

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas.....	ix	
Índice de Figuras.....	xi	
1	Introducción.....	1
1.1	Ácido Hialurónico	2
1.1.1	Estructura.....	2
1.1.2	Aplicaciones y Mercado	3
1.1.3	Producción de Ácido Hialurónico	4
1.1.4	Ácido Hialurónico Sintasa.....	6
1.1.5	Otras Consideraciones y Desafíos	8
1.2	Macroalgas y Algas Pardas.....	9
1.2.1	Polisacáridos Para Almacenamiento.....	10
1.2.2	Polisacáridos de la Pared Celular y Extracelular	11
1.2.3	Algas Pardas en Chile.....	14
1.2.4	Ruta de Degradación de Alginato.....	15
1.2.5	Alginato Liasas	16
1.3	Cepa BAL 1611	18
2	Objetivos.....	20
2.1	Objetivo General.....	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	Metodología.....	22
3.1	Plan de Trabajo	23
3.2	Materiales	23
3.3	Equipos	23
3.4	Metodología Experimental	23
3.4.1	Knock-Out de genes	24
3.4.2	Células de E. coli electrocompetentes	24
3.4.3	Electroporación con plásmido pkD46	25
3.4.4	Transformación con fragmento (producto de la amplificación con plásmido pkD3)	25

3.4.5	Preparación de gel para electroforesis	25
3.4.6	Electroforesis	26
3.4.7	Reacción de PCR	26
3.4.8	Verificación de inserción de fragmento por PCR de Colonia	28
3.4.9	Reacción de PCR de Colonia.....	28
3.4.10	Incorporación de genes para la síntesis de ácido hialurónico.....	30
3.4.11	Preparación de medio LB líquido.....	31
3.4.12	Cultivo en medio LB líquido	31
3.4.13	Preparación de medio líquido M9 con alginato al 1 [%]	31
3.4.14	Condiciones de cultivo para la producción de ácido hialurónico	32
3.4.15	Concentración de Ácido Hialurónico producido en E. coli.....	33
3.4.16	Obtención de muestras y medición de las concentraciones de carbohidratos, etanol y ácido hialurónico en muestras de cultivo.....	33
3.4.17	Cuantificación de la concentración de ácido hialurónico utilizando un método turbidimétrico	34
3.4.18	Cultivos para FBA	35
3.4.19	FBA (Flux Balance Analysis).....	36
4	Resultados y Discusión.....	37
4.1	Knock-out de genes para síntesis de etanol desde la cepa BAL 1611	38
4.1.1	Diseño y síntesis de fragmento de ADN para el knock-out.....	38
4.1.2	Transformación de cepas con pkD46 y fragmento	39
4.1.3	Comprobación de knock-out por genotipo	39
4.1.4	Comprobación de knock-out por Fenotipo	42
4.2	Incorporación de genes de producción de ácido hialurónico.....	45
4.3	Producción de Ácido Hialurónico	46
4.3.1	Cuantificación por HPLC	47
4.3.2	Cuantificación por turbidimetría.....	49
4.4	Análisis de Flujo Metabólico en Nueva Cepa Recombinante	53
4.4.1	Construcción de modelo a escala genómica	54
4.4.2	Obtención de datos para el modelo.....	56
4.4.3	Análisis de balance de flujo.....	71

4.4.4	Otros análisis y discusiones	76
5	Conclusiones	79
	Bibliografía	81
A	Anexos	I
A.1	Ruta Metabólica Cepa BAL 1611.....	II
A.2	Tecnologías de manufactura de Ácido Hialurónico	III
A.3	Tablas y Gráficos Fermentaciones.....	IV
A.3.1	Datos comprobación de la producción de etanol	IV
A.3.2	Datos para cuantificación de AH.....	V
A.3.3	Datos recopilados para FBA.....	VI
A.4	Tablas Comparativas FBA.....	XVI
A.5	Cálculo de producción de ATP para diferentes carbohidratos	XXVII
A.6	Ladder GeneRuler 1 kb Plus.....	XXVII
A.7	Código MATLAB-COBRA.....	XXVIII

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I APLICACIONES DE AH EN LAS ÁREAS BIOMÉDICA Y FARMACOLÓGICA (BOERIU ET AL., 2013).	3
TABLA II PARTIDORES UTILIZADOS PARA LA GENERACIÓN DEL FRAGMENTO PARA EL KNOCK-OUT.	27
TABLA III REACTIVOS Y CANTIDADES UTILIZADAS EN LAS REACCIONES CON POLIMERASA PHUSION PARA CADA TUBO, PARA EL CASO CON UNA TEMPERATURA Y UN GRADIENTE DE TEMPERATURAS.	27
TABLA IV PROGRAMA UTILIZADO PARA LA POLIMERASA PHUSION.	27
TABLA V PARTIDORES DISEÑADOS PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE GENES DE Z. MOBILIS.	28
TABLA VI PARTIDORES DISEÑADOS PARA LA PRESENCIA DE GENES QUE FLANQUEAN LOS DE INTERES.	29
TABLA VII REACTIVOS UTILIZADOS EN UNA REACCIÓN CON GoTAQ.	29
TABLA VIII PROGRAMA UTILIZADO PARA LA POLIMERASA GoTAQ.	30
TABLA IX COMPUESTOS PARA PREPARAR MEDIO MÍNIMO M9.	32
TABLA X COMPUESTOS PARA PREPARAR UNA FERMENTACIÓN DE MEDIO MINIMO CON ALGINATO COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.	32
TABLA XI RANGO DE LOS ESTÁNDARES PREPARADOS.	34
TABLA XII COMPOSICIÓN DE CADA MUESTRA PARA CURVA DE CALIBRACIÓN.	35
TABLA XIII COMPOSICIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	35
TABLA XIV CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA FERMENTACIÓN DE COMPROBACIÓN DE KNOCK-OUT POR FENOTIPO.	42
TABLA XV CONDICIONES DE CULTIVO.	47
TABLA XVI CONDICIONES DE CULTIVO PARA LAS DIFERENTES CEPAS.	50
TABLA XVII RENDIMIENTOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	53
TABLA XVIII CONDICIONES DE CULTIVO.	56
TABLA XIX RESULTADOS DE GENERACIÓN Y CONSUMO DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS MEDIDOS.	70
TABLA XX CONDICIONES INICIALES DE LAS SIMULACIONES PARA ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO.	71
TABLA XXI FLUX Y TASA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA MODIFICADA DE E.COLI. INCLUYE LOS RESULTADOS DEL FBA QUE ESTÁN SUBRAYADOS.	72
TABLA XXII REACCIONES CON LOS FLUJOS PARA CADA SIMULACIÓN, CON SU NÚMERO ASOCIADO.	75
TABLA XXIII PRODUCCIÓN ENERGÉTICA EN ATP DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS.	76
TABLA XXIV PRODUCCIÓN ENERGÉTICA EN ATP DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, DÓNDE SE INCLUYE PRODUCIR UN DÍMERO DE AH.	77
TABLA XXV TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO. (BOERIU ET AL., 2013)	III
TABLA XXVI CONCENTRACIONES DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 1.	IV
TABLA XXVII CONCENTRACIONES DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 2.	IV
TABLA XXVIII CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 1.	IV
TABLA XXIX CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 2.	V
TABLA XXX CONCENTRACIONES FINALES DE DIFERENTES CULTIVOS.	V
TABLA XXXI DENSIDAD ÓPTICA PARA EL SEGUIMIENTO DEL CULTIVO.	VI
TABLA XXXII RECOPIACIÓN DE PESOS PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO DE CÉLULAS.	VI
TABLA XXXIII DENSIDAD ÓPTICA PARA EL CÁLCULO DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	VIII
TABLA XXXIV TIEMPO DE RETENCIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES DETECTORES.	IX
TABLA XXXV CONCENTRACIONES DE ACETATO EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XI
TABLA XXXVI CONCENTRACIONES DE ALGINATO EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XII
TABLA XXXVII CONCENTRACIONES DE ARABINOSA EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XIII
TABLA XXXVIII CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XIV

TABLA XXXIX CONCENTRACIONES DE MANITOL EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XV
TABLA XL CONCENTRACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO PRESENTES EN EL TIEMPO EN LAS FERMENTACIONES.....	XVI
TABLA XLI FLUJOS DE LAS SIMULACIONES CON MÁS REACCIONES.	XVI
TABLA XLII TABLA COMPARATIVA CON LA SIMULACIÓN DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL SIN PIRUVATO DESCARBOXILASA COMO BASE PARA LA COMPARACIÓN.	XX
TABLA XLIII TABLA COMPARATIVA CON LA SIMULACIÓN DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL CON PIRUVATO DESCARBOXILASA COMO BASE PARA LA COMPARACIÓN.	XXIII

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DE LA CADENA DE ÁCIDO HIALURÓNICO	2
FIGURA 2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO. ADAPTADO DE (BOERIU ET AL., 2013).	4
FIGURA 3 RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN E.COLI. ADAPTADO DE (YU Y STEPHANOPOULOS, 2008).....	6
FIGURA 4 MODELO ESQUEMÁTICO DE LAS CLASES I Y II DE HAS. MODIFICADO DE (WEIGEL Y DEANGELIS, 2007).	7
FIGURA 5 DETALLE DE HAS CLASE I. ADAPTADO DE (WEIGEL, 1998).	8
FIGURA 6 FISIOLOGÍA DE MACROALGAS PARDAS.	9
FIGURA 7 ESTRUCTURA DE MANITOL.	10
FIGURA 8 ESTRUCTURA DE LAMINARINA. LA ESTRUCTURA ES PRINCIPALMENTE GLUCANOS NO RAMIFICADOS UNIDOS POR ENLACES BETA(1' A 3'). EN (A) EL MANITOL SE ENCUENTRA UNIDO AL TERMINAL REDUCIDO (CADENA M). EN (B) LA GLUCOSA SE ENLAZA AL TERMINAL REDUCIDO (CADENA G). ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003).....	11
FIGURA 9 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE ALGAS PARDAS. ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003).....	12
FIGURA 10 MODELO CON DETALLE DE LA PARED INTERNA DE ALGAS PARDAS. (DENIAUD-BOUËT ET AL., 2014).....	12
FIGURA 11 ALGINATO ESTRUCTURAL. EN (A) MONOMEROS DE ALGINATO. EN (B) POLIMERO DE ALGINATO. EN (C) SECUENCIAS DE LA CADENA DEL POLIMERO DE ALGINATO. ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003; KIM ET AL., 2011).	13
FIGURA 12 PRODUCCIÓN ANUAL (BIOMASA HÚMEDA) DE PESCA DE ALGAS PARDAS ENTRE 1984 Y 2006 (VÁSQUEZ, 2009).15	
FIGURA 13 RUTA ENTNER-DOUDOROFF. ADAPTADO DE (PEEKHAUS Y CONWAY, 1998).....	16
FIGURA 14 ALGINATO LIASAS. LA DEGRADACIÓN DE ALGINATO SE REALIZA POR BETA ELIMINACIÓN DE FORMA ENDOLITICA (A) Y EXOLITICA (B). MONOSACARIDOS INSATURADOS SON LIBERADOS DEL ALGINATO O OLIGOSACARIDOS POR LAS ALGINATO LIASAS EXOLITICAS. LOS MONOSACARIDOS SON CONVERTIDOS NO ENZIMATICAMENTE EN ÁCIDO URÓNICO 4-DEOXI-L-ERITRO-5-HEXOCEULOSA (DEHU) (C) (KIM ET AL., 2011).....	17
FIGURA 15 VÍAS METABÓLICAS EN BAL 1611. ADAPTADO DE (LENGELER Y LIN, 1972; SAIER Y REIZER, 1992; WARGACKI ET AL., 2012).....	18
FIGURA 16 GENES ELIMINADOS DEL GENOMA DE BAL 1611 (WARGACKI ET AL., 2012).	19
FIGURA 17 DIAGRAMA QUE DESCRIBE EL MÉTODO UTILIZADO POR (DATSENKO Y WANNER, 2000), APLICADO AL TRABAJO DE TESIS.	24
FIGURA 18 DIAGRAMA QUE REPRESENTA LA ZONA DE INTERÉS EN EL GENOMA DE BAL 1611.....	28
FIGURA 19 ESQUEMA DEL PLÁSMIDO PMBAD-SSEAB.(VAISMAN, 2014)	31
FIGURA 20 GELES DE ELECTROFORESIS CON LOS FRAGMENTOS PARA EL KNOCK-OUT.	38
FIGURA 21 CULTIVOS EN TUBOS DE ENSAYO DE E. COLI TRANSFORMADA (IZQUIERDA) Y NO TRANSFORMADA (DERECHA) EN MEDIO LB CON CLORANFENICOL.	39
FIGURA 22 DIAGRAMA DE LOS FRAGMENTOS DE INTERES A AMPLIFICAR.	40
FIGURA 23 GELES CON RESULTADOS DE LA PCR DE COLONIAS DE CEPAS DE BAL 1611 MODIFICADAS Y NO MODIFICADAS. ...	41
FIGURA 24 GEL CON RESULTADOS DE LA PCR DE COLONIA.	41
FIGURA 25 GEL DE ELECTROFORESIS CON RESULTADOS DE UNA PCR DE COLONIAS DE CEPAS DE E. COLI.	42
FIGURA 26 PRODUCCIÓN DE ETANOL CLONES DE CEPA BAL 1611 MODIFICADA.	43
FIGURA 27 DETALLE DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE DIFERENTES CLONES DE CEPA BAL 1611 MODIFICADA.	44
FIGURA 28 CONCENTRACIÓN DE ETANOL DE DIFERENTES VARIANTES RECOMBINANTES.	44
FIGURA 29 GEL DE ELECTROFORESIS CORRESPONDIENTE A LA EXTRACCIÓN DE PLASMIDIO DE DOS CEPAS TOP 10.	46
FIGURA 30 PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL ESTÁNDAR DE AH A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	47
FIGURA 31 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA CEPA MODIFICADA.....	48
FIGURA 32 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS HIALURÓNICOS DE DIFERENTES FUENTES. (SHODEX, 2016).....	49
FIGURA 33 RESULTADOS UTILIZANDO EL ESTÁNDAR DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	50

FIGURA 34 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO LB CON GLUCOSA Y AMPICILINA	51
FIGURA 35 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO M9 CON AMPICILINA.....	51
FIGURA 36 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO LB CON CON ALGINATO, MANITOL Y AMPICILINA.....	52
FIGURA 37 CONCENTRACIONES FINALES DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	53
FIGURA 38 DIAGRAMA DE LA RED METABÓLICA DE LA CEPA MODIFICADA DE E. COLI.....	55
FIGURA 39 MATRACES AL FINAL DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS.	56
FIGURA 40 MATRAZ CON SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS A TRAVÉS DE UNA MANGUERA Y JERINGA.	57
FIGURA 41 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA MODIFICADA EN EL MEDIO DE CULTIVO.	58
FIGURA 42 TASA DE CRECIMIENTO.....	58
FIGURA 43 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ACETATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	59
FIGURA 44 ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ACETATO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.	60
FIGURA 45 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR TURBIDIMETRÍA.	61
FIGURA 46 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.	62
FIGURA 47 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	63
FIGURA 48 ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	63
FIGURA 49 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARABINOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	64
FIGURA 50 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE ARABINOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	65
FIGURA 51 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.	66
FIGURA 52 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO, DETALLE DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	66
FIGURA 53 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE MANITOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.	67
FIGURA 54 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE MANITOL DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	67
FIGURA 55 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	68
FIGURA 56 PRODUCCIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO EN LA FERMENTACIÓN.....	68
FIGURA 57 CONCENTRACIONES DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS DEL CULTIVO.	69
FIGURA 58 DETALLE DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS COMPUESTOS CON LAS MENORES MAGNITUDES.....	70
FIGURA 59 DIAGRAMA DE FLUJOS METABÓLICOS EN E.COLI UTILIZADA EN ESTE ESTUDIO. SE MUESTRA LOS VALORES DE LOS FLUJOS EN LOS CÍRCULOS AMARILLOS.	74
FIGURA 60 DIAGRAMA DE RUTAS METABÓLICAS EN LA CEPA BAL 1611. TAMBIÉN SE INCLUYE LA SECCIÓN DE LA RUTA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO.....	II
FIGURA 61 CURVA ESTÁNDAR PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO.	VII
FIGURA 62 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCETRACIÓN STOCK DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	VII
FIGURA 63 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACION POR TURBIDIMETRÍA, ANTES DE LAS 10 HORAS DE CULTIVO.....	VIII
FIGURA 64 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR TURBIDIMETRÍA DESPUÉS DE LAS 8 HORAS DE CULTIVO.....	IX
FIGURA 65 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ACETATO CON UN DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN.	X
FIGURA 66 RESULTADOS UTILIZANDO UNA COCENTRACIÓN STOCK DE ACETATO CON UN DETECTOR DE LUZ ULTRA VIOLETA.	X
FIGURA 67 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ALGINATO.	XI
FIGURA 68 RESULTADOS URILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ARABINOSA.	XII
FIGURA 69 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ETANOL.	XIII
FIGURA 70 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE MANITOL.	XIV
FIGURA 71 CURVA OLIGÓMEROS, BASADO EN ALGINATO DEGRADADO POR HIDRÓXIDO DE SODIO.	XV
FIGURA 72 LADDER GENE RULER 1 KB PLUS.....	XXVII