



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA

ESCALAMIENTO Y OPTMIZACION DE LA PRODUCCION DE ENZIMAS ALGINATO LIASAS RECOMBINANTES

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGIA

LISA ANNETTE ZAPATA URRUTIA

PROFESOR GUIA:

MARIA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISION:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

JAVIER GIMPEL HENRIQUEZ

Este trabajo ha sido financiado por:

Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB.

SANTIAGO DE CHILE

2017

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TITULO DE: Ingeniera Civil en Biotecnología

POR: Lisa Annette Zapata Urrutia

FECHA: 26/10/2017

PROFESOR GUIA: María Elena Lienqueo

ESCALAMIENTO Y OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE ENZIMAS ALGINATO LIASAS RECOMBINANTES

La biorrefinería se define como una serie de procesos que permiten la obtención de variados productos de valor a partir algún tipo de biomasa. Debido a la extensa costa de nuestro país, la biorrefinaría de algas se presenta como una excelente alternativa para el desarrollo de nuevos capitales. Las algas contienen una gran cantidad de compuestos químicos útiles en variadas industrias, desde la farmacéutica hasta la de biocombustibles. Además, las algas pardas, llamadas así por su color, presentan hasta un 40% de su peso seco en alginato, azúcar que puede ser degradada por enzimas alginato liasas que rompen los enlaces formados por las subunidades del carbohidrato.

Estudios realizados en la Universidad de Chile, lograron expresar 9 alginato liasas provenientes de 5 organismos distintos en volúmenes de 20 [ml] obteniendo 1 [U/ml]. De ahí la necesidad de escalar y determinar la factibilidad económica de su producción. En el presente trabajo, se logró escalar la producción 75 veces (20 a 1.500 [ml]), obteniendo en el mejor de los casos 5,81 [U/ml], esto se logró modificando las condiciones de operación. El cultivo se desarrolló a 37°C en un medio Terrific con la adición de 5 [g/l] de lactosa. Se comparó además la actividad de la enzima producida con una versión comercial A, permitiendo determinar que la producción de 1,5 [l] de medio de cultivo es equivalente a 2,6 unidades de producto comercial de 100 [mg] o el equivalente monetario a CLP\$ 504.888. Esto permite la obtención de una evaluación económica positiva para un proyecto de implementación de laboratorio para la producción de enzima, con un VAN superior a MM CLP\$200 en un horizonte de evaluación de 10 años, con la producción, tres veces a la semana, de dos reactores de 1,5 [l]. Finalmente se corrobora la factibilidad económica de la producción en mayor escala de este producto, compitiendo con las versiones actualmente comercializadas. Esto se podría traducir en el impulso necesario para el desarrollo de industrias de biorrefinería de algas con aplicaciones en áreas tan diversas como combustibles, medicina, alimentación, farmacia, etc.

Los estudios realizados en esta memoria se encuentran financiados por el fondo basal FB 0001 del Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB.

A mis padres Inés y Stefan,

por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional

A mis abuelos Cristina, Luis, Sergio y Trinidad

por sus enseñanzas y dar calor a mi vida

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las profesoras Maria Elena Lienqueo y Oriana Salazar por su ayuda y orientación, no sólo durante el desarrollo de este trabajo, sino que también durante todos estos años de enseñanza. A Javier Gimpel por su ayuda e infinita paciencia durante las largas jornadas en el laboratorio y por su siempre buena disposición a escuchar y resolver mis preguntas.

Al Centro de Biotecnología y Bioingeniería por financiar esta investigación y permitirme desarrollar este trabajo.

A mis padres, mis pilares, por el apoyo incondicional, por creer en mí, por enseñarme el camino, porque gracias a ustedes sé que con esfuerzo todas las metas son posibles.

A mis abuelos por su preocupación constante y el cariño incondicional. Por ser los pilares de una familia loca pero hermosa.

A Tomás, por hacerme reír y rabiar, por ser mi hermanito, por todos esos cafés tan necesarios cuando el cuerpo y la mente perdían las fuerzas.

A los amigos de siempre, Ángelo, Sebastián, Tamara, Javier, Pablo y Joakin, por todas esas tardes de distracción, las conversaciones interminables y las risas inolvidables.

A Matías, por acompañarme durante todos estos años, por ser mi pareja y mejor amigo, por llenar mi vida de colores y por todos esos detalles que llenan de alegría nuestros días juntos.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos compañeros que conocí durante este tiempo, a quienes me permitieron desarrollar la docencia y aprender de esto. A todos quienes me recibieron con alegría en las clases y hacían de esa experiencia algo inolvidable. Gracias por permitirme ser parte de sus caminos y por todas esas palabras de cariño que me llevo en el corazón.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1 Algas y biorrefinería.....	1
1.2 Alginato	2
1.2.1 Usos y aplicaciones	2
1.3 Enzimas alginato liasas	3
1.3.1 Enzimas alginato liasas comerciales	3
1.4 Situación actual y estudios relevantes.....	4
1.4.1 Estudios sobre caracterización y expresión de alginato liasas.....	4
1.4.2 Estudios sobre uso de alginato liasas en producción de bioetanol	5
1.4.3 Escalamiento de la producción de enzimas alginato liasas.....	6
1.5 Motivación	7
1.6 Objetivos	7
1.6.1 Objetivos generales	7
1.6.2 Objetivos específicos	8
2. Marco teórico	9
2.1 Alginato liasas.....	9
2.1.1 Alginato liasas recombinantes	10
2.2 Escalamiento de la producción de enzimas	10
2.2.1 Obtención de biomasa	11
2.2.1.1.1 Fase de latencia	11
2.2.1.1.2 Fase exponencial o logarítmica	12
2.2.1.1.3 Fase estacionaria.....	12
2.2.1.1.4 Fase de muerte	13
2.2.2 Medio de cultivo	13
2.2.3 Efecto del pH	14
2.2.4 Efecto de la temperatura.....	15
2.2.5 Oxígeno disuelto en el medio	15
2.2.6 Inducción por lactosa y densidad del cultivo	16
3. Metodología	18
3.1 Metodología general	18

3.2	Materiales	18
3.2.1	Enzimas alginato liasas evaluadas en el escalamiento	18
3.2.2	Insumos y Reactivos.....	19
3.2.3	Equipos.....	20
3.3	Parámetros y propiedades importantes para la evaluación del proceso de fermentación y producción de alginato liasa	20
3.3.1	Densidad óptica	20
3.3.2	Concentración de glucosa.....	20
3.3.3	Actividad alginato liasa	21
3.4	Diseño del proceso experimental	21
3.4.1	Fermentación en pequeña escala (matraz)	23
3.4.1.1	Preparación de medio de cultivo	23
3.4.1.2	Inoculación	24
3.4.1.3	Fermentación	24
3.4.2	Fermentación en biorreactor.....	24
3.4.2.1	Medio de autoinducción	24
3.4.2.1.1	Preparación de medio de cultivo	24
3.4.2.1.2	Inoculación	24
3.4.2.1.3	Fermentación	25
3.4.2.2	Medio Terrific.....	25
3.4.2.2.1	Preparación de medio de cultivo	25
3.4.2.2.2	Inoculación	26
3.4.2.2.3	Fermentación	26
3.4.2.2.4	Inducción	26
3.4.3	Toma de muestras	26
3.4.3.1	Evaluación de crecimiento.....	26
3.4.3.2	Evaluación de actividad.....	27
3.4.4	Preparación del extracto de proteínas	27
3.4.5	Relación entre densidad óptica y gramos de biomasa.....	27
3.4.6	Ensayo de actividad alginato liasa	27
4.	Resultados y discusiones	29
4.1	Evaluación de producción en 500 [ml].....	29
4.2	Escalamiento de producción en biorreactor de 1.5 [l]	30

4.2.1	Comparación entre medio de autoinducción y Terrific.....	30
4.2.2	Producción en Medio Terrific	32
4.2.2.1	Evaluación de temperaturas	32
4.2.2.2	Evaluación de la concentración de lactosa en la inducción ...	34
4.3	Evaluación de resultados	37
4.4	Comparación con alginato liasa comercial A	39
4.5	Evaluación económica	41
5.	Conclusiones.....	47
6.	Recomendaciones.....	49
7.	Bibliografía	50
8.	Anexos.....	57
	Anexo A. Algas pardas.....	57
	Anexo B. Propiedades funcionales y usos de distintos alginatos	62
	Anexo C. Producción de alginato liasas recombinantes.....	63
	Anexo D. Comparación entre cultivos discontinuos y continuo.	65
	Anexo E. Curva de obtención de biomasa	65
	Anexo F. Comparación de la composición de los medios de cultivo Terrific y de autoinducción.	66
	Anexo G. Densidad óptica del cultivo al momento de la inducción en variados estudios	66
	Anexo H. Test de Glucosa. MQuant™	67
	Anexo I. Curva de Calibración de glucosa	67
	Anexo J. Biorreactor	69
	Anexo K. Influencia de la edad del cultivo con el largo de la fase lag ..	74
	Anexo L. Efectos de la preparación de lactosa.....	75
	Anexo M. Curva de calibración de peso seco	76
	Anexo N. Comparación de actividad de la enzima G con versión comercial	76
	Anexo O. Evaluación económica.....	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del alginato.....	2
Figura 2: Sacarificación de alginato mediante enzimas.....	9
Figura 3: Efecto del medio de cultivo en la obtención de biomasa de Escherichia coli recombinante.....	14
Figura 4: Diseño experimental.....	23
Figura 5: Clasificación de ficocoloides de algas pardas.....	59
Figura 6: Curva de crecimiento de Escherichia coli.....	65
Figura 7: Ficha técnica de test de glucosa Merck.....	67
Figura 8: partes del biorreactor.....	69
Figura 9: conexiones presentes en la cubierta del biorreactor.....	70
Figura 10: salidas del reactor que deben ser selladas.....	71
Figura 11: preparación de mangueras del biorreactor.....	71
Figura 12: instalación del condensador en el biorreactor.....	72
Figura 13: Mangueras selladas del condensador del biorreactor.....	72
Figura 14: vista final del biorreactor listo para ser autoclavado.....	73
Figura 15: panel digital del controlador del biorreactor.....	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enzimas alginato liasas producidas recombinantemente en el proceso de escalamiento	19
Tabla 2: Insumos y reactivos utilizados	19
Tabla 3: Equipos utilizados durante el escalamiento de la producción de enzimas alginato liasas	20
Tabla 4: Fermentaciones realizadas durante la primera evaluación de la expresión	21
Tabla 5: Variación de condiciones según resultados de la primera evaluación de la expresión de proteína en biorreactor de 1,5 [l]	22
Tabla 6: Protocolo de variación en la agitación del biorreactor.....	25
Tabla 7: Actividades específicas máximas observadas para cultivos a distintas temperaturas	33
Tabla 8: Actividad específica máxima observada para cultivos con distintas concentraciones de inductor.	36
Tabla 9: Actividad específica máxima observada para distintos tipos de enzima.....	39
Tabla 10: Detalle OPEX (Costos de operación), por batch, para proyecto de producción de alginato liasa, sin considerar sueldos.....	41
Tabla 11: resumen de VAN y flujo de caja neto acumulado para un proyecto con dos biorreactores y distintos sistemas de financiamiento ..	45
Tabla 12: Principales algas pardas explotadas en Chile	57
Tabla 13: Exportación de algas pardas entre 1991 y 1992.....	60
Tabla 14: usos de distintos alginatos y función.....	62
Tabla 15: Alginato liasas expresadas en E. coli	63
Tabla 16: ventajas y desventajas de la producción en sistemas continuos y discontinuos	65
Tabla 17: composición de los medios terrific y de autoinducción.....	66
Tabla 18: densidades ópticas al momento de la inducción utilizadas en variados estudios	66
Tabla 19: Concentración de glucosa utilizada para la construcción de curvas de calibración	67
Tabla 21: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando un biorreactor.	78
Tabla 22: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y financiamiento 3F.....	79
Tabla 23: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y	

financiamiento 50%3F y 50% bancario, con 17,16% de interés anual en un plazo de 5 años.....	80
Tabla 24: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y financiamiento 100% bancario, con 17,16% de interés anual en un plazo de 5 años	81

1. Introducción

1.1 Algas y biorrefinería

La biorrefinería se entiende como un proceso industrial, que integra diversidad de etapas para la conversión de biomasa a una amplia gama de productos, que van, desde combustibles, hasta compuestos químicos de alto valor, con uso médico, alimenticio o farmacológico [1]. Debido a la extensa costa presente en el país, y a la gran variedad de algas que se desarrollan, la biorrefinería se presenta como una alternativa atractiva para el desarrollo de nuevos capitales. En el Anexo A, Sección A.1, se muestran las principales especies de algas pardas explotadas en Chile.

La extracción de algas pardas se desarrolla principalmente en las regiones del norte del país, siendo las más importantes la III, IV y II en orden de producción. En el Anexo A, Sección A.2, se muestra la distribución regional del desembarque total de algas extraídas en el país durante el año 2008.

Las algas pardas resultan ser una excelente materia prima para el desarrollo de biorrefinería en Chile, debido a la presencia de pigmentos de alto valor comercial en su biomasa, como clorofila, β -carotenos, violaxantina y fucoxantina [2]. Además, se puede encontrar hasta un 40% DW (peso seco) de alginato en la matriz celular de estas algas [3]. En el Anexo A, Sección A.3 se muestra la clasificación detallada de ficocoloides que poseen las algas pardas.

A pesar de ser un recurso de alta presencia en el país, a lo largo de la historia sólo se ha visto como una materia prima exportable y no como la fuente de desarrollo de una nueva industria nacional, como es la industria del alginato internacionalmente [4]. Según datos históricos, entre el año 1991 y 1992, del total de algas pardas extraídas en Chile, el 98.7% fue exportado como materia prima para la industria de alginatos de Japón, Reino Unido, E.U. y Francia. Mientras que la pequeña producción de alginatos en el país, contribuía como máximo, sólo al 0.18% de la producción mundial [4]. En el Anexo A, Sección A.4, se muestran los volúmenes de exportación por país y especie de algas durante este periodo.

Actualmente, el mercado de algas se encuentra en ascenso, un ejemplo de esto es que, en el año 2008, el valor de la tonelada de huiro negro fue de 1.336 dólares, un 47% más que en el año anterior y 2,5 veces el mayor valor registrado durante el año 2003 [5]. En el Anexo A, Sección A.5 se detalla la evolución de los niveles de exportación de Huiro negro y su valor entre los años 1999 y 2008.

1.2 Alginato

El alginato; azúcar estructural de la pared celular de las algas pardas, es un polímero lineal, y está formado por monómeros de ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico, llamados comúnmente unidades M y G, respectivamente. Estas unidades interactúan mediante enlaces glicosídicos, sin patrones regulares, pudiendo establecer entonces, uniones M-M, M-G, G-M o G-G, lo cual complejiza aún más su estructura, obteniéndose formas encapsuladas, tipo cinta o escalera [3,6].

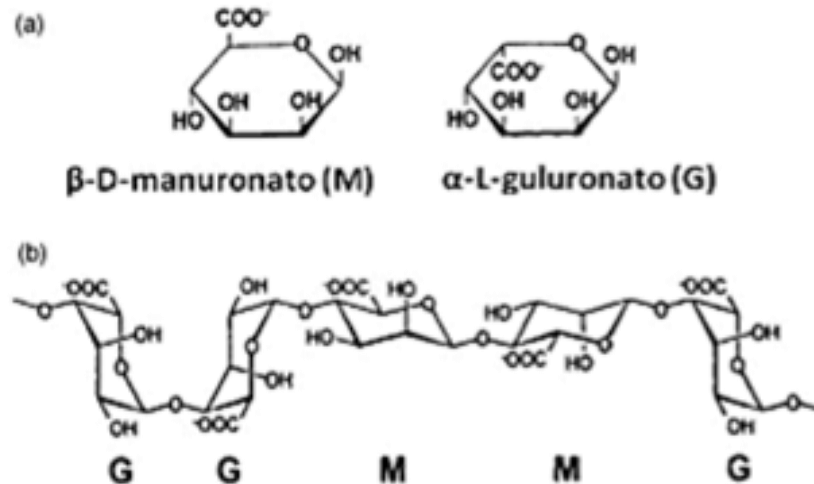


Figura 1: Estructura del alginato. (a) Monómeros constituyentes; (b) Diversas formas estructurales en el polímero dependiendo de la secuencia adoptada por los monómeros [3].

1.2.1 Usos y aplicaciones

Los alginatos poseen variadas aplicaciones debido a su capacidad de formar geles y su biocompatibilidad. En la industria textil y alimenticia se usan como espesantes en tintes, salsas, helados y productos lácteos en general. Mientras que en medicina se utilizan sus propiedades antibacterianas, prebióticas y algunos medicamentos son encapsulados en este material, ya que permite una liberación prolongada y controlada del fármaco [3,7-8]. Todo esto lo transforma en un "commodity" de importante valor comercial. En Anexo B se muestran las propiedades funcionales y usos de distintos alginatos.

Se estima que el mercado mundial del alginato alcanza las 20.000 [t], el cual se encuentra dominado por la compañía norteamericana Kelco, la cual fue fusionada con la inglesa Alginate Industries Ltd, acaparando por completo el mercado internacional. Un menor porcentaje, cercano al 20%

de la producción de alginato proviene de países como Noruega, Alemania, Japón y Australia [9].

A pesar de las variadas aplicaciones del alginato, este producto resulta ser además el causante del principal problema para la biorrefinería de este tipo de algas, ya que dificulta la extracción de otros productos de valor y se trata además de un carbohidrato de difícil fermentación, lo cual disminuye las posibilidades de aplicación en biocombustibles. Finalmente, la refinera de algas depende de tecnologías que permitan descomponer sus carbohidratos estructurales para permitir la extracción de compuestos químicos o el propio alginato y además que el precio de estas aplicaciones sea competitivo.

1.3 Enzimas alginato liasas

Las enzimas alginato liasas, también llamadas alginasas, o alginato depolimerasas son biocatalizadores capaces de sacarificar el alginato liberando azúcares menos complejos. Con ellas se logra la fragmentación de la biomasa algal para la posterior extracción de productos de valor comercial o la fermentación de carbohidratos para la producción de bioetanol, entre otras aplicaciones [10-12]

1.3.1 Enzimas alginato liasas comerciales

Sigma-Aldrich comercializa la enzima en su presentación Alginate Lyase powder A1603, de 100 [mg], conteniendo 1.000 unidades de enzima a un precio de CLP \$193.000 [13], sin embargo, no se declara la forma de producción de esta. Por otra parte, Megazyme la comercializa como Alginate lyase (*Sphingomonas sp.*). Una enzima de alta pureza, obtenida por métodos recombinantes, en una presentación de 42 [mg] conteniendo 5.000 unidades de enzima a un precio de CLP \$120.150 [14].

Debido al alto costo asociado, resulta imposible utilizar las versiones comerciales actuales en algún proceso de producción industrial. En consecuencia, el desarrollo de una industria basada en la refinera de algas se ve mermado por la inexistencia de métodos enzimáticos económicamente factibles de implementar. De ahí la importancia de encontrar formas de producción de bajo costo que permita la implementación de procesos de biorrefinería algal.

1.4 Situación actual y estudios relevantes

A pesar de la gran cantidad de usos que poseen las enzimas alginato liasas, y sus aplicaciones a nivel industrial, los estudios realizados históricamente, se centran en la búsqueda, caracterización y expresión de enzimas provenientes de distintos microorganismos, la aplicación de estas para la generación de bioetanol y no en el escalamiento y producción de grandes volúmenes de las mismas.

1.4.1 Estudios sobre caracterización y expresión de alginato liasas

Las alginato liasas se han podido encontrar en hongos, bacterias marinas y bacterias del suelo. Esto se debe a que estos organismos son capaces de utilizar el alginato como fuente de carbono. Además, algunos moluscos las poseen en su sistema digestivo para procesar las algas que les sirven de alimento.

Lo anterior da origen a una amplia diversidad de enzimas con distintas especificidades, niveles de actividad y condiciones óptimas de operación. Esto ha motivado el estudio, caracterización y expresión de distintas variedades provenientes de múltiples organismos.

En el año 1995, Fujiyama K, Maki H, Kinoshita S y Yoshida T. lograron producir una cepa de *Escherichia coli* capaz de producir alginato liasas de forma recombinante utilizando un inserto proveniente de *Pseudomonas sp.* Los resultados de esta experiencia permitieron obtener una alta producción de la enzima en la bacteria huésped [15].

En el año 2008, Ma, L. Chi, Z. Li, J y Wu, L lograron producir una alginato liasa de *Pseudoalteromonas elyakovii* en *Escherichia coli*, obteniendo niveles de expresión casi 40 veces superiores a los de la bacteria nativa, en este caso la temperatura óptima de operación de la enzima era de 30°C [16]

En el año 2011 enzimas provenientes de *Streptomyces sp.* Fueron producidas por Shin, J.W., Choi, S.H. y KIM D.E. de forma recombinante en *Escherichia coli*, obteniendo liasas altamente activas a 15°C. Además, estas fueron inmovilizadas en nanopartículas lo que permitió su reutilización hasta 15 veces [17]. El mismo año Ryu, M. y Lee, E. utilizaron una enzima recombinante proveniente de *Sphingomonas sp* de actividad exolítica para la obtención de monosacáridos de alginato [18]. Además, Jian-Wei, L. Sheng, J. Song, Xiu-Lan, C. Bin-Bin y Yu-Zhong, Z. lograron extraer una alginato liasa bifuncional de un cultivo de *Pseudoalteromonas sp.* La temperatura óptima de operación se determinó en 50 °C y aunque mostró

mayor actividad en la ruptura de enlaces de unidades G-G en comparación con M-M, se logró evidenciar una alta actividad en ambos casos [19].

En el 2014 Inoue, A. Mashino, C. Kodama, T y Ojima, T lograron purificar una alginato liasa endolítica de la fracción periplásmica de la bacteria *Flavobacterium sp.* La enzima poseía una temperatura óptima de operación de 55 °C, condición útil en procesos industriales realizados a altas temperaturas. Además, se identificó y amplificó el gen que la codificaba y se expresó en *Escherichia coli* obteniéndose un rendimiento 8 veces mayor de la proteína que en el sistema nativo [20]

En el año 2015 Li, S. Yang, X. Zhang, L. Yu, W y Han, F. lograron expresar en *Escherichia coli* el gen de una alginato liasa resistente a bajas temperatura (15 °C) proveniente de la bacteria *Agarivorans sp* [21].

Como se puede observar a partir de lo anterior, los estudios se han focalizado en la búsqueda de distintas variedades de alginato liasas con aplicaciones industriales, obteniendo enzimas resistentes a altas y bajas temperaturas, pero no se ha estudiado la producción de estas en volúmenes que satisfagan los procesos industriales.

1.4.2 Estudios sobre uso de alginato liasas en la producción de bioetanol

Los biocombustibles de tercera generación, provenientes de algas, son considerados una alternativa sostenible y con gran potencial en el país. Sin embargo, el principal problema asociado a este proceso es la imposibilidad de los microorganismos utilizados comúnmente de forma industrial para fermentar el alginato, principal azúcar disponible en las algas. A partir de esto se desprende la utilidad de enzimas alginato liasas para solucionar el problema.

En el año 2012 Wargacki, A.J. Leonard, E. Win, M.N. y Regitsky, D.D diseñaron una cepa de *Escherichia coli* con genes provenientes de *Vibrio splendidus* que sintetizaban enzimas para el transporte y el metabolismo de alginato. Esto logró crear una bacteria capaz de degradar, absorber y metabolizar el alginato en etanol directamente desde las algas, alcanzando la conversión de cerca del 80% de los azúcares teóricamente consumidos [22].

De forma similar, en el año 2014 Enquist-Newman, M. Faust, A. y Bravo, D. modificaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* integrándole genes provenientes de *Asteromyces cruciatus* capaces de transportar y metabolizar el alginato en etanol obteniendo una conversión de hasta 83% de los azúcares teóricamente consumidos [11]

En Chile recientemente se han realizado estudios sobre el escalamiento del uso de este tipo de microorganismos (*Escherichia coli*). Se probó y adaptó

el proceso a fermentaciones de volúmenes de 75 [L]. El proceso diseñado contiene etapas de lixiviación ácida, despolimerización, sacarificación y fermentación, alcanzando el 64% del rendimiento teórico máximo de etanol [23].

Estos estudios demuestran la utilidad de las algas para la producción de biocombustibles. Sin embargo, se han centrado en el desarrollo de un microorganismo cuyo metabolismo permita directamente la producción de bioetanol a partir de la fermentación de alginato, lo cual aún no es posible de implementar debido a la toxicidad que genera en los microorganismos la acumulación de ciertas sustancias químicas producto de la modificación de sus vías metabólicas [11,23]

1.4.3 Escalamiento de la producción de enzimas alginato liasas

Como se mencionó anteriormente, los estudios sobre la producción de alginato liasas se centran en la búsqueda y expresión de nuevas variedades de enzima y no en el escalamiento de la producción de éstas. En el año 1993, K. Ostgaard, S. H. Knutsen, N. y Dyrset, I. M. realizaron un estudio para el escalamiento de la producción de una alginato liasa proveniente de *Klebsiella pneumoniae*. Este estudio evaluó la producción de la enzima en cultivos de 14 [L], sin embargo, la enzima se produjo en su organismo nativo y no de forma recombinante [24]

En el desarrollo experimental se realizaron las fermentaciones a 35°C, pH 7 y agitación en rangos de 200 a 800 [rpm]. Además, la cantidad de oxígeno disuelto en el medio (OD) se varió entre 30 y 80% de saturación. Al tratarse de la producción de enzima en el organismo nativo, se evaluó la incidencia de distintos tipos de alginatos, como fuente de carbono, en la inducción de la producción de la enzima. A partir de esto se determinó que la adición de alginato depolimerizado al medio de cultivo incrementa la producción de estas [24]

Posteriormente, en el año 1994 se estudió el mismo proceso, pero se modificó el medio de cultivo. Se utilizó una estrategia que contemplaba la adición de dos fuentes de carbono, sacarosa destinada al crecimiento celular y alginato encargado de la inducción de la producción de la enzima. En el proceso se presentó represión de la producción de alginato liasa por la presencia de sacarosa, sin embargo, esto se solucionó mediante la adición controlada por fed batch de ambas fuentes de carbono [25]

Las condiciones de operación se monitorearon para mantener un pH 7, 40% de OD y agitación entre 200 y 1200 [rpm]. En esta ocasión se logró aumentar en cinco veces los datos reportados en el estudio anterior donde la única fuente de carbono era alginato [24-25]

Estudios como los anteriores demuestran, el interés por la producción a mayor escala de enzimas alginato liasas, sin embargo, no se presentan trabajos sobre el escalamiento de la producción de enzimas recombinantes a pesar de las numerosas experiencias produciendo liasas de distintos orígenes en *Escherichia coli*.

1.5 Motivación

El uso de las algas como alimento se remonta a los inicios de la historia, sin embargo, recientemente se ha impulsado la producción de macroalgas para la obtención de productos químicos de alto valor y biocombustibles. Para lograr la extracción de sustancias de valor o la fermentación de los carbohidratos del alga, es necesario el uso de enzimas de alto valor comercial y limitada disponibilidad.

El presente trabajo de título plantea el escalamiento de la producción enzimática y la optimización de ésta, permitiendo la producción de la enzima en cultivos de mayor volumen y determinando las condiciones de operación necesarias que permitan un óptimo rendimiento en la producción de la proteína soluble, esto motivado por la necesidad de grandes cantidades de alginasas para desarrollar reacciones enzimáticas a nivel industrial.

1.6 Objetivos

La producción de enzima alginato liasa ha sido previamente optimizada para volúmenes de 20 [ml], sin embargo, con la finalidad de escalar la producción de enzima alginato liasa desde cultivos de esa magnitud a cultivos de 1.5 [L], se pretende estudiar y determinar las condiciones de temperatura y concentración de inductor en el medio que maximicen la cantidad de unidades de actividad enzimática por [ml] de cultivo, para lograrlo, se establecen los siguientes objetivos:

1.6.1 Objetivos generales

- Escalar la producción de enzima alginato liasa y determinar las condiciones de operación (temperatura y concentración de inductor) que aseguren su producción máxima, dentro de los rangos estudiados.

1.6.2 Objetivos específicos

- Escalar la producción de las enzimas H (Aly PEEC), G (Aly SJ02), Atu (Atu3025) y O, producidas recombinantemente en *Escherichia coli* BL21 Rosetta™ 2. La fermentación es realizada en volúmenes de 500 [ml] para determinar si las condiciones actuales de operación, determinadas mediante una optimización previa, permiten una producción comparable con la obtenida en estudios previos en volúmenes de 20 [ml].
- Escalar la producción de aquella enzima con mejor rendimiento a un biorreactor de 1.5 [L] y analizar los efectos generados por la temperatura y concentración de inductor en el medio durante la fermentación y producción de la enzima.
- Evaluar los resultados obtenidos en fermentaciones produciendo las enzimas restantes, aplicando las condiciones de crecimiento que presentan mejor rendimiento.
- Determinar el rendimiento óptimo alcanzado en la fermentación (actividad [U/ml]) y realizar una evaluación económica de los resultados obtenidos.

2. Marco teórico

A continuación, se expondrán los factores más importantes en el proceso de escalamiento de la producción de enzimas alginato liasas recombinantes.

2.1 Alginato liasas

Las enzimas alginato liasas, también llamadas alginasas, o alginato depolimerasas son biocatalizadores capaces de sacarificar el alginato liberando azúcares menos complejos. Su acción es principalmente endolítica y consiste en una β -eliminación que libera monómeros insaturados, que presentan enlaces dobles entre los átomos de carbono de los residuos terminales [10, 26-27]. Dependiendo de la interacción entre los tipos de unidades fundamentales, β -D-manurónico y α -L-gulurónico, llamados comúnmente unidades M y G, se pueden presentar los siguientes mecanismos de depolimerización:

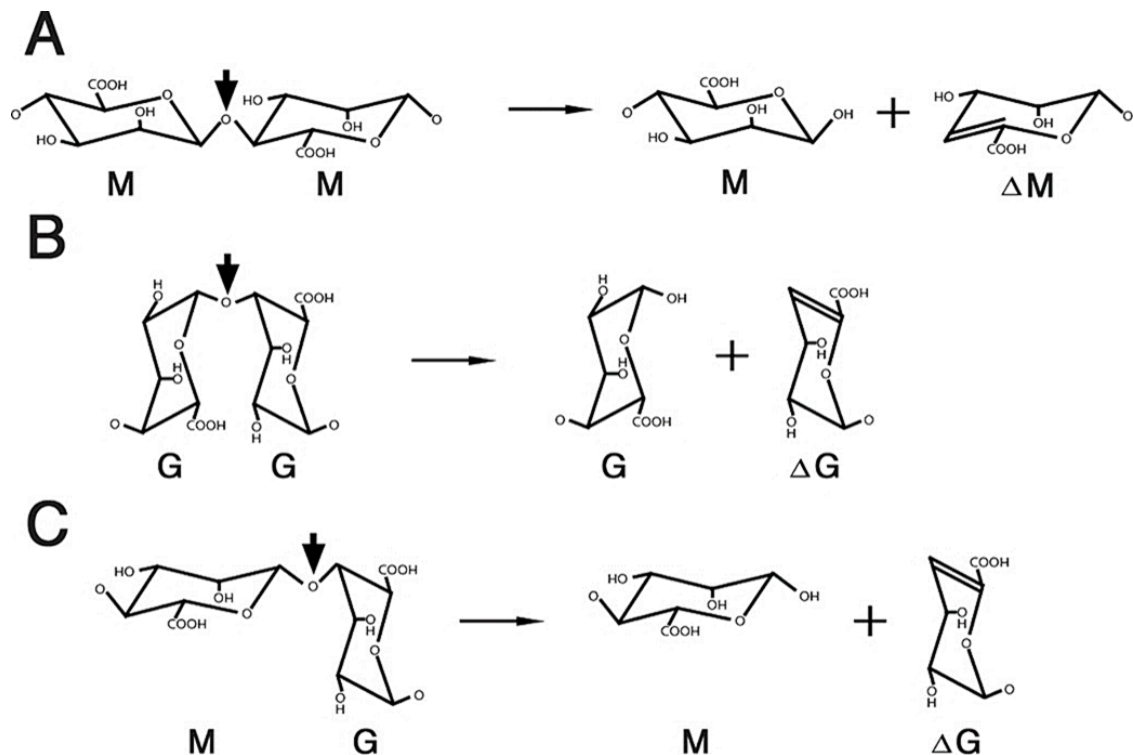


Figura 2: Sacarificación de alginato mediante enzimas alginato liasas, la reacción de β -eliminación libera monómeros insaturados que presentan doble enlace, estos son identificados como Δ G y Δ M. (A) Sitio de acción entre unidades interactuantes de β -D-manurónico. (B) Sitio de acción entre unidades interactuantes de α -L-gulurónico. (C) Sitio de acción entre unidades interactuantes de β -D-manurónico y α -L-gulurónico [27].

Debido a su capacidad para desestabilizar la pared celular, las enzimas alginato liasas, surgen entonces, como la respuesta factible a los problemas de biorrefinería de algas, permitiendo la fragmentación de la biomasa algal para la posterior extracción de productos de valor comercial o la fermentación de carbohidratos para la producción de bioetanol [10-12]. Además, presentan aplicaciones en tratamientos médicos para la ruptura de biofilms de alginato producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, permitiendo una mayor eficiencia de antibióticos [28] y la producción de oligoalginatos con una composición de GM determinada, aprovechando la especificidad de la enzima [29].

2.1.1 Alginato liasas recombinantes

Actualmente existen sólo dos alginato liasas comerciales, esto hace imposible su uso industrial debido al alto costo que poseen [13-14]. Estudios realizados en la Universidad de Chile, a partir de los cuales se desprende el siguiente trabajo de título, han permitido obtener de forma recombinante en *Escherichia coli*, 9 alginato liasas provenientes de 5 microorganismos distintos, correspondientes a *Pseudoalteromonas sp*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Sphingomonas sp*, *Agarivorans sp*, *Vibrio Splendidus* y *Microbulbifer sp*. [ver anexo Anexo A]. En el Anexo C, Sección C.1 se muestra el detalle de las enzimas expresadas.

Utilizando un sistema de autoinducción, se logró alcanzar 1 [U actividad/ml] de medio de cultivo. Sin embargo, la producción sólo se había realizado a nivel de laboratorio con volúmenes de 20 [ml] [30]. En el Anexo C, Sección C.2, se detalla el protocolo utilizado para lograrlo.

2.2 Escalamiento de la producción de enzimas

El escalamiento de la producción de un elemento consiste en el diseño de un proceso y la determinación de procedimientos de operación de una unidad de tamaño comercial basándose en datos teóricos y experimentación a un nivel de operación pequeño, también llamado, escala de laboratorio [31].

La principal dificultad del proceso de escalamiento es determinar las condiciones favorables para la producción en mayor volumen. Se podría creer que basta con conservar las condiciones de la escala de laboratorio, sin embargo, suele ser difícil aproximar estos valores para realizar un proceso industrial ya que el comportamiento del cultivo o proceso responde a una serie de complejos factores. Finalmente, el éxito en el proceso de

escalamiento se logra al producir grandes cantidades de producto a un precio económicamente rentable [31].

El escalamiento de un proceso biotecnológico o bioquímico presenta aún más desafíos, ya que mantener el ambiente propicio para el desarrollo de un microorganismo obliga a poseer un control detallado de las condiciones ambientales presentes en el biorreactor; como el pH, la cantidad de sustrato, la agitación, el estrés hidrodinámico; el mantenimiento de la esterilidad, la temperatura, la oxigenación, la cantidad de biomasa y la generación de productos secundarios posiblemente tóxicos por parte de esta [32].

La producción de enzima recombinante involucra etapas de fermentación, ruptura de las células, purificación y formulación del producto final. Sin embargo, es la fermentación el punto crítico que determina la productividad del proceso, y por lo tanto el foco del escalamiento. Esta etapa se ve afectada por muchos factores, los más importantes son: el medio de cultivo, el pH, la temperatura, concentración del inductor de la producción de enzima y los niveles de oxígeno disuelto en el medio (en el caso de cultivos aeróbicos) [30].

Existen diferentes formas de realizar el proceso de fermentación, por ejemplo: el cultivo "batch", el cual es discontinuo, "fedbatch" el cual posee una pequeña alimentación durante el proceso y finalmente el sistema continuo. En el Anexo D, se muestra en detalle las diferencias entre estos tipos de cultivo.

El cultivo "batch" es el de mayor incidencia en la industria biotecnológica, debido a que posee un sistema de operación simple, menor costo de mantención y menor riesgo de contaminación. Debido a lo anterior, suele ser un buen primer paso para la producción en mayor volumen a pesar de obtenerse menores rendimientos que en el resto de los sistemas [32].

2.2.1 Obtención de biomasa

Al inocular un medio nutritivo estéril con microorganismos, en este caso específico *Escherichia coli*, y manteniendo condiciones adecuadas para el crecimiento, se pueden observar cuatro fases de desarrollo [ver Anexo E].

2.2.1.1.1 Fase de latencia

Cuando los microorganismos son introducidos en un nuevo medio de cultivo, el aumento del número de células tarda en comenzar. En esta fase se desarrolla la adaptación a las nuevas condiciones del medio y la síntesis

de las enzimas necesarias para la actividad metabólica. En esta etapa no ocurre un cambio sustancial del número de células, pero aumenta la masa celular ya que estas se preparan para hacer uso de todos los nutrientes que el medio de cultivo les ofrece [33-35].

El tiempo que dura la fase de latencia es muy variable y depende directamente de las condiciones en las cuales se encontraban las células antes de ser inoculadas en el nuevo medio. Un factor muy importante es la edad del inóculo, ya que inóculos viejos presentan acumulación de productos tóxicos y exposiciones largas a falta de nutrientes dentro de la célula lo que aumenta el tiempo de la fase de latencia [34]

2.2.1.1.2 Fase exponencial o logarítmica

Luego de adaptadas las células a las nuevas condiciones del medio, comienza la fase de crecimiento exponencial, en donde la división celular ocurre a la mayor velocidad posible dependiendo del tipo de microorganismo y de las condiciones del medio; como temperatura, pH, niveles de oxígeno, estrés mecánico, etc. [33,36].

Esta etapa se desarrolla hasta que un nutriente esencial se acaba o se acumulan toxinas hasta un nivel capaz de inhibir el crecimiento [36].

2.2.1.1.3 Fase estacionaria

Al alcanzarse altos niveles de biomasa, se comienzan a acabar los nutrientes y a acumular toxinas, estas pueden ser desechos celulares, metabolitos secundarios u ácidos orgánicos generados por el metabolismo celular. Esto disminuye el crecimiento comenzando la fase estacionaria. En esta etapa no ocurre un aumento o disminución considerable del número de células, y se siguen manteniendo la mayoría de los procesos metabólicos y biosintéticos [37].

Las células comienzan a adaptarse a las condiciones adversas del medio disminuyendo su volumen y modificando algunas de sus características físicas. La forma se vuelve redondeada, la pared se vuelve más gruesa y disminuye la cantidad de flagelos. Además, el metabolismo se adapta, acumulando algunos compuestos y degradando macromoléculas innecesarias [38].

2.2.1.1.4 Fase de muerte

Finalmente, el cultivo celular comienza una fase de muerte cuya intensidad depende del tipo de microorganismo [34], existiendo un porcentaje de las células que pueden sobrevivir en el cultivo por meses, esto es posible ya que consiguen los nutrientes necesarios para su supervivencia de aquellas células lisadas durante la etapa de muerte [39].

A continuación, se analizarán los factores de mayor influencia en el proceso de fermentación de *E. coli* para la producción de enzimas alginato liasas y la obtención de altas densidades de biomasa en un sistema "Batch".

2.2.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo es una sustancia líquida o sólida que contiene todos los elementos nutritivos necesarios que facilitan el crecimiento del microorganismo cultivado. Los medios deben formularse cuidadosamente ya que tienen grandes efectos sobre la biomasa y los niveles de producción de enzimas recombinantes.

Se estima que el 50% del peso seco de una célula corresponde a carbono, por lo que la parte fundamental de un medio de cultivo es el sustrato que aporte el carbono necesario para la síntesis de las unidades estructurales básicas de una célula y la energía y macromoléculas necesarias para su metabolismo. Los más utilizados en la actualidad son glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa [32].

El segundo elemento de mayor importancia es el nitrógeno, el cual alcanza entre el 8 y el 15% del peso seco de la biomasa, por lo tanto, diseñar un medio de cultivo con una buena fuente de nitrógeno es esencial para que las células sean capaces de producir proteínas, ácidos nucleicos, membranas y paredes celulares [40]. Normalmente se utilizan subproductos industriales como suero de leche, soya o extracto de levadura para satisfacer estos requerimientos ya que son económicamente favorables y pueden aportar otros elementos favorables en pequeñas cantidades, como vitaminas y cofactores [41].

Para lograr un aumento en la obtención de biomasa y la productividad en cultivos recombinantes se han realizado numerosos estudios de la composición de los medios de cultivo y la optimización de estos [42-43]. El objetivo ha sido mejorar las condiciones para el crecimiento, prevenir la degradación de la proteína deseada y disminuir la acumulación de productos secundarios tóxicos para el cultivo [44]. Otro factor a mejorar es el proceso de inducción. Existen medios de autoinducción que son mucho más complejos y que permiten la producción de la proteína recombinante

una vez que se ha consumido la mayor parte de la fuente de carbono principal [45-46].

Estudios han demostrado la incidencia de distintas composiciones de medio en los niveles de biomasa producidos. Esto está directamente relacionado con el porcentaje de fuentes de carbono y nitrógeno que estos poseen. En los estudios de laboratorio realizados para la producción de alginato liasa recombinante se utilizó medio Terrific y de autoinducción [47]. En el Anexo F, se muestra la comparación entre las composiciones de ambos medios.

En la Figura 3 se observan la variación de biomasa obtenida teóricamente esperada según el tipo de medio utilizado. Se puede observar que la composición del medio de autoinducción permite la obtención de casi el doble de biomasa que el medio Terrific en cultivos de *Escherichia coli* recombinante [47].

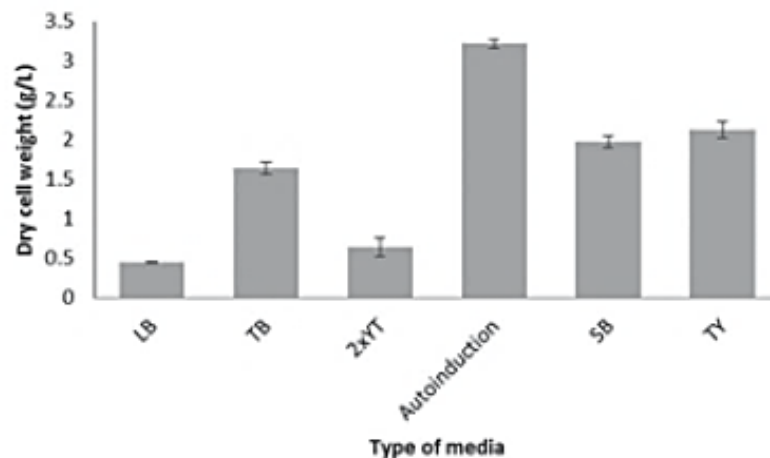


Figura 3: Efecto del medio de cultivo en la obtención de biomasa de *Escherichia coli* recombinante [47]. Los medios analizados corresponden a Luria (LB), Terrific (TB), medio Triptona -extracto de levadura modificado (2Xyt), medio de autoinducción, medio sulfito bismuto (SB) y medio Triptona -extracto de levadura (TY).

2.2.3 Efecto del pH

Todos los microorganismos necesitan desarrollarse en un rango establecido de pH, por lo que el control de este y el uso de buffers es de vital importancia. La mayoría de las bacterias se desarrollan en medios neutros o ligeramente alcalinos en un rango entre 6.5 y 7.5, sin embargo, son capaces de tolerar pHs entre 5 y 9 [48].

La bacteria *Escherichia coli* requiere de pH 7 para alcanzar su óptimo crecimiento. Muchas de las enzimas responsables de su metabolismo

funcionan sólo en un estrecho rango de pH intracelular, el cual es ligeramente superior al del medio de cultivo. Esto se debe a que los procesos metabólicos de obtención de energía requieren de una diferencia de potencial entre el medio intra y extra celular. En la mayoría de las bacterias el pH intracelular se debe encontrar entre 6 y 8, en el caso de la *Escherichia coli* el valor óptimo es 7.6 [36]

2.2.4 Efecto de la temperatura

Los rangos de temperatura que aseguran la supervivencia de microorganismos normalmente son amplios, sin embargo, se suele utilizar una temperatura de entre 35 y 37°C para *Escherichia coli* [33].

La temperatura tiene directa relación con la velocidad a la cual ocurren las reacciones metabólicas dentro de la célula, acelerando o ralentizando los procesos biosintéticos. Se estima que la *Escherichia coli* puede desarrollarse en un rango de temperatura entre 8 y 48°C, sin embargo, el óptimo crecimiento se obtiene a temperatura fisiológica [33,49].

Por otro lado, es importante considerar que en la producción de proteínas recombinantes la estabilidad y la conformación de la proteína generada es de vital importancia, por lo que no siempre la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es igual a la temperatura de máxima generación del producto deseado. Es por eso que en estos casos se suele utilizar un perfil de temperatura variable, en el que se mantiene la temperatura óptima de crecimiento hasta la obtención de un nivel de biomasa deseado y a partir de ese punto la temperatura se varía y se induce la producción [49].

2.2.5 Oxígeno disuelto en el medio

La fluctuación en los niveles de oxígeno durante la fermentación puede causar estrés oxidativo, generando inestabilidad del plasmidio y oxidación de las proteínas. La tasa de aireación y oxigenación tienen directa relación con la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y estudios han indicado que el 35% de OD es el óptimo para la obtención de alta densidad de células y actividad enzimática, esto debido a que condiciones anaeróbicas de cultivo generan una mayor acumulación de metabolitos secundarios tóxicos [30]. Por otro lado, la agitación es crucial para la transferencia del oxígeno en la fermentación, sin embargo, altos niveles de agitación reducen la productividad debido al estrés mecánico al que se ven enfrentadas las células y la ruptura de muchas de estas [30,50].

2.2.6 Inducción por lactosa y densidad del cultivo

La producción recombinante de alginato liasas se ha desarrollado en este caso bajo la influencia del promotor t7, cuya RNA polimerasa posee el promotor lac. Esto permite tener un control del momento en el cual las células comienzan la producción de la proteína recombinante. Mientras el medio carezca de lactosa, tanto la producción de ARN polimerasa como de enzima encontrará reprimida, sin embargo, al agregar esta sustancia, el promotor t7 se expresa en altos niveles generando elevadas cantidades de RNA polimerasa la cual además transcribe el gen clonado para la producción de enzima, desencadenando entonces la inducción de la producción de alginato liasas. En el caso de medios de autoinducción el proceso de expresión comienza cuando los niveles de glucosa son bajos, debido a que esta actúa como represor [47].

Por otro lado, altos niveles de glucosa desencadenan el aumento de los niveles de glucosa en el medio, debido al metabolismo de esta, lo cual podría reprimir la producción. Este efecto puede ser eliminado utilizando IPTG, un símil de lactosa, sin embargo, posee un elevado costo.

El control de la inducción es muy importante en la producción de altos volúmenes de proteína, esto se debe a la necesidad de generar cultivos densos y altamente productivos, ya que la producción específica es proporcional a la densidad celular final alcanzada [47].

Una célula cuyo metabolismo se encuentra principalmente dirigido a la generación de un producto recombinante, puede sufrir de altos niveles de estrés metabólico, disminuyendo considerablemente su capacidad de crecimiento y reproducción. En consecuencia, es de suma importancia mantener el promotor reprimido durante la fase de crecimiento celular hasta alcanzar una alta densidad [47]. Sin embargo, se debe cuidar no llegar hasta la etapa estacionaria de crecimiento, ya que en esta se presenta agotamiento de los nutrientes, disminución de la actividad metabólica y degradación de proteínas innecesarias para el metabolismo. En contraposición, inducir durante la fase de crecimiento exponencial, asegura mayor cantidad de nutrientes, alta actividad metabólica, menor estrés y acumulación de productos tóxicos [47,53].

A pesar de la importancia de este punto en la producción, es imposible determinar una densidad exacta en la que es óptima la inducción de proteínas, esto se debe a que influye el sistema de expresión utilizado y la proteína recombinante específica producida. Estudios han evaluado la inducción desde etapas tempranas de crecimiento (OD 0.2 a 600 [nm]) hasta etapas avanzadas (OD superior a 3 a 600 [nm]) obteniendo resultados muy variables dependiendo de producto generado [53]. En el Anexo G, se muestra como la densidad óptica del cultivo al momento de la

inducción varía dependiendo de la proteína generada en una gran cantidad de estudios.

3. Metodología

3.1 Metodología general

La producción de enzima alginato liasa a bajo costo depende directamente de la obtención de grandes cantidades de biomasa y altos niveles de expresión, por lo que se realizará el escalamiento de la producción desde 20 [ml] a 1.5 [l]. Esta fermentación se desarrollará en un biorreactor variando algunas condiciones de operación que permitan determinar bajo qué características la fermentación es más productiva.

En estudios previos realizados en Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) de la Universidad de Chile, se lograron expresar alginato liasas provenientes de distintos organismos. En este proceso de escalamiento se evaluará cómo reacciona la producción de 4 enzimas, con capacidades catalíticas favorables, al proceso de fermentación en mayor volumen y se escalará una de ellas para luego validar los resultados con las 3 enzimas restantes. Esto asumiendo que la producción de las 4 enzimas poseen un comportamiento similar frente a distintas condiciones de operación, situación que fue observada en la optimización de la producción previamente realizada a cultivos de 20 [ml].

3.2 Materiales

3.2.1 Enzimas alginato liasas evaluadas en el escalamiento

En la Tabla 2 se pueden observar las enzimas utilizadas durante las experiencias de laboratorio. Estas fueron producidas recombinantemente en *Escherichia coli* BL21 Rosetta™ 2. Esta bacteria posee el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5, por lo que es adecuada para la producción de proteínas usando lactosa o IPTG como inductor. Por otro lado, posee ARNt para 7 codones raros (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC y CGG) en un plásmido resistente al cloranfenicol [54].

Tabla 1: Enzimas alginato liasas producidas recombinantemente en el proceso de escalamiento

Enzima/gen		Organismo	Acción	Referencia
H	AlyPEEC	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> IAM	Endolítica	[55-56]
G	AlySJ02	<i>Pseudoalteromonas SM0524</i>	Endolítica	[57-58]
Atu	Atu3025	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain C58	Exolítica	[59-60]
O	---	<i>Lewinella pérsica</i>	Exolítica	[61]

3.2.2 Insumos y Reactivos

En la Tabla 2 se pueden observar los reactivos utilizados durante las experiencias de laboratorio.

Tabla 2: Insumos y reactivos utilizados

Insumo o reactivo	Proveedor
Medio de cultivo Luria (caldo)	Miller
Medio Terrific	Preparación por receta [Anexo C]
Medio de Autoinducción	Preparación por receta [anexo C]
Ampicilina	Sigma
Cloranfenicol	Calbiochem
Glicerol	Winkler
Lactosa monohidratada	Merck
Glucosa	Merck
Alginato	Merck
Alginato liasa	Sigma
Tris	Winkler
DNS	Preparación por receta [Anexo C]
Antifoam 289	Sigma
Test Glucosa MQuant™	Merck

3.2.3 Equipos

En la Tabla 3 se detallan los equipos utilizados durante las experiencias de laboratorio.

Tabla 3: Equipos utilizados durante el escalamiento de la producción de enzimas alginato liasas

Equipo	Fabricante y modelo
Agitador termorregulado	LabTech LSI-150M
Biorreactor	Biostat®B B. Braun Biotech International
Bomba de aire	Air 275 R plus, Sera
Espectrofotómetros	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000
Espectrofotómetro de placas	ASYS UVM340
Centrifuga	Eppendorf 5403
Termociclador	Heal Force T960
Sonicador	Microson XL2000
Balanza	Phyo MP-3000G

3.3 Parámetros y propiedades importantes para la evaluación del proceso de fermentación y producción de alginato liasa

3.3.1 Densidad óptica

Existen métodos mediante los cuales se puede determinar la cantidad de biomasa presente en una muestra, en el caso de la densidad óptica esto se realiza de forma indirecta, ya que se mide la cantidad de luz dispersada a través del cultivo, de esta forma, se puede considerar que la luz dispersada es proporcional a la masa del cultivo [62].

Para esto se utiliza un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 y se mide la densidad óptica a 600 [nm].

3.3.2 Concentración de glucosa

En el caso de cultivos con medio de autoinducción es importante conocer el tiempo aproximado en el cual se produce la inducción, para esto se usan test de glucosa MQuant™ de Merck, los cuales consisten en cintas de papel que cambian de color en distintas intensidades según la concentración de glucosa en el medio. En el Anexo H, se detallan las características técnicas

y el funcionamiento de este test, el cual entrega resultados en un intervalo de medida de entre 10 y 500 [mg/l] de glucosa.

3.3.3 Actividad alginato liasa

La actividad de las enzimas se mide con ensayos de Miller, también llamado DNS (ácido dinitrosalicílico) [63], el cual consiste en medir los azúcares liberados en una reacción entre el extracto de proteínas y alginato a partir de variaciones en la absorbancia medida a 550 [nm]. Para establecer una curva de calibración se utilizan concentraciones variables de glucosa entre 0 y 5.56 [mM]. En el Anexo I, Sección H.1, se puede ver en detalle las concentraciones de glucosa utilizadas.

3.4 Diseño del proceso experimental

El estudio involucra, en primera instancia, la evaluación de la producción de enzima en volúmenes de 500 [ml]. Para esto se utilizará el mismo protocolo utilizado en la producción de 20 [ml] mostrado en el Anexo C, Sección C.2. De esta forma se pretende determinar cuál de las cuatro proteínas trabajadas presenta una mejor producción frente a condiciones adversas de crecimiento, las cuales son generadas al aumentar los volúmenes de cultivo dificultando los procesos de homogenización y oxigenación.

Las fermentaciones en biorreactor contemplan primero una evaluación de la expresión de la enzima y el medio a la producción en mayor escala y a partir de esto se plantea la modificación o mantenimiento del medio de cultivo de autoinducción a medio Terrific para mantener un control sobre el momento de la inducción y la concentración de lactosa de ser necesario. Como muestra la Tabla 4, hasta esta etapa se realizan 12 fermentaciones.

Tabla 4: Fermentaciones realizadas durante la primera evaluación de la expresión

Volumen	Numero de fermentaciones	Variables	Condiciones de operación
500 [ml] matraz	8	Cepas (O, Atu, G y H) duplicado	25°C y 200 [rpm]
1,5 [l] biorreactor	4	Medio autoinducción y Terrific duplicado	25°C y 5 [g/l] de lactosa en medio Terrific

Esta proteína es entonces la utilizada para llevar a cabo el escalamiento al biorreactor de 1.5 [l], bajo distintas condiciones de temperatura (25, 31 y 37°C) y en duplicado. De modificarse el medio, entonces se evaluará la inducción de lactosa con tres concentraciones distintas: 2.5, 5 y 10 [g/l]. Este proceso se realiza agregando el inductor cuando la densidad óptica del cultivo alcanza 1 ± 0.2 medida a 600 nm. Como muestra la Tabla 5, el número de fermentaciones posteriores varía de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa previa.

Tabla 5: Variación de condiciones según resultados de la primera evaluación de la expresión de proteína en biorreactor de 1,5 [l]

Medio	Numero de fermentaciones	Temperatura °C	Concentración de inductor
Auto inducción	6	25, 31 y 37 duplicado	----
Terrific (TB)	10	25, 31 y 37 (5 [g/l] lactosa) duplicado	Temperatura con mejor resultado 2,5 y 10 [g/l] duplicado

Una vez finalizados los experimentos y considerando los resultados que muestran un mejor rendimiento se procede a evaluar las condiciones realizando fermentaciones con el resto de las enzimas. Todos los procesos de fermentación son realizados utilizando duplicados. La Figura 4 muestra gráficamente el flujo de razonamiento utilizado en este diseño.

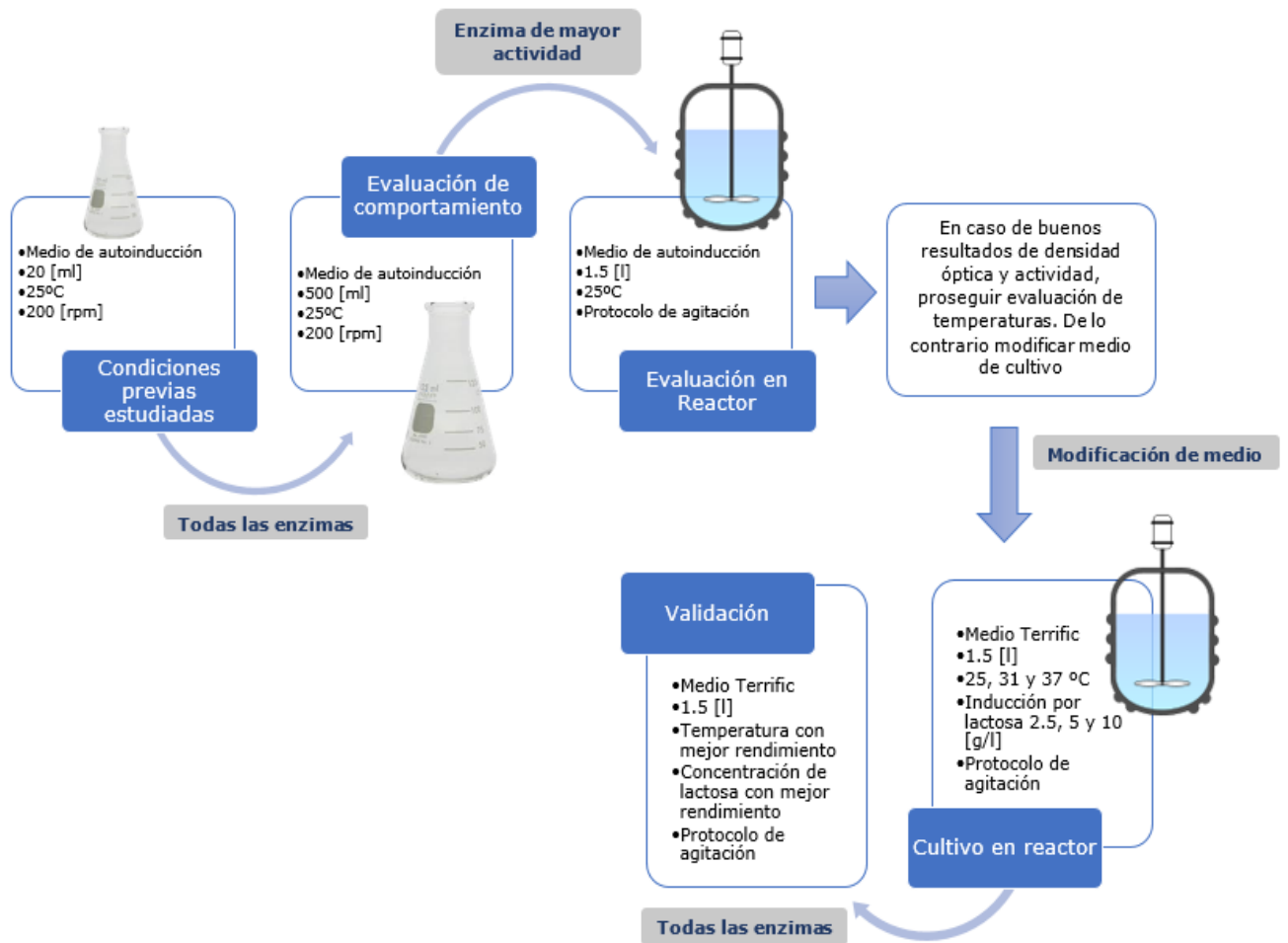


Figura 4: Diseño experimental

3.4.1 Fermentación en pequeña escala (matraz)

3.4.1.1 Preparación de medio de cultivo

El medio de autoinducción es preparado bajo un protocolo que está constituido por 4 soluciones estériles (medio nutritivo, buffer, sulfato de magnesio y fuentes de carbono) que posteriormente deben ser mezcladas en proporciones definidas [ver anexo C].

Se desea evaluar las cuatro alginato liasas por lo que se preparan 8 matraces de 2 [l] con 500[ml] de medio de cultivo de autoinducción, de

esta forma se trabaja con duplicados de cada muestra. Además, se deben agregar los antibióticos, ampicilina y cloranfenicol.

3.4.1.2 Inoculación

Los matraces son inoculados a partir de cultivos congelados hasta obtener una densidad óptica de 0.05, medida a 600 [nm].

3.4.1.3 Fermentación

Una vez inoculados los medios, los matraces son puestos en agitadores termorregulados LabTech LSI-150M a 25°C y 200 [rpm]

3.4.2 Fermentación en biorreactor

3.4.2.1 Medio de autoinducción

3.4.2.1.1 Preparación de medio de cultivo

Al igual que en el caso de fermentación en matraces, el medio de autoinducción es preparado bajo un protocolo que está constituido por 4 soluciones estériles (medio nutritivo, buffer, sulfato de magnesio y fuentes de carbono) que posteriormente deben ser mezcladas en proporciones definidas.

Se prepara 1.5 [l] de medio de cultivo de autoinducción (fuentes de nitrógeno) y se autoclava dentro del biorreactor, una vez estéril adicionar el resto de los componentes. Además, se debe agregar 0.2 [ml] de Antiespumante y los antibióticos, ampicilina y cloranfenicol. En el Anexo 0, Secciones J.1 y J.2, se muestra el detalle de las partes del biorreactor, su armado y preparación.

3.4.2.1.2 Inoculación

Se desea evaluar aquella alginato liasa que haya presentado el mejor comportamiento en volumen de 500 [ml], por lo que se inocula a partir de cultivos frescos preparados en medio Luria con densidades ópticas entre 2.3 y 2.7 medida a 600 [nm], hasta obtener una densidad óptica de 0.05 medida a 600 [nm]. Se trabaja con inóculo fresco debido a importantes

diferencias en los tiempos de duración de la fase lag [ver Sección 6 y Anexo K]

3.4.2.1.3 Fermentación

El biorreactor es mantenido a una temperatura constante según diseño experimental, sin embargo, la agitación, es modificada en función del tiempo de fermentación para asegurar la oxigenación necesaria en el medio. En el 0, Sección J.3, se detalla la forma de funcionamiento del equipo.

El sistema de sensor de oxígeno presenta una baja confiabilidad en los datos entregados, por lo que se optó por establecer un sistema fijo de modificación en la aireación. Este consiste en la inyección constante de 3 [l/min] de aire y variaciones en la agitación regidas por los parámetros establecidos en la Tabla 6.

Tabla 6: Protocolo de variación en la agitación del biorreactor

Agitación [rpm]	Parámetro
200	Primeras 2 horas desde la inoculación
300	Después de 2 horas de fermentación
400	Una vez alcanzada OD 1 medida a 600 [nm]
Aumentar en 100 [rpm]	Cada 1.5 horas hasta llegar a 700 [rpm] como valor máximo

Durante la fermentación no se realizan ajustes de pH, sólo se controla su variación.

3.4.2.2 Medio Terrific

3.4.2.2.1 Preparación de medio de cultivo

Se prepara 1.5 [l] de medio de cultivo Terrific (fuentes de nitrógeno y carbono) y se autoclava dentro del biorreactor, una vez estéril adicionar el buffer. Además, se deben agregar 0.2 [ml] de antiespumante y los antibióticos, ampicilina y cloranfenicol.

3.4.2.2.2 Inoculación

Al igual que en el caso anterior, se inocula a partir de cultivos frescos preparados en medio Luria con densidades ópticas entre 2.3 y 2.7 medida a 600 [nm], hasta obtener una densidad óptica de 0.05 medida a 600 [nm]. Se trabaja con inóculo fresco debido a importantes diferencias en los tiempos de duración de la fase lag [ver Sección 6 y Anexo K].

3.4.2.2.3 Fermentación

En este caso el biorreactor es mantenido a una temperatura constante de 37°C hasta el momento de la inducción, a partir de ese instante la temperatura es modificada según el diseño experimental. En el caso de la agitación, se mantiene el protocolo expuesto en la Tabla 6.

3.4.2.2.4 Inducción

La inducción se realiza con una solución de lactosa microfiltrada de 150 [g/l] adicionada en las concentraciones establecidas en el diseño experimental. El momento de la inducción se estableció como el punto en que la densidad óptica alcanza 1 ± 0.2 medida a 600 [nm]. Se trabaja lactosa sin autoclavar debido a diferencias importantes en el nivel de inducción y la preparación del inductor [ver sección 6 y Anexo L].

3.4.3 Toma de muestras

3.4.3.1 Evaluación de crecimiento

Para todos los casos de fermentación con medio de autoinducción se tomaron muestras cada dos horas y se midió absorbancia a 600 [nm] diluyendo de ser necesario. Además, se realizó test de glucosa para establecer el punto en que se termina este nutriente y se induce la producción de proteína.

En los cultivos con medio Terrific se tomaron muestras cada hora y se midió absorbancia a 600 [nm] diluyendo de ser necesario.

3.4.3.2 Evaluación de actividad

Para todos los casos de fermentación con medio de autoinducción se tomaron muestras cada dos horas, estas consisten en el pellet obtenido a partir de 2 [ml] de cultivo, centrifugado a 6.000 [rpm] (10.000 G) por 5 [min] en una centrifuga Eppendorf 5403 a 4°C. En el caso del medio Terrific se realizó el mismo procedimiento cada hora.

3.4.4 Preparación del extracto de proteínas

Los pellets obtenidos a partir de los cultivos tanto de matraces como biorreactor, fueron resuspendidos en 600 [μl] de buffer tris 50 mM, pH 7.5.

Las muestras fueron sonicadas en dos ciclos de 10 segundos cada uno (1/8", 8 watts), manteniéndola siempre en hielo.

Una vez sonicadas las células, se centrifugó las muestras a 12.000 [rpm] (40.000 G) por 12 [min] y se mantuvo la temperatura en 4°C. Una vez centrifugadas se conservó el sobrenadante congelado a -20°C.

3.4.5 Relación entre densidad óptica y gramos de biomasa

Para lograr normalizar la actividad obtenida en cada experiencia por gramo de biomasa producida, se generó un cultivo en matraz con medio Terrific siguiendo el mismo protocolo declarado anteriormente. Este cultivo es centrifugado y lavado 3 veces. Posteriormente el pellet es secado a 60°C por 48 [h]. Los resultados obtenidos se pueden ver en el Anexo M.

3.4.6 Ensayo de actividad alginato liasa

Para las muestras enzimáticas de las alginato liasas O y ATU, se mezclaron 500 [μl] de buffer de reacción alginato 1% con 25 [μl] de extracto de proteínas y se incubaron estas reacciones a 30°C durante 8 [h].

En el caso de G y H se mezclaron 500 [μl] de buffer de reacción alginato 0.5% con 18.75 [μl] de extracto de proteínas y se incubaron estas reacciones a 30°C durante 1.5 [h].

La diferencia en los tiempos de incubación de las enzimas se debe a que O y Atu poseen una acción exolítica mientras que G y H una acción endolítica. Esto lleva a que se presenten grandes diferencias en la actividad y sean

necesarios largos tiempos de incubación en el caso de las primeras para poder apreciar un nivel de actividad considerable.

Posteriormente se mezclan en partes iguales la muestra de reacción y reactivo DNS, en una placa de PCR de 96 pocillos. Este proceso se realiza en triplicado.

Como curva de calibración se utilizaron muestras de glucosa en concentraciones entre 0.0 y 5.56 [mM] como muestra el Anexo I, Sección H.1.

Finalmente, la placa de PCR es incubada por 12 [min] a 90°C, para posteriormente las muestras ser traspasadas a un microplaca de 96 pocillos y su absorbancia medida a 550 [nm].

Para determinar la actividad obtenida en cada muestra, las absorbancias medidas con normalizadas restando un control negativo compuesto por una reacción con extracto crudo de *Escherichia coli* y los valores de absorbancia obtenidos son utilizados para calcular su equivalente de extremos reductores [mM] usando la curva de calibración, si es necesario se puede extrapolar en ella.

4. Resultados y discusiones

A continuación, se detallan paso a paso los resultados obtenidos en cada una de las etapas del proceso experimental.

4.1 Evaluación de producción en 500 [ml]

En una primera instancia se evaluó la expresión de la proteína en una escala 25 veces mayor a la utilizada en estudios previos (de 20 [ml] a 500 [ml]), para esto se mantuvieron todas las condiciones de operación, correspondientes a 25 °C, 200 [rpm] de agitación y un medio de cultivo de autoinducción, en un matraz de 1 [l].

Como se aprecia en el Gráfico 1, se observa una expresión similar de proteína G y H, al cabo de 20 horas de fermentación. En el caso de las oligoalginato liasas O y Atu, no se observó actividad estudiando 22 horas de fermentación. Esto puede tener su origen en las condiciones desfavorables de oxigenación que se producen en un cultivo en matraz. A pesar de lo anterior es necesario notar los bajos niveles de actividad alcanzados, los cuales difieren ampliamente de los alcanzados en fermentaciones de 20 [ml] bajo similares condiciones de cultivo.

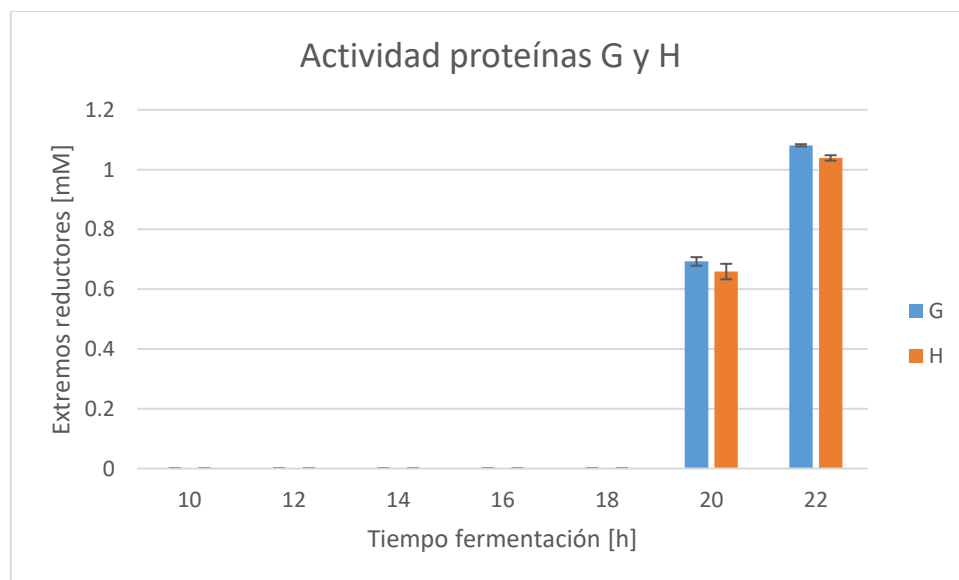


Gráfico 1: Actividad alginato liasa de proteínas G y H en cultivos de 500 [ml] de medio de autoinducción.

Debido a la actividad alginato liasa levemente superior de la enzima G, se define esta como la mejor candidata para ser realizado el escalamiento de la producción.

4.2 Escalamiento de producción en biorreactor de 1.5 [l]

Para la producción de alginato liasa G, se evalúa en primera instancia el efecto del medio de cultivo en la inducción de la producción de enzima, para posteriormente evaluar distintas condiciones de operación.

4.2.1 Comparación entre medio de autoinducción y Terrific

Se realizaron fermentaciones en duplicado para evaluar la producción de biomasa y enzima en volúmenes de 1,5 [l] de medio de cultivo.

En el Gráfico 2, se muestran las curvas de crecimiento de la biomasa una vez alcanzado el punto de inducción y manteniendo una temperatura de 37°C. En el caso del medio de autoinducción este se determinó usando un test de glucosa. Como se puede apreciar, la biomasa alcanzada usando el medio de cultivo Terrific, utilizando 5 [g/l] de lactosa como inductor es superior en aproximadamente 3,5 veces la alcanzada en un medio de autoinducción. Además, en el segundo prácticamente no se observa crecimiento de biomasa luego de alcanzado el punto de inducción, lo cual genera un bajo rendimiento. Esto se debe a que la inducción se produce luego de alcanzar niveles muy bajos de glucosa en el medio, por lo que las condiciones de crecimiento se vuelven completamente desfavorables, obligando a las células a permanecer en un estado estacionario de crecimiento y de disminución de su metabolismo, a pesar de la presencia de glicerol que debiese servir como fuente de carbono.

Por otro lado, los tiempos de fermentación son muy desfavorables para el medio de autoinducción, presentándose 18 [h] de fermentación previos a la inducción, mientras que en el caso del medio Terrific los tiempos son cercanos a 4 horas. Situación que hace a este último mucho más favorable para el uso industrial debido al alto costo de los tiempos de operación de una planta de producción.

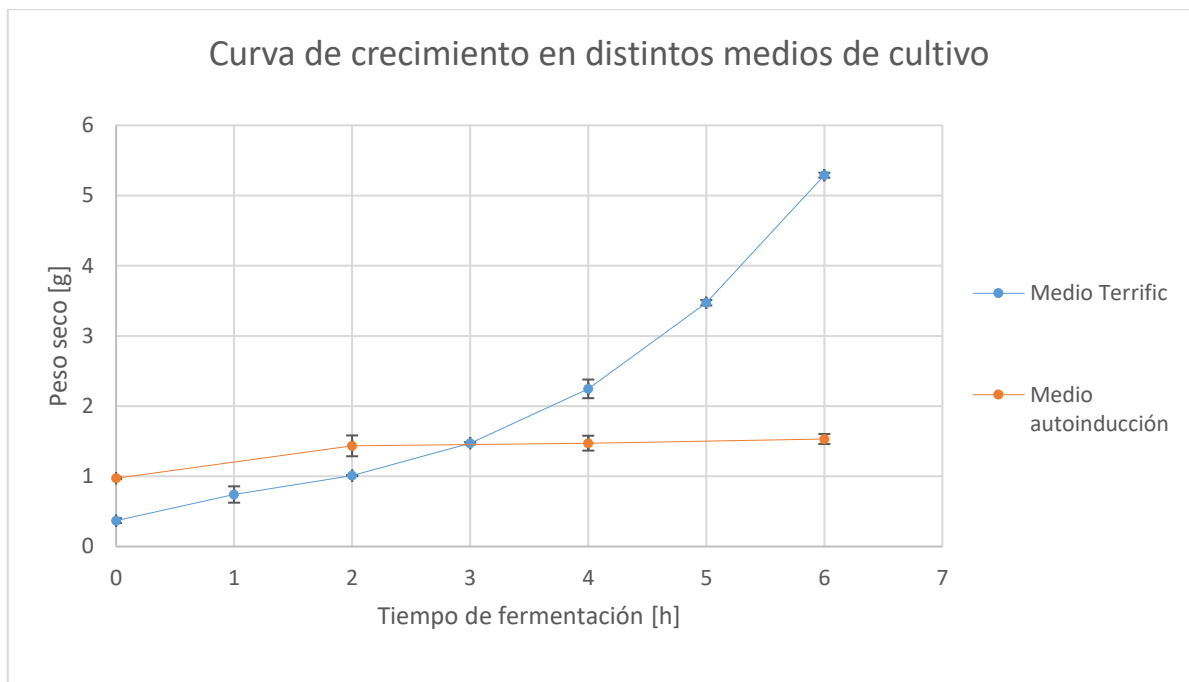


Gráfico 2: Curva de crecimiento de biomasa a 37°C en medio de cultivo Terrific con 5 [g/l] de lactosa y autoinducción en un biorreactor de 1,5 [l]. Tiempo 0 corresponde a momento de la inducción

Al evaluar la actividad alginato liasa en ambos casos, se observan amplias diferencias, mientras que en el medio de autoinducción no se presenta actividad alguna, en el medio Terrific, se alcanzan niveles de actividad cercanos 0,5 [Mm] de extremos reductores. Si bien este nivel de actividad es aproximadamente la mitad de lo esperado, se espera que la modificación de las condiciones de operación permita un aumento en la producción de enzima.

Todo lo anteriormente expuesto contrasta con lo planteado en estudios previos [ver sección 2.2.2 Efecto del medio de cultivo], en donde se obtienen los máximos rendimientos usando medios de autoinducción para la generación de biomasa y enzimas recombinantes. En estos casos la producción en medio Terrific cercana a la mitad de la obtenida con el medio de autoinducción. Si bien, no existe un motivo claro que explique estas diferencias, podría estar relacionado con la naturaleza propia de cada enzima.

Debido a todo lo planteado anteriormente se opta por el uso de medio Terrific para escalar la producción de enzima alginato liasa, modificando entonces las condiciones de operación utilizadas actualmente.

4.2.2 Producción en Medio Terrific

Para la producción de enzima en medio Terrific, se evaluó la modificación de la temperatura de operación y la concentración de lactosa utilizada para la inducción de la generación de enzima.

4.2.2.1 Evaluación de temperaturas

Se realizaron fermentaciones en duplicado para tres temperaturas distintas de operación, 25, 31 y 37 °C, correspondientes a la temperatura óptima obtenida en estudios previos, la temperatura óptima para el crecimiento de *Escherichia coli* y una temperatura intermedia. Como se observa en el Gráfico 3, la generación de biomasa se ve favorecida por el aumento de la temperatura, sin embargo, las diferencias presentadas en crecimientos a 31 y 37 °C son muy bajas. Por lo que en primera instancia se podría utilizar cualquiera de las dos para la producción. Sin embargo, en el Gráfico 4 se observan grandes diferencias en los niveles de actividad alcanzados en los cultivos desarrollados a distintas temperaturas.

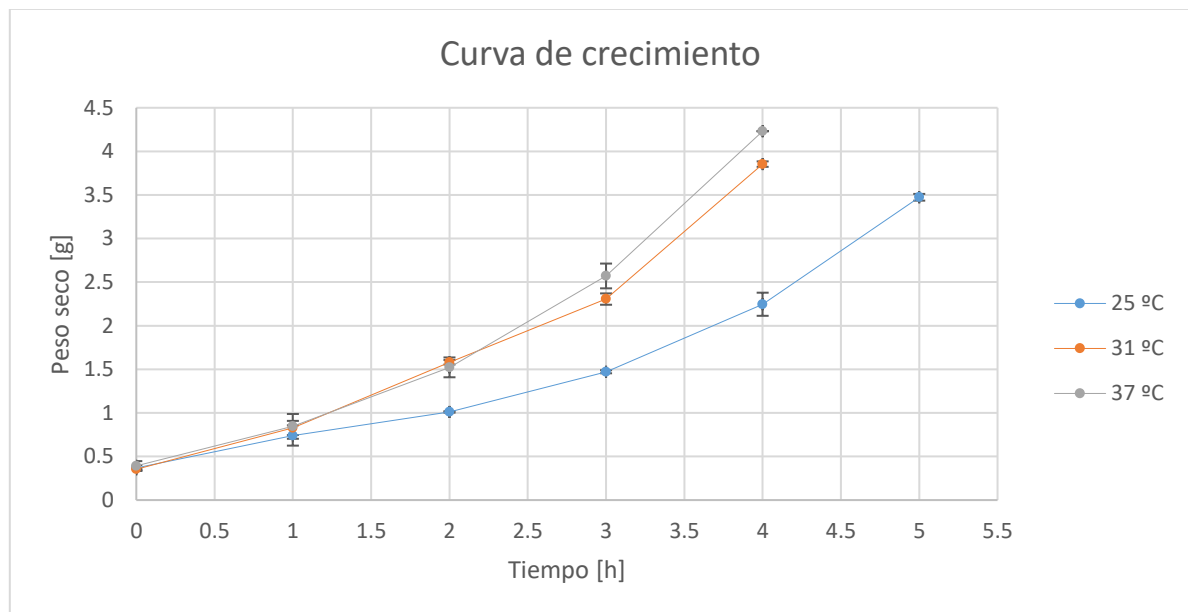


Gráfico 3: Curva de crecimiento de biomasa para la producción en enzima G en temperaturas de 25, 31 y 37 °C

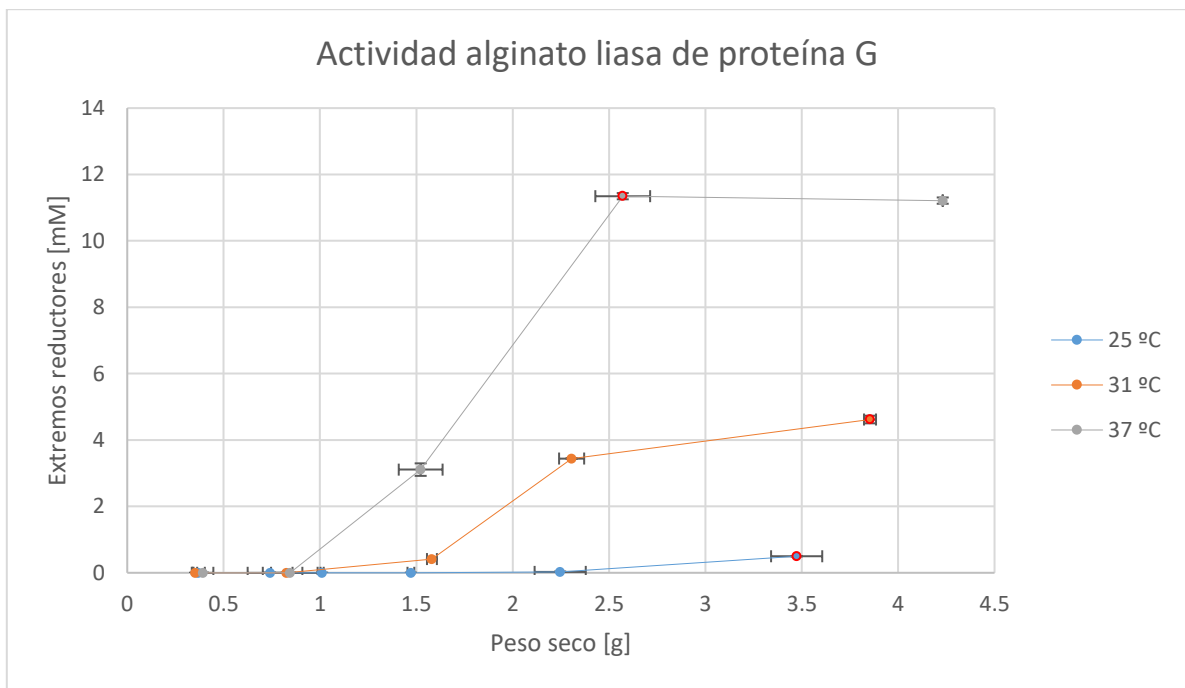


Gráfico 4: Actividad alginato liasa obtenida en cultivos a distinta temperatura, variando entre 25, 31 y 37 °C. Los marcadores rojos corresponden a la máxima actividad específica observada.

Tabla 7: Actividades específicas máximas observadas para cultivos a distintas temperaturas

Temperatura [°C]	Actividad específica máxima $\frac{\text{extremos reductores [mM]}}{\text{peso seco [g]}}$
25	4,41
31	1,49
37	0,14

A diferencia de lo esperado, la máxima actividad se presentó en el cultivo desarrollado a 37 °C. La bibliografía y los estudios previos habían planteado la producción a 25°C probablemente para asegurar un correcto plegamiento de la enzima generada, ya que estas son originarias de ambientes marinos fríos, sin embargo, los resultados obtenidos muestran tres veces más actividad a 37 que a 31 °C y casi 32 veces más que a 25 °C, como se puede observar en la Tabla 7. Esto se puede deber a un consumo más lento de la glucosa generada a partir del metabolismo de la lactosa y por lo tanto a la represión de la inducción de la enzima.

En la curva perteneciente a 37°C se puede observar además que una vez alcanzados los 2,5 [g] de biomasa seca, se obtiene el máximo nivel de enzima por gramo de biomasa, por lo que a pesar de que el cultivo se siga haciendo más denso, los niveles de actividad se vuelven constantes. Esta

situación permite determinar ese punto cómo el óptimo de cosecha, disminuyendo los tiempos de fermentación.

Finalmente, y a partir de todo lo anteriormente mencionado, se concluye que a pesar de obtenerse niveles similares de biomasa a 31 y 37 °C, las diferencias en la actividad son considerablemente altas, por lo que se adopta la máxima temperatura trabajada como la óptima para la producción de esta enzima.

4.2.2.2 Evaluación de la concentración de lactosa en la inducción

A continuación, se prosigue la evaluación de distintas concentraciones de lactosa como inductor, manteniendo fija la temperatura en 37°C.

Se realizaron fermentaciones en duplicado para concentraciones de 2,5; 5 y 10 [g/l] de lactosa. Como se observa en el Gráfico 5, la producción de biomasa es muy similar con concentraciones entre 5 y 10 [g/l], mientras que al usar sólo 2,5 [g/l], se obtiene una menor producción de biomasa en igual tiempo de fermentación aproximadamente (indicar el porcentaje), lo cual podría significar una disminución en el rendimiento.

La obtención de una mayor cantidad de biomasa se debe probablemente a la mayor cantidad de fuentes de carbono en el medio. Si bien, la lactosa es una fuente más difícil de metabolizar, su ruptura, genera galactosa y glucosa, lo cual favorece el crecimiento.

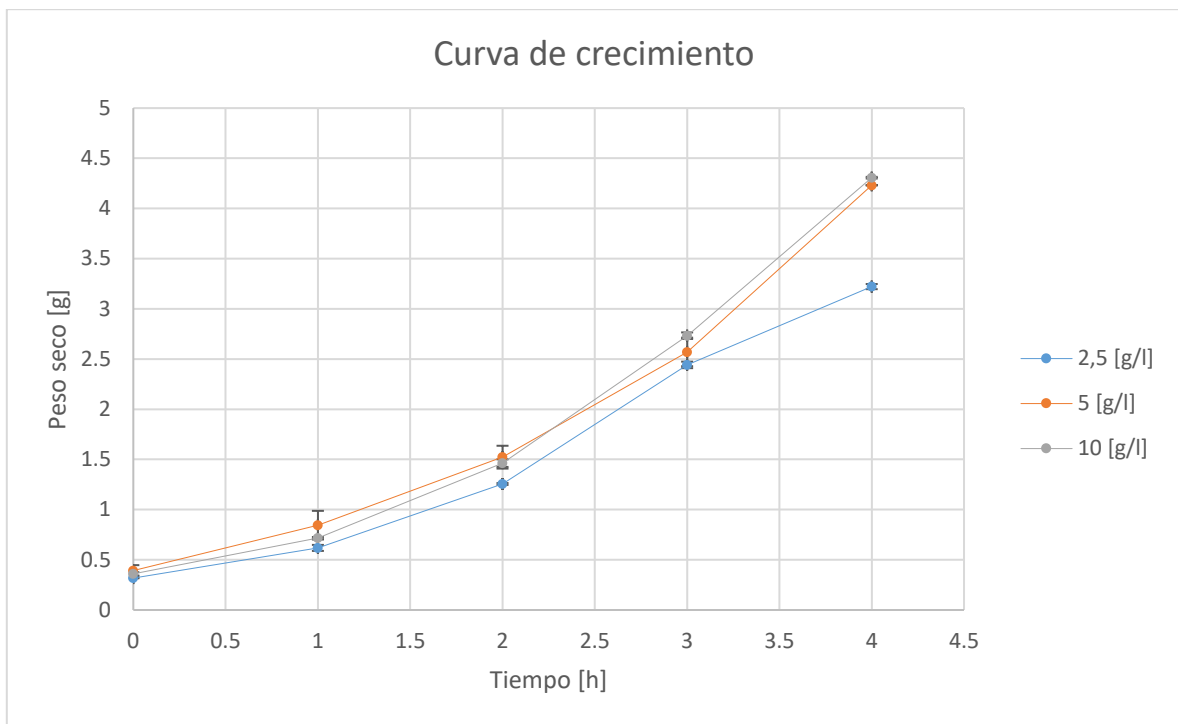


Gráfico 5: Curva de crecimiento de biomasa utilizando distintas concentraciones de lactosa como inductor. 2,5; 5 y 10 [g/l]

Si bien la producción de biomasa se ve favorecida por la adición de lactosa, es necesario prestar atención al efecto represor de la lactosa generada al metabolizar el inductor. En el Gráfico 6 se observan los niveles de actividad alcanzados bajo las tres condiciones de concentración, evidenciando que la adición de 10 [g/l] de lactosa genera probablemente un efecto represor luego de la inducción, debido al aumento considerable de la glucosa en el medio, obteniéndose entonces una actividad menor a 3 [mM] de extremos reductores.

Por otro lado, las actividades con concentraciones de 2,5 y 5 [g/l] de lactosa alcanzan concentraciones en niveles de 9 y 11,2 [mM] de extremos reductores respectivamente. A partir de lo anterior y a pesar de ser niveles bastante similares de actividad, se determina que la mejor condición corresponde a la adición de 5 [g/l] de lactosa, debido principalmente a la obtención de mayor actividad en un menor tiempo de fermentación correspondiente a 3 horas luego de la inducción, mientras que la máxima actividad de la segunda condición se obtuvo una hora más tarde.

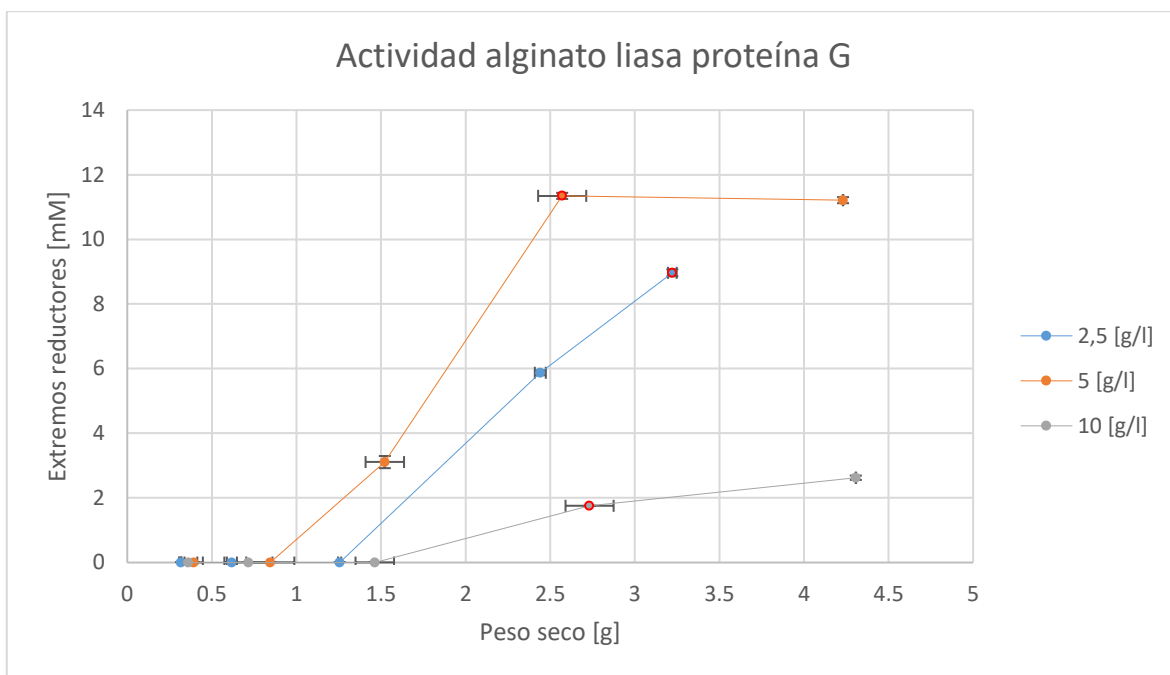


Gráfico 6: Actividad alginato liasa para enzima G producida con distintas concentraciones de lactosa como inductor. 2,5; 5 y 10 [g/l]. Los marcadores rojos corresponden a la actividad específica máxima observada.

Tabla 8: Actividad específica máxima observada para cultivos con distintas concentraciones de inductor.

Concentración de lactosa [g/l]	Actividad específica máxima $\frac{\text{extremos reductores [mM]}}{\text{peso seco [g]}}$
2,5	2,78
5	4,41
10	0,64

Finalmente, las condiciones óptimas establecidas mediante el proceso experimental fueron la producción a 37°C con inducción al alcanzar una densidad óptica de 1 medida a 600 [nm] y la adición de 5 [g/l] de lactosa microfiltrada. Estas condiciones permiten la inducción de la producción de enzima disminuyendo al máximo el efecto represor de la aparición de glucosa debido al metabolismo del inductor, además se favorece la producción de biomasa obteniéndose entonces niveles de actividad mayores al doble de los registrados en los estudios realizados previamente con producciones en 20 [ml]. Sin embargo, se debe evaluar la actividad de esta enzima comparada con la versión comercial para determinar tanto la viabilidad de su uso como la viabilidad económica de su producción. Por

otro lado, se deben evaluar las condiciones para la producción en mayor escala de las otras tres enzimas estudiadas. Es necesario mencionar además que factores como el pH, no presentaron cambios significativos en ninguna de las experiencias por lo que sólo se midió como forma de control. Además las fases lag de cultivo presentaron una alta variabilidad, por lo que sólo se analizaron los datos obtenidos desde el punto de inducción, nivel a partir del cual el crecimiento responde a un patrón similar en todos los casos analizados.

4.3 Evaluación de resultados

Para validar las condiciones de operación obtenidas en el análisis previo, se realizaron fermentaciones para la producción de las otras tres enzimas estudiadas previamente, obteniéndose los resultados que se detallan a continuación.

En el Gráfico 7 se observan las curvas de producción de biomasa para las 4 enzimas estudiadas, alcanzando niveles similares de peso seco en el caso de las dos oligoalginato liasas (O y Atu), mientras que G y H difieren en aproximadamente 1 gramo de peso seco final siendo mayor la producción para la proteína G, lo cual puede evidenciar una mayor carga metabólica en la producción de la proteína H, lo cual atenúa la replicación celular.

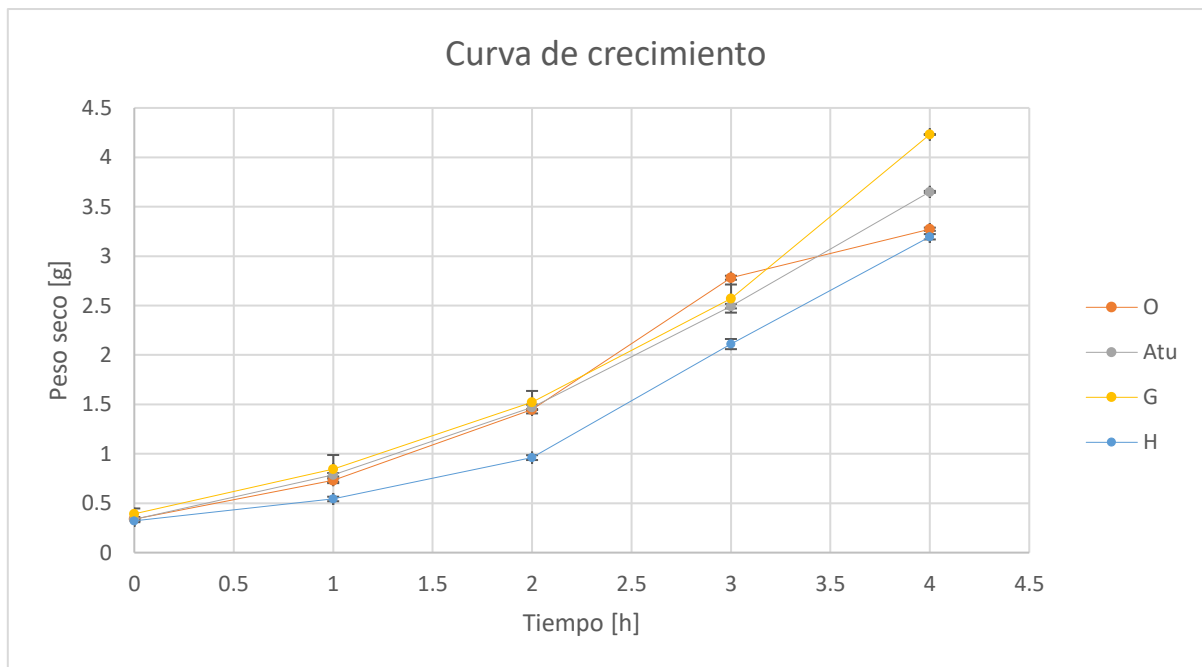


Gráfico 7: curva de crecimiento de biomasa en fermentación realizada a 37°C y con adición de 5 [g/l] de lactosa, para la producción de enzimas O, Atu, G y H.

A pesar de lo anterior, en los cuatro casos se obtienen altos niveles de biomasa por lo que se podrían esperar altos rendimientos de mantenerse el comportamiento mostrado en los análisis anteriores. Sin embargo, como se observa en el Gráfico 8, los niveles de actividad difieren hasta en 25 veces.

Los niveles de actividad mostrados por las oligoalginato liasas alcanzan 1,56 y 2,18 [mM] de extremos reductores, niveles elevados al considerar que poseen sólo actividad exolítica. Por otro lado, la enzima H muestra un nivel de actividad muy bajo, cercanos a una concentración de 0,5 [mM] de extremos reductores, lo cual es 25 veces menor a la actividad alcanzada por la proteína G, con características de acción similar (endolítica). Por lo tanto, se hace necesario a futuro considerar la evaluación de otras condiciones de operación para la producción de la proteína H, considerando además que al observar el Gráfico 1, se logró obtener el doble de actividad en cultivos de 500 [ml] con medio de autoinducción.

Finalmente, las condiciones de operación estudiadas experimentalmente en este caso son aplicables para 3 de las proteínas estudiadas, ambas oligoalginato liasas y la endoalginato liasa G.

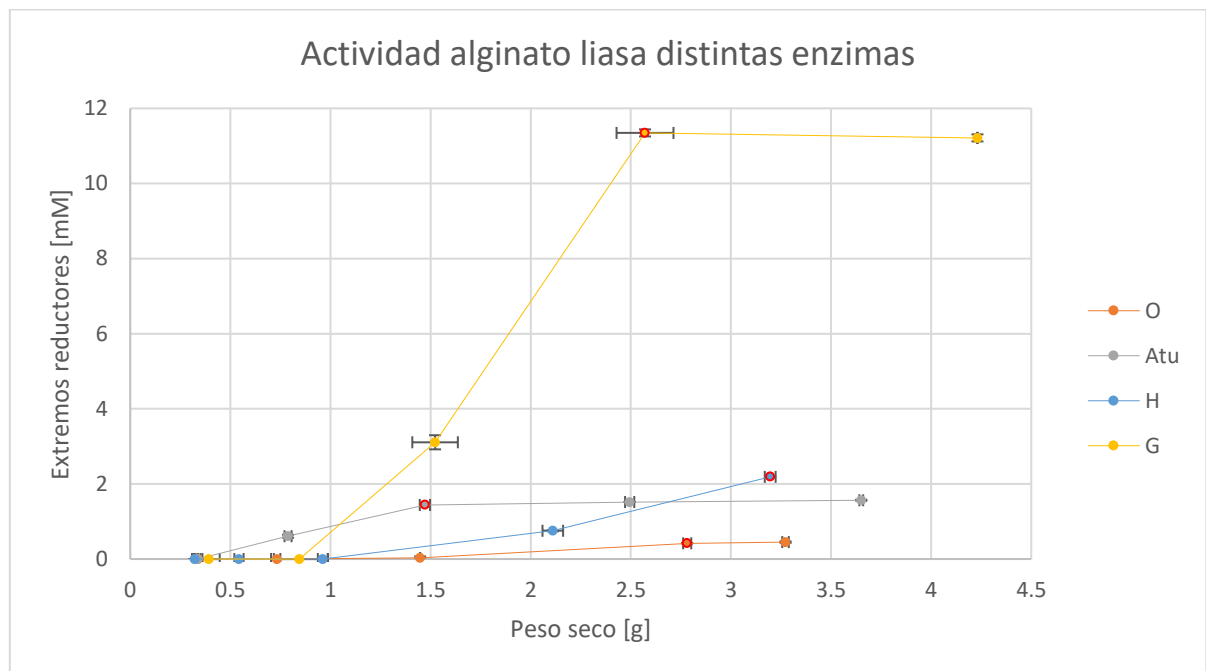


Gráfico 8: Actividad alginato liasa obtenida por las enzimas exoalginatoliasas O, Atu, y las endoalginatoliasas G y H en fermentaciones realizadas a 37°C y con adición de 5 [g/l] de lactosa, los marcadores rojos corresponden a la máxima actividad específica observada.

Tabla 9: Actividad específica máxima observada para distintos tipos de enzima

Enzimas	Actividad específica máxima <i>extremos reductores [mM]</i> <i>peso seco [g]</i>
<i>O</i>	<i>0,15</i>
<i>Atu</i>	<i>0,98</i>
<i>H</i>	<i>0,68</i>
<i>G</i>	<i>4,41</i>

4.4 Comparación con alginato liasa comercial A

Actualmente, se comercializa la alginato liasa A, de 100 [mg], la cual tiene un contenido de 1.000 unidades de enzima a un precio de CLP\$193.000 [13].

En el Gráfico 9 se observa la actividad mostrada por la enzima comercial en sus condiciones de operación óptimas establecidas por la empresa, las cuales corresponden a incubación a 37°C y un pH de 6,3. Como se puede ver, hasta la concentración estudiada de 0,15 [U/ml] no se observa una actividad superior a la mostrada por la enzima G, por lo que se extrapolo en el ajuste lineal obtenido para realizar una comparación de ambas enzimas.

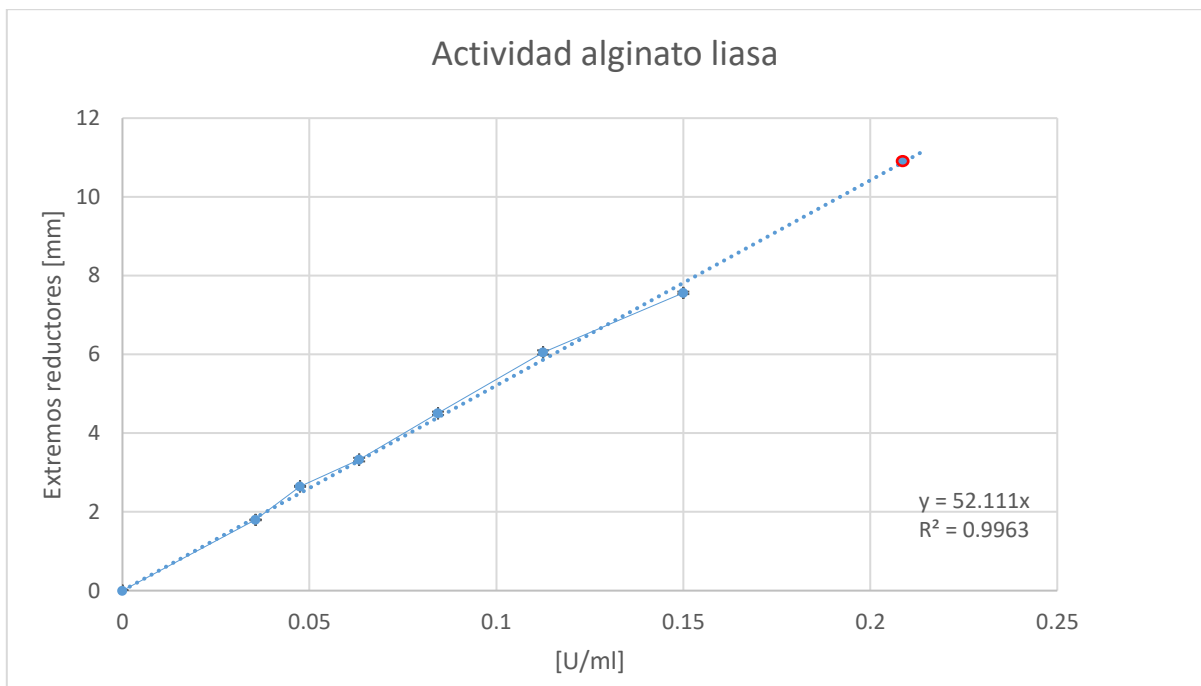


Gráfico 9: Actividad de alginato liasa comercial A. Marcador rojo corresponde al valor de actividad alcanzado por la enzima G

A partir de la extrapolación se determina que el extracto enzimático de proteína G, posee 5,81 [U/ml] obteniéndose un total de 450 [ml] a partir del cultivo de 1,5 [l] lo cual corresponde a 2.616 [U] el equivalente a 2,6 unidades de alginato liasa comercial A de 100 [mg] o CLP \$504.888 por batch producido. Para mayores detalles ver Anexo N.

Finalmente, se confirma el alto nivel de actividad obtenido por la enzima G y su viabilidad de uso siendo comparable con la enzima presente comercialmente. Mientras el producto comercial A presenta 10 [U/mg], el extracto preparado contiene las mismas unidades en 1,72 [ml] de extracto, pudiendo esto ser concentrado al modificar las cantidades de buffer adicionado.

4.5 Evaluación económica

A continuación, se plantea un análisis económico simple para un proyecto de producción de enzima alginato liasa. Para esto se consideró una inversión inicial cercana a MM CLP\$166 correspondiente a la implementación de un laboratorio de biotecnología, además de costos de operación superiores a MM CLP\$7,5 anuales, considerando la producción de 3 'batch' de 1,5 [l] semanales generados por un único operario. Todos los detalles relacionados a flujos de caja se encuentran en el Anexo 0.

Tabla 10: Detalle OPEX (Costos de operación), por batch, para proyecto de producción de alginato liasa, sin considerar sueldos.

		Cantidad	Unid.	Precio (CLP)		Costo (CLP)	Ref	%
Electricidad	Funcionamiento del controlador	7,8	[kWh]	112	[kWh]	876	[65]	7,6
Agua	preparación medios	1,5	[l]	355	[m3]	0,53	[66]	0,0
	regulación térmica (aprox 400 cc/min)	240	[l]	355	[m3]	85,20	[66]	0,7
Medio de cultivos	tris	11,62	[g]	212.044	[k]	2.464	[67]	21,5
	extracto de levadura	36	[g]	77.124	[k]	2.776	[67]	24,2
	Triptona	18	[g]	91.909	[k]	1.654	[69]	14,4
	Glicerol	6	[ml]	58.371	500 [ml]	700	[70]	6,1
	KH ₂ PO ₄	3,465	[g]	23.975	[k]	83	[71]	0,7
	K ₂ HPO ₄	18,81	[g]	45.642	[k]	859	[72]	7,5
	antifoam	6	[ml]	178.000	[l]	1.068	[73]	9,3
antibioticos	ampicilina (100 [mg/ml])	750	[μl]	126.000	25 [g]	378	[74]	3,3
	Cloranfenicol (34 [mg/ml])	750	[μl]	78.284	25 [g]	80	[75]	0,7
lactosa	(5 [g/l])	7,5	[g]	57.592	[k]	432	[76]	7,6
TOTAL						11.457		

Como se puede ver en la Tabla 10, el mayor porcentaje de gastos en insumos corresponde a elementos para medios de cultivo, como extracto de levadura, triptona y buffer tris. Esto se debe al alto valor comercial que estos poseen y sus características técnicas (grado de laboratorio). De forma paralela el mayor gasto general en los costos de operación corresponde al sueldo de operarios, suma superior a MM CLP\$5,77 anuales por trabajador, considerando un sueldo mensual cercano a CLP \$500.000 para un técnico.

En el siguiente análisis los ingresos fueron calculados utilizando el 60% del valor comercial de la enzima A, obteniéndose una recuperación de la inversión luego del quinto año.

Como se observa en el Gráfico 10, para una evaluación en 10 años, se obtiene al finalizar el periodo, un flujo de caja neto superior a MM CLP\$214, lo cual se traduce en un VAN (Valor actual neto) superior a MM CLP\$23,5. Para esta evaluación se consideró un sistema de financiamiento 3F ('Family, Friends & Fools') que corresponde al uno de capitales propios.

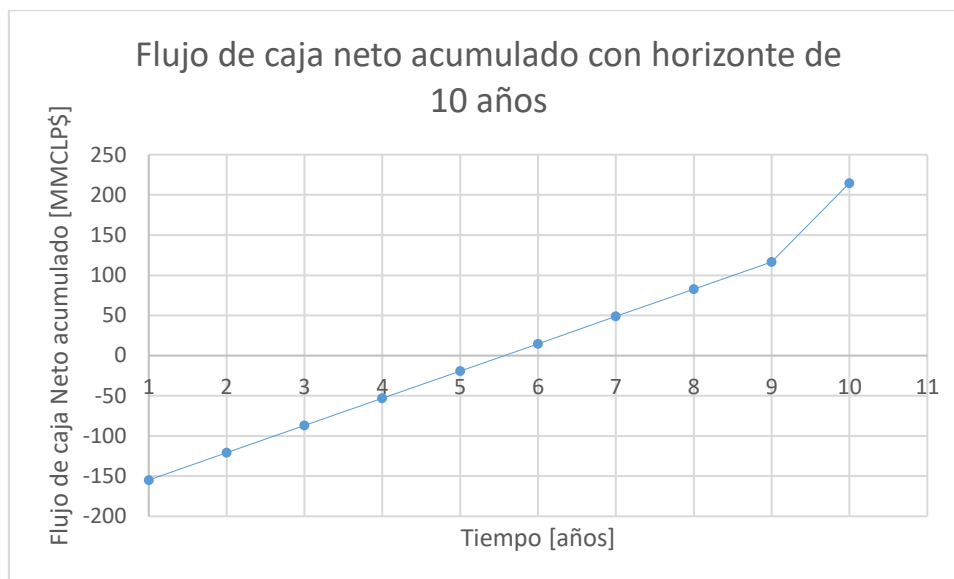


Gráfico 10: Flujo de caja neto para el proyecto de puesta en marcha de un laboratorio de biotecnología para la producción de alginato liasa en un horizonte de evaluación de 10 años. Precio de venta considerado igual al 60% del de la enzima comercial A

A pesar de la obtención de un VAN positivo, se debe considerar que la búsqueda de producciones a menor costo se plantea para lograr una mayor incidencia de este tipo de enzimas en el mercado y a menor precio de venta para favorecer el desarrollo de industrias de biorrefinería de algas, por lo que sigue siendo insuficiente este valor. Frente a esto es que se determinó el valor mínimo de venta que asegura un VAN 0, lo cual no es una buena oportunidad de inversión, pero presenta una idea general de los niveles en los cuales se puede variar el precio de la producción. En el primer análisis el precio de venta de un 'batch' de producción alcanza los CLP\$302.932 mientras que el valor mínimo de venta que iguala el costo de oportunidad del inversor es de CLP\$268.000, valor levemente superior a la mitad del precio de venta actual de adquisición para un laboratorio de una cantidad proporcional de enzima comercial A (CLP\$504.888).

Una forma de disminuir aún más el precio es aumentar la producción, por ejemplo, al duplicarla, utilizando dos reactores en paralelo, se obtiene un

precio mínimo de venta por 'batch' cercano a CLP\$142.000, lo que equivale aproximadamente a la mitad del precio considerando sólo un reactor en funcionamiento. Además, como se observa en el siguiente gráfico, la inversión se recupera luego del tercer año de funcionamiento, obteniendo un flujo de caja neto acumulado superior a MMCLP\$555 y un VAN superior a MMCLP\$212

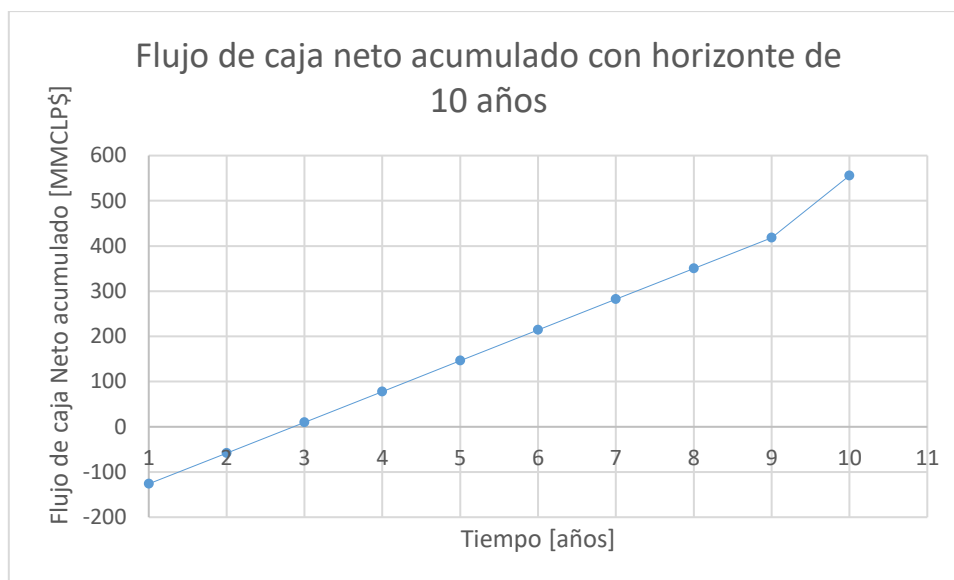


Gráfico 11: Flujo de caja neto para el proyecto de puesta en marcha de un laboratorio de biotecnología para la producción de alginato liasa en un horizonte de evaluación de 10 años con dos biorreactores. Precio de venta considerado igual al 60% del de la enzima comercial A

De forma análoga al análisis anterior, se realizó un flujo de caja para el mismo proyecto con dos fermentadores, pero con 50% de financiamiento 3F y 50% de financiamiento a través de una institución financiera, la cual otorga un crédito con 17,16% de interés anual el cual debe ser pagado en un plazo de 5 años. Como se puede ver en el siguiente gráfico, el flujo de caja neto acumulado alcanza los MMCLP\$500 y el VAN supera los MMCLP\$227.

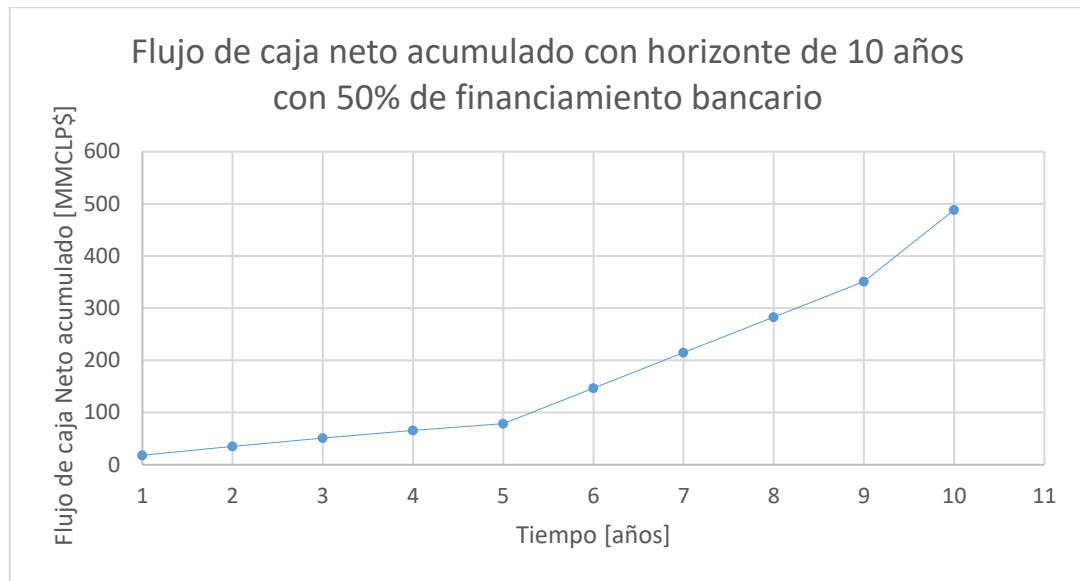


Gráfico 12: Flujo de caja neto para el proyecto de puesta en marcha de un laboratorio de biotecnología para la producción de alginato liasa en un horizonte de evaluación de 10 años con dos biorreactores y 50% de financiamiento bancario. Precio de venta considerado igual al 60% del de la enzima comercial A

Por otro lado, si el proyecto fuese financiado 100% por una entidad bancaria, el flujo de caja neto acumulado alcanzaría igualmente los MMCLP\$500, como se aprecia en el siguiente gráfico, sin embargo el VAN sería levemente inferior, alcanzando los MMCLP\$219. Lo cual evidencia

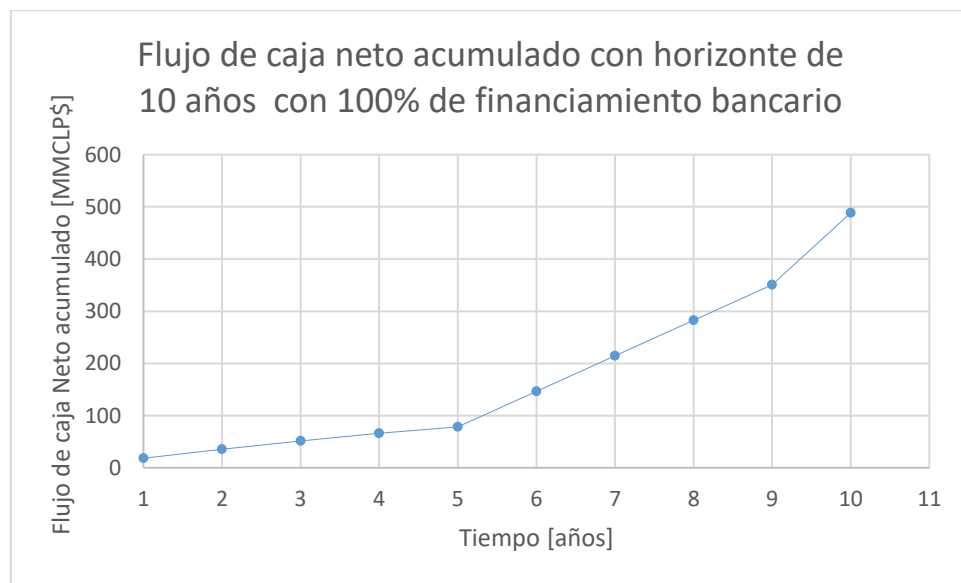


Gráfico 13: Flujo de caja neto para el proyecto de puesta en marcha de un laboratorio de biotecnología para la producción de alginato liasa en un horizonte de evaluación de 10 años con dos biorreactores y 100% de financiamiento bancario. Precio de venta considerado igual al 60% del precio de la enzima comercial A

En la Tabla 11, se observa un resumen de los valores de VAN y flujo de caja neto acumulado para el proyecto de producción de enzima alginato liasa con dos biorreactores y distintos sistemas de financiamiento. Como se puede ver, lo más conveniente es optar por un sistema de financiamiento mixto ya que esto minimiza costos al restar impuestos y disminuir el pago de intereses versus el financiamiento 3F y 100% bancario respectivamente.

Tabla 11: resumen de VAN y flujo de caja neto acumulado para un proyecto con dos biorreactores y distintos sistemas de financiamiento

Financiamiento	VAN	Flujo de caja neto acumulado
3F	\$ 212.619.367	\$555.705.561
50% 3F + 50% banco	\$ 227.052.681	\$534.429.033
100% banco	\$ 219.353.903	\$488.364.600

De forma paralela si se considera que el proyecto sólo plantea la compra de dos biorreactores y los insumos para la producción, y que ya se cuenta con un laboratorio, entonces el VAN supera los MM CLP\$316 considerando el 60% del valor de la enzima comercial actual, además el flujo de caja neto acumulado supera los MM CLP\$622 y se obtiene un precio de venta mínimo cercano a los CLP\$64.000 por 'batch'. Este análisis es aplicable a un proyecto de producción para un laboratorio ya implementado como es el caso del Centro de biotecnología y bioingeniería, CEBIB.

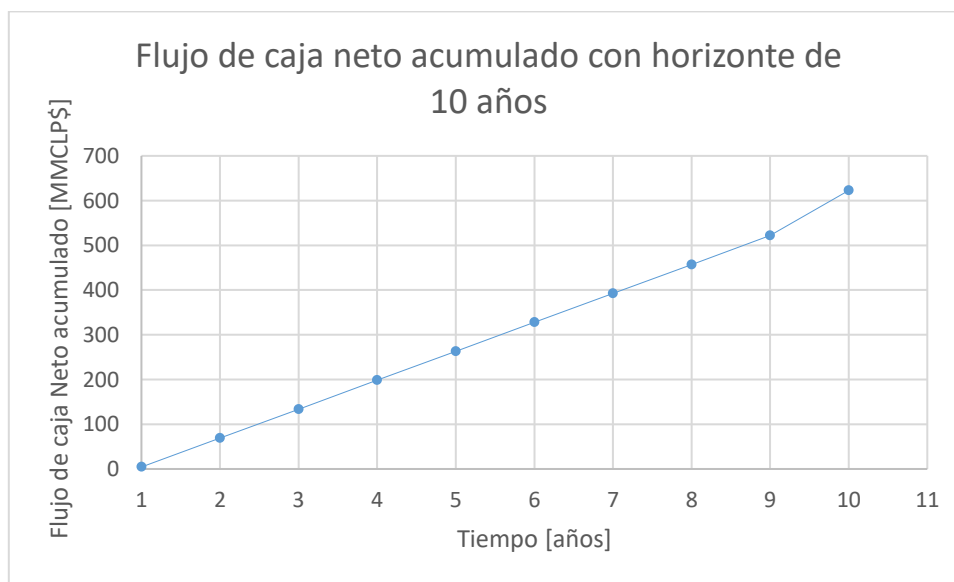


Gráfico 14: Flujo de caja neto acumulado para proyecto de producción de enzima alginato liasa en un laboratorio ya implementado, con un horizonte de evaluación de 10 años y dos biorreactores en funcionamiento.

Como se puede ver, la producción de enzima puede ser rentable incluso en la escala en la cual fue producida durante esta fase experimental, sin embargo, lograr disminuir los costos para impulsar una industria de biorrefinería de algas obliga a disminuir los precios de venta y la mejor forma de hacer esto rentable es la producción en mayor escala, considerando que la viabilidad de esto ya fue corroborada en los presentes estudios.

5. Conclusiones

A partir del desarrollo experimental y del análisis de los resultados obtenidos, se puede concluir que existen congruencias y divergencias en la producción de enzima y el comportamiento teóricamente esperado.

Se logró escalar la producción de alginato liasa en 75 veces (de 20 a 1.500 [ml]), obteniendo buenos rendimientos en tres de los cuatro casos analizados, correspondientes a las enzimas O, Atu y G. En el caso de la enzima H, los resultados obtenidos fueron inesperadamente bajos por lo que es necesario una reevaluación de las condiciones de producción en este caso que permitan niveles de actividad similares a los obtenidos por la enzima G. Esta diferencia refleja la dificultad existente en los procesos de escalamiento en biotecnología, ya que los resultados dependen no sólo de las condiciones ambientales del reactor sino que también de la naturaleza del microorganismo y el gen expresado.

Los resultados plantean la producción a 37°C, con la adición de 5 [g/l] de lactosa. Es este primer punto, el que plantea la principal divergencia con los resultados esperados, ya que la producción actual se había desarrollado a 25°C con la intención de favorecer un correcto plegamiento de las proteínas y disminuir el estrés metabólico que podría mermar la eficiencia del proceso. Por otro lado, se corroboró que concentraciones medias de lactosa (5 [g/l]) aseguran un proceso de inducción eficiente y un aumento en la producción de biomasa, permitiendo la producción de enzima sin un efecto inhibitor asociado al metabolismo del inductor y la aparición de glucosa en el medio. Una forma de solucionar este problema podría ser el uso de IPTG, sin embargo, su alto costo interfiere con el objetivo planteado en este estudio de producir enzima cuyo uso industrial sea económicamente factible.

En relación a los objetivos planteados en el estudio, como se mencionó anteriormente, se logró realizar el escalamiento de la producción, evaluar la influencia de factores como el medio de cultivo, la temperatura y la concentración de inductor, permitiendo establecer un protocolo claro de producción de enzima alginato liasa en mayor escala y con niveles de actividad comparables con las enzimas comerciales A. Además, se logró establecer una evaluación económica general para un proyecto de producción de la enzima G, permitiendo establecer las bases que admiten el desarrollo de una pequeña industria de producción de alginato liasa. El proyecto resulta ser económicamente favorable siempre y cuando la producción sea elevada a 2 batch en paralelo, alcanzando un VAN superior a MMCLP\$200 en todos los casos analizados.

Si bien, la determinación de las condiciones óptimas que aseguran una producción elevada de enzima en volúmenes de 1.5 [l] es un punto fundamental de este trabajo, es muy importante destacar que se logró

además corroborar la factibilidad económica de la producción en mayor escala de este producto, compitiendo con las versiones actualmente comercializadas y permitiendo además una disminución considerable de los precios, aun planteando producciones de sólo 3 'batch' semanales. Esto se podría traducir en el impulso necesario para el desarrollo de industrias de biorrefinería de algas con aplicaciones en áreas tan diversas como combustibles, medicina, alimentación, farmacia, etc. Las cuales se ven limitadas por el alto costo de las enzimas alginato liasas necesarias [23].

De forma indirecta, además, se determinó la importancia de las condiciones de preparación del inductor, en este caso lactosa, la cual al ser autoclavada y almacenada, sufría un alto nivel de degradación que repercutía en la nula obtención de enzima en el proceso, por lo que se recomienda firmemente el uso de lactosa filtrada y almacenada congelada. Por otro lado, la edad y condición del inóculo, tiene influencia directa en los tiempos de fermentación, aumentando considerablemente la fase de latencia del crecimiento de microorganismos, por lo que el uso de inóculo fresco y en densidades ópticas cercanas a 2,5 medida a 600 [nm] permite la obtención de una fase lag de un tercio de lo medido con inóculo congelado.

Finalmente, es necesario plantear nuevos desafíos para estudios futuros que podrían abordar el análisis de nuevas condiciones de operación, como temperaturas cercanas a 40°C que permitan disminuir los tiempos de producción o el estudio del comportamiento de la inducción con otras concentraciones de lactosa, por ejemplo 7,5 [g/l]. Además, todos los análisis realizados experimentalmente, consistían en la degradación de alginato de grado técnico, por lo que se debería estudiar el comportamiento en un sustrato natural, es decir, distintos tipos de algas, para corroborar la capacidad de acción de la enzima. Por otro lado, un punto a analizar en el futuro corresponde a la purificación de la enzima, los estudios realizados actualmente plantean su venta como un extracto crudo, que puede ser utilizado en procesos que no requieran una alta pureza, sin embargo para aplicaciones en industrias como la farmacéutica es necesario la obtención de una enzima purificada.

6. Recomendaciones

- La fase lag del cultivo tiene directa relación con la edad del inóculo utilizado, por lo que se recomienda utilizar inóculo fresco con densidades ópticas cercanas a 2.5, medida a 600 [nm]. De esta forma se puede disminuir en más del 50% el tiempo de adaptación. En el Anexo K se muestra en detalle las diferencias observadas durante las etapas de laboratorio.
- El proceso de inducción se vio fuertemente afectado por la preparación de la solución de lactosa, en los casos de soluciones autoclavadas, sólo se logró inducir la producción cuando estas se encontraban frescas. Por lo que se recomienda el uso de soluciones microfiltradas de lactosa y almacenadas congeladas. En el Anexo L, se detallan las diferencias observadas durante el laboratorio, en la capacidad de inducción de las soluciones de lactosa autoclavada con distintos niveles de frescura y la lactosa microfiltrada. Esto hace replantear la real utilidad de los medios de cultivo de autoinducción que poseen lactosa autoclavada, debido al estrés que igualmente debe sufrir esta fuente de carbono en el proceso de esterilización. Un punto a analizar en el futuro puede ser la producción con medio de autoinducción con lactosa microfiltrada adicionada luego de la esterilización con calor.

7. Bibliografía

- [1] CONACYT. Energías renovables: La alternativa de las biorrefinerías [en línea] <<http://centrosconacyt.mx/objeto/energias-renovables-la-alternativa-de-las-biorefinerias/#sthash.JxjUrYli.dpuf>> [consulta: octubre 27 2016]
- [2] PEÑA, E. PALACIOS, M. OSPINA, M. 2005. Algas como indicadoras de contaminación. Cali. Universidad del Valle. 165p.
- [3] AYARZA, J. 2014. Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. Revista de Química PUCP. 28: 19-24.
- [4] FAO. Estado actual y perspectivas de la explotación de algas alginofitas en sudamerica [en línea] <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB483S/AB483S02.htm>> [consulta: 25 octubre 2016]
- [5] SUBPESCA. Cochayuyos y huiros. [en línea] <http://www.subpesca.cl/portal/616/articles-4806_documento.pdf> [consulta: 25 octubre 2016]
- [6] GARCIA, M. QUINTERO, R. LOPEZ, A. 2004. Biotecnología alimentaria. 5 ed. México. Editorial Limusa. 637p.
- [7] AVENDAÑO, G. LOPEZ, A. PALOU, E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. 2013. Universidad de Puebla. 87-96.
- [8] FAO. La industria de las algas marinas [en línea] <<http://www.fao.org/docrep/004/Y3550S/Y3550S04.htm#3.2>> [consulta: 25 octubre 2016]
- [9] GARCÍA, M. QUINTERO, R., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Biotecnología alimentaria. Limusa, Noriega Editores. Mexico. 5 ed. México. Editorial Limusa. 637p
- [10] HEE, K. CHOUL-GYUN, L. EUN, L. 2011. Alginate Lyase: Structure, Property, and Application. The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer. 16:843
- [11] ENQUIST-NEWMAN, M. FAUST, A. BRAVO, D. 2014. Efficient ethanol production from Brown macroalgae sugar by a synthetic yeast platform. Nature, 505, 239-243.
- [12] RYU, M. LEE, E. 2011. Saccharification of alginate by using exolytic oligoalginate lyase from marine bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 17(5), 853-858.

- [13] SIGMA ALDRICH. Alginate lyase [en línea] <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1603?lang=es®ion=CL>> [consulta: 18 agosto 2017]
- [14] MEGAZYME. Alginate Lyase sphingomonas [en línea] <<https://secure.megazyme.com/Alginate-lyase-sphingomonas-sp>> [consulta: 18 agosto 2017]
- [15] FUJIYAMA, K. MAKI, H. YOSHIDA, T. 1995. High gene expression in *Escherichia coli* of recombinant alginate lyase as a fused protein with β -galactosidase α -peptide. Japón. International Center of Cooperative Research in Biotechnology. FEMS, Microbiology Letters, 126, 13-17
- [16] MA, L. CHI, Z. LI, J. WU, L. 2008. Overexpression of alginate lyase of *Pseudoalteromonas elyakovii* in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the recombinant alginate lyase. World journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 89-96.
- [17] SHIN, J.W., CHOI, S.H., KIM, D.E. ET AL. 2011. Heterologous expression of an alginate lyase from *Streptomyces* sp. ALG-5 in *Escherichia coli* and its use for preparation of the magnetic nanoparticle-immobilized enzymes. Bioprocess and Biosystems engineering, 34, 113-119.
- [18] RYU, M., LEE, E. 2011. Saccharification of alginate by using exolytic oligoalginate lyase from marine bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 17(5), 853- 858.
- [19] JIAN-WEI, L. SHENG, J. SONG, XIU-LAN, C. BIN-BIN, X. YU-ZHONG, Z. Purification and Characterization of a Bifunctional Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. Marine Biotechnology, 9,109–123
- [20] INOUE, A. MASHINO, C. KODAMA, T. OJIMA, T. 2011. Characterization of an alginate lyase, FIAlyA, from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 and its expression in *Escherichia coli*. Marine Biotechnology, 13, 256-263.
- [21] LI, S. YANG, X. ZHANG, L. YU, W. HAN, F. 2015. Cloning, Expression, and Characterization of a Cold-Adapted and Surfactant-Stable Alginate Lyase from Marine Bacterium *Agarivorans* sp. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 25, 681-686.
- [22] WARGACKI, A.J. LEONARD, E. WIN, M.N. REGITSKY, D.D. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from Brown macroalgae. Science, 335,308-313..
- [23] CAMUS, C. BALLERINO, P. DELGADO, R. OLIVERA, A. LEYRON, C. BUSCHMANN, A. 2016. Scaling up bioetanol production from the farmed

Brown macroalga *Macrocystis pyrifera* in Chile. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.

- [24] K. OSTGAARD, S. H. KNUTSEN, N. DYRSET, I. M. 1994. Aasen Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology. *Enzyme and microbial technology*. 15, 756-763.
- [25] N. DYRSET, K. Q. LYSTAD, D. W. LEVINE. 1995. Development of a fermentation process for production of an alginate G-lyase from *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41. 523-530.
- [26] TREJO, A. 2012. Influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre la síntesis y actividad de las alginato liasas extracelulares de *Azotobacter Vinelandii*. Tesis de Ingeniería Química. Veracruz. Universidad Veracruzana. 89p.
- [27] MASAYUKI, Y. 2004. Structure and Function of a Hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* Protein PA1167 Classified into Family PL-7. *The Journal of biological chemistry*. 279. 31863-72.
- [28] ALKAWASH, M. SOOTHILL, J. SCHILLER, N. 2006. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Apmis*, 114, 131-138.
- [29] AARSTAD, O. TØNDERVIK, A. SLETTA, H. SKJAK-BRÆK, G. 2011. Alginate sequencing: An analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes. *Biomacromolecules*, 13,106-116.
- [30] GIMPEL, J. LIENQUEO, M. SALAZAR, O. 2016. Optimization of recombinant soluble expression of alginate lyase: an essential tool for Brown algae biotechnology.
- [31] RUIZ A. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Tesis para optar al título de doctorado en ingeniería. Universidad nacional de Colombia, Facultad de minas. 2009
- [32] GARCÍA J, SANTANA Z, ZUMALACÁRREGUI L, QUINTANA M, GONZÁLEZ D, FURRAZOLA G, CRUZ O. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Edt Finlai. La Habana, Cuba. *Vaccimonitor* 22, 2.
- [33] GANZON A, GOMEZ J. Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos. Fontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia. 2007
- [34] BENINTENDE S, SANCHEZ C. crecimiento bacteriano [en línea] <<http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbi>

ologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf> [consulta: junio 18, 2017]

- [35] CRUEGER W, 1993. Biotecnología: Manual de microbiología. Edt acribia, Zaragoza, España. 73-117 pp.
- [36] ATKINSONS B. 1986. Reactores Bioquímicos. Edt Reverte.S.A. Barcelona, España. 19-24 pp.
- [37] MADIGAN M Y MARTINKO J. 1999. Block Biología de los microorganismos. Octava edición. Edt. Prentice hall. Madrid, España. 153-155 pp.
- [38] RAMIREZ J. Y FERRAT G. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista latinoamericana de microbiología. 47. 3-4. 92-101 pp.
- [39] SCRAAGG A. 2002. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Edt. Limusa. Mexico. 283-314 pp.
- [40] TRAN QH, UNDEN G. Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. Eur J Biochem 1998; 251, 538-43
- [41] KONSTANTIN B, NAOKI N, TOSHIOMI Y. Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *E. coli* in fed-batch cultivation for phenilalanine production. Journal of Fermentation and Bioengineering 1990;70:253-60.
- [42] ROMANO D, MOLLA G, POLLEGIONI L, MARINELLI F. 2009 Optimization of human D-amino acid oxidase expression in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 68:72-78
- [43] ZHANG C, FAN DD, SHANG LA, MA XX, LUO YE, XUE WJ ET AL (2010) Optimization of fermentation process for human-like collagen production of recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology. Chin J Chem Eng 18:137-142
- [44] KLEMAN GL, STROHL WR (1994) Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. Curr Opin Biotechnol 5:180-186
- [45] COFRE O, RAMIREZ M, GOMEZ JM, CANTERO D (2012) Optimization of culture media for etanol production from glycerol by *Escherichia coli*. Biomass Bioenerg 37:275-281
- [46] YUAN H, YANG X, HUA ZC (2004) Optimization of expression of an Annexin V-Hirudin chimeric protein in *Escherichia coli*. Microbiol Res 159:147-156

- [47] AZURA, A. 2015. Recombinant enzyme fermentation. En: Recombinant Enzymes from basic science to commercialization. Malasia. Springer
- [48] GARCIA VERA. 2da. Edición. Introducción a la microbiología. Editorial universidad Estatal a distancia. Madrid, España
- [49] JESUS A.F. 2013. Biotecnología aplicada a la medicina. Editorial Diaz de Santos. Madrid, España
- [50] HUANG, C. HENRY, L. YAN, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. Journal Microbiology Biotechnology. 2012. 39:383-99
- [51] RAMIREZ J. Y FERRAT G. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista latinoamericana de microbiología 47.92-101 pp.
- [52] CRUEGER W, 1993. Biotecnología: Manual de microbiología. Edt acribia, Zaragoza, España. 73-117 pp.
- [53] QUIROGA A. 2010 Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes. Memoria para optar al título de ingeniera civil en biotecnología. Maria Elena Lienqueo. Universidad de Chile.
- [54] MERCK. Rosetta 2 [en línea] <http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Rosetta-2DE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-71397?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cl%2F&bd=1> [consulta: octubre 13, 2017]
- [55] NCBI. extracellular alginate lyase [*Pseudoalteromonas* sp. IAM14594] [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4322372>> [Consulta: mayo 24, 2017]
- [56] LI, JW, DONG, S. SONG, J. LI, C-B., CHEN, X.L., XIE, B. ZHANG, Y. 2011. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. Marine drugs. 109-123.
- [57] NCBI. alginase [*Pseudoalteromonas* sp. SM0524] [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/618885355>> [consulta: agosto 20, 2017]
- [58] AKIHITO, O., WATARU, H., KOUSAKU, M. A biosystem for alginate metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58: Molecular identification of Atu3025 as an exotype family PL-15 alginate lyase. Elsevier. Research in Microbiology. 157, 642-649
- [59] AKIHITO O, MASAYUKI Y, BUNZO M, WATARU H, KOUSAKU M. Crystal Structure of Exotype Alginate Lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Biological chemistry.

- [60] NCBI. oligo alginate lyase [Agrobacterium fabrum str. C58] [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_357573.1> [consulta: agosto 20, 2017]
- [61] NCBI. alginate lyase [Lewinella persica] [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/648540042?report=genpept>> [consulta: agosto 20, 2017]
- [62] EQUIPOS Y LABORATORIO. Qué es y usos del espectrofotómetro [en línea] <http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1311> [consulta: octubre 20, 2017]
- [63] INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL DE COLOMBIA. Bradford y DNS [en línea] <<https://sites.google.com/site/enzineticipiig/bradford-y-dns>> [consulta: octubre 23, 2017]
- [64] PROCESOS BIORREACTORES [en línea] <<http://procesosbio.wikispaces.com/Dise%C3%B1o+B%C3%A1sico>> [consulta: mayo 29, 2017]
- [65] B. BRAUN BIOTECH. Operating Manual, Biostat B. Alemania
- [66] SUPERINTENDENCIA DE SERVICIOS SANITARIOS. Aguas andinas, Tarifas Vigentes [en línea] <<http://www.siss.gob.cl/577/w3-article-4625.html>> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [67] MERCK. Buffer TRIS [en línea] <http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Tris-Base%2C-Molecular-Biology-Grade---CAS-77-86-1---Calbiochem,EMD_BIO-648310> [consulta: septiembre 2, 2016]
- [68] MERCK. Extracto de levadura [en línea] <https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Yeast-extract,MDA_CHEM-111926?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cl%2F> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [69] MERCK. Peptona [en línea] <https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Peptone-from-casein-%28Tryptone%29,MDA_CHEM-107213> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [70] MERCK. Glicerol [en línea] <https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Glycerol---CAS-56-81-5---Calbiochem,EMD_BIO-356350> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [71] MERCK. Potassium dihydrogen-phosphate [en línea] <https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Potassium-dihydrogen-phosphate,MDA_CHEM-104873> [consulta: septiembre 2, 2017]

- [72] MERCK. Dipotassium hydrogen-phosphate [en línea]
<https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/di-Potassium-hydrogen-phosphate,MDA_CHEM-105104> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [73] SIGMA ALDRICH. Antifoam [en línea]
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6426?lang=es®ion=CL>> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [74] SIGMA ALDRICH. Ampicilina [en línea]
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Ampicillin&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=es®ion=CL&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853090>> [consulta: septiembre 2, 2017]
- [75] MERCK. Cloranfenicol [en línea]
<http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Chloramphenicol---CAS-56-75-7---Calbiochem,EMD_BIO-220551?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cl%2F>
[consulta: septiembre 2, 2017]
- [76] MERCK. Lactosa monohidratada [en línea]
<https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Lactose-monohydrate,MDA_CHEM-107660?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cl%2F#anchor_orderingcomp> [consulta: septiembre 2, 2017]

8. Anexos

Anexo A. Algas pardas

A.1 Principales algas pardas explotadas en Chile

Tabla 12: Principales algas pardas explotadas en Chile [5].

Nombre Común	Nombre Científico	Posición taxonómica
Cochayuyo	Durvillaea antarctica	División: Phaeophyta Clase: Phaeophyceae Orden: Durvillaeales Familia: Durvillaeaceae
Huiro	Macrocystis pyrifera	División: Phaeophyta Clase: Phaeophyceae Orden: Laminariales Familia: Lessoniaceae
	Macrocystis integrifolia	
Huiro negro	Lessonia nigrescens	
Huiro palo	Lessonia trabeculata	

A.2 Distribución regional del desembarque total de algas pardas en el año 2008

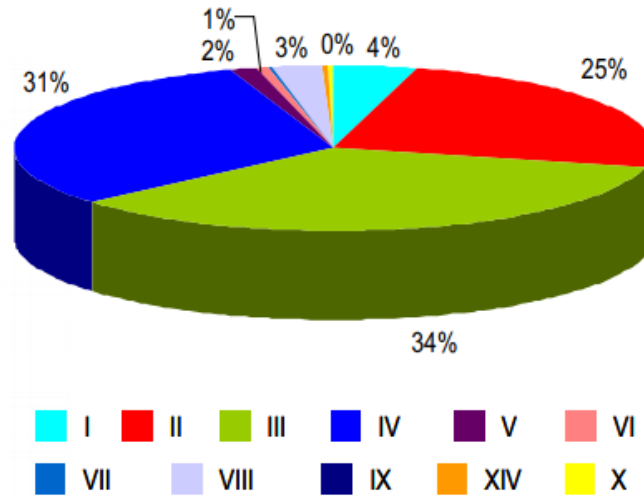


Gráfico 15: Distribución regional del desembarque de algas pardas [5]

A.3 Clasificación de los ficocoloides presentes en las algas pardas

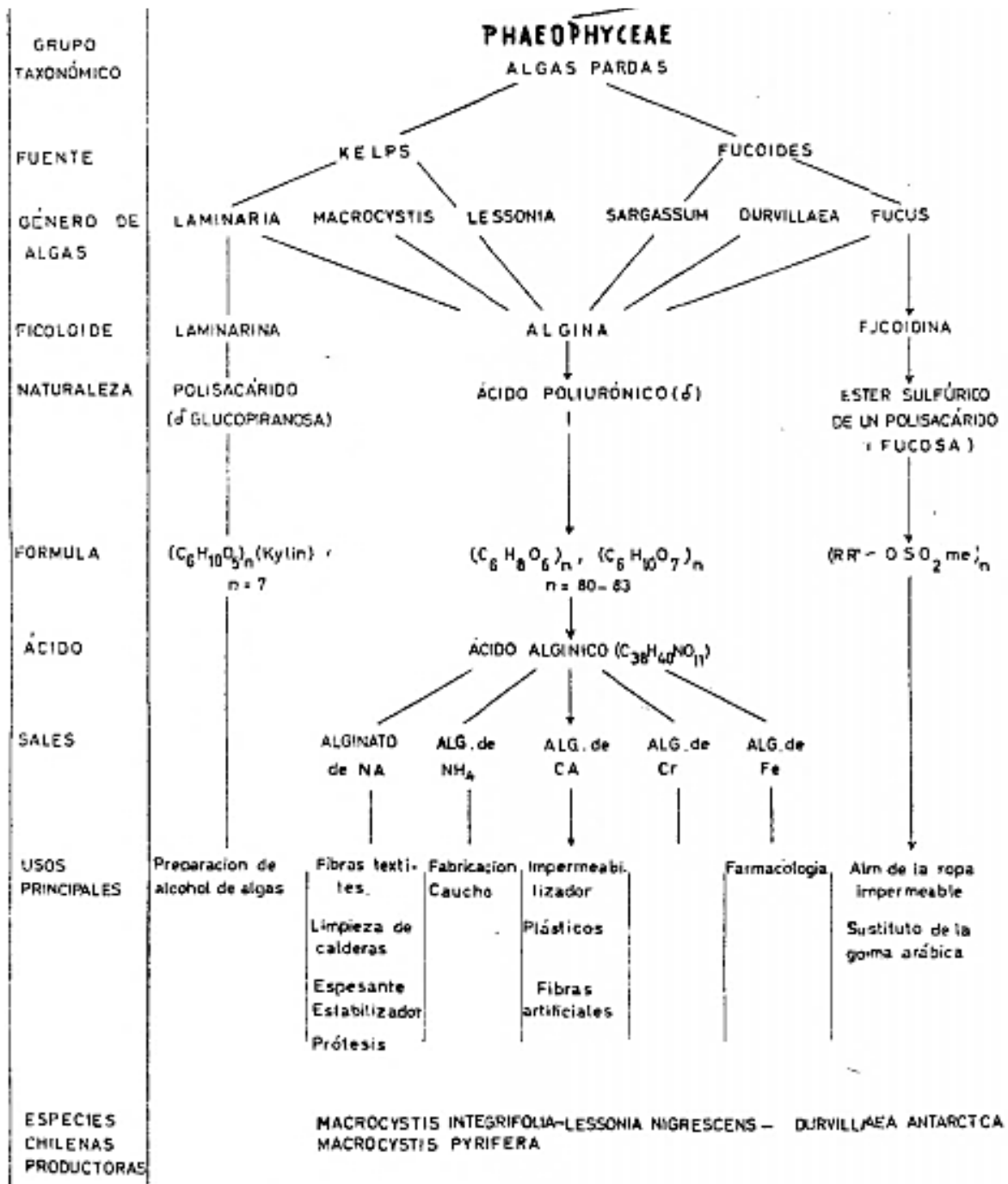


Figura 5: Clasificación de ficocoloides de algas pardas [63]

A.4 Exportación de algas pardas (por especie) y país de destino, noviembre 1991 a octubre 1992 (tm peso seco)

Tabla 13: Exportación de algas pardas entre 1991 y 1992 [4]

País de destino	<i>Lessonia nigrescens</i>	<i>Lessonia trabeculata</i>
Japón	4,325.62	868.37
Reino Unido	1,427.74	3,503.06
U.S.A.	1,400.89	33.50
Francia	-	-
Corea del Sur	442.00	270.00
Taiwan	-	-
Noruega	-	-
Holanda	37.97	20.00
Dinamarca	17.00	-
Siría	-	-
España	-	-
Suecia	-	-
Total	7,944.66	4,424.93

<i>Macrocystis integrifolia</i>	<i>Durvillaea antarctica</i>	Total
29.03	-	5,223.02
-	-	4,939.80
1,375.40	500.67	3,310.46
1,529.32	-	1,539.32
-	-	712.00
-	-	436.94
-	-	293.44
-	-	57.97
-	-	17.00
-	-	4.54
1.00	-	1.00
-	0.20	0.20
2,934.75	1,212.35	16,516.69

A.5 Cantidad exportada y precios FOB de huiro negro (1999 2008)

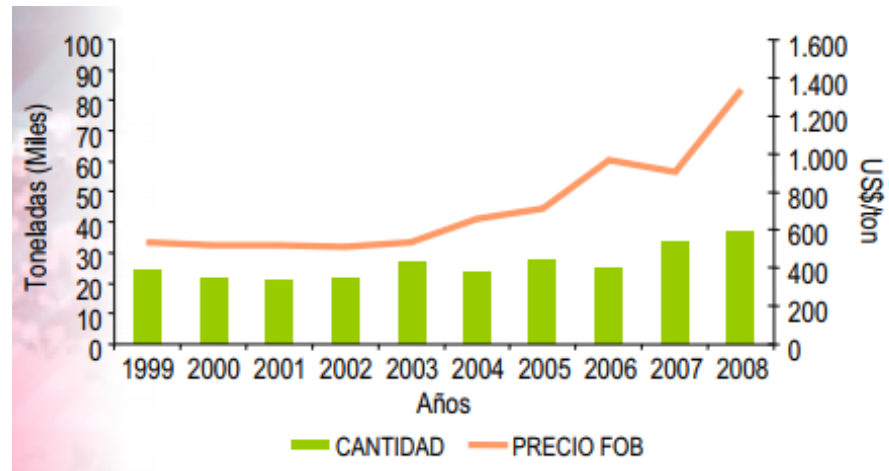


Gráfico 16: Exportación y precios de Huiro negro entre 1999 y 2008 [5]

Anexo B. Propiedades funcionales y usos de distintos alginatos

Tabla 14: usos de distintos alginatos y función [9]

Industria	Uso	Producto
Alimentos	Estabilizador de emulsiones	Helados
	Agente gelificante	Postres tipo gelatina Rellenos de panificación Sustituto de frutas Cubiertas de embutidos
	Espesante	Salsas y aderezos Productos congelados Productos enlatados Productos deshidratados
Farmaceutica	Estabilizador de espuma	Cerveza y vino
	Emulsificador y espesante	Jabones Lociones Champú
	Agente desinterador	Tabletas
	Gel absorbente	Vendajes quirúrgicos
Agricultura	Agente de suspensión	Ungüentos y antibióticos
	Agente de retención de agua	Acondicionador de suelos
Papel	Agente de suspensión	Corte y dimensionamiento de papel
Textil	Espesante, gelificante	Impresión de géneros
Otras industrias	Agente gelificante	Explosivos Odontología Juguetería Tratamiento de aguas Biocatalizadores

Anexo C. Producción de alginato liasas recombinantes. Universidad de Chile

C.1 Enzimas expresadas recombinantemente

Tabla 15: Alginato liasas expresadas en *E. coli* [30]

Nombre	Especie de origen
<i>AlyA-D2</i>	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01
<i>AlyB</i>	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01
<i>AlyD</i>	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01
<i>Aly-SJ02</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524
<i>AlyPEEC</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> IAM
<i>AlgmsP</i>	<i>Microbulbifer</i> sp. 6532 ^a
<i>AlyL1</i>	<i>Agarivorans</i> sp. L11
<i>A1-II</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A1
<i>A1-II'</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A1

C.2 Protocolo utilizado

Se prepararon inóculos de las bacterias clonadas en 7 [ml] de medio LB líquido adicionado con 100 [µg/ml] de ampicilina y 34 [µg/ml] de cloranfenicol. Esos se utilizaron para inocular 60 [ml] de medio de cultivo de forma de obtener 0,05 de OD₆₀₀ final. Los matraces fueron incubados en un shaker a 25°C y 200 [rpm] [30].

Se tomaron muestras de la fermentación para determinar la actividad enzimática. Estas muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en TBS, para luego ser sometidas a sonicación durante 10 [s]. El resultado fue centrifugado nuevamente y el sobrenadante sometido a un ensayo de actividad de DNS, el cual consiste en medir los azúcares liberados en una reacción entre el extracto de proteínas y alginato a partir de variaciones en la absorbancia medida a 550 [nm] [30].

C.3 Medios de cultivo

Terrific Both:

- H₂O desionizado, 900 [ml]
- Tryptona, 12 [g]
- Extracto de levadura, 24 [g]

- Glicerol, 4 [ml]

Agitar hasta que los solutos se hayan disuelto y luego esterilizar en autoclave.

Agregar 100 ml de una solución estéril de 0.17 M de KH_2PO_4 , 0.72 M de K_2HPO_4 . (Esta solución se prepara disolviendo 2,31 g de KH_2PO_4 y 12,54 g de K_2HPO_4 en 90 ml de H_2O . Después de que las sales se hayan disuelto, ajuste el volumen de la solución a 100 ml con H_2O y esterilícelo en autoclave)

Medio de autoinducción ZYM 5052:

Para un litro de medio se mezclan en esterilidad las siguientes soluciones, todas autoclavadas de forma independiente.

N-Z-amine AS	1%	}	958 [ml]
Yeast extract	0.5%		
Na_2HPO_4	25mM	}	20 [ml]
KH_2PO_4	25mM		
NH_4Cl	50mM		
Na_2SO_4	5mM		
Mg SO_4	2mM		2 [ml]
Glycerol	0.5%	}	20 [ml]
Glucose	0.05%		
D-Lactose	0.2%		

Anexo D. Comparación entre cultivos discontinuos y continuo.

Tabla 16: ventajas y desventajas de la producción en sistemas continuos y discontinuos [63]

	Operación en discontinuo	Operación en continuo
1	Generalmente mejor para pequeños volúmenes de producción(V)	Mejor para producciones indefinidas de un producto o conjunto de productos (V)
2	Más flexible en operaciones multiproducto (V)	
3	Generalmente requiere un capital relativamente bajo (V)	Generalmente requiere un capital relativamente alto (D)
4	Fácil de parar y limpiar (V)	
5	Requiere un tiempo de parada inherente entre cargas (D)	No hay tal tiempo (V) pero las paradas provocadas por mantenimientos inesperados pueden ser costosas (D)
6	El Coste de operación puede ser relativamente alto (D)	Coste de operación relativamente bajo (V)
7	Estado no estacionario implica control de proceso y una uniformidad de producto más difícil de conseguir (D)	Estado estacionario implica control de proceso y una uniformidad de producto menos difícil de conseguir (V)

Anexo E. Curva de obtención de biomasa

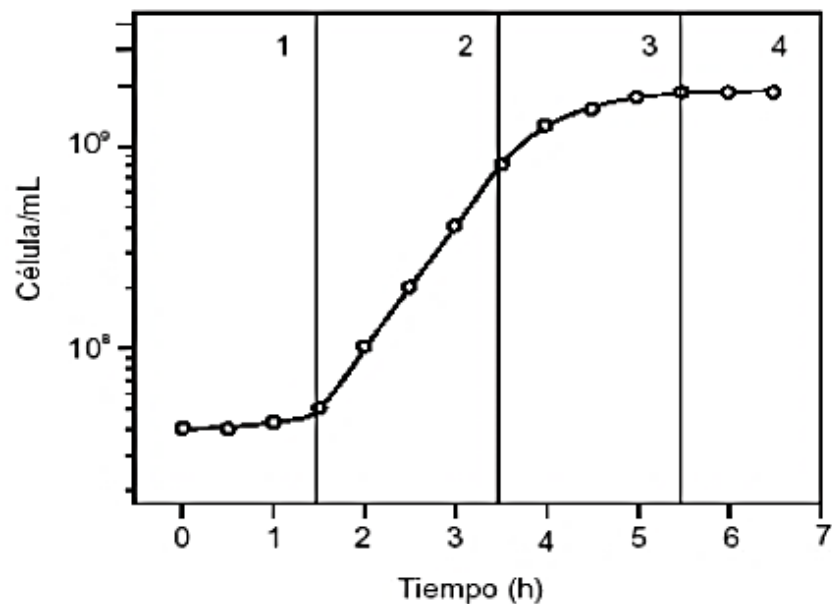


Figura 6: Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en medio nutritivo. 1) fase de latencia. 2) fase de crecimiento exponencial o logarítmico. 3) fase de transición. 4) fase estacionaria [35].

Anexo F. Comparación de la composición de los medios de cultivo Terrific y de autoinducción.

Tabla 17: composición de los medios terrific y de autoinducción [47]

Terrific	Autoinducción
1,2% peptona	2,5% triptona
2,4% extracto de levadura	1,25% extracto de levadura
72 mM K ₂ HPO ₄	37,5 mM Na ₂ HPO ₄
17 mM KH ₂ PO ₄	7,5 mM NH ₂ Cl
0,4% glicerol	8 mM Na ₂ SO ₄
	1,25% glicerol
	0,3% glucosa
	0,1% lactosa
	0,1% L-arabinosa
	1 mM MgSO ₄
	trazas

Anexo G. Densidad óptica del cultivo al momento de la inducción en variados estudios

Tabla 18: densidades ópticas al momento de la inducción utilizadas en variados estudios [53]

Densidad celular en el punto de inducción 600 [nm]	Hospedero	Producto
3	BL21 (DE3)	Interleuquina 13
1,5	BL21 (DE3)	Cutinasa
1	BL21 (DE3) pLysS	Pro-resilina
2	Rosseta (DE3), BL21 (DE3)	Proteína de membrana de <i>Legionella pneumophila</i>
0,8	BL21 (DE3)	b-1,3-glucanasa

Anexo H. Test de Glucosa. MQuant™

1.17866.0001

MQuant™ Test Glucosa

1. Método

Por la acción catalítica de la glucosa-oxidasa la glucosa es transformada a lactona del ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno que aquí se forma reacciona en presencia de peroxidasa con un indicador redox orgánico dando un colorante verde azulado. La concentración de glucosa se determina **semicuantitativamente** por comparación visual de la zona de reacción de la tira de ensayo con las zonas de una escala colorimétrica.

2. Intervalo de medida y número de determinaciones

Intervalo de medida / graduación de la escala colorimétrica	Número de determinaciones
10 - 25 - 50 - 100 - 250 - 500 mg/l de glucosa	50

3. Campo de aplicaciones

Material de las muestras:

Bebidas (p. ej. zumos de fruta y verdura), alimentos y conservas alimentarias tras preparación apropiada de la muestra (p. ej. **oxidación de ácido ascórbico y sulfitos**)

Soluciones de fermentación

7. Técnica

Introducir la zona de reacción de la tira de ensayo **durante 2 segundos** en la muestra preparada (15 - 30 °C).

Eliminar el exceso de líquido de la tira sacudiéndola y, **después de 1 minuto**, clasificar el color de la zona de reacción de la mejor manera posible de acuerdo con una zona de color de la etiqueta.

Leer el correspondiente valor de medición en mg/l de glucosa.

Notas sobre la medición:

- Después de transcurrido el tiempo de reacción indicado, la zona de reacción puede continuar cambiando de color. Esto no debe ser tenido en cuenta en la medición.
- Si el color de la zona de reacción corresponde a la tonalidad más oscura de la escala colorimétrica o es más intenso, debe repetirse la medición con **nuevas** muestras diluidas, hasta que se obtenga un valor inferior a 500 mg/l de glucosa.

En el resultado del análisis debe considerarse correspondientemente la dilución (ver también apartado 6):

Resultado del análisis = valor de medición x factor de dilución

8. Control del procedimiento

Comprobación de las tiras de ensayo y de la manipulación:

Disolver 0,1 g de D(+)-glucosa anhidra en agua destilada, completar con ésta a 100 ml y mezclar.

Contenido de glucosa: 1000 mg/l.

Dejar en reposo durante 2 horas esta solución patrón, luego diluir con agua destilada a 50 mg/l de glucosa y analizar como se describe en el apartado 7.

Figura 7: Ficha técnica de test de glucosa Merck

Anexo I. Curva de Calibración de glucosa

H.1 Concentraciones de Glucosa

Tabla 19: Concentración de glucosa utilizada para la construcción de curvas de calibración

Muestra	1	2	3	4	5	6
Concentración [Mm]	0,0	1,11	2,22	3,33	4,44	5,56

H.2 Ajuste lineal

A partir de las pruebas realizadas se utilizó el siguiente ajuste lineal para el análisis de resultado:

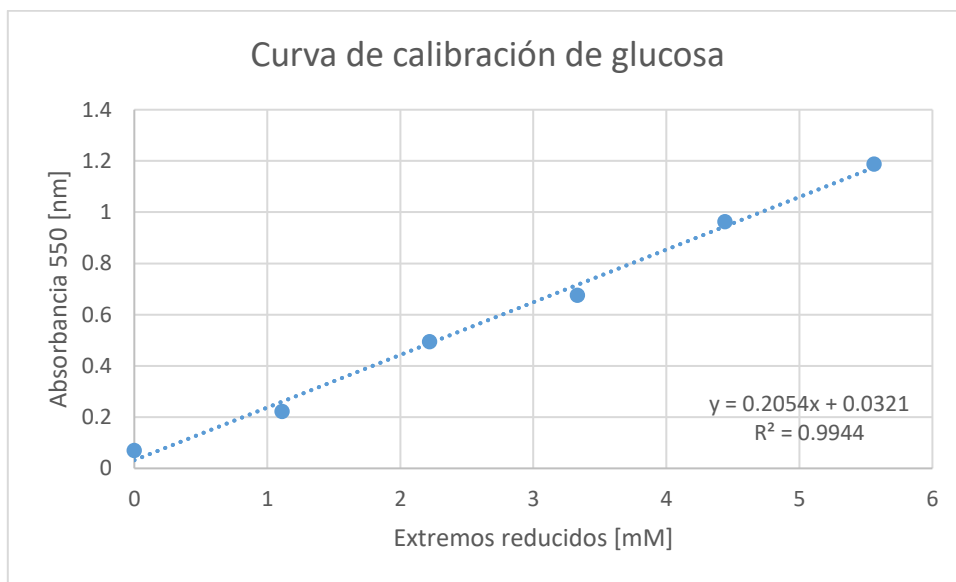


Gráfico 17: Curva de calibración de glucosa

Anexo J. Biorreactor

J.1 Partes del biorreactor

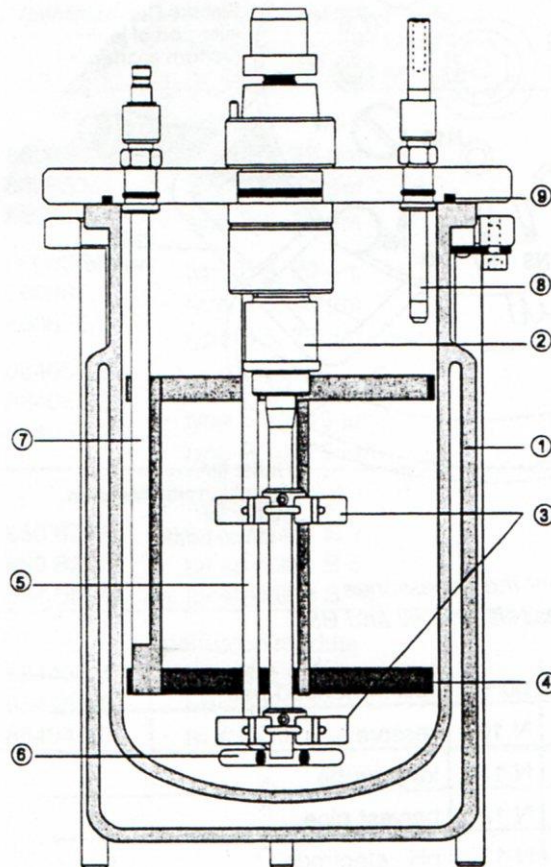


Fig. 4 - 5: Culture vessel type B 2; internal setup:

- (1) jacketed glass vessel
- (2) stirrer shaft
- (3) 6-bladed disc impeller
- (4) baffle insert
- (5) sparger pipe
- (6) sparger ring for air inlet
- (7) harvest pipe
- (8) antifoam probe
- (9) O-ring seal of top-plate

Figura 8: partes del biorreactor [65]

4.2.3 Top plate Design and Placement of the Accessories

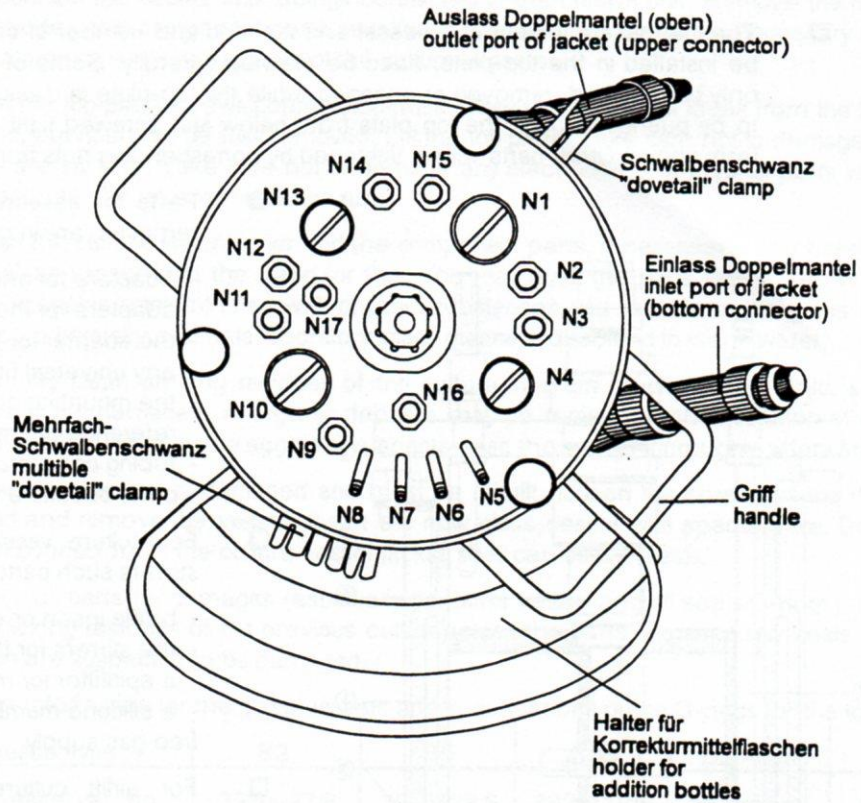


Fig. 4 - 4: Top plate Design and Placement of the Accessories
- example for standard culture vessels type B2 and B5

port	recommended use	port	recommended use
N 1	exhaust cooler	N 10	reserve
N 2	Pt-100 temperature sensor	N 11	level probe
N 3	antifoam probe	N 12	harvest pipe
N 4	pO ₂ - electrode	N 13	pH - electrode
N 5	supply of acid	N 14	air / gas inlet (sparger pipe)
N 6	supply of alkaline agent	N 15	holder of baffle insert
N 7	supply of antifoam agent	N 16	reserve
N 8	supply of substrate	N 17	holder of silicone membrane insert
N 9	reserve		

Figura 9: conexiones presentes en la cubierta del biorreactor [65]

J.2 Preparación del biorreactor

- Lavar y secar el biorreactor, para evitar la corrosión, solo utilizar etanol y agua destilada.
- En los costados y la parte superior del reactor se deben tapar todas las salidas con algodón y papel aluminio. Para asegurar que el papel no se salga durante el autoclavado, se recomienda amarrar con elásticos



Figura 10: salidas del reactor que deben ser selladas

- De igual forma, todas las mangueras deben estar selladas con algodón, aluminio y prensas. Además, las salidas y entradas de aire deben poseer filtros en sus extremos.

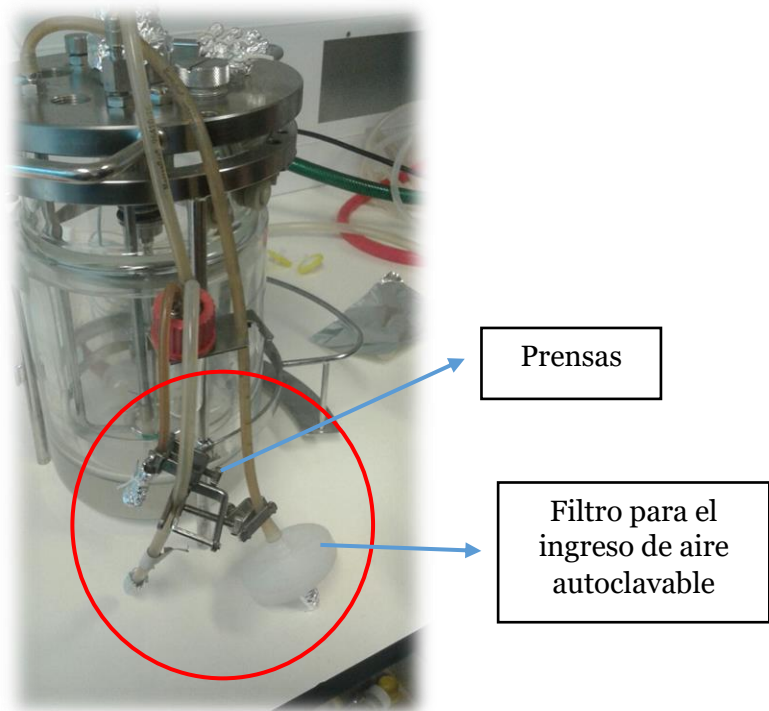


Figura 11: preparación de mangueras del biorreactor

- Para evitar la salida de vapor, se debe instalar un condensador con una salida superior que posee un filtro y dos mangueras que deben ser selladas

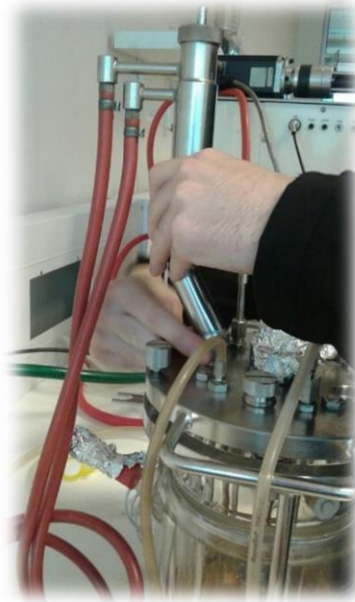


Figura 12: instalación del condensador en el biorreactor



Figura 13: Mangueras selladas conectadas al condensador del biorreactor

- Finalmente, se debe colocar el medio de cultivo dentro del reactor y sellar levemente los tornillos para cerrar la tapa y autoclavar, durante el autoclavado estos tornillos deben estar sueltos, no olvidar apretar al terminar el proceso de esterilización.

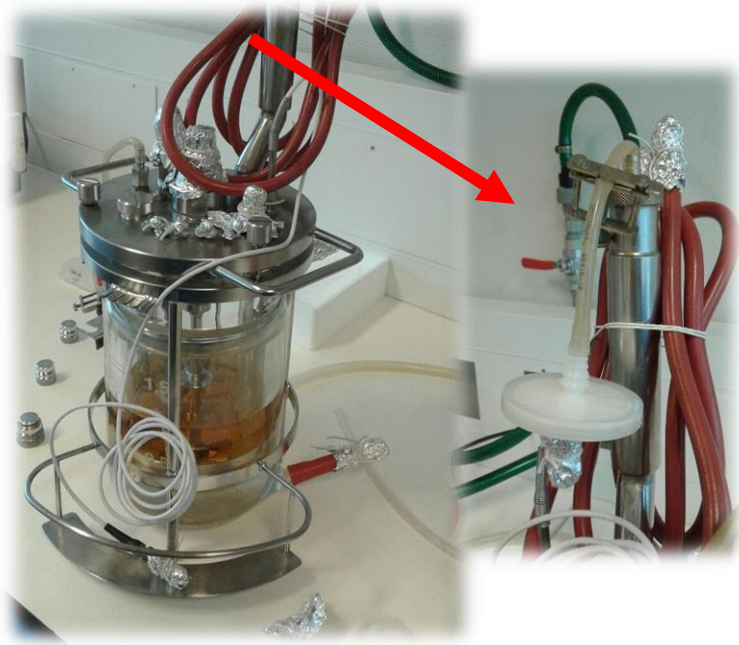


Figura 14: vista final del biorreactor listo para ser autoclavado

J.3 Funcionamiento

Una vez autoclavado el reactor, se debe conectar al controlador, red de aireación y la red de agua potable, que permite el control de la temperatura.

El controlador cuenta con un panel digital como se aprecia en la Figura 15, al presionar el botón "calibration" se accede al menú que se ve en la imagen. Posteriormente se puede modificar cada 'setpoint' presionando 'enter' para ingresar a cada variable.

Una vez ingresadas las variables a controlar, presionar "process values" para ver en pantalla la condición actual de cada una de las variable.



Figura 15: panel digital del controlador del biorreactor

Anexo K. Influencia de la edad del cultivo con el largo de la fase lag

A continuación, se detallan algunas de las duraciones de la fase de latencia de distintas fermentaciones realizadas durante las primeras fases experimentales. Esta fase es entendida como el tiempo entre la inoculación y la obtención de una densidad optima igual a 1 medida a 600 [nm]

Tabla 20: duración de algunas de las fases de latencia observadas dependiendo de las distintas condiciones del inóculo

Tipo de fermentación	Estado del inóculo	OD 600 [nm]	Duración fase lag [h]	Temperatura [°C]
Matraz 500 [ml]	congelado	6,23	11,3	25
Matraz 500 [ml]	congelado	3,05	7,5	25
Biorreactor 1,5 [l]	congelado	3,27	6	37
Biorreactor 1,5 [l]	fresco	4,52	6,7	37
Biorreactor 1,5 [l]	fresco	2,54	4,2	37

Anexo L. Efectos de la preparación de lactosa en la inducción de proteína

En el siguiente gráfico se observa la diferencia presentada en la expresión de proteína utilizando lactosa recién autoclavada y lactosa filtrada, es importante mencionar que luego de dos días de almacenamiento de la lactosa autoclavada, ya no se observa inducción en la producción de proteína

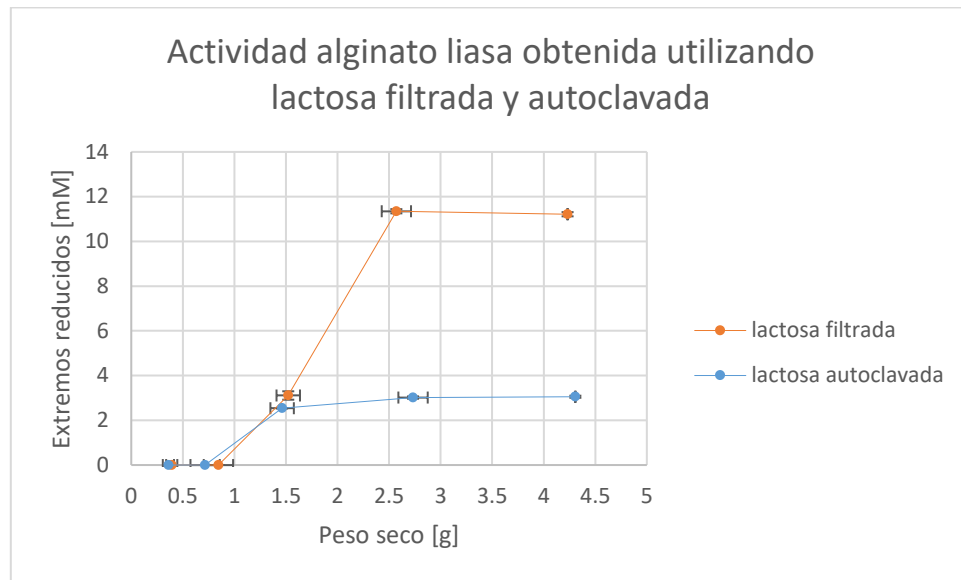


Gráfico 18: comparación del uso de lactosa autoclavada y filtrada

Anexo M. Curva de calibración de peso seco

A partir de la medición del peso de distintas cantidades de cultivo seco, se construyó el siguiente ajuste lineal

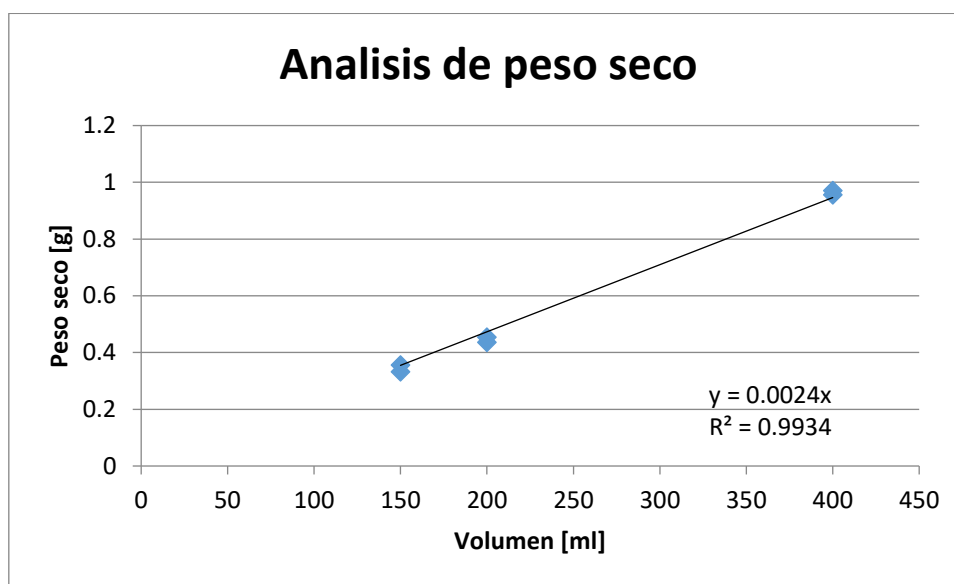


Gráfico 19: análisis de peso seco, para muestras con OD 9,4

Asumiendo el volumen fijo de 1,5 [l] de cultivo se obtuvo la función que relaciona densidad óptica del cultivo y peso seco de biomasa.

$$\text{peso seco} = 0,383 \cdot OD$$

Anexo N. Comparación de actividad de la enzima G con versión comercial

El Gráfico 9, muestra la relación entre unidades de actividad contenidas en la reacción y concentración [mM] de extremos reductores para la enzima comercial A. A partir de este, es posible extrapolar la cantidad de unidades contenidas en la reacción con mayor actividad de la proteína G.

$$[mM] = 52,111 \cdot \left[\frac{U}{ml} \right]$$

La Máxima actividad medida para G es 11,34 [mM]

$$\frac{11,34}{52,111} = \left[\frac{U}{ml} \right] = 0,218 \left[\frac{U}{ml} \right]$$

Estas unidades enzimáticas estaban contenidas en 37,5 [μl] de mix enzimático, preparado a partir de un pellet de 2 [ml] de cultivo y 600 [μl] de buffer tris.

$$600[\mu l] \cdot \frac{1500[ml]}{2 [ml]} = 450 [ml] \text{ de mix enzimático por batch}$$

Considerando que 37,5 [μl] contienen 0,218 [U], es posible estimar la cantidad total de [U] en el cultivo total, o 450 [ml] de mix enzimático equivalente.

$$\frac{450 [ml] \cdot 0,218[U]}{37,5 [\mu l]} = 2.616 [U]$$

Finalmente, en los 450 [ml] de mix se pueden encontrar 2.616 [U], o 5,81 [U/ml] de mix enzimático.

Anexo O. Evaluación económica

Tabla 21: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando un biorreactor.

	Año 0	Año 1	Año 2	...	año 9	año 10
(+) Ingresos por ventas producto		\$ 78.762.528	\$ 78.762.528	\$...	\$ 78.762.528	\$ 78.762.528
(-) OPEX		\$ 7.558.438	\$ -7.558.438	\$...	\$ -7.558.438	\$ -7.558.438
(-) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$-16.612.899	\$...	\$-16.612.899	\$-16.612.899
(-) Pérdidas ejercicio anterior						
(=) Utilidad antes de Impuesto	\$ -	\$ 54.591.191	\$ 54.591.191	\$...	\$ 54.591.191	\$ 54.591.191
(-) Impuesto (25%)	\$ -	\$ 13.647.798	\$-13.647.798	\$...	\$-13.647.798	\$-13.647.798
(=) Utilidad después de Impuesto	\$ -	\$ 40.943.393	\$ 40.943.393	\$...	\$ 40.943.393	\$ 40.943.393
(+) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ 16.612.899	\$...	\$ 16.612.899	\$ 16.612.899
(+) Pérdida ejercicio anterior			\$	\$	\$ -	\$
(=) Flujo de caja Operacional	\$ -	\$ 57.556.292	\$ 57.556.292	\$...	\$ 57.556.292	\$ 57.556.292
(-) Inversiones	\$ -166.128.990					
(+) Valor Residual de los activos						\$ 41.532.248
(-) Capital de trabajo	\$ 22.675.315					
(+) Recuperación del Capital de Trabajo						\$ 22.675.315
(=) Flujo de Capitales	\$ -188.804.305	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 64.207.563
Flujo de caja Neto	\$ -188.804.305	\$ 57.556.292	\$ 57.556.292	\$...	\$ 57.556.292	\$121.763.855
Flujo de caja neto acumulado	\$ -188.804.305	\$ 131.248.013	\$-73.691.721	\$...	\$329.202.323	\$450.966.177
VAN ACUMULADO	\$ -188.804.305	\$ 137.414.759	\$-91.531.235	\$...	\$117.869.996	\$157.074.698

Tabla 22: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y financiamiento 3F.

	Año 0	Año 1	Año 2	...	año 9	año 10
(+) Ingresos por ventas producto		\$ 94.515.034	\$ 94.515.034	\$...	\$ 94.515.034	\$ 94.515.034
(-) OPEX		\$ 9.345.693	\$ -9.345.693	\$...	\$ -9.345.693	\$ -9.345.693
(-) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ -16.612.899	\$...	\$ -16.612.899	\$ -16.612.899
(-) Pérdidas ejercicio anterior						
(=) Utilidad antes de Impuesto	\$ -	\$ 68.556.442	\$ 68.556.442	\$...	\$ 68.556.442	\$ 68.556.442
(-) Impuesto (25%)	\$ -	\$ 17.139.110	\$ -17.139.110	\$...	\$ -17.139.110	\$ -17.139.110
(=) Utilidad después de Impuesto	\$ -	\$ 51.417.331	\$ 51.417.331	\$...	\$ 51.417.331	\$ 51.417.331
(+) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ 16.612.899	\$...	\$ 16.612.899	\$ 16.612.899
(+) Pérdida ejercicio anterior			\$	\$	\$ -	\$
(=) Flujo de caja Operacional	\$ -	\$ 68.030.230	\$ 68.030.230	\$...	\$ 68.030.230	\$ 68.030.230
(-) Inversiones	\$ -166.128.990					
(+) Valor Residual de los activos						\$ 41.532.248
(-) Capital de trabajo	\$ -28.037.078					
(+) Recuperación del Capital de Trabajo						\$ 28.037.078
(=) Flujo de Capitales	\$ -194.166.068	\$	\$	\$	\$ -	\$ 69.569.326
Flujo de caja Neto	\$ -194.166.068	\$ 68.030.230	\$ 68.030.230	\$...	\$ 68.030.230	\$ 137.599.556
Flujo de caja neto acumulado	\$ -194.166.068	\$ 126.135.838	\$ -58.105.608	\$...	\$ 418.106.005	\$ 555.705.561
VAN ACUMULADO	\$ -194.166.068	\$ 133.424.791	\$ -79.191.508	\$...	\$ 168.315.993	\$ 212.619.367

Tabla 23: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y financiamiento 50%3F y 50% bancario, con 17,16% de interés anual en un plazo de 5 años

	Año 0	Año 1	Año 2	año ...	año 9	año 10
(+) Ingresos por ventas producto		\$ 94.515.034	\$ 94.515.034	...	\$ 94.515.034	\$ 94.515.034
(-) OPEX		\$ 9.345.693	\$ -9.345.693	...	\$ -9.345.693	\$ -9.345.693
(-) Pago de interes credito		\$ 16.659.449	\$ -14.532.629	...		
(-) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ -16.612.899	...	\$ -16.612.899	\$ -16.612.899
(-) Pérdidas ejercicio anterior				...		
(=) Utilidad antes de Impuesto	\$ -	\$ 51.896.993	\$ 54.023.812	...	\$ 68.556.442	\$ 68.556.442
(-) Impuesto (25%)	\$ -	\$ 12.974.248	\$ -13.505.953	...	\$ -17.139.110	\$ -17.139.110
(=) Utilidad después de Impuesto	\$ -	\$ 38.922.745	\$ 40.517.859	...	\$ 51.417.331	\$ 51.417.331
(+) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ 16.612.899	...	\$ 16.612.899	\$ 16.612.899
(+) Pérdida ejercicio anterior			\$ -	...	\$ -	\$ -
(=) Flujo de caja Operacional	\$ -	\$ 55.535.644	\$ 57.130.758	...	\$ 68.030.230	\$ 68.030.230
(-) Inversiones	\$ -166.128.990			...		
(+) prestamos	\$ 97.083.034			...		
(-) amortizaciones		\$ 12.394.051	\$ -14.520.871	...		
(+) Valor Residual de los activos				...		\$ 41.532.248
(-) Capital de trabajo	\$ 28.037.078			...		
(+) Recuperación del Capital de Trabajo				...		\$ 28.037.078
(=) Flujo de Capitales	\$ 97.083.034	\$ -	\$ -14.520.871	...	\$ -	\$ 69.569.326
Flujo de caja Neto	\$ 97.083.034	\$ 55.535.644	\$ 42.609.888	...	\$ 68.030.230	\$ 137.599.556
Flujo de caja neto acumulado	\$ 97.083.034	\$ 41.547.390	\$ 1.062.497	...	\$ 396.829.477	\$ 534.429.033
VAN ACUMULADO	\$ 97.083.034	\$ 47.497.638	\$ -13.529.296	...	\$ 182.749.307	\$ 227.052.681

Tabla 24: Flujo de caja para proyecto de producción de alginato liasa G con precio de venta equivalente al 60% de enzima comercial A y horizonte de evaluación de 10 años. Producción utilizando dos biorreactores y financiamiento 100% bancario, con 17,16% de interés anual en un plazo de 5 años

	Año 0	Año 1	Año 2	año ...	año 9	año 10
(+) Ingresos por ventas producto		\$ 94.515.034	\$ 94.515.034	...	\$ 94.515.034	\$ 94.515.034
(-) OPEX		\$ 9.345.693	\$ -9.345.693	...	\$ -9.345.693	\$ -9.345.693
(-) Pago de interes credito		\$ 33.318.897	\$ -29.065.265	...		
(-) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ -16.612.899	...	\$ -16.612.899	\$ -16.612.899
(-) Pérdidas ejercicio anterior				...		
(=) Utilidad antes de Impuesto	\$ -	\$ 35.237.545	\$ 39.491.177	...	\$ 68.556.442	\$ 68.556.442
(-) Impuesto (25%)	\$ -	\$ 8.809.386	\$ -9.872.794	...	\$ -17.139.110	\$ -17.139.110
(=) Utilidad después de Impuesto	\$ -	\$ 26.428.158	\$ 29.618.383	...	\$ 51.417.331	\$ 51.417.331
(+) Depreciaciones		\$ 16.612.899	\$ 16.612.899	...	\$ 16.612.899	\$ 16.612.899
(+) Pérdida ejercicio anterior			\$ -	...	\$ -	\$ -
(=) Flujo de caja Operacional	\$ -	\$ 43.041.057	\$ 46.231.282	...	\$ 68.030.230	\$ 68.030.230
(-) Inversiones	\$ -166.128.990			...		
(+) prestamos	\$ 194.166.068			...		
(-) amortizaciones		\$ 24.788.067	\$ -29.041.699	...		
(+) Valor Residual de los activos				...		\$ 41.532.248
(-) Capital de trabajo	\$ 28.037.078			...		
(+) Recuperación del Capital de Trabajo				...		\$ 28.037.078
(=) Flujo de Capitales	\$ -	\$ 24.788.067	\$ -29.041.699	...	\$ -	\$ 69.569.326
Flujo de caja Neto	\$ -	\$ 18.252.991	\$ 17.189.583	...	\$ 68.030.230	\$ 137.599.556
Flujo de caja neto acumulado	\$ -	\$ 18.252.991	\$ 35.442.573	...	\$ 350.765.044	\$ 488.364.600
VAN ACUMULADO	\$ -	\$ 16.297.313	\$ 30.000.743	...	\$ 175.050.528	\$ 219.353.903