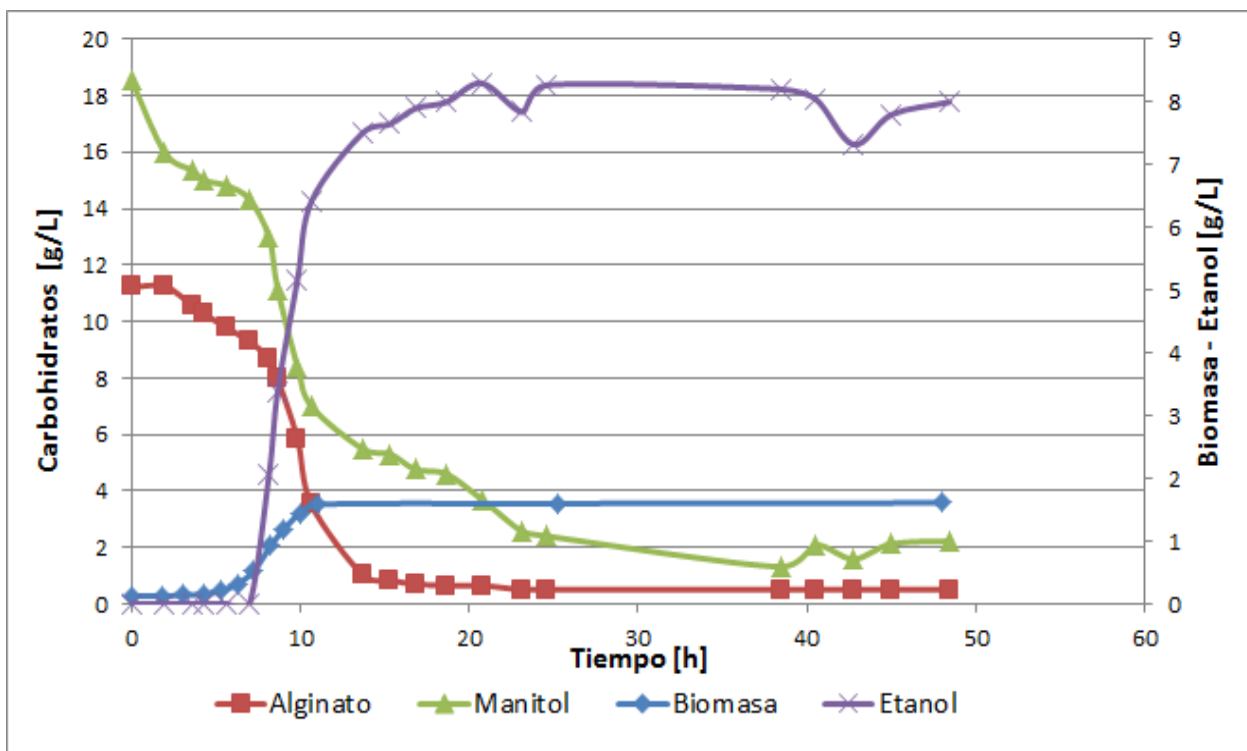


Gráfico 3.7: Consumo y producción cultivo 1% de alginato y 1,6% de manitol

Se puede apreciar que, a diferencia de los cultivos analizados hasta ahora, la producción de etanol comienza casi a la par con el crecimiento celular y que la tasa de producción (pendiente) es la mayor hasta ahora, alcanzando la concentración máxima de etanol a las 15[h] de cultivo, con un valor igual a 8 [g/L]. Esta concentración es casi el doble de las obtenidas en los cultivos con preponderancia de alginato.

Dado que la producción de etanol y el crecimiento celular se desarrollan en el mismo intervalo de tiempo, alginato y manitol disminuyen su concentración en el cultivo de manera simultánea. Considerando los rendimientos de biomasa antes presentados, es que se supone que ambos carbohidratos están entrando a la vía ED para ser convertidos en piruvato. De este flujo, sólo una pequeña parte está siendo destinada a la producción de biomasa, la cual contribuye al procesamiento de alginato, puesto que pone al servicio más enzimas; y el resto debería estar siendo procesado para la formación de producto. Por lo tanto, la razón que podría estar detrás de que la producción de etanol esté directamente asociada al crecimiento, es la masa de manitol

disponible en el cultivo. Este carbohidrato cumpliría doble función, ya que como se ha mencionado, es fundamental para otorgar poder reductor a la célula, permitiendo que la alcohol deshidrogenasa convierta el acetaldehído a etanol.

Esta última aseveración es respaldada gráficamente por los cambios de concentración de manitol. La curva presenta claramente dos secciones de consumo. La primera se puede relacionar a la formación de biomasa y la segunda a la producción de etanol. Tras el análisis del cultivo representado por el Gráfico 3.5, se sabe que es posible la fermentación sólo con el poder reductor que produce una mínima masa de manitol. En consecuencia, el flujo de alginato es transformado eficientemente a etanol con un mínimo consumo de manitol. El exceso de carbohidrato deber ser utilizado por las bacterias en otras vías.

La concentración de alginato en el medio disminuye a una tasa menor hasta que comienza la producción de etanol. Tras este punto (8 [h]), la pendiente de descenso se incrementa hasta que se acaba completamente el carbohidrato. Por lo tanto, el consumo presenta dos fases, una destinada principalmente a la producción de biomasa y otra para generar etanol, con un flujo mínimo a biomasa hasta alcanzar el estado estacionario.

Hasta este punto las diferencias en las tasas de consumo ligadas a la producción de biomasa y de etanol, para un mismo cultivo, no habían sido tan evidentes, dado que el crecimiento y la producción ocurren en tiempos distintos, proporcionando continuidad al cambio de concentración. En otras palabras, la disminución de sacáridos en el medio debido a la proliferación era sucedida, inmediatamente, por el consumo responsable del aumento de la concentración de etanol en el cultivo. No obstante, el cultivo con 1% de alginato y 1,6% de manitol mostraría que una vez finalizado el crecimiento, la componente del consumo ligada a la producción sería la única responsable del cambio de concentración de los carbohidratos presentes en el medio. Ésta estaría incluida, en las primeras horas del cultivo, en el primer segmento de la curva, cuya tasa de consumo sería el resultado de proliferar y producir etanol simultáneamente. Esto se puede observar especialmente en los cambios de concentración de manitol que exhibe el Gráfico 3.7.

Es importante recordar que, en éste y en los casos anteriores, la baja variación de la concentración en las primeras horas de cultivo podría asociarse al tiempo de adaptación del microorganismo a la degradación de alginato. Con la vía funcionando eficientemente (ya activada), el consumo aumentaría y se destinaría, como ya se mencionó antes, a la producción de etanol. A pesar de que el contenido de alginato en el medio es menor que en los casos anteriores, la eficiencia de las vías degradativas no disminuye, puesto que de ser así la tasa de producción sería baja. El flujo másico destinado a la producción no solo proviene de las vías de degradación de alginato, sino que también de las de manitol. Para la célula, éste último es fácil de metabolizar, y a causa de que su concentración en el medio no es menor, el flujo se procesa igual o más rápido que en los otros casos expuestos, teniendo consecuencias a nivel de producción (tasa). La menor concentración de alginato, por otro lado, implica que la masa proteica necesaria para procesarlo es menor, y con ello la carga metabólica disminuye, y por lo tanto, el sustrato puede ser mejor aprovechado. En consecuencia, la maquinaria enzimática funciona similar en todas las condiciones discutidas hasta ahora.

Si la composición de la macroalga propuesta como materia prima para la producción de biocombustible fuera similar a la razón 5:8, entonces fermentarla podría ser económicamente viable, suponiendo que la célula sea capaz de degradar eficientemente ambos carbohidratos para la producción de etanol, los aproveche al máximo y obtenga concentraciones de producto similares a las alcanzada si se fermentara dicha razón de alginato-manitol.

El Gráfico 3.8 es el último en que se analizan los flujos de consumo y producción. Este cultivo tiene un 2% de manitol y sólo un 0,6% p/v de alginato, pero esta concentración es suficiente para que el cultivo se comporte totalmente distinto al experimento con manitol como única fuente de carbono. Éste último presentó bajas concentraciones de biomasa y ausencia de etanol tras 25 y 48 [h] de cultivo. En consecuencia la presencia de alginato en el cultivo permitiría una sinergia entre ambos sustratos, logrando una densidad celular comparable con la de los otros cultivos, y el carácter fermentativo en el mismo.

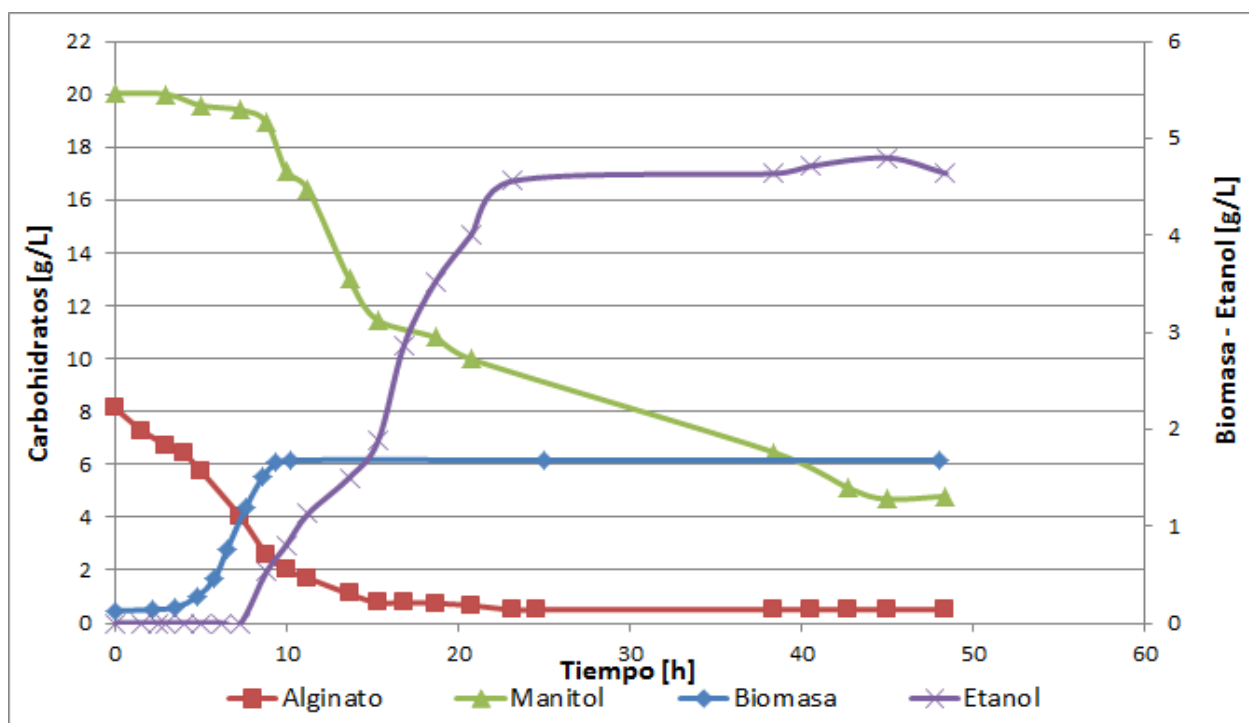


Gráfico 3.8: Consumo y producción cultivo 0,6% de alginato y 2% de manitol

Las curvas de crecimiento y producción de etanol se comportan similares a los cultivos con mayor concentración de alginato, ya que la producción de etanol comienza pocas horas antes de alcanzar la concentración final de biomasa. A pesar de disponer de manitol en altas concentraciones (2% p/v), pareciera que este carbohidrato no promueve la producción temprana de etanol, como se pudo apreciar en el cultivo anterior (ver Gráfico 3.7). El metabolismo de manitol está asociado a la producción de etanol, puesto que su concentración disminuye drásticamente cuando comienza la producción de etanol. Los cambios de concentración de manitol durante la fase temprana de crecimiento son casi nulos, contrario a lo que sucede con alginato, quién sí estaría siendo procesado para la formación de biomasa.

Con el inicio de la producción de etanol en el medio y la baja masa de alginato disponible, los flujos de ambos sustratos son conducidos a la producción de etanol, limitando la formación de biomasa, hasta que se consume por completo el alginato disponible en el medio. Esto constituiría la primera etapa fermentativa de la célula. En este segmento pareciese que, tanto alginato como manitol, son consumidas con una tasa similar.

La curva de producción de etanol exhibe una segunda etapa fermentativa, donde el principal carbohidrato utilizado es manitol, aunque no se consume por completo, pues un cuarto de la masa no fue degradada. A pesar de que la tasa de producción es similar a la obtenida en la etapa anterior, el cambio de concentración de manitol es menor. Esto se puede asociar a la ausencia de alginato en el cultivo, el cual restablece el balance redox en la célula y confiere mejores condiciones para la fermentación. Una vez metabolizado el alginato presente en el medio, parte del manitol entraría a las vías glicolíticas para ser transformado en piruvato (y posteriormente en etanol). Este proceso genera un exceso de equivalentes reductores, que podrían ser utilizados por los oligoalginatos que aún estén *ad portas* de ser metabolizados por la célula y que no son cuantificados por el HPLC, ya que metabolizarlos conlleva a un consumo de poder reductor. Cuanto menor sea la concentración de oligómeros, menor será la masa de manitol procesada hasta piruvato, y por lo tanto, menor la tasa de consumo hasta que el poder reductor sea consumido para no desequilibrar a la célula. En consecuencia, el alginato es eficientemente utilizado.

A diferencia del cultivo con la razón 5:8 de alginato-manitol (1% de alginato), la tasa de producción de etanol es menor, alcanzando la concentración máxima de producto cerca de las 20 [h] de cultivo. El máximo de etanol obtenido corresponde a 4,6 [g/l].

Luego de analizar las curvas de consumo y producción de los cultivos en distintas razones de alginato-manitol, se observó que la cinética de consumo y producción pareciera no ser afectada por la composición de carbohidratos. La mayoría de los análisis realizados se aplican a todos los cultivos. El análisis de las curvas permite especular acerca de qué estaría pasando dentro del microorganismo. Gracias a esto, se observó que la biomasa declina su crecimiento cuando comienza la producción de etanol. Los sustratos son degradados hasta piruvato, y éste es rápidamente transformado por la enzima piruvato descarboxilasa, la cual tiene una alta afinidad por su sustrato [39, 52, 53]. Tanto ésta como la alcohol deshidrogenasa (enzimas en la vía de producción de etanol) están expresadas constitutivamente en BAL 1611, por lo que cualquier flujo de piruvato es transformado rápidamente a etanol, limitando su paso a otras vías, como por ejemplo el ciclo de Krebs, fuente de precursores para algunos aminoácidos. Esto sucede una vez que la concentración de biomasa es capaz de generar la masa suficiente de enzimas para degradar alginato. En este punto la proliferación celular se ve disminuida. En los cultivos por lote, la limitante de crecimiento es la falta de sustrato, cosa que no ocurre en estos cultivos. Por esto se concluye que la producción de etanol limita el crecimiento, a causa del desbalance metabólico inducido por las enzimas constitutivas que transforman piruvato en etanol.

Todos los cultivos alcanzan sus concentraciones máximas de etanol luego de 20 [h]. Los valores obtenidos pueden ser tolerables por *E. coli*, por lo que la concentración del producto no afectaría la viabilidad del microorganismo, ni sería inhibitorio de por sí [54].

Es importante destacar que el método utilizado para medir concentraciones en los cultivos (HPLC- método de azúcares) no permite cuantificar oligoalginatos. Considerando la eficiencia de las enzimas, la tasa de desaparición de alginato, no necesariamente es la misma que la de los oligómeros, e incluso se puede pensar que éstos persistirían en el cultivo más tiempo. Por un lado, este hecho permite fermentar más allá de acabado el alginato; y por otro lado abre la interrogante de si éste es completamente consumido. Si no lo es, entonces su masa no se está considerando al momento de realizar cálculos, generando errores en los resultados. No obstante, en esta memoria, se considerará que los oligómeros son consumidos en su totalidad.

3.1.2.5 Rendimiento de Producto ($Y_{p/s}$)

El último parámetro a evaluar, es el rendimiento de producto. Éste se obtuvo con las concentraciones máximas de etanol alcanzadas en las fermentaciones. Para cada razón de alginato-manitol, se realizaron cultivos en triplicado. El error, al igual que en los gráficos anteriores, está representado por las barras.

Hasta ahora, ni la velocidad de crecimiento, ni el rendimiento de biomasa han sido suficientes para determinar alguna condición óptima de fermentación. Sin embargo, han sido de suma importancia para eliminar la variable de composición química de las macroalgas, propuestas como sustrato para la producción de etanol.

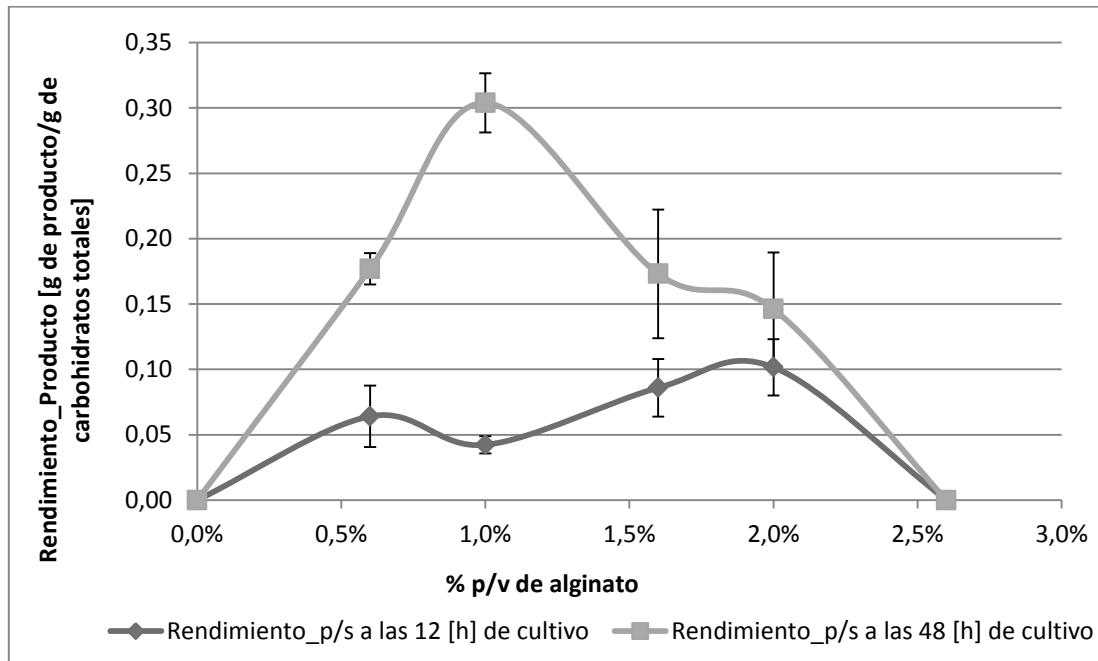


Gráfico 3.9: Rendimiento de Producto

El Gráfico 3.9 muestra el comportamiento de los rendimientos de producto a las 12 y 48 [h] de cultivo en las distintas razones de alginato-manitol. Inicialmente se supuso que la

producción de etanol estaría ligada al crecimiento del microorganismo, alcanzando ambos el estado estacionario tras 12 [h] de cultivo. Sin embargo al cuantificar las muestras de los cultivos y construir las curvas de consumo y producción, éstas quedaron incompletas, por lo que se decidió medir por otras 36 [h] (48 [h] de cultivo). Con estas nuevas mediciones se completaron las curvas y se pudo apreciar la concentración máxima de etanol, la que se alcanzó aproximadamente a las 25 [h], pero se tomó una muestra de cultivo a las 48 [h] para cuantificar el rendimiento de producto en las distintas razones de alginato manitol al final de cada fermentación. Estos valores son los que se muestran en el Gráfico 3.9.

Los cultivos extremos presentaron concentración nula de etanol en todos los tiempos de cultivo medidos. Esto refuerza la conclusión que dichos puntos no son viables para la fermentación de carbohidratos.

Se calculó el rendimiento de producto a las 12 [h] de cultivo. Los resultados obtenidos muestran que los rendimientos son similares entre sí, aumentando levemente hacia los cultivos con mayor concentración de alginato. Esto resulta ser favorable si se considera que cerca del 60% de los carbohidratos del alga son alginatos, el que podría convertirse eficientemente a etanol. Esta medida corresponde a un censo inicial, ya que como se vio en la sección anterior la producción de etanol comienza alrededor de las 8[h].

Se midió la concentración al final del cultivo y se obtuvo un cambio importante en los rendimientos, si se comparan con los calculados a las 12[h] de cultivo. A diferencia de los parámetros anteriores, el rendimiento de producto a las 48 [h] resultó ser el óptimo. Esto significa que fermentando en razones 5:8 de alginato-manitol, el microorganismo crece a una velocidad razonable y se torna eficiente en la conversión de sustrato a biomasa y, sobre todo, a etanol. Por tanto, esta condición presenta los máximos experimentales.

Los tiempos en que se alcanza la máxima concentración de biomasa y de etanol, en los cultivos con la razón 5:8 de alginato-manitol, son comparables con los tiempos en que los otros cultivos llegan a estado estacionario, inclusive la concentración final de producto se logra antes en este cultivo. Esto se puede comprobar en los gráficos de consumo y producción. El tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima es cercano a las 20 [h], por lo que no es necesario realizar fermentaciones de 24 [h] en las mismas condiciones. De esta manera se evita malgastar recursos en el mantenimiento del cultivo, particularmente agitación y calentamiento. Este tiempo máximo de fermentación debe ser evaluado en escalas mayores, escalando y controlando las condiciones fluidodinámicas.

El óptimo obtenido se relaciona, además, con el estado en que se encuentra el microorganismo. Según lo observado y analizado en el Gráfico 3.3 y en el Gráfico 3.4, la tasa de mantenimiento al fermentar en estas condiciones, debería ser de las más bajas. Esto no se puede aseverar, puesto que es muy difícil cuantificar la tasa de mantenimiento del microorganismo.

Se puede observar que el máximo cambio de rendimiento en el tiempo resultó darse en las condiciones que ahora se consideran óptimas. Esto podría reflejar la eficiencia fermentativa en dichas condiciones.

El máximo experimental, coincide con las condiciones en que fermentaron Wargacki y su equipo. No obstante, este trabajo muestra una serie de razones por la cual se consideran éstas como condiciones óptimas.

La Tabla 3.3 resume los rendimientos de producto a las 12 y 48 [h].

Tabla 3.3: Rendimientos de producto

% p/v de Alginato	Rendimiento Producto a las 12 [h] [g de producto/ g de sustrato]	Rendimiento Producto a las 48 [h] [g de producto/ g de sustrato]
2,6 %	0	0
2%	0,102 ± 0,022	0,146 ± 0,043
1,6%	0,086 ± 0,022	0,173 ± 0,049
1%	0,042 ± 0,007	0,304 ± 0,023
0,6%	0,064 ± 0,024	0,177 ± 0,012
0%	0	0

Los valores obtenidos son similares a los rendimientos de etanol a partir de glucosa en *E. coli* genéticamente modificada [55, 56]. Aunque, en su mayoría son menores a los presentados por Wargacki y su grupo [32].

Es importante mencionar que mientras menor sea concentración de los sustratos fermentados, mayor es la posibilidad de que los rendimientos sean bajos, debido a que un mayor flujo es destinado al mantenimiento del microorganismo, proporcionalmente. Las tasas de mantenimiento se pueden volver despreciables frente a los requerimientos de crecimiento en fermentaciones a mayor escala.

Fuera del óptimo, se observa que los rendimientos en las otras condiciones de cultivo son similares entre sí. En consecuencia, se abre así la oportunidad de fermentar algas con mayor o menor contenido de alginato, logrando conversiones similares. Los rendimientos obtenidos para los cultivos con mayor presencia de alginato presentan los mayores errores (mayores al 20%), lo que hace que el rendimiento experimental sea variable, en lugar de ser constante entre distintos lotes de fermentación.

Los resultados indican que para un mayor rendimiento de producto es necesaria una mayor concentración de manitol, en comparación con la de alginato. Sin embargo, la razón alginato-manitol no debe ser muy distinta de 1, puesto que para razones más extremas el rendimiento disminuye notablemente. Dicha relación permitiría la transformación de manitol a piruvato, manteniendo el balance redox en la célula.

Los experimentos realizados no incluyeron la temperatura como variable. Estudios previos con macroalga (Wargacki *et al.*, 2012) indicarían que se obtienen mejores rendimientos si la fermentación se realiza a 30[°C]. Sería interesante, como recomendación, estudiar los

parámetros en dichas condiciones con rigurosidad y compararlos con los resultados obtenidos. Dado que *E. coli* crece, de manera óptima, a 37 [°C], se cree que esta temperatura sería la ideal para la formación de biomasa, y para el funcionamiento de la maquinaria degradativa de alginato.

3.1.3 Fermentaciones Micro-aeróbicas

Las fermentaciones micro-aeróbicas se realizaron en viales de 150 [ml]. El medio de cultivo utilizó la capacidad completa del recipiente, luego fue sellado herméticamente. Las muestras fueron tomadas con una jeringa estéril.

En los cultivos aeróbicos, la agitación y aireación son variables importantes, sobre todo al momento de cambiar de escala productiva, ya que implican costos no menores. Algunas fermentaciones en escala productiva se realizan en condiciones anaeróbicas con microorganismos capaces de desarrollarse en dicho ambiente, disminuyendo algunos costos. Los microorganismos anaeróbicos tienen metabolismo energético menos eficiente que los aeróbicos, lo cual implica menores tasas de crecimiento y cultivos más extensos en el tiempo. Cabe destacar que este último punto no necesariamente se traduce en menores rendimientos y/o conversión, incluso varios organismos anaeróbicos están siendo ampliamente estudiados por sus altos rendimientos de etanol en ausencia de oxígeno [39]. En consecuencia, es importante comparar y analizar si existe una ventaja comparativa entre una u otra condición, y si estas condiciones pueden ser complementarias en distintas fases del proceso, tal como lo presentó la publicación de Wargacki.

E. coli es un anaerobio facultativo, por tanto debería crecer y fermentar en ausencia de oxígeno luego de un tiempo de adaptación. Pensando en una escala productiva, poder producir etanol en condiciones micro-aeróbicas (anaerobia estricta es más compleja de conseguir), eliminaría la variable aireación y disminuiría la necesidad de agitación mientras los procesos de transferencia y homogeneidad no se vean afectados. Por lo tanto, es relevante realizar experimentos en estas condiciones. Cabe destacar que de obtenerse producciones de etanol comparables con las presentadas en los cultivos aeróbicos, se procederá a evaluar la potencia de agitación y diseño de fermentador, tal como se explicó en la metodología general (ver sección 2.1).

La primera interrogante a responder fue si los microorganismos crecían en condiciones micro-aeróbicas y en distintas razones de alginato-manitol como fuente única de carbono. Si la respuesta fuera afirmativa, entonces se podrían analizar los rendimientos de biomasa, de producto y el tiempo necesario para que el cultivo se desarrolle. Luego se compararían los resultados y se tomaría una decisión, considerando además si económicamente conviene más una mayor agitación para aumentar el rendimiento de producto, o si es conveniente mantener el cultivo más tiempo en condiciones micro-aeróbicas para lograr una concentración máxima de etanol mayor o igual a la obtenida en los cultivos aeróbicos, entre otros puntos en donde la variable económica influye considerablemente. Los experimentos planteados y realizados para estudiar el comportamiento fermentativo en condiciones micro-aeróbicas han sido concebidos en escala de laboratorio, en la cual la variable económica no es tan tangible como en escalas productivas, sin embargo vale considerarla, a grandes rasgos, para tener nociones de cuánto costaría fermentar en

determinadas condiciones, según lo obtenido en los resultados realizados en esta escala. No obstante, variables de importancia económica como agitación, calentamiento, tiempo cultivo, entre otras, deben ser evaluadas e incluidas en el diseño del fermentador (o de la planta productiva), considerando los fenómenos de transferencia, etapas limitantes y fluidodinámica del proceso.

Si los microorganismos no proliferaran en estas condiciones, entonces habría que definir en qué punto se debe comenzar el cultivo micro-aeróbico (concentración de biomasa) y evaluar la producción de etanol. En el mejor de los casos, las bacterias fermentarían con rendimientos altos, a pesar de que no crezcan. Sin embargo, en términos económicos, es importante identificar cuánto sustrato serían capaces de fermentar para no desperdiciar la materia prima, además de evaluar cómo se comportan en las distintas razones de alginato y manitol. Por lo tanto, los factores a analizar para tomar una decisión son tres, resultando muchos experimentos si se estudian todas las combinaciones posibles. Por esta razón es que se realizó un diseño experimental dónde se definieron los factores de estudio y los límites en que éstos podrían variar (ver sección 2.3.7). Los resultados obtenidos de las fermentaciones se presentan a continuación.

La Tabla 3.4 muestra las condiciones en que se realizaron las fermentaciones a partir del diseño experimental estadístico.

Tabla 3.4: Condiciones de fermentaciones micro-aeróbicas

Experimento	D.O del cultivo recién inoculado [% v/v]	Concentración de azúcares totales [% p/v]	Razón de alginato-manitol
1	5%	0,50%	3:10
2	50%	0,50%	3:10
3	5%	2%	3:10
4	50%	2%	3:10
5	5%	0,50%	10:3
6	50%	0,50%	10:3
7	5%	2%	10:3
8	50%	2%	10:3
9	25%	1%	5:8
10	25%	1%	5:8
11	25%	1%	5:8

A pesar de que *E. coli* es facultativo, ninguno de los cultivos realizados mostró crecimiento. Era esperable que, para aquéllos cuyo inóculo inicial estuviese más concentrado y dispusieran de menos masa de azúcares, no se observara crecimiento, como es el caso de los experimentos 2 y 6. Por el contrario, se esperaba crecimiento de los cultivos 3 y 7, debido a que la masa de carbohidratos en el medio era mayor, el que podía ser utilizado por las bacterias para aumentar su concentración celular (pequeña al inicio del cultivo).

A diferencia de los cultivos aeróbicos, el tiempo de fermentación fue de 72 [h], debido a que se consideraron los tiempos de adaptación a las nuevas condiciones y que la producción sería a una tasa menor. A medida que avanzaba la fermentación se decidió extender los tiempos en que se tomaban muestras, debido a que las bacterias no estaban creciendo y que ese intervalo era suficiente para obtener curvas de consumo y producción con buena resolución.

Al cuantificar el consumo y la producción se observó que todos los cultivos degradaron completamente los carbohidratos en el medio. Sin embargo, la concentración de etanol fue considerablemente menor que en los cultivos aeróbicos, dando indicios de que esta condición no era factible para los propósitos fermentativos deseados. Por ello, no se procedió a analizar los resultados del diseño factorial con el modelo propuesto para esta condición. Tampoco se realizaron los experimentos, ni los análisis propuestos a continuación del diseño experimental para evaluar la potencia de agitación y el diseño del fermentador.

La concentración final alcanzada en cada uno de los experimentos propuestos por el diseño estadístico experimental se compara con los resultados obtenidos en cultivos aeróbicos en condiciones similares en el Gráfico 3.10. Los cultivos se realizaron en duplicado (excepto los que representaban el punto central, el que se realizó en triplicado), pudiendo asociar un error.

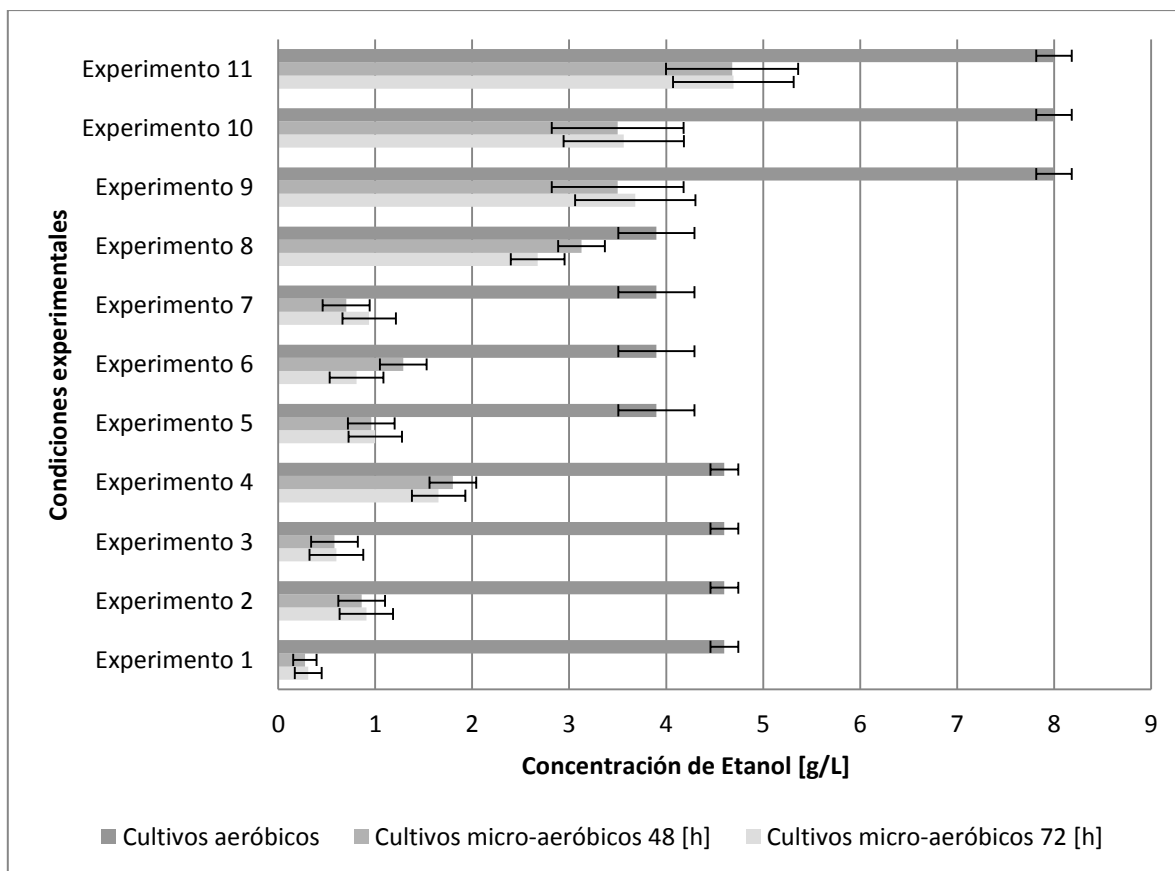


Gráfico 3.10: Concentración de etanol en cultivos micro-aeróbicos

Se puede apreciar que la producción de etanol, en general, es bastante baja en comparación con la concentración alcanzada en los cultivos anaeróbicos. Tiene sentido que los experimentos 1, 2, 5 y 6, tuviesen una baja concentración de etanol, debido a que la concentración de azúcares totales era muy baja. Es notable que la diferencia de concentración entre los cultivos 1 y 2, al igual que 5 y 6, es menor al 30% a pesar de que el experimento 2 y 6 tuvieran una concentración de biomasa 10 veces mayor. Esto indicaría que existe un consumo no menor para mantener a la biomasa cuando el sustrato disponible tiene baja concentración, ya que a pesar de no estar utilizando sustrato para proliferar, este no estaría siendo utilizado en su totalidad para fermentar, sobre todo en los cultivos con mayor concentración celular. Para los cultivos que disponen de más sustrato, se puede apreciar que las concentraciones alcanzadas se diferencian en más de un 70%, sugiriendo que las tasas de mantenimiento se hacen despreciables frente al flujo que está siendo procesado a etanol, y que éste es mayor si aumenta la biomasa presente en el cultivo.

Las concentraciones de etanol alcanzadas en los cultivos con inóculo inicial pequeño (1, 3, 5, 7), sugieren que es necesaria una masa crítica para fermentar y alcanzar concentraciones atractivas para operar en estas condiciones. Si la masa de carbohidratos fermentables es suficiente, además de cumplir con lo enunciado en cuanto a la biomasa, las mayores concentraciones deberían obtenerse en los experimentos 4 y 8 (sólo cambia la razón de alginato-manitol) del diseño experimental, el cual consta de 8 experimentos en distintas condiciones. Adicionalmente se incluyeron los puntos medios del diseño, los cuales son optativos, pero sugeridos y están representados por los experimentos 9, 10 y 11. La concentración máxima de etanol se logra en los experimentos 4 y 8, tal como se había deducido, siempre y cuando no se consideren los puntos medios. Sin embargo, son éstos últimos los que, en efecto, presentan las mayores concentraciones de etanol. No obstante, el valor conseguido no es comparable con los valores conseguidos por los cultivos aeróbicos. Es importante mencionar que los cultivos microaeróbicos y aeróbicos no son directamente comparables, ya que éstos últimos disponían de más sustrato y la concentración de biomasa alcanzada es mayor, pero de igual manera los rendimientos son bajos.

Los experimentos 9, 10 y 11 son triplicados de una misma condición, que representa el punto central de las variaciones de los factores escogidos. El punto central del factor 3, coincide con la razón 5:8 de alginato-manitol. La concentración de etanol en estos cultivos es la mayor de todos los experimentos, lo cual reforzaría, que esta razón es la mejor para fermentar teóricamente.

El gráfico muestra las concentraciones de etanol a las 48 [h] y a las 72 [h]. En general, éstas no varían mucho entre sí, sugiriendo que el proceso fermentativo llegó a estado estacionario antes de las 48 [h]. Sin embargo, se puede apreciar que en algunos cultivos (4, 6 y 8) la concentración a las 48 [h] es levemente mayor que a las 72 [h]. Esto se puede asociar a un error experimental, o bien a que la enzima alcohol deshidrogenasa es reversible [52, 53], ya que no se han reportado estudios en que *E. coli* utilice etanol como fuente de carbono.

Los procesos en condiciones anaeróbicas (o similares) se ven favorecidos si el potencial redox es bajo. Esto se puede lograr eliminando los agentes oxidantes como el oxígeno, o bien aumentando los reductores. Como se ha mencionado antes, el metabolismo de manitol genera

equivalentes reductores, por lo que es de esperar que en condiciones micro-aeróbicas, la fermentación de manitol sea más eficiente. No obstante, los resultados no mostraron diferencias importantes en las concentraciones de etanol de cultivos con más masa de manitol en el medio (experimentos 1- 4), con respecto a los otros experimentos.

3.1.4 Fermentaciones de Macroalga

Los experimentos realizados hasta ahora notifican lo que sucedería si se fermentaran composiciones teóricas de macroalgas pardas con carbohidratos puros. No obstante, es fundamental para este estudio y posibles aplicaciones, evaluar lo que sucede al fermentar algas y comprobar si los resultados se replican.

Los resultados obtenidos permitirán definir la factibilidad, *grosso modo*, de producir etanol a partir de algas pardas. Además, en este trabajo se evaluará la eficiencia de sacarificar y fermentar simultáneamente (SSF), pudiendo eliminar etapas en la producción de etanol, volviéndolo más atractivo y rentable. La sacarificación y fermentación simultánea, se realizaron adicionando alginato liasas de Sigma (aislada de *Sphingomonas sp.A1*) y oligoalginato liasas proporcionadas por BAL Chile S.A. (aislada de *E. coli* BL21(DE3)). Se añadió manitol comercial como suplemento para algunos cultivos, para evaluar si el porcentaje presente en el alga permite la fermentación.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos al fermentar *Macrocystis pyrifera* pretratada con una solución de ácido sulfúrico al 2% y sin este pretratamiento.

3.1.4.1 Crecimiento Celular

Tal como se mencionó en la metodología, las curvas de crecimiento celular se obtuvieron mediante recuento en placa. Las muestras se plaquearon y se incubaron a 37[°C] durante 12[h]. Las unidades formadoras de colonias por unidad de volumen ([UFC/ ml]) obtenidas se tabularon y luego, mediante la ecuación (2) de la sección 2.3.10 se expresaron en unidades de absorbancia, para, posteriormente, poder expresarlas en unidades de masa por volumen ([g/l]). El proceso de transformación de unidades tiene errores asociados, sobre todo porque las curvas de calibración no fueron realizadas a partir de las fermentaciones de alga. En consecuencia el Gráfico 3.11 muestra una aproximación de la proliferación de los microorganismos al ser cultivados en algas.

Se puede apreciar que la concentración alcanzada es mayor a la de los cultivos con reactivos comerciales. Esto se puede asociar a que las algas tienen una composición variada y rica en carbohidratos metabolizados naturalmente por *E. coli*, siendo estos flujos los que aumentarían la biomasa en los cultivos.

También se observa que los cultivos con alga sin pretratamiento alcanzan una concentración levemente mayor. Esto puede tener dos explicaciones. La primera es que al ser pretratada con ácidos diluidos, parte del contenido de azúcares se pierde en el tratamiento, aunque las pérdidas no han sido importantes, de acuerdo a los estudios que los avalan (Dra. M^a

Cristina Ravanal “comunicación personal”). Por otro lado, se tiene que las algas utilizadas en los cultivos sin pretratamiento, fueron directamente a los matraces, sin ser esterilizados previamente, ya que someterlos a altas presiones y temperaturas (autoclave) se considera como pretratamiento. Inclusive, el tratamiento con ácidos diluidos incluye etapas en que la muestra se somete a altas temperaturas (ver Anexo A1). Por lo tanto, las algas sin pretratar podrían acarrear consigo esporas o microorganismos adheridos a la capa exterior de la materia prima. Al dejar las placas cultivadas por más de 12 [h], se podía apreciar claramente la presencia de hongos, más que nada en las muestras provenientes de los cultivos con algas sin pretratamiento, ya que el procedimiento con ácido sulfúrico esteriliza, de manera indirecta. Es por ello, que la experiencia se tuvo que repetir, esterilizando en el autoclave ambas muestras, es decir, las algas tratadas y no tratadas con ácido sulfúrico. Así, el error debería disminuir, aunque no se tiene la certeza de la completa eliminación de los hongos.

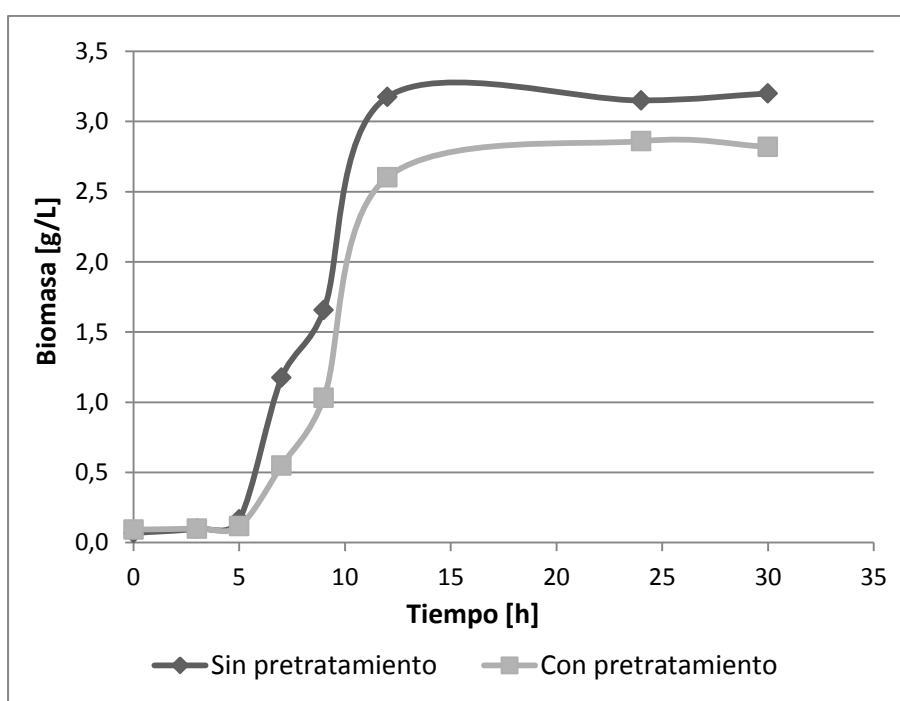


Gráfico 3.11: Concentración de biomasa en fermentaciones de *Macrocytis Pyrifera*

En escala industrial, se podría fermentar las algas directamente extraídas del mar, con un secado previo para disminuir el contenido de agua. Dados los resultados obtenidos, es altamente probable que los fermentadores, además de bacterias, puedan contener otro tipo de microorganismos. Para saber cómo podría afectar la producción de etanol habría que aislarlos y estudiarlos, pero *a priori* podrían convivir dentro del cultivo. Se recomienda, de todas maneras, esterilizar la materia prima antes de fermentarla.

3.1.4.2 Producción de Etanol

El Gráfico 3.12 y el Gráfico 3.13 muestran los resultados de las fermentaciones realizadas en condiciones aeróbicas.

El Gráfico 3.12 muestra las fermentaciones de algas sin pretratamiento con ácidos diluidos. Se discierne que, a pesar de que las algas no fueron pretratadas, igualmente fermentaron, alcanzando concentraciones de etanol cercanas a los 3[g/l]. La adición de enzimas y manitol aumentó la tasa de producción, con respecto a las fermentaciones de alga sin pretratamiento. Sin embargo, este incremento sólo implica que el estado estacionario se alcanza antes, y no afecta la concentración máxima obtenida en uno u otro caso. Agregar enzimas al cultivo (sacarificación y fermentación simultánea) permite la exposición del polímero de alginato y facilita su degradación, además de aumentar el flujo de sustrato fermentable, ya que las enzimas complementan la maquinaria degradativa instaurada en la bacteria. Si, conjuntamente, se aumenta el manitol disponible, entonces se explicaría el aumento de la tasa de producción observada.

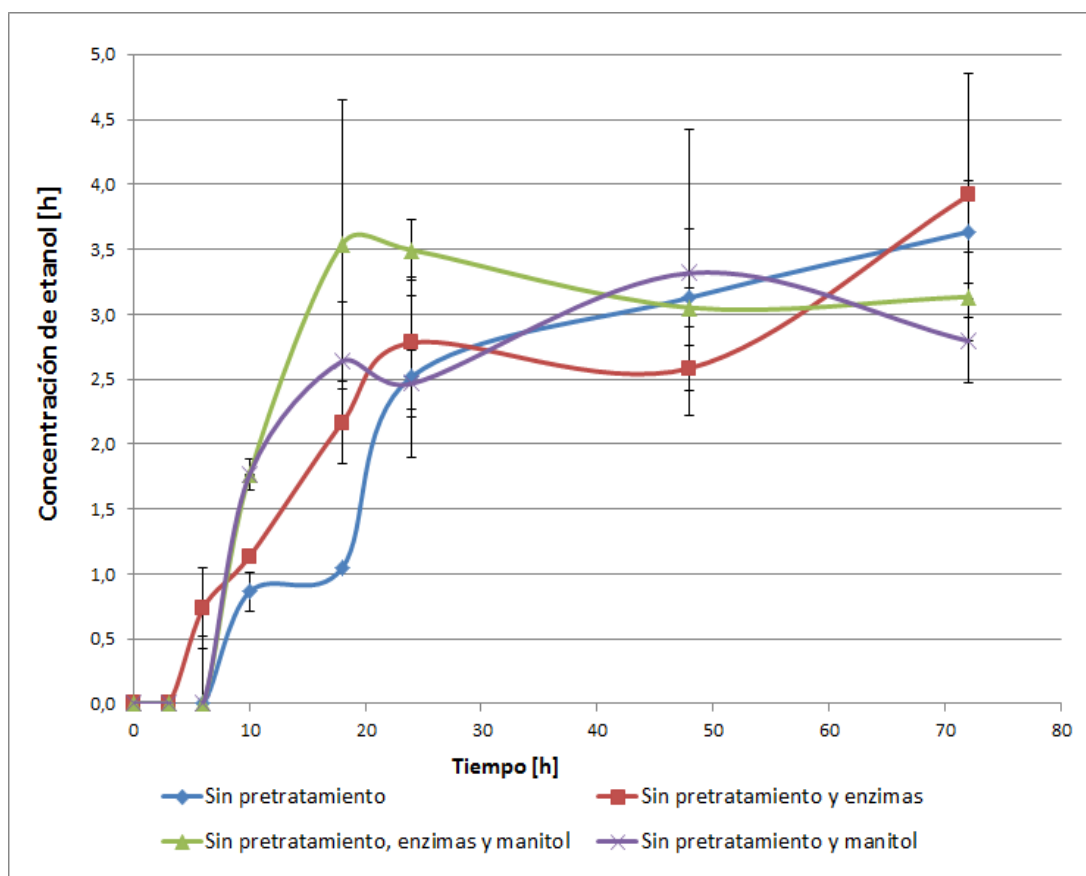


Gráfico 3.12: Fermentaciones de *Macrocyctis pyrifera* sin pretratamiento

Si se compara el cultivo con enzimas y manitol *versus* el que sólo fue suplementado con manitol, se observa que se comportan igual. Esto indicaría que la maquinaria de degradación de alginatos expresada en BAL1611 es suficiente para fermentar el alginato de macroalgas, siendo

prescindible una etapa de sacarificación. La presencia de manitol, por tanto, sería el principal responsable de la tasa de producción mayor, observada en dichos cultivos. Esto tiene sentido, pues como se aprecia en la Tabla 1.1, la masa de este carbohidrato en la macroalga es baja, comparada con la de alginato, aunque, de igual manera, se puede fermentar sólo alga obteniendo la misma concentración de etanol en un tiempo mayor (aproximadamente 5 [h] más de cultivo).

El Gráfico 3.13 muestra las concentraciones de etanol de las fermentaciones de macroalgas pretratadas con ácido sulfúrico.

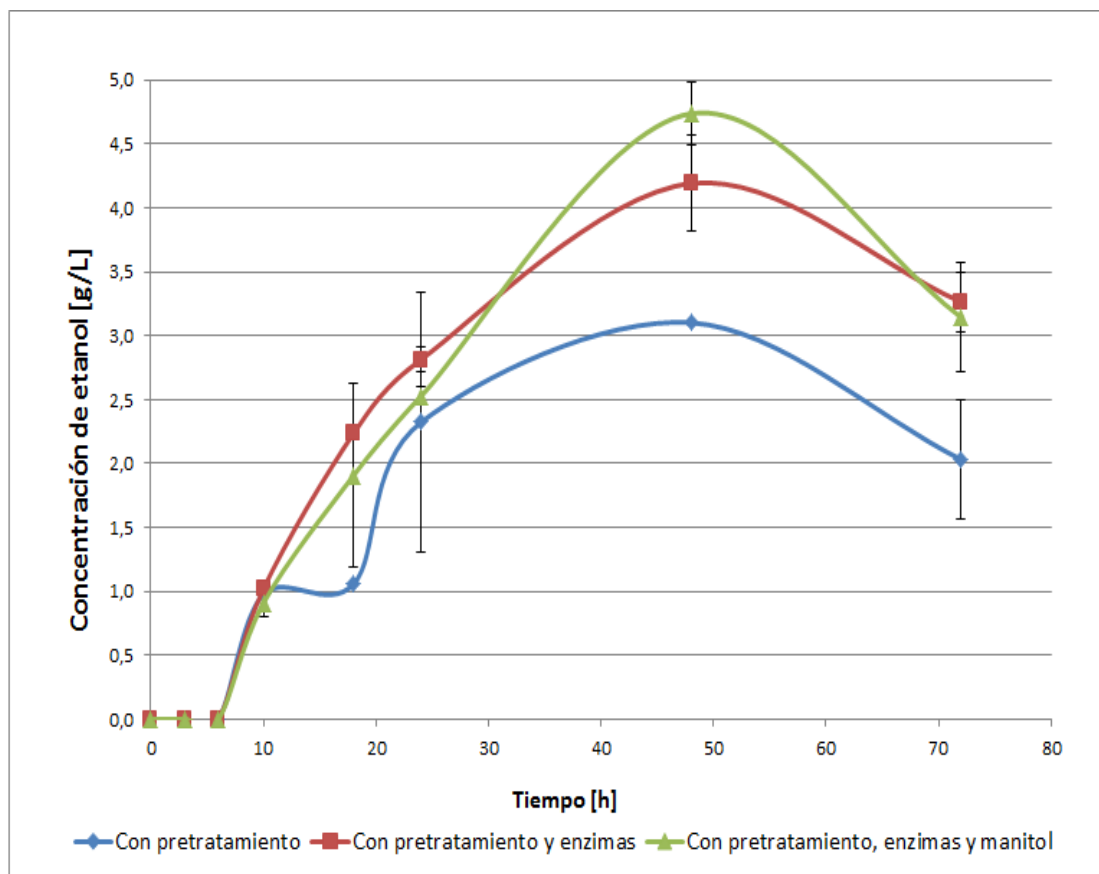


Gráfico 3.13: Fermentación de *Macrocystis pyrifera* con pretratamiento

Cuando las algas son pretratadas con ácido sulfúrico previo a la fermentación, la curva de concentración de etanol se comporta similar a las obtenidas en los cultivos sin pretratamiento. Particularmente, el experimento sin suplementos y con algas pretratadas, logra una concentración máxima de etanol igual a la de los cultivos sin pretratamiento, y con una tasa de producción mayor que la obtenida en la fermentación equivalente. Esto se puede asociar a que el tratamiento ayuda a exponer los carbohidratos del alga, haciéndolos más accesibles a las enzimas secretadas por la bacteria.

Como antes se mencionó, la maquinaria enzimática de degradación de alginato es suficiente para metabolizar el polímero, por lo que la adición de enzimas no aumenta la tasa de producción y la concentración de etanol es levemente mayor, pero sujeta a error experimental.

Se puede observar que las concentraciones de etanol son levemente mayores a las obtenidas en las fermentaciones con algas sin pretratamiento. La concentración máxima en estos cultivos está alrededor de 4 [g/l]. El cultivo suplementado con manitol es el que presenta la mayor concentración de producto (cerca de los 5 [g/l]), sugiriendo que manitol es un sustrato limitante para la formación de etanol, principalmente porque entrega poder reductor necesario para pasar de acetaldehído a etanol. Cabe destacar que se suplementó con una masa de manitol tal que la razón entre alginato disponible en el alga y el manitol del alga más el suplemento fuera 10:3. Es decir, que la masa de manitol adicionada es pequeña, siendo poco probable que ésta haya sido metabolizada para producir piruvato y luego etanol.

Los experimentos con alga pretratada se comportan similarmente a sus equivalentes no tratados, por lo que se considera que la fermentación de macroalgas, particularmente de *Macrocystis pyrifera* es factible a escala de laboratorio, proceso que podría escalarse, y para el cual no es necesario pretratar, ni incluir una etapa de sacarificación.

Al cuantificar la producción de etanol, se observó que el consumo de alginato en todos los cultivos se mantienen en un valor bajo y constante, lo que ilustra que a medida que se va liberando el alginato de la pared del alga, es degradado y consumido por los microorganismos.

Los rendimientos de producto varían entre 0,26 y 0,3 [g de etanol/g de masa seca], siendo considerablemente mayores a los valores obtenidos con reactivos comerciales. Esto se puede asociar a que las algas tienen más de un tipo de carbohidrato, los que pueden ser metabolizados naturalmente por el microorganismo, y por lo tanto hay un aprovechamiento total de los azúcares fermentables. De igual manera, se piensa que carbohidratos diferentes a alginato y manitol, son procesados para la formación de biomasa (uso de otros nutrientes) y para la tasa de mantención, permitiendo que el flujo de alginato y manitol se destine en su totalidad a la formación de etanol. Otra posibilidad es que parte de los otros carbohidratos sean procesados para formar piruvato.

La Tabla 3.5 muestra la masa de alga remanente en los cultivos (en duplicado) luego de fermentar 1 [g] de masa seca. Una vez finalizadas las fermentaciones, las fracciones de alga fueron colectadas y secadas a 100[°C] durante 24 [h], luego se masaron y tabularon. La finalidad de este experimento fue tener una idea de qué porcentaje de la materia prima fue fermentada. A diferencia de los cultivos con reactivos comerciales, estos experimentos contenían masa no fermentable proveniente del alga, por lo que era de esperar que existiera un remanente. Contrario a lo esperado, las fermentaciones sin pretratamiento degradaron más masa algal que las que sí fueron tratadas antes. Así, se puede comprobar la efectividad de la maquinaria de degradación, cuando el acceso a los carbohidratos no es tan directo. De la misma manera, se supone que otros nutrientes propios de la materia prima, pudieron ser aprovechados. Sin embargo no se identificó un patrón de consumo.

Tabla 3.5: Masa de macroalgas después de fermentar 1[g] de alga

Condiciones de fermentación	Masa de <i>Macrocystis pyrifera</i> luego de la fermentación [g]
Macroalga pretratada	0,61
Macroalga pretratada y enzimas	0,80
Macroalga pretratada, enzimas y manitol	0,60
Macroalga sin pretratamiento	0,22
Macroalgas sin pretratamiento y enzimas	0,23
Macroalgas sin pretratamiento, enzimas y manitol	0,19
Macroalgas sin pretratamiento y manitol	0,38

Para tener certeza de cuánto carbohidrato, efectivamente, había sido degradado, se enviaron dos muestras a caracterizar a la Universidad de Abo Akademi (Finlandia). Los métodos utilizados fueron: metanólisis ácida e hidrólisis ácida. Los resultados se cuantificaron mediante cromatografía de gases. Las muestras elegidas fueron las correspondientes a cultivos con algas sin pretratamiento, y con algas pretratadas y suplementadas con enzimas externas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.6.

Se escogieron estas muestras, pues la primera mostraría el escenario global y basal de consumo del microorganismo, mientras que la otra muestra daría cuenta de qué sucede cuando la materia prima se interviene con tratamientos y etapas previas a la fermentación (sacarificación), sin alterar los resultados con suplementos externos de carbohidratos. Es importante mencionar que la concentración de etanol no fue un parámetro determinante, debido a que en ambos cultivos los resultados fueron similares.

Tabla 3.6: Caracterización de *Macrocystis pyrifera* luego de la fermentación

	mg/g de muestra	
	Sin pretratamiento	Con pretratamiento y enzimas
Arabinosa	0,100	0,250
Fucosa	1,220	5,370
Fructosa	0,000	0,000
Galactosa	7,460	6,210
Ácido Galacturónico	0,660	0,300
Glucosa	133,7	253,1
Glucosa (no celulósico)	23,35	7,530
Glucosa (celulósica)	110,4	245,5
Ácido Glucurónico	5,880	5,360
Ácido Manurónico y Ácido Gulurónico	31,32	24,31
Manitol	0,550	0,200
Manosa	4,660	3,750
Ramnosa	0,630	0,610
Xilosa	1,520	2,160

Para el análisis de consumo de carbohidrato no se tomarán en cuenta los valores presentados para glucosa, ni ácido galacturónico en la Tabla 3.6, puesto que los éstos son mayores a los reportados para la caracterización de macroalga sin fermentar (ver Tabla 1.1).

Los resultados muestran que, en general, las bacterias consumieron más carbohidratos cuando la materia prima no fue tratada, reforzando la idea de eficiencia de las enzimas implicadas en el metabolismo, no sólo de alginato, sino de manera global. El alginato, al igual que manitol, fue más consumido en el cultivo de algas pretratadas y suplementada con enzimas, lo que tiene sentido, ya que disponían de más enzimas para degradar la materia prima, y con ello aumentaría el flujo destinado a la producción de etanol, siendo consecuente con las concentraciones de producto alcanzadas en dicho cultivo. No obstante, la diferencia entre uno y otro (cultivos mostrados en Tabla 3.6) no es importante, ya sea en concentración de etanol, tasas de consumo y producción, como crecimiento celular. En consecuencia, los resultados presentados confirman que es posible fermentar macroalgas en condiciones aeróbicas, aprovechando la materia prima. Las mayores concentraciones de etanol se obtuvieron adicionando manitol, por lo tanto, la nueva interrogante a contestar es cuánto manitol se puede adicionar con tal de obtener mayores concentraciones en los cultivos, y por ende mejores rendimientos, a costa de un mayor costo.

Considerando la masa de carbohidratos total de *Macrocystis pyrifera* previo a la fermentación, y la masa remanente de los mismos, se obtuvo que un 63% y 65% de los azúcares de las algas sin pretratamiento y pretratadas, respectivamente, fueron fermentados. En ambos experimentos se consumieron masas similares de carbohidratos, siendo levemente mayores en la fermentación con macroalgas tratadas con ácido sulfúrico. Por lo tanto, más del 50% de los azúcares presentes en las algas fueron fermentados, quedando en la masa remanente, prioritariamente, otros elementos del alga. Esto permite concluir, en conjunto con los otros análisis realizados, que no es necesario que la materia prima sea pretratada, ni que el proceso incluya una etapa de sacarificación.

Tal como se mencionó anteriormente, la producción de etanol alcanzó concentraciones máximas de 3[g/l] y 4 [g/l] en las fermentaciones con algas sin pretratamiento y con pretratamiento, respectivamente. Estas concentraciones son comparables con las alcanzadas en las fermentaciones con reactivos puros. En consecuencia, los resultados expuestos previamente son reproducibles al fermentar macroalgas, haciendo factible que ésta se utilice como materia prima para la producción de biocombustibles en Chile.

Los rendimientos de producto se calcularon a partir de la masa total de macroalga y corresponden a un 92% del rendimiento teórico en escala de laboratorio [32]. Este es un resultado muy atractivo, como punto inicial, para el desarrollo de la industria de biocombustibles en Chile, utilizando como materia prima macroalgas nativas y de fácil crecimiento.

3.2 Resultados de Modelamiento

Las ecuaciones diferenciales planteadas en la sección 2.4.1 se resolvieron mediante el método *ode45* de MATLAB. La resolución numérica se graficó junto a los datos experimentales tal como lo muestra el Gráfico 3.14.

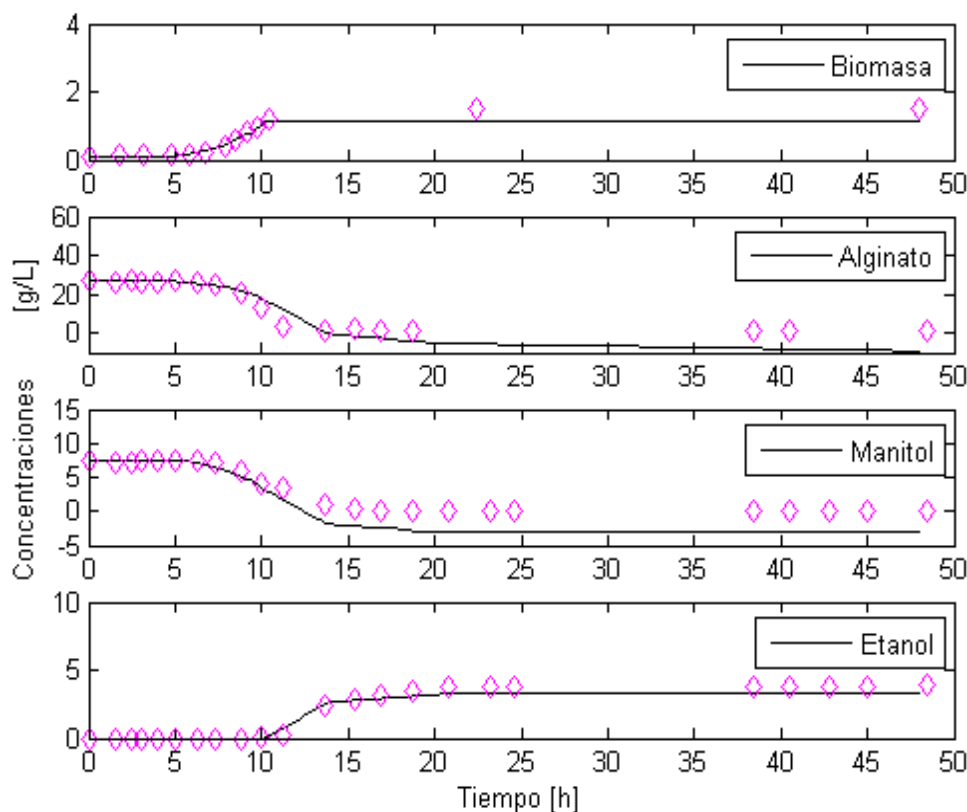


Gráfico 3.14: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 2% alginato

La resolución inicial se llevó a cabo con valores de parámetros aleatorios, los que se fueron cambiando hasta lograr que la curva (continua) se ajustara a los datos experimentales (discretos), de modo de tener un valor inicial para realizar el ajuste de parámetros.

El gráfico muestra una de las condiciones de fermentación. Particularmente, es el cultivo con la razón 10:3 de alginato-manitol, las otras condiciones están en el Anexo A7. Los puntos experimentales no fueron completamente ajustados por el modelo. Esto puede ser debido a que los datos experimentales tienen un error asociado y a que el modelo no representa correctamente el estado fisiológico del microorganismo y los cambios en las tasas de consumo. Es decir, que los supuestos tomados al momento de plantear el modelo no fueron apropiados.

Para aplicar el modelo fue necesario imponer ciertos intervalos de tiempo en que las ecuaciones fuesen válidas, por ejemplo para la ecuación que modela el crecimiento exponencial.

Con el planteamiento de las ecuaciones diferenciales, su resolución y posterior ajuste, se pudo observar que el fenómeno depende de varios parámetros, los que no necesariamente están relacionados entre sí de manera directa y/o lineal.

El modelo, a diferencia de los datos experimentales por sí solos, permite el desglose del fenómeno y el ajuste de otros parámetros, como por ejemplo la tasa de mantenimiento. Parámetros referentes a los rendimientos, mantenimiento y constantes de saturación fueron determinados para cada sustrato, tal como lo muestra la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Parámetros Ajustados

Parámetros	Razón 10:3	Razón 8:5	Razón 5:8	Razón 3:10
$\mu_{max} [h^{-1}]$	0,480	0,500	0,560	0,580
$m_p [h^{-1}]$	0,650	0,230	1,500	0,150
$Y_{p/x} [g_p/g_x]$	0,150	0,080	4,700	2,000
$Y_{x/s(alginato)} [g_x/g_s]$	0,107	0,283	0,200	0,261
$Y_{p/s(alginato)} [g_p/g_s]$	0,156	0,281	0,800	0,565
$m_s(alginato) [g/g \cdot h^{-1}]$	0,130	0,010	0,000	0,000
$K_s(alginato) [g/L]$	0,00001	0,00010	1,00000	2,00000
$Y_{x/s(manitol)} [g_x/g_s]$	0,230	0,375	0,200	0,466
$Y_{p/s(manitol)} [g_p/g_s]$	0,520	0,411	0,600	0,303
$m_s(manitol) [g/g \cdot h^{-1}]$	0,000	0,015	0,050	0,010
$K_s(manitol) [g/L]$	0,900000	0,100000	0,001000	0,000001

Los resultados obtenidos muestran que para cada razón de alginato-manitol existe un conjunto de parámetros característicos, que explicarían matemáticamente, el accionar del microorganismo frente a los sustratos disponibles en cada caso. Los parámetros ajustados representan la distribución de los flujos metabólicos, y su análisis por separado y en globalidad da una noción más amplia de lo que ocurre en el microorganismo. No obstante, el proceso, a nivel biológico, es mucho más complicado y, dados los supuestos sobre los que se construyó el modelo, éste es suficiente para explicar a cabalidad lo que sucede en la realidad.

Se observa que las velocidades de crecimiento aumentan conforme la concentración de alginato disminuye en el medio. Sin embargo éstas son lo suficientemente parecidas como para concluir que la proporción de carbohidratos no influye en el crecimiento.

De acuerdo a la ecuación (9) de la sección 2.4.1, la velocidad de formación de producto (q_p) está asociada al crecimiento del microorganismo y al mantenimiento. Considerando los resultados obtenidos tras el ajuste, la velocidad de formación de producto es máxima en la razón 5:8 de alginato-manitol. Dado que la velocidad de crecimiento es similar en todos los cultivos (varía menos de un 10%), las causas de esto recaen en el rendimiento de producto referido a la biomasa ($Y_{p/x}$) y en la velocidad específica de formación de producto asociado al mantenimiento (m_p). El primer parámetro tiene un valor considerable en las razones de alginato-manitol 5:8 y 3:10, siendo más del doble en la primera condición que en la segunda. Por otro lado, el segundo

parámetro tiene un orden de magnitud más en la razón 5:8, si se compara con el valor presentado en la razón 3:10. Por esta razón el responsable de que la tasa de formación de producto sea máxima es la velocidad específica de formación de producto asociada al mantenimiento. Vale destacar que cuando la biomasa llega a estado estacionario, el término asociado al crecimiento se anula, siendo el término asociado al mantenimiento el responsable de la formación de producto. Como en la razón 5:8 de alginato-manitol, éste es mayor, entonces luego de finalizado el crecimiento, las bacterias siguen produciendo a una tasa alta, lo cual explicaría las concentraciones finales de etanol logradas en esta condición en las fermentaciones.

Con los valores de los parámetros, y considerando las ecuaciones planteadas en la sección 2.4.1, se puede apreciar que en las distintas razones de alginato-manitol, los flujos de alginato son destinados a la producción de biomasa y, principalmente, de etanol. Aunque no hay un patrón que indique qué vía consume más masa, sí se puede concluir que el consumo de alginato relacionado al mantenimiento de la célula es bajo en las razones 10:3 y 8:5 y nulo en las otras condiciones.

En el caso de manitol, se aprecia que existe un flujo destinado a la mantención del microorganismo, además de los flujos destinados a la producción de biomasa y etanol. Esto implica que el microorganismo utilizaría este sustrato para mantenerse, incluyendo al metabolismo energético y a la generación de poder reductor. Bajo este contexto, el flujo alginato estaría siendo destinado, principalmente, a la producción de etanol.

Se observa que a medida que la concentración de alginato disminuye en el medio, el flujo del mismo destinado a mantenimiento disminuye hasta llegar a cero, mientras que el consumo de manitol asociado al mantenimiento aumenta. Esto indicaría que alginato estaría siendo consumido por las otras vías, y que manitol sería consumido, principalmente, para mantener a la célula, excepto cuando su concentración en el cultivo es muy baja, como es el caso de la razón 10:3, la cual cuenta, además, con un exceso de alginato, razón por la que es este carbohidrato quién suple las necesidades de mantenimiento del microorganismo.

Finalmente se observa que las constantes de saturación (K_s) para cada sustrato no variaron de los valores iniciales entregados para realizar el ajuste, e incluso el valor resultante en diferentes razones de alginato-manitol varía en órdenes de magnitud. Esto indicaría que estos parámetros no influirían en la forma que adopta el modelo al ajustarse a los datos experimentales. Es decir, que no tendrían mayor relevancia al momento de analizar el crecimiento, consumo y producción del microorganismo. Esto se puede asociar a que las fermentaciones realizadas disponían de una concentración por sobre la condición de saturación de *Monod*. La significancia de la diferencia del mismo parámetro para distintos escenarios es difícil de definir y no se observa un patrón claro referente al aumento o disminución de alginato, por ejemplo.

Se puede concluir que la razón 5:8 de alginato-manitol es la condición óptima para fermentar, debido, principalmente, a la velocidad específica de formación de producto asociado al mantenimiento.

El modelamiento del fenómeno entrega un conjunto de parámetros que dan indicios de lo que sucede en la célula al fermentar en distintas razones de alginato-manitol, reforzando la relevancia que éstas tienen en el crecimiento, consumo, mantenimiento y producción.

Elaborar un modelo más complejo no era el objetivo principal de este estudio, pero se recomienda el desarrollo de un modelo fenomenológico más sofisticado para comprender mejor cómo se comporta el metabolismo de los carbohidratos y la producción de etanol en este sistema. Además, éste sería de suma utilidad al momento de escalar el proceso, etapa que se sugiere realizar.

4. Conclusiones

A partir del estudio realizado se puede concluir que la razón que reporta mejor rendimiento de etanol es 5:8 en condiciones aeróbicas. No obstante, el microorganismo puede crecer y fermentar favorablemente en distintas razones de alginato-manitol, lo que elimina la variable de composición química de algas pardas. Ambos carbohidratos son aprovechados para la formación de biomasa y de producto. Además es necesaria la presencia de ambos, aunque sea en pequeñas concentraciones, para obtener etanol.

El factor concluyente para determinar la razón óptima de fermentación fue el rendimiento de producto, ya que tanto el rendimiento de biomasa, como la velocidad de crecimiento se comportaron similares en todos los cultivos. Con ello, se pudo identificar que el microorganismo aumentaba su tasa de mantenimiento a medida que aumentaba la concentración de alginato en el medio. A pesar de esto, se considera que BAL 1611 es una plataforma eficiente para la conversión de carbohidratos a etanol, por lo que se recomienda fuertemente que se emplee en la producción de biocombustibles. Si bien no es tan tolerante al etanol como otros microorganismos, se podría evaluar un cambio en el modo de operación del proceso que disminuya esta limitante.

La evaluación de las curvas de consumo y de producción revelan que el rol principal de manitol es entregar poder reductor a la célula, el cual puede ser utilizado tanto en el crecimiento y metabolismo del microorganismo, como para la producción de etanol. Por otro lado, alginato es consumido para la formación de biomasa y de piruvato destinado a la producción de etanol.

En condiciones aeróbicas es posible replicar con algas las fermentaciones realizadas con reactivos comerciales. De hecho al fermentar *Macrocystis pyrifera* se observó que no es necesario que la razón de carbohidratos se asemeje a la razón óptima determinada, sino que basta con la composición natural de la misma. Por lo tanto, esta macroalga nativa de Chile y su uso como materia prima para la producción de biocombustibles abre una oportunidad importante para la aumentar la participación de las ERNC en la generación de energía del país, avanzando hacia la meta propuesta por el gobierno.

Las fermentaciones de macroalgas mostraron que no es necesario un tratamiento previo a la materia prima, ni una etapa de sacarificación. Esto último debido a la eficiente maquinaria degradativa que dispone el microorganismo genéticamente modificado por Wargacki. Se recomienda, de todas maneras, suplementar con manitol o algún compuesto de desecho industrial que aporte poder reductor a la célula, con la finalidad de obtener mejores rendimientos de producto.

Los experimentos realizados en condiciones micro-aeróbicas no reportaron los resultados esperados. Ninguno de los cultivos realizados mostró proliferación celular y la concentración de etanol alcanzada es inferior a la obtenida en condiciones aeróbicas. Si al escalar el proceso se determina que la variable de mayor costo es la agitación y/o aireación, entonces queda a criterio del ingeniero de procesos a cargo reevaluar esta condición para fermentar.

Los mejores resultados obtenidos en condiciones micro-aeróbicas, indican que es necesaria una masa crítica para fermentar, por lo que se sugiere evaluar el modo de operación *Fed-Batch*.

Se observaron cambios morfológicos en las bacterias al hacerlas crecer en distintas razones de alginato-manitol. A medida que aumentaba la concentración de alginato en el medio, las células tendieron formar aglomerados, disminuir su tamaño y perder su forma bacilar.

Las condiciones de fermentación óptimas a escala de laboratorio pueden ser utilizadas en escalas mayores, respetando las razones entre carbohidratos y los criterios de escalamiento.

Se planteó y resolvió el modelo fenomenológico del proceso, considerando esencialmente los balances de masa e imponiendo supuestos para los balances de energía y momento. Se obtuvo un conjunto de parámetros que permiten al modelo describir lo observado experimentalmente. Éstos son característicos para cada condición estudiada, y representan la distribución de flujos metabólicos. Analizar los parámetros obtenidos, ya sea por separado o de manera global da nociones más amplias de lo que estaría ocurriendo al interior del microorganismo.

El ajuste del modelo permitió cuantificar rendimientos, mantenimiento y constantes de saturación relativas a cada sustrato, obteniéndose que manitol es consumido para el mantenimiento celular, mientras que alginato se destina principalmente a la formación de producto. Esto refuerza la conclusión previa sobre el rol de manitol en la fermentación.

De acuerdo al análisis de parámetros, la razón 5:8 de alginato-manitol es la condición óptima para fermentar, ya que la tasa de producción es mayor que en las otras condiciones. La causa de ello se debe, principalmente, a la velocidad específica de formación de producto debido al mantenimiento.

Se recomienda desarrollar un modelo más sofisticado que incluya todos los fenómenos de transporte, el cual podría ser utilizado para hacer predicciones en otras escalas.

El estudio experimental desarrollado en esta memoria no consideró variables como la temperatura, pH o agitación. Por lo tanto se recomienda complementar este estudio añadiendo dichas variables, otorgando otras perspectivas valiosas al momento de decidir el escalamiento del proceso.

Finalmente se concluye que los objetivos propuestos en esta memoria se cumplieron y ésta puede ser utilizada para el desarrollo de la industria de biocombustibles en Chile.

Bibliografía

- [1] Word Energy Resources: 2013 Survey. Octubre, 2013. [en línea]. Londres, Inglaterra. Word Energy Council. < <http://www.worldenergy.org/wp-content/uploads/2014/04/Traduccion-Estudio-Recursos-Energeticos1.pdf>>. [Consulta: 3 de junio 2014].
- [2] RUIZ, J. Los Biocombustibles en Chile: Principales Avances. En: Seminario Internacional “Biocombustibles y su futuro en la matriz energética”. Santiago, Chile. Comisión Nacional de Energía, Gobierno de Chile. 2009.
- [3] LÓPEZ, A.; URRUTIA, D. Tendencias mundiales en el uso de la electricidad en el transporte (tecnologías, costos, perspectivas). Opciones para la región metropolitana. [en línea]. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile < <http://web.ing.puc.cl/~power/mercados/transporteelec/index.html> >. [Consulta: 23 de junio 2014].
- [4] TOKMAN, M. Política Energética: Nuevos Lineamientos. [en línea] . Santiago, Chile. Comisión Nacional de Energías. Gobierno de Chile. 2008 <http://www.cne.cl/archivos_bajar/Politica_Energetica_Nuevos_Lineamientos_08.pdf>. [Consulta: 23 de enero 2015].
- [5] Energía Renovables No Convencionales. [en línea]. Santiago, Chile. Ministerio de Energía. <http://antiguo.minenergia.cl/minwww/opencms/14_portal_informacion/la_energia/ernc.html>. [Consulta: 23 de junio 2014].
- [6] RFA: RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Climate of Opportunity. [en línea]. <http://www.ethanolrfa.org/page/-objects/pdf/outlook/RFAoutlook2010_fin.pdf?nocdn=1>. [Consulta: 2 de junio 2014].
- [7] Etanol. [en línea]. Comisión Nacional para el Ahorro de Energía. El Salvador. < http://www.cne.gob.sv/index.php?view=items&cid=4%3Afaq-biocombustibles&id=3%3Aicuales-son-las-ventajas-y-las-desventajas-de-usar-etanol-en-lugar-de-gasolina&option=com_quickfaq&Itemid=181>. [Consulta: 2 de junio 2014].
- [8] GARCÍA, J.; GARCÍA, J. Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Informe de Vigilancia Tecnológica. [en línea]. España. Fundación para el conocimiento Madrid; CEIM. <http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt4_biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf>. [Consulta: 15 de junio 2014].
- [9] FERREIRA, V.; OLIVEIRA, M.; SILVA, S. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. Electronic Journal of Biotechnology. 13 (2):. 2010.
- [10] HORTA, L.; ABEL; J. Bioetanol de caña de azúcar: Energía para el desarrollo sostenible. [en línea]. < <http://www.bioetanoldecanadeazucar.org/es/download/cap3.pdf>>. [Consulta: 20 de enero 2015].

- [11] DEMIRBAS, M.; DEMIRBAS, A. Biofuels from algae for sustainable development. Applied Energy. 88 (10): 3473-3480. 2011.
- [12] MAYNE, L.; YUCEL, E. International Energy Outlook.: Liquid Fuels.[en línea].U.S.DOE/EIA-0484(2010).<<http://large.stanford.edu/courses/2010/ph240/riley2/docs/EIA-0484-2010.pdf>>. [Consulta: 25 de junio 2014].
- [13] KASHIYAMA, Y.; CAMUS, C.. Producción de biocombustibles y productos químicos renovables a partir del alga nativa local *Macrocystis pyrifera*. En: Seminario internacional de biocombustibles de algas. Antofagasta, Chile. Universidad de Antofagasta. 2009.
- [14] RIOS, C.; MUTSCKE, E. Aporte al conocimiento de *Macrocystis pyrifera*: Revisión bibliográfica sobre los “huirales” distribuidos en la Región de Magallanes. Anuales Instituto Patagonia. 37(1): 97-102. 2009
- [15] PLANA, J.; MANSILLA, A. Estudio poblacional de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Laminariales: Phaeophyta) en ambientes protegidos y expuestos al oleaje en Tierra del Fuego. Gayana. 71(1): 66-75. 2007.
- [16] Estrategia Nacional de Energía 2012-2030-Energía para el futuro. [en línea]. Santiago, Chile. Ministerio de Energía. < <http://www.minenergia.cl/estrategia-nacional-de-energia-2012.html>>. [Consulta: 23 de junio 2014].
- [17] BUNSTER, J. Política energética para un Chile desarrollado. [en línea]. Chile. Comisión Minería y Energía Cámara de Diputados.< http://www.senado.cl/prontus_senado/site/artic/20121217/asocfile/20121217174333/presentacion_ministro_de_energia.pdf>. [Consulta: 23 de junio 2014].
- [18] Tipos de Energías.[en línea]. Chile. Comisión Nacional de Energía. < <http://www.cne.cl/component/content/article/43-renovables-no-convencionales/399-tipos-energia>>. [Consulta: 10 de junio 2014].
- [19] AVALOS, V. Biocombustibles en Chile.[en línea]. Ministerio de Energía. Chile. < <http://www.cec.uchile.cl/~biocombustibles/Viviana%20Avalos%20Biocombustibles%20liquidos%20UChile%2015nov2010.pdf>>. [Consulta: 11 de junio 2014].
- [20] Gobierno Transparente.[en línea].Santiago, Chile. Ministerio de Energía. < <http://www.gobiernotransparentechile.cl/directorio/entidad/17/262/vinculos>>. [Consulta: 10 de junio 2014].
- [21] MARTÍNEZ, V.; MALDONADO, P. Estados de Proyecto ERNC en Chile. Reporte Centro de Energía Renovables. Mayo 2014.
- [22] Centro Nacional para la Innovación y Fomento de las Energías Sustentables. [en línea]. Santiago, Chile. Ministerio de Energía.< <http://cifes.gob.cl/>>. [Consulta: 20 de abril 2014].
- [23] GARCÍA, G. Usos y Aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica. [en línea]. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. <

<http://fci.uib.es/Servicios/libros/conferencias/seae/Usos-y-aplicaciones-de-macroalgas-microalgas-y.cid221515>>. [Consulta: 23 de junio 2014].

[24] WANG, X., LIU, X., WANG, G. Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation. Journal of Integrative Plant Biology. 53 (3):246-252. 2011.

[25] PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. British Phycological Journal. 14(2):. 1979

[26] ORTIZ, J. Composición Nutricional y Funcional de las Algas Clorofíceas Chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. [en línea]. 2011. Santiago, Chile. <<http://www.captura.uchile.cl/bitstream/handle/2250/14729/Monograf%C3%ADa%20I%20-%20Algas%20Verdes.pdf?sequence=1>>. [Consulta: 23 de junio 2014].

[27] WESTERMEIER, R. Variación estacional y en diferentes partes del talo de los contenidos químicos de *Macrocystis pyrifera* LC Agardh de la zona intermareal de Mehuín, sur de Chile. En: Congreso de ciencias del mar. Universidad Austral de Chile. 2014.

[28] ZIMMERMAN, R.; KREMER, J. In situ growth and chemical composition of the giant kelps. *Macrocystis pyrifera*: response to temporal changes in ambient nutrients availability Marine Ecology. 27(): 277-285. 1986.

[29] RODRÍGUEZ, Y.; HERNÁNDEZ, G. Variación estacional y geográfica de la composición química de *Macrocystis pyrifera* en la costa occidental de baja california. Ciencias Marinas. 17(3): 91-107. 1991.

[30] MANSILLA, A.; ÁVILA, M. Using *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh from southern Chile as a source of applied biological Compounds. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 21(2): 262-267. 2011.

[31] PESO-ECHARRI; P.; FRONTELA-SASETA, C.; GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, C. Polysaccharides from seaweed as ingredients in marine aquaculture feeding: alginate, carrageenan and ulvan. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 47(3): 373-381. 2012

[32] Brown Macroalgae An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from por Adam J. Wargacki et al. Science 335(): 308-313. 2012.

[33] CHOI, J.H.; KEUM, K.C.; LEE, S.Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Sciences. 61(): 876-885. 2006

[34] JONASSON, P.; LILJEQVIST, S.; NYGREN, P.A.; STAHL, S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology and Applied Biochemistry. 35(): 91-105.2002

[35] Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost por Avi Flamholz et al. PNAS.110 (24): 10039–10044. 2013

[36] CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: History, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev. 9(1):1–27. 1992

- [37] FUHRER T.; FISCHER E.; SAUER U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. Journal of Bacteriol. 187(5):1581–1590. 2005
- [38] VARELA, G. Fisiología y metabolismo bacteriano. [en línea]. Montevideo, Uruguay. Universidad de la Republica. < <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>>. [Consulta: 31 de enero 2012].
- [39] ESPARZA, E. Producción de etanol por *Zymomonas mobilis* en fermentación en medio sólido. Tesis (Magíster en Biotecnología). México. Universidad Autónoma Metropolitana. 2012.
- [40] VASQUEZ, H. DACOSTA, O. Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. Ingeniería, Investigación y Tecnología. 8(4): 249-259. 2007.
- [41] BISSON, L. University of California. Section 3 - The Alcoholic Fermentation, Yeast Biology. [en línea] <<http://fbisson.ucdavis.edu/PDF/VEN124%20Section%203.pdf>> [Consulta: 15 de junio 2014].
- [42] BONEY, A. D. Aspects of the biology of seaweeds of economical importance. Adv. Mar. Biol. 3(): 105-253. 1965
- [43] ZENG A., DECKWER W.D. Bioreactor techniques under microaerobic conditions from molecular level to pilot plant reactors. Chem. Eng. Sci. 51() :2305-2314. 1996
- [44] JANSEN N.B.; FLICKINGLER M.C.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnol. Bioeng. 26 ():362-369. 1984
- [45] Competition (iGEM), e.I.G.E.M. PyeaR + CArG nitric oxide, nitrate & nitritesensing hybrid 'Bacterial-Mammalian' promoter. 2012.
- [46] Monod, J. Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes. 2da ed. Paris: Hermann. 1958.
- [47] DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Applied Microbiology and Biotechnology. 63 (3): 258-266. 2003
- [48] LUEDEKING, R.; PIRET, E. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. 1(4): 393-412. 1959
- [49] ANDERSEN, K.; VON MEYENBURG, K. Are Growth Rates of *Escherichia coli* in Batch Cultures Limited by Respiration?. Journal of Bacteriology. 144(1):114-123.1980
- [50] SIGALA, J.; FLORES, N.; HERNÁNDEZ, G.; THAEDO, M.; GOSSET, G.; BOLIVAR, F. Caracterización de una cepa mutante de *Escherichia coli* que tiene una velocidad específica de crecimiento en acetato tres veces más elevada que la cepa silvestre. En: VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Cuernavaca, México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2001.

- [51] MANDIGAN, M. T., MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock biología de los microorganismo. Ed. Prentice Hal Iberia. 8va ed. Revisada, Inc. pp 149-177.
- [52] Specific Ethanol Production Rate in Ethanologenic Escherichia coli Strain KO11 Is Limited by PyruvateDecarboxylase por Gerardo Huerta-Beristain et al. Journal Mol. Microbiol. Biotechnol. 15 (): 55-64. 2008
- [53] ROMERO, A. Desarrollo de una cepa etanológica a partir de Bacillus subtilis. Tesis (Magíster en ciencias). México. Universidad Nacional Autónoma de México.2003
- [54] Improving Ethanol Tolerance of Escherichia coli by Rewiring Its Global Regulator cAMP Receptor Protein (CRP) por Huiqing Chong *et al.*PLOS ONE. 8(2): e57628. 2013
- [55] Modulation of endogenous pathways enhances bioethanol yield and productivity in Escherichia coli por Neha Munjal *et al.* Microbial Cell Factories. 11(): 145. 2012
- [56] ALTERHUM, F.; INGRAM, L. O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 55(8):1943-1948.1989
- [57] PRUITT, K.; KAMAU, D. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. Journal of Industial Microbiology. 12 (): 221-231. 1993

Anexos

Anexo A1: Protocolos**Medio M9**

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 1 [ml]
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- pH-metro
- Mechero
- Filtro pirinola de tamaño de poro 0,2 [μm]
- 500 [ml] de agua destilada
- Sales : Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , KH_4Cl , MgSO_4 y CaCl_2
- *Parafilm* (cubrir las soluciones)
- Tubos Falcon de 10 [ml]
- Botella de vidrio de 500 [ml]

Procedimiento:

Para preparar 500 [ml] medio mínimo M9 dos veces concentrado (2x), masar: 6 [g] de Na_2HPO_4 ; 3 [g] de KH_2PO_4 ; 0,5 [g] de NaCl y 1 [g] de KH_4Cl .

Luego ponerlo en un matraz Erlenmeyer, agregar 500 [ml] de agua destilada y agitar hasta que quede homogéneo (transparente). Ajustar el pH a 7,4 con una solución de NaOH [1M]. Posteriormente, trasvasar a una botella de 500 [ml] limpia y esterilizar el medio en el autoclave.

Además preparar concentrados de MgSO_4 y CaCl_2 , se recomienda 0,2 [g/l]. Filtrar las soluciones bajo mechero y almacenarlas en tubos Falcon.

Medio LB

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 2 [ml]
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- pH-metro
- Medio LB sintético
- Sal: NaCl
- Botella de vidrio de 1[l]
- 1[l] de agua destilada

Procedimiento

Para preparar medio *Luria-Bertani*, agregar 15,5 [g] del medio sintético listo y 9,5 [g] de *NaCl* al matraz. Luego verter 1[l] de agua destilada. Agitar hasta que la solución esté homogénea. Luego ajuste el pH a 7,2 y trasvasar a una botella limpia. Esterilizar en el autoclave.

Medio sólido LB – Agar

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 2 [ml]
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- pH-metro
- Mechero
- Medio LB sintético
- Sal: *NaCl*
- Botella de vidrio de 1[l]
- 1[l] de agua destilada
- Agar-Agar
- Placas Petri
- *Parafilm*

Procedimiento:

Preparar medio LB tal como se especificó y agregar 1% p/v de Agar-Agar. Agitar con una bala magnética hasta que quede homogéneo. Trasvasar a la botella y esterilizar en el autoclave. Antes de que se enfríe completamente (y antes que gelifique) verter sobre placas Petri bajo mechero, o en una cámara de flujo laminar. Esperar a que el medio solidifique y se enfríe para cerrar las placas. Luego sellarlas con *parafilm* y almacenarlas a 4[°C].

Concentrados de alginato y manitol

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 500 [ml]
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- Botella de vidrio de 100[ml]
- Alginato de sodio
- D-manitol
- 500[ml] de agua destilada
- *Parafilm* (cubrir las soluciones)

Procedimiento:

Masar 10 [g] de manitol y depositarla en el matraz. Verter 100 [ml] de agua destilada y agitar hasta que la solución se homogenice. Luego trasvasar a una botella limpia y esterilizar en el autoclave.

Alginato forma aglomerados al contacto con el agua, además mientras más concentrado esté la solución, más viscoso se torna el líquido. Se recomienda que la concentración no supere 6,5% p/v.

Verter 50 [ml] en el matraz y depositar la bala magnética en el fondo. Masar 6 [g] de alginato de sodio y depositarlo en el matraz cuidando que no se adhiera a la bala, ni a los bordes del matraz. Agitar unos segundos y luego verter 50 [ml] más. Cubrir el matraz con *parafilm* y dejar agitando por varias horas, hasta que la solución esté homogénea. Puede aplicar calor para acelerar la disolución. Luego esterilice en el autoclave.

Protocolo de Fermentación**Materiales:**

- Matraz de Erlenmeyer de 500 [ml]
- Medio M9 2X
- Agua destilada estéril
- Concentrados de Alginato y Manitol
- Concentrados de $MgSO_4$ y $CaCl_2$
- Mechero
- Micropipeta p200, p1000 y p5000 [μ l]
- Cubetas plásticas para espectrofotometría.
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensayo
- *Stock* congelado de E. coli BAL 1611
- Tubos *Eppendorf* de 1,5 [ml]
- Tubos Falcon de 10 [ml]
- Congelador a -20 [°C]
- Centrífuga

Procedimiento:

Día 1: Prepare un inóculo de 5 [ml] en un tubo de ensayo. Bajo mechero agregue 2,5 [ml] de M9. Además, agregue el volumen necesario para suplementar con alginato y manitol (a partir del *stock*) de acuerdo a la razón que estime conveniente para un volumen final de 5[ml]. Añadir sulfato de magnesio y cloruro de calcio, tal que su concentración final sea de 2 [mM] y 1[mM], respectivamente. Finalmente, verter agua destilada hasta completar los 5 [ml]. Dejar crecer durante toda la noche a 37[°C] y 250 [rpm] de agitación.

Día 2: Suponiendo que se realizará un cultivo de 100 [ml], añada, bajo mechero, 50 [ml] de medio M9 2X, el volumen necesario para suplementar con alginato y manitol (a partir del *stock*) de acuerdo a la razón que estime conveniente para un volumen final de 5[ml]. Se recomienda usar la micropipeta p5000 para agregar éstos volúmenes. Luego, agregar Añadir sulfato de magnesio y cloruro de calcio, tal que su concentración final sea de 2 [mM] y 1[mM], respectivamente. Finalmente, verter agua destilada hasta completar los 100 [ml] y agitar suavemente con la mano hasta que la solución se homogenice.

Tome un 1[ml] de medio con una micropipeta p1000 y deposítelo en una cubeta de plástico. Coloque *parafilm* para cubrir la muestra. Éste será el blanco para poder medir la absorbancia. Es recomendable guardar medio sin células para hacer diluciones cuando se necesite. Para ello, tome 10 [ml] de medio y deposítelo en un tubo Falcon de 10 [ml] y guárdelo a 4[°C].

Tome un 1[ml] de inóculo con una micropipeta p1000 y viértalo en el matraz. Agitar suavemente con la mano. Tomar un 1[ml] para medir absorbancia y 1,5 [ml] para medir consumo y producción. Vierta el contenido de ésta última en un tubo *Eppendorf* y centrifugue a 3000[G-Force]. Recupere el sobrenadante y deposítelo en otro tubo *Eppendorf* rotulado con la hora, qué es, y el nombre del experimentador. Luego refrigérela a -20 [°C] y descarte el pellet. La otra muestra deposítela en una cubeta de plástico. Asegúrese de que la solución esté homogénea.

Calibre el espectrofotómetro y ajuste la longitud de onda a 600 [nm]. Mida el blanco, e indíquelo al equipo que se trata del blanco. Luego mida la muestra y registre su valor. Cuando el valor medio por el equipo supere 1, diluya la muestra con el medio guardado, o bien con agua destilada. Recuerde ponderar el valor de la medición por el factor de dilución.

Realice mediciones de absorbancia y guarde muestras para la medición de consumo y producción cada una hora, registrando la hora y los valores obtenidos, hasta completar 24 [h] de cultivo. Se recomienda efectuar dos cultivos, uno en el que se midan las 12 primeras horas, y otro en el que se mida las 12 [h] siguientes.

Día 3: Colecte 5[ml] de sobrenadante y guárdelo a -20 [°C]. Esterilice el cultivo antes de descartar el medio.

Operación del equipo HPLC

Materiales:

- Ácido Sulfúrico 96% p/v
- 4 [l] de agua ultra purificada
- Matraz de Erlenmeyer 1[l]
- Botella de vidrio de 5[l]
- Unidad de filtración
- Filtro de membrana 0,2 [µm]
- Filtro pirinola 0,2 [µm]
- Tubos *Eppendorf*

- Bomba de vacío
- Ultrasonicador
- Viales de 1,5 [ml]
- *Septums*
- *Vial caps*
- Jeringa de 3[ml]
- Micropipeta p200 y p1000
- Vaso precipitado
- *Parafilm*

Procedimiento:

1. Preparación de Fase móvil:

Tomar 2,1 [ml] de ácido sulfúrico concentrado y diluirlo en 1 [l] de agua dentro de un matraz, agitar suavemente y luego filtrar la solución utilizando la bomba de vacío y la unidad de filtración. El filtrado se trasvasa a la botella de 5 [l]. Posteriormente, se filtran los 3 [l] de agua ultra purificada restantes y se depositan en la botella de vidrio, tal que la concentración en la solución de 4 [l] sea 5[mM]. Se desgasifica la solución en el ultrasonicador durante 5 [min].

Adicionalmente se recomienda filtrar 2 litros de agua ultra purificada, verterla en una botella adecuada y desgasificarla.

2. Obtención de la curva estándar

Se preparan muestras con distinta concentración (al menos 4) de alginato, manitol y etanol. Para ello, se toma una muestra del reactivo en cuestión y se diluye con agua ultra purificada hasta alcanzar la concentración deseada. Se toma un volumen de 1,5 [ml] con una jeringa y se hace pasar a través del filtro pirinola, depositando el filtrado en el vial. Se tapa el vial con el *septum* y el vial *caps*.

Las muestras se inyectan en duplicado y luego se asocia el área de los picos a la concentración conocida para generar la curva de calibración.

3. Preparación de muestras.

Las muestras están congeladas a -20 [°C], por lo que se recomienda descongelarla a 4[°C] o a temperatura ambiente. Mientras esto sucede, se toma un volumen de 100[ml] de agua y se vierte en un vaso precipitado y luego se cubre con *parafilm*. Con una micropipeta p1000 se toma 1,2 [ml] de agua y se deposita en un tubo *Eppendorf* de 1,5 [ml], luego se toma 300[μ l] de la muestra y se vierte en el mismo. Se agita suavemente con la mano. Con una jeringa de 3 [ml] se succiona completamente el contenido, haciéndose pasar por un filtro de pirinola y se deja caer la solución filtrada en el vial de 1,5 [ml]. Es importante que al menos el 75% del vial tenga solución. Luego, se tapa el vial con el *septum* y el vial *cap*, se rotula y se pone en el muestreador del equipo HPLC. Este procedimiento se repite tantas veces como muestras se deseen cuantificar. Los filtros pirinola y las jeringas son desechables.

4. Operación del equipo

Lo primero es instalar la fase móvil, poniendo la bomba indicada dentro del recipiente. Luego se prende el equipo, partiendo por el estabilizador del voltaje, y luego los otros módulos. Se enciende el computador y se abre el programa *LC-system*. Se elige el detector y se configuran las opciones de análisis (método de azúcares) y se guarda el método.

Se purga las bombas y el *autosampler* (20 [min] aproximadamente). Luego se instala la columna y se ambienta las líneas con fase móvil durante 20 [min]. De la misma forma se ambienta el detector, dejando la válvula abierta (*R-Flow*) otros 20 [min]. Se cierra la válvula del detector, y luego se realiza un cero (10 [min]) y un *balance* (5 [min]) para estabilizar el sistema. Finalmente, se revisa la línea base (*Base line check*) y se hecha a correr el *batch*. El *batch* se puede crear en la opción *Batch Process*, indicando el vial del que debe tomar la muestra, el nombre de la misma, el volumen de inyección y dónde se guardarán los datos. Una vez configurado se presiona *start batch*.

Finalmente se da la opción de hacer un *shutdown*, es decir, programar el equipo para que se apague una vez que se termina de tomar muestras. Seleccionar el programa por 60 [min].

5. Fin de uso

Una vez terminado de usar el equipo, este debe lavarse. Se purgan las líneas, el *autosampler* y el detector con la fase móvil (30 [min]). Se desinstala la columna y se guarda. Se realiza una purga a las bombas y autosampler con agua ultra purificada (20 [min]). Luego se lavan las líneas y el detector con agua ultra purificada (20 [min]). Finalmente, se purga las líneas y el *autosampler* con metanol de cromatografía al 100%. Luego se apaga el equipo.

Pretratamiento de algas con ácido sulfúrico

Materiales:

- Viales
- Ácido sulfúrico 2% p/v
- Baño de silicona
- Agua destilada
- 5 [g] de *Macrocystis pyrifera*
- Tubo Falcon de 50 [ml]
- Centrífuga
- Placa Petri
- Papel *Alusa Foil*

Procedimiento:

Se coloca 1[g] de alga en un vial y se adicionan 3 [ml] de ácido sulfúrico al 2%. Luego el vial se lleva a un baño de silicona a 120 [°C] durante 1 [h]. Se remueve el vial y se le agregan 40 [ml] de agua destilada.

La solución se deposita en un tubo Falcon de 50 [ml] y se centrifuga 5 [min] a 7000 [rpm]. Se elimina el sobrenadante. Repetir el procedimiento hasta que el sobrenadante tenga pH 5 (alrededor de 7 lavados).

Colectar el pellet de alga y depositarlo en una placa Petri. Taparla con papel *alusa foil* y hacerle orificios verticales. Dejar la placa en un estufa a 30 [°C] por 2 días. Luego tomar el alga seca y guardarla.

OBS. Se utilizaron 18 viales con 18 [g] de alga final y luego del pretratamiento se obtuvo 6 [g] de alga para poder realizar SSF.

Tinción de Gram

Material:

- Cultivo de 5[ml] de BAL1611
- Lugol
- Cristal Violeta
- Safranina
- Agua destilada
- Alcohol
- Acetona
- Portaobjetos
- Pinza de ropa
- Mechero
- Microscopio electrónico
- Aceite de inmersión

Procedimiento.

Realizar un frotis en el portaobjetos, tomarlo con la pinza de ropa y fijarlo mediante la aplicación de calor al acercarlo levemente al mechero. Cubra el frotis con cristal violeta y déjelo en reposo por 1 [min].

Lávalo con una solución de lugol y déjelo escurrir suavemente hasta que se hayan desprendido unas laminillas de aspecto metálico. Déjelo con lugol por 1 [min]. Decolore rápidamente (15 [s]), dejando escurrir en forma alternada alcohol-acetona y agua destilada (chorro suave), hasta que se desprenda todo el colorante violeta.

Cubra su frotis con el colorante de contraste safranina al 1% por 10 [s]. Lávelo suavemente con agua, séquelo con papel suavemente y obsérvelo en inmersión.

Anexo A2: Curvas de Calibración

Las curvas de calibración utilizadas para expresar en unidades de concentración los datos obtenidos tras la medición de muestras en el HPLC son las siguientes:

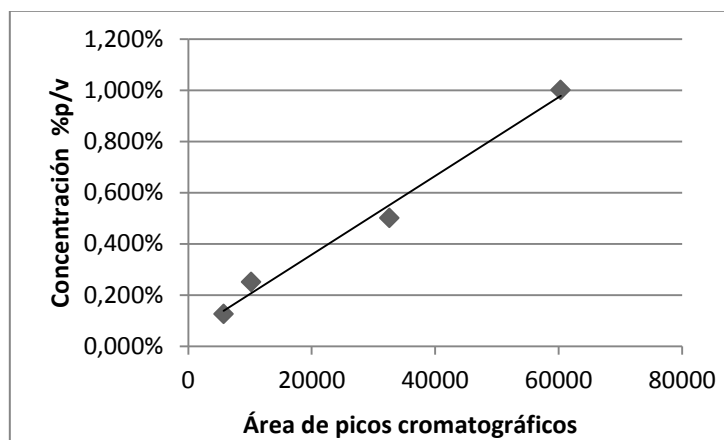


Gráfico A.1: Curva de Calibración para alginato

La relación lineal obtenida tiene un coeficiente de correlación de 0,98 y está dada por:

$$y \left[\% \frac{p}{v} \right] = 2 \cdot 10^{-8} \cdot x[\text{Área}] + 5 \cdot 10^{-4} \quad (A1)$$

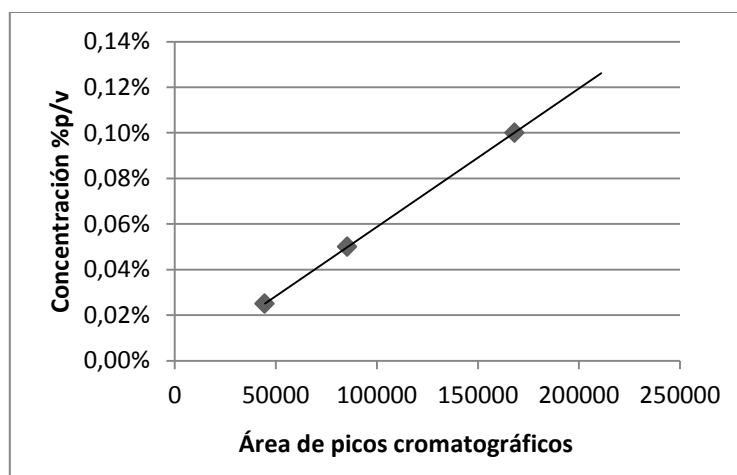


Gráfico A.2: Curva de Calibración para manitol

La relación lineal obtenida tiene un coeficiente de correlación de 1 y está dada por:

$$y \left[\% \frac{p}{v} \right] = 6 \cdot 10^{-9} \cdot x[\text{Área}] - 2 \cdot 10^{-5} \quad (A2)$$

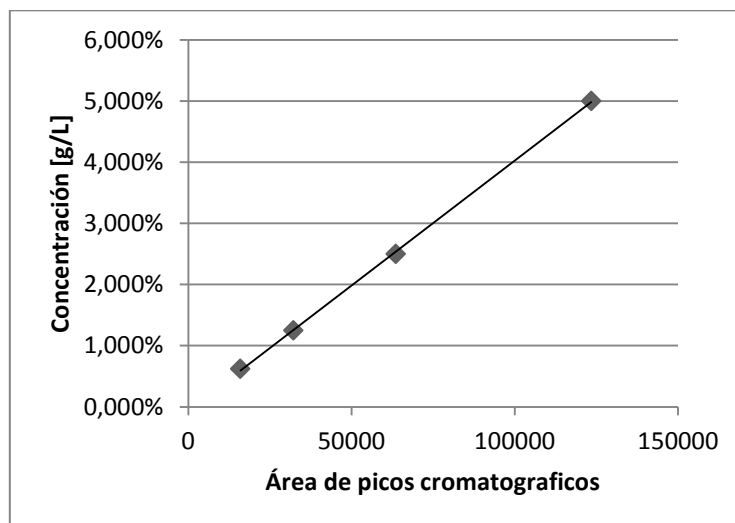


Gráfico A.3: Curva de Calibración para etanol

La relación lineal obtenida tiene un coeficiente de correlación de 0,99 y está dada por:

$$y \left[\frac{g}{L} \right] = 4 \cdot 10^{-7} \cdot x[\text{Área}] - 6 \cdot 10^{-4} \quad (A3)$$

Anexo A3: Ejemplos de Cálculos

Razones de Alginato-Manitol

Considerando que se dispone de concentrados de alginato 6% p/v y manitol 10% p/v y se desea suplementar un cultivo de 150 [ml] en una razón 5:8. Esta razón es equivalente a suplementar con un 1% de alginato y 1,6% de manitol.

$$\% \frac{p}{v} \Rightarrow \frac{1 [g]}{100 [ml]} = \frac{x [g]}{125 [ml]} \quad (A4)$$

$$\Rightarrow x = 1,25 [g] \text{ de alginato}$$

Luego,

$$\frac{6 [g]}{100 [ml]} = \frac{1,25 [g]}{x [ml]} \quad (A5)$$

$$\Rightarrow x = 20,83 [ml] \text{ de concentrado de alginato}$$

En el caso de manitol,

$$\% \frac{p}{v} \Rightarrow \frac{1,6 [g]}{100 [ml]} = \frac{x [g]}{125 [ml]} \quad (A6)$$

$$\Rightarrow x = 2 [g] \text{ de manitol}$$

Luego,

$$\frac{10 [g]}{100 [ml]} = \frac{2 [g]}{x [ml]} \quad (A7)$$

$$\Rightarrow x = 20 [ml] \text{ de concentrado de manitol}$$

Por lo tanto, se debe suplementar 20 [ml] de manitol; 20,83 [ml] de alginato; 62,5 [ml] de medio M9 2x; 70 [μl] de $CaCl_2$; 150 [μl] de $MgSO_4$ y el volumen de agua estéril necesario para completar 125 [ml].

Es importante notar que el total de azúcares utilizado fue de 2,6% p/v, por lo tanto las razones 10:3 contienen 2% de un carbohidrato y 0,6% del otro.

Parámetros Experimentales

El cálculo de los rendimientos experimentales se calculó como se indica a continuación:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{máximo alcanzado de biomasa}}{\text{total de sustrato suplementado}} \Rightarrow \frac{1,5 \left[\frac{gWD}{L} \right]}{26 \left[\frac{g}{L} \right]} \quad (A8)$$

$$\Rightarrow Y_{x/s} = 0,058 \left[\frac{g_{Biomasa}}{g_{Sustrato}} \right] \approx 6\%$$

En el caso del rendimiento de producto:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{máximo alcanzado de producto}}{\text{total de sustrato suplementado}} \Rightarrow \frac{3,9 \left[\frac{g}{L} \right]}{26 \left[\frac{g}{L} \right]} \quad (A9)$$

$$\Rightarrow Y_{p/s} = 0,15 \left[\frac{g_{Producto}}{g_{Sustrato}} \right] \approx 15\%$$

Finalmente, para la velocidad de crecimiento se utilizó el *software* Excel. Lo primero fue linealizar la ecuación:

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (A10)$$

$$\Rightarrow \ln(x) = \mu \cdot t + \ln(x_0)$$

Luego se identificó el segmento del grafo que estaba caracterizado por un comportamiento exponencial, se le aplicó la función logaritmo y se graficó. Con una regresión lineal se obtuvo el valor de la pendiente, que como se aprecia en la ecuación linealizada, corresponde a la velocidad de crecimiento.

Factores de dilución a partir de [UFC/ml]

De acuerdo a la ecuación (2), se tiene que:

$$y \left[\frac{UFC}{ml} \right] = 10^8 \cdot x [D. O_{600}]$$

Entonces, suponiendo una densidad óptima de 2 [$D. O_{600}$], dado la turbiedad del cultivo, entonces se tendría 200.000.000 [UFC/ml]. Para que el recuento en placa sea efectivo las colonias deben estar entre 30- 300 [UFC/placa]. Por lo tanto, si se toma 1 [ml] del cultivo y se diluye en un factor 6, entonces se tendrá una concentración de 200 [UFC/ml] y se puede sembrar en placa.

La concentración deseada se logra realizando diluciones seriadas.

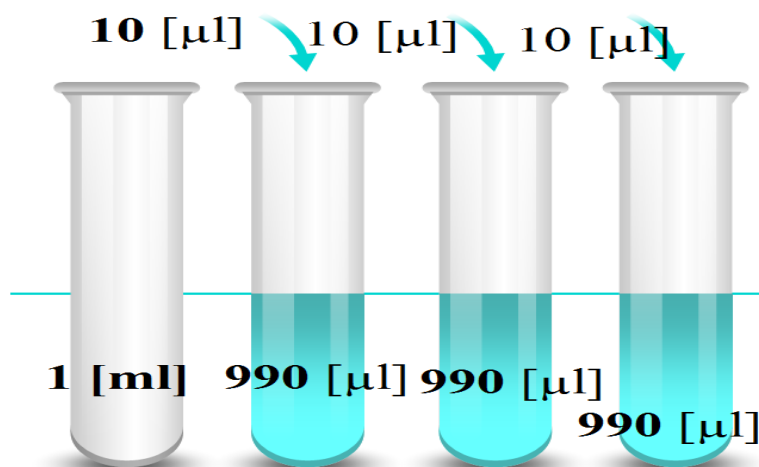


Figura A.1: Esquema de Dilución Seriada, factor 6

Anexo A4: Cromatogramas

En esta sección se muestran los cromatogramas entregados por el *software* del HPLC al medir un estándar de alginato, manitol, medio M9 y etanol. Así, se pudo identificar los picos de interés en la muestra medida.

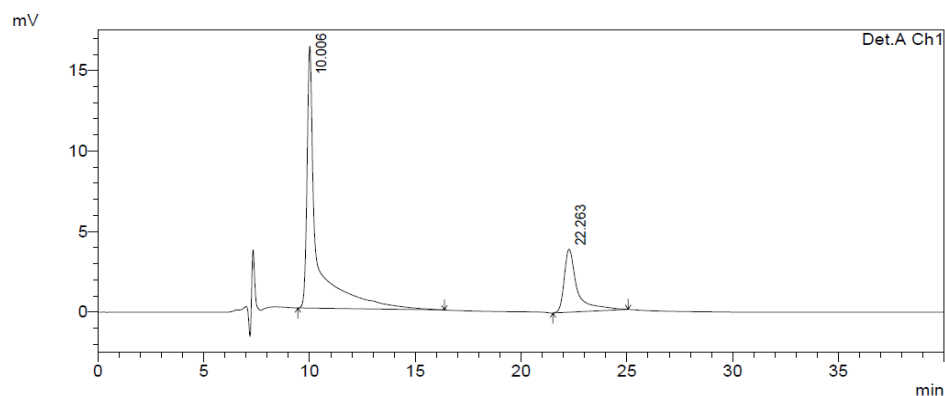


Figura A.2: Cromatograma de estándar de M9

Se puede apreciar que hay 3 picos, de los cuales sólo uno corresponde al estándar de M9. Con pruebas sucesivas se pudo determinar que el estándar es identificado a los 11 [min] aproximadamente, siendo los otros dos picos contaminantes de la muestra.

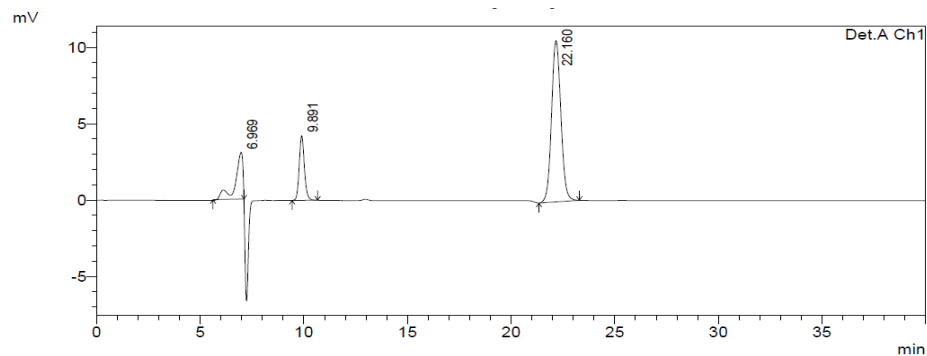


Figura A.3: Cromatograma para estándar de alginato y M9

En este caso se puede observar claramente qué pico representa a alginato y su tiempo de retención es aproximadamente 7 [min]. El siguiente compuesto identificado es M9 (contenido en la muestra), mientras que el último corresponde al contaminante. Es importante mencionar que el contaminante viene en el agua y en este cromatograma se aprecia un pico más grande, dado que la muestra está menos concentrada.

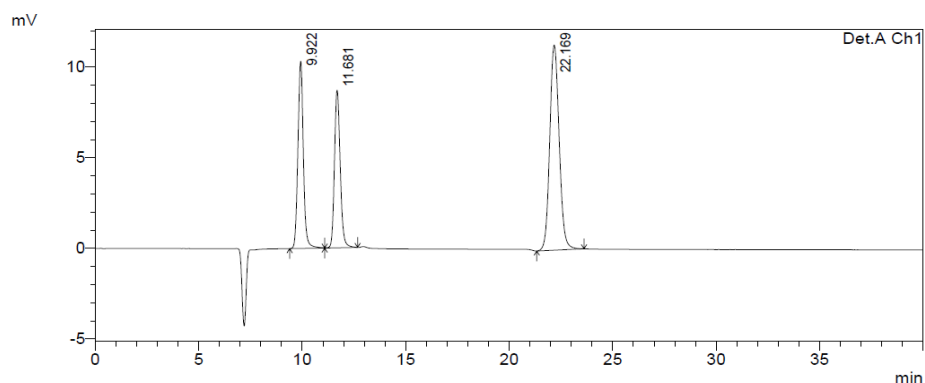


Figura A.4: Cromatograma para estándar de manitol y M9

Manitol es identificado por el método de HPLC un poco antes que M9, aproximadamente a los 10 [min]. El contaminante nuevamente está presente, lo que confirma que éste está en el agua utilizada para preparar las muestras.

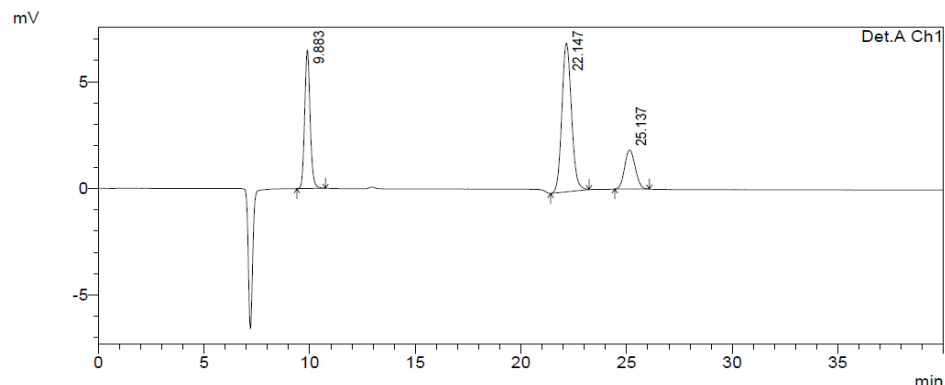


Figura A.5: Cromatograma para estándar de etanol y M9

Considerando los cromatogramas anteriores, se identifica el pico de etanol aproximadamente a los 25 [min]. Adicionalmente se midió una muestra de alginato que había sido hidrolizada con hidróxido de sodio para identificar en qué tiempo de retención se podría apreciar oligoalginatos. El resultado no fue muy claro, no obstante da una noción que permitió ser concluyente en otras mediciones.

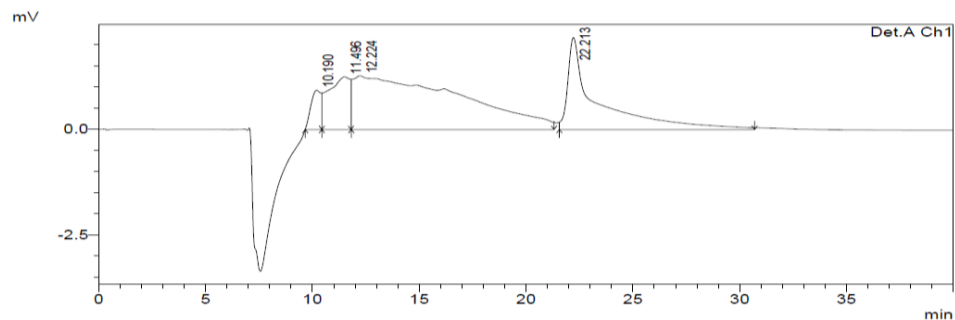


Figura A.6: Cromatograma de alginato hidrolizado

Anexo A5: Vía de Degradación de Carbono en BAL 1611

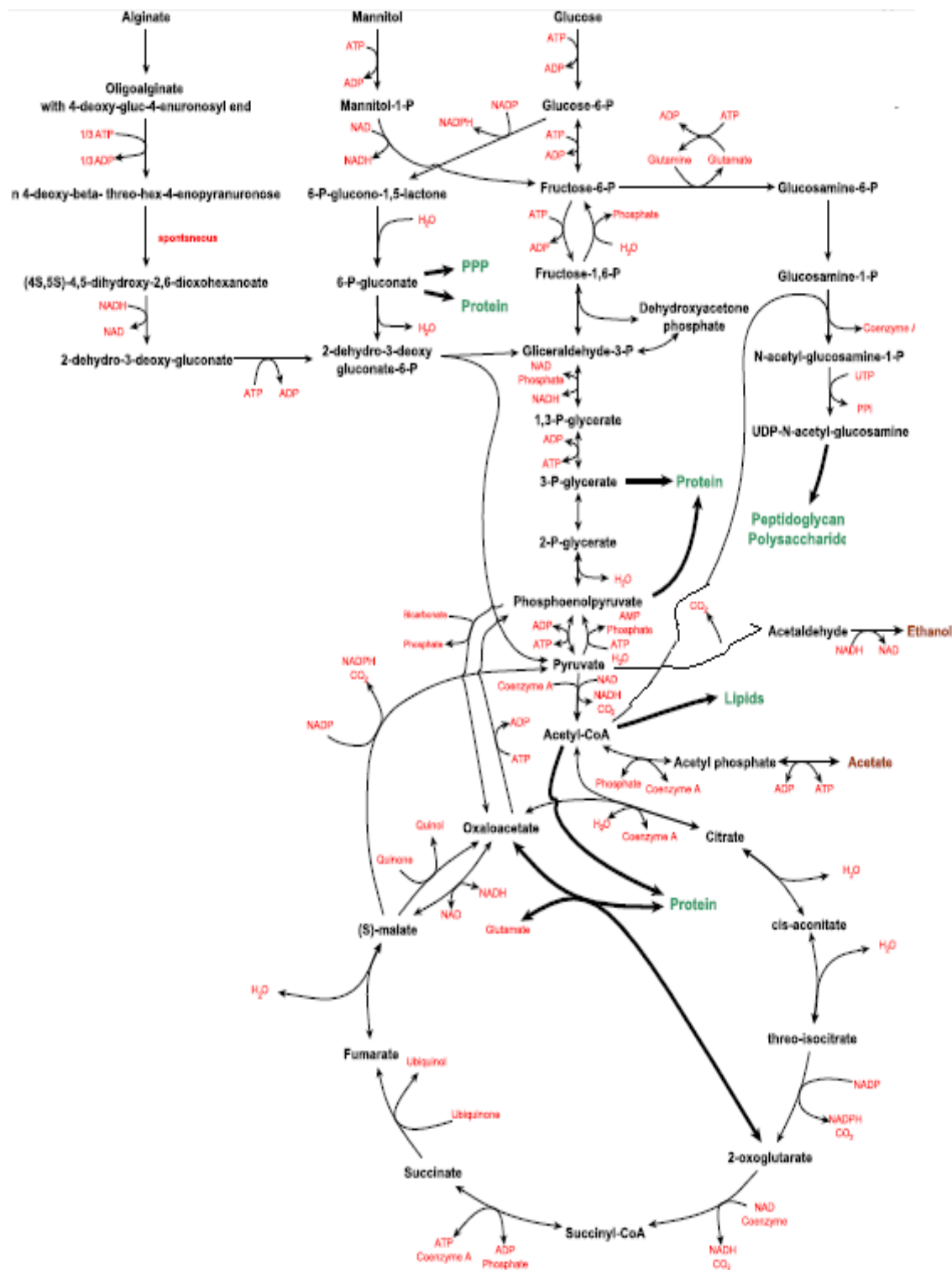


Figura A.7: Vías de degradación de carbono

Anexo A6: Datos Experimentales

A continuación se presentan los datos experimentales obtenidos para realizar, tanto las curvas de crecimiento, como las de consumo y producción.

Tabla A.1: Datos de crecimiento en cultivo 2,6% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,12	0,00	0,12	0,000	0,11
1,52	0,12	2,37	0,11	15,12	0,18
2,60	0,13	5,23	0,12	18,00	0,18
4,75	0,18	7,65	0,12	21,02	0,18
7,65	0,19	9,85	0,13	22,75	0,17
9,25	0,19	23,0	0,13	26,38	0,18
11,6	0,20	25,0	0,13	38,93	0,18
83,6	0,20	50,8	0,13	45,58	0,18

Tabla A.2: Datos de crecimiento en cultivo 2% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,12	0,00	0,12	0,00	0,12
1,58	0,13	1,78	0,14	1,78	0,13
2,52	0,12	3,18	0,14	3,18	0,13
4,75	0,21	4,82	0,15	4,82	0,13
5,75	0,31	5,80	0,19	5,80	0,17
6,77	0,50	6,77	0,27	6,77	0,23
7,65	0,76	7,85	0,46	7,85	0,40
8,42	1,01	8,50	0,73	8,50	0,60
9,15	1,32	9,12	0,94	9,12	0,84
10,0	1,58	9,77	1,17	9,77	0,98
10,7	1,69	10,4	1,25	10,4	1,21
11,65	1,70	22,38	1,86	22,3	1,52

Tabla A.3: Datos de crecimiento en cultivo 1,6% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,13	0,00	0,13	0,00	0,12
2,35	0,13	2,35	0,13	3,07	0,13
3,52	0,14	3,52	0,14	5,00	0,25
4,67	0,20	4,67	0,21	5,83	0,39
5,83	0,36	5,83	0,39	6,33	0,59
7,17	0,79	7,17	0,88	6,82	0,66
8,23	1,19	8,23	1,20	7,38	0,83
8,95	1,34	8,95	1,28	8,17	1,27
10,1	1,43	10,1	1,34	10,1	1,77
10,9	1,51	10,9	1,35	10,9	1,78

Tabla A.4: Datos de crecimiento en cultivo 1% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,12	0,00	0,12	0,00	0,12
1,33	0,13	1,78	0,13	1,78	0,12
2,52	0,15	3,12	0,14	3,12	0,14
3,50	0,18	4,28	0,15	4,28	0,16
4,58	0,25	5,32	0,22	5,32	0,21
5,63	0,35	6,30	0,35	6,30	0,32
6,68	0,67	7,27	0,57	7,27	0,53
7,48	1,01	8,25	0,95	8,25	0,92
8,42	1,40	9,00	1,25	9,00	1,18
10,0	1,83	9,98	1,45	9,98	1,44
10,7	1,91	11,1	1,54	11,1	1,59

Tabla A.5: Datos de crecimiento en cultivo 0,6% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,13	0,00	0,13	0,00	0,13
2,17	0,13	2,17	0,13	2,17	0,14
3,53	0,17	3,53	0,17	3,53	0,16
4,80	0,25	4,80	0,26	4,80	0,27
5,83	0,43	5,83	0,44	5,83	0,47

6,55	0,75	6,55	0,84	6,55	0,76
7,62	1,03	7,62	1,12	7,62	1,18
8,62	1,52	8,62	1,41	8,62	1,50
9,42	1,67	9,42	1,58	9,42	1,65
10,2	1,86	10,2	1,80	10,2	1,68

Tabla A.6: Datos de crecimiento en cultivo 2,6% manitol

Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [g/l]
0,00	0,12	0,00	0,11	0,00	0,11
1,50	0,13	1,72	0,13	1,72	0,13
2,42	0,14	3,20	0,17	3,20	0,16
3,50	0,16	4,22	0,24	4,22	0,22
4,58	0,22	5,28	0,35	5,28	0,31
5,55	0,31	6,25	0,50	6,25	0,41
6,63	0,43	7,22	0,73	7,22	0,52
7,48	0,50	8,20	0,98	8,20	0,63
8,50	0,63	8,93	1,13	8,93	0,75
9,25	0,68	9,93	1,21	9,93	0,81
10,1	0,78	11,1	1,46	11,1	0,85

Tabla A.7: Consumo y Producción cultivo 2% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Alginato [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Manitol [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Etanol [g/l]
0,00	27,00	0,00	7,50	0,00	0,00
1,60	26,4	1,60	7,03	1,60	0,00
2,50	26,8	2,50	7,24	2,50	0,00
3,00	26,0	3,00	7,50	3,00	0,00
4,00	26,5	4,00	7,40	4,00	0,00
5,00	27,0	5,00	7,57	5,00	0,00
6,30	25,9	6,30	7,48	6,30	0,00
7,30	24,5	7,30	7,09	7,30	0,00
8,80	20,7	8,80	5,95	8,80	0,00
10,0	13,3	10,0	3,99	10,0	0,04
11,3	2,95	11,3	3,50	11,3	0,30
13,7	1,21	13,7	1,00	13,7	2,44
15,3	1,85	15,3	0,32	15,3	2,82

16,8	1,74	16,8	0,00	16,8	3,20
18,7	1,56	18,7	0,00	18,7	3,50
38,4	1,57	20,8	0,00	20,8	3,74
40,5	1,50	23,2	0,00	23,2	3,78
48,4	1,48	24,6	0,00	24,6	3,80
		38,4	0,00	38,4	3,80
		40,5	0,00	40,5	3,80
		42,8	0,00	42,8	3,80
		45,0	0,00	45,0	3,80
		48,4	0,00	48,4	3,90

Tabla A.8: Consumo y Producción cultivo 1,6% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Alginato [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Manitol [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Etanol [g/l]
0,00	16,97	0,00	10,92	0,00	0,00
1,60	16,35	1,60	10,50	1,60	0,00
4,00	16,38	4,00	10,79	2,50	0,00
5,00	16,47	5,00	10,67	3,00	0,00
6,30	16,09	6,30	10,49	4,00	0,00
7,30	14,68	7,30	9,863	5,00	0,00
8,80	12,69	8,80	8,507	6,30	0,00
10,0	11,00	10,0	6,995	7,30	0,00
13,7	0,948	11,3	6,056	8,80	0,27
15,3	0,870	13,7	3,166	10,0	1,13
20,8	0,729	15,3	1,600	11,3	1,43
23,2	0,836	16,8	0,693	13,7	1,96
24,6	0,764	18,7	0,474	15,3	2,37
38,4	0,664	20,8	0,300	16,8	3,45
40,5	0,754	23,2	0,000	18,7	3,70
45,0	0,745	24,6	0,000	20,8	4,42
48,4	0,617	38,4	0,000	23,2	4,68
		40,5	0,000	24,6	4,46
		42,8	0,000	38,4	4,44
		45,0	0,000	40,5	4,50
		48,4	0,000	42,8	4,43
				45,0	4,33
				48,4	4,50

Tabla A.9: Consumo y Producción cultivo 1% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Alginato [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Manitol [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Etanol [g/l]
0,00	11,2	0,00	18,5	0,00	0,00
2,00	11,2	2,00	15,9	2,00	0,00
3,58	10,5	3,58	15,3	3,58	0,00
4,33	10,2	4,33	15,0	4,33	0,00
5,67	9,78	5,67	14,8	5,67	0,00
7,00	9,29	7,00	14,3	7,00	0,00
8,15	8,70	8,15	13,0	8,15	2,05
8,67	7,96	8,67	11,1	8,67	3,39
9,83	5,86	9,83	8,42	9,83	5,16
10,6	3,52	10,6	7,00	10,6	6,42
13,6	1,05	13,6	5,50	13,6	7,50
15,3	0,84	15,3	5,31	15,3	7,65
16,8	0,70	16,8	4,76	16,8	7,90
18,6	0,65	18,6	4,60	18,6	8,00
20,7	0,65	20,7	3,70	20,7	8,30
23,1	0,50	23,1	2,55	23,1	7,84
24,5	0,50	24,5	2,40	24,5	8,27
38,4	0,50	38,42	1,31	38,42	8,20
40,5	0,50	40,50	2,08	40,50	8,05
42,7	0,50	42,75	1,59	42,75	7,32
45,0	0,50	45,00	2,13	45,00	7,80
48,4	0,50	48,42	2,22	48,42	8,00

Tabla A.10: Consumo y Producción cultivo 0,6% alginato

Tiempo de cultivo [h]	Alginato [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Manitol [g/l]	Tiempo de cultivo [h]	Etanol [g/l]
0,00	8,13	0,00	20,1	0,00	0,00
1,60	7,28	3,00	20,0	1,60	0,00
3,00	6,72	5,00	19,5	2,50	0,00
4,00	6,42	7,30	19,4	3,00	0,00
5,00	5,76	8,80	18,9	4,00	0,00
7,30	4,00	10,0	17,0	5,00	0,00
8,80	2,60	11,3	16,4	6,30	0,00
10,0	2,00	13,7	13,0	7,30	0,00

11,3	1,70	15,3	11,5	8,80	0,53
13,7	1,10	18,7	10,8	10,0	0,80
15,3	0,77	20,8	9,98	11,3	1,12
16,8	0,78	38,4	6,45	13,7	1,50
18,7	0,75	42,8	5,10	15,3	1,88
20,8	0,67	45,0	4,68	16,8	2,86
23,2	0,50	48,4	4,80	18,7	3,52
24,6	0,50			20,8	4,00
38,4	0,50			23,2	4,56
40,5	0,50			38,4	4,64
42,8	0,50			40,5	4,71
45,0	0,50			45,0	4,80
48,4	0,50			48,4	4,64

Anexo A7: Ajustes a Curvas

A Continuación se muestra el ajuste de la resolución numérica a los datos experimentales para los cultivos crecidos en las distintas razones de alginato manitol.

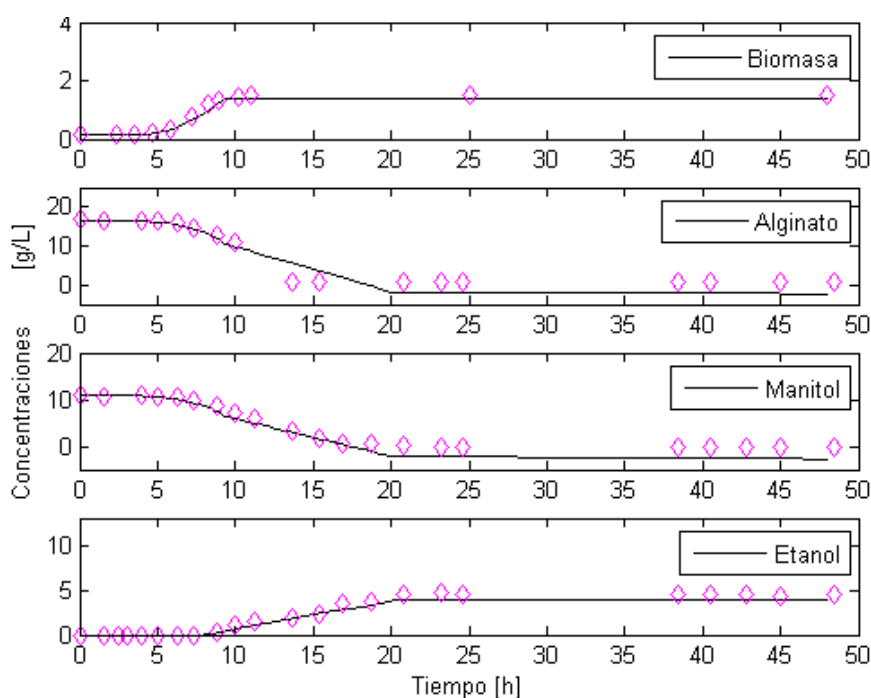


Gráfico A.4: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 1,6% alginato

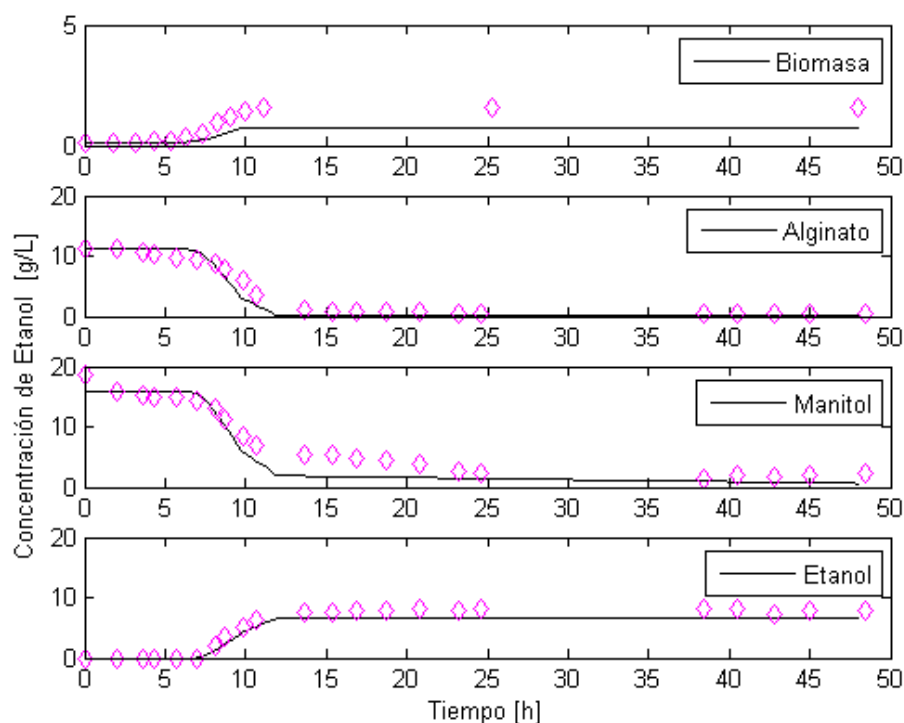


Gráfico A.5: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 1% alginato

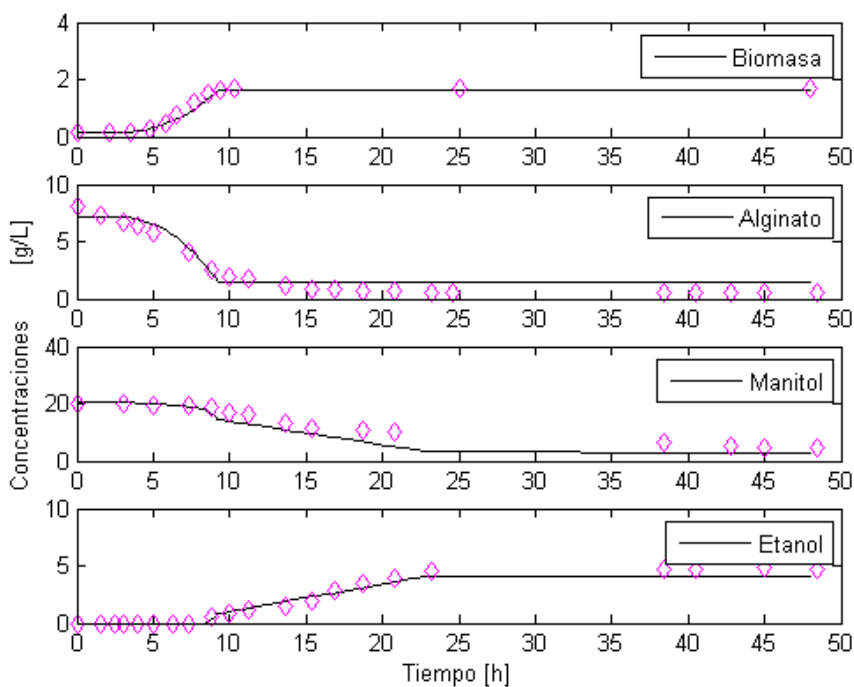


Gráfico A.6: Resolución y ajuste de parámetros cultivo 0,6% alginato

Anexo A8: Código de Programación

A continuación se presenta el código de programación utilizado en el *software* MATLAB

Main

```

clear all
close all
%% definición de tiempo

t0=0;
tf=48;
%% definición de condiciones iniciales
x0=0.127;
s0=7.2;
s1=20.4;
p0=0;
y0=[x0 s0 s1 p0];

%%resolución de sistema diferencial
[T,Y]=ode45('modelo_sin_saturacion',[t0,tf],y0);

%% Datos de Biomasa
data=xlsread('datos_3_10.xls');
t_biomasa = data(:,1);
t_biomasa(isnan(t_biomasa))=[];
x_biomasa = data(:,2);
x_biomasa(isnan(x_biomasa))=[];

%% Datos sustrato
t_alginato = data(:,3);
t_alginato(isnan(t_alginato))=[];
x_alginato = data(:,4);
x_alginato(isnan(x_alginato))=[];

t_manitol = data(:,5);
t_manitol(isnan(t_manitol))=[];
x_manitol = data(:,6);
x_manitol(isnan(x_manitol))=[];

%% Datos Producto
t_etanol = data(:,7);
t_etanol(isnan(t_etanol))=[];
x_etanol = data(:,8);
x_etanol(isnan(x_etanol))=[];

%% GRAFICO ODE45
figure (1)
subplot 411
plot(T,Y(:,1),'-', 'LineWidth',1,'color','k');
axis([t0 50 0 4])
legend('Biomasa','Location','NorthEast');
```

```

hold on
plot(t_biomasa,x_biomasa,'d','Color','m')
subplot 412
plot(T,Y(:,2),'-', 'LineWidth',1,'color','k');
legend('Alginato','Location','NorthEast');
ylabel('[g/L]');
hold on
plot(t_alginato,x_alginato,'d', 'Color','m')
subplot 413
plot(T,Y(:,3),'-', 'LineWidth',1, 'color','k');
legend('Manitol','Location','NorthEast');
ylabel ('Concentraciones');
hold on
plot(t_manitol,x_manitol,'d', 'Color','m')
subplot 414
plot(T,Y(:,4), '-', 'LineWidth',1, 'color','k');
axis([t0 50 0 10])
legend('Etanol','Location','NorthEast');
xlabel('Tiempo [h]');
hold on
plot(t_etanol,x_etanol,'d','Color','m')

```

Función

```

function dy=modelo_sin_saturacion(t,y)
dy=zeros(4,1);
%% definición de parámetros
mu_max=0.58;
y_xs=0.261;
y_ps=0.565;
y_px=2;
ms=0;
mp=0.15;
ks=2;
y_xs1=0.466;
ms1=0.01;
y_ps1=0.303;
ks1=0.000001;
qp1=0;

%% Condición de tiempo en que mu es válido
if t<3
    mu=0;
elseif t>3 && t<9.3
    mu=mu_max*(y(2)/(ks + y(2)))*(y(3)/(ks1 + y(3)));

else
    mu=0;
end
%% condiciones de tiempo que define la producción de etanol
if t<8.5
    qp=0;
elseif t>8.5 && t<23

```

```
        qp=y_px*mu + mp;
else
    qp=0;
end
%% Set de ecuaciones diferenciales
dy(1)= mu*y(1);
dy(2)=-y(1)*((mu/y_xs) + ms + (qp1/y_ps));
dy(3)=-y(1)*((mu/y_xs1) + ms1 + (qp/y_ps1));
dy(4)=qp*y(1);

return
```