

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