

# **“Desarrollo de un proceso de fermentación para la producción de EGasa1, una enzima capaz de mejorar la calidad del biodiesel”**

Ma. Florencia Eberhardt  
Licenciada en Biotecnología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos de Rosario (IPROBYQ), área Ingeniería Genética y Tecnología de Fermentación, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2013 y el 7 de Diciembre de 2016, bajo la dirección del Dr. Hugo G. Menzella y la co-dirección del Dr. Andrés Aguirre.

Director: Dr. Hugo Menzella.....

Co-Director: Dr. Andres Aguirre.....

Jurado: .....

Jurado: .....

Jurado: .....

Defendida:.....

Índice

<b>Divulgación</b> .....	2
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	15
Biodiesel .....	16
Sistemas de producción de proteínas recombinantes .....	28
<i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión bacteriano.....	28
Sistemas de chaperonas moleculares .....	30
Cultivo de <i>E. coli</i> de alta densidad de células.....	32
Sistemas de expresión de genes heterólogos en <i>E. coli.</i> ....	36
Biología Sintética .....	36
Optimización del uso de codones .....	37
Enzimas termófilas .....	38
Lisis celular.....	39
Extracción de proteínas de membrana con detergentes .....	43
Biotransformación en medios no convencionales.....	45
<b>Objetivos</b> .....	48
<b>Materiales y Métodos</b> .....	52
General.....	53
Genes sintéticos .....	54
Construcción de vectores .....	54
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	58
Secuenciación de ADN.....	59
Preparación plasmídica .....	59
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	59

Electroforesis de ácidos nucleicos .....	60
Integración cromosomal del operón catabólico de sacarosa en la cepa industrial .....	60
Condiciones de crecimiento para los estudios de expresión en microplacas	62
Determinación del crecimiento microbiano .....	63
Disrupción celular y análisis de proteínas.....	64
Ensayos de actividad.....	64
Fermentación de alta densidad celular .....	65
Homogeneización de alta presión para cultivos de alta densidad .....	65
Purificación .....	66
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>65</b>
1. Rediseño del gen que codifica para la EGasa1 optimizando el uso de codones a fin de maximizar su expresión en <i>E. coli</i> .....	72
2. Selección del promotor óptimo para la expresión de la proteína EGasa1	75
3.Co-expresión de EGasa1 con chaperones moleculares.....	77
4. Optimización de las condiciones del proceso. ....	80
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>87</b>
1. Ingeniería genética de <i>E. coli</i> a fin de que pueda crecer eficientemente utilizando glicerol como única fuente de carbono y energía.....	91
2. Incorporación del operón <i>cscAKB</i> conteniendo los genes del catabolismo de sacarosa a <i>E. coli</i> BL21 AI.....	95
3. Desarrollo de un proceso de producción en lote alimentado.....	99
A. Efecto de la utilización de diferentes fuentes de carbono en cultivos en lote alimentado a alta densidad de células.....	99
B. Selección de las cepas recombinantes con mejores niveles de expresión.....	101

C. Reformulación del medio mínimo utilizado para los cultivos de alta densidad de células.....	104
D. Perfiles de alimentación Post- Inducción.....	106
I. Análisis del perfil de caudales de alimentación.....	107
II. Determinación de la relación carbono-nitrógeno (C:N) óptima en la solución de alimentación.....	110
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>118</b>
1. Escalado de la fermentación.....	121
2. Procesamiento de los cultivos del lote alimentado. Purificación de la EGasa1.....	123
3. Puesta a punto de la extracción de EGasa1 con diferentes detergentes.....	125
4. Evaluación y optimización de la actividad de la EGasa1 en biodiesel.....	130
5. Tratamiento enzimático a gran escala.....	133
6. Impacto en las puebas de calidad del biodiesel.....	137
<b>Conclusiones.....</b>	<b>144</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>149</b>

# Divulgación

## **Publicaciones en revistas científicas internacionales con referato**

Aguirre A., Peiru S., Eberhardt F., Vetcher L., Cabrera R., Menzella H. (2014) Enzymatic hydrolysis of steryl glucosides, major contaminants of vegetable oil-derived biodiesel. *Applied Microbiology Biotechnology* 98:4033–4040. doi: 10.1007/s00253-013-5345-4

Peiru S., Aguirre A., Eberhardt F., Braia M., Cabrera R., Menzella H. (2015). A scalable process for the enzymatic removal of steryl glucosides from biodiesel. *Biotechnology for Biofuels*. 8:223. doi: 10.1186/s13068-015-0405-x

Eberhardt F., Aguirre A., Menzella H.G, Peiru S. (2017). Strain engineering and process optimization for enhancing the production of a thermostable steryl glucosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 44(1):141-147. DOI 10.1007/s10295-016-1866-z.

## **.Trabajos en eventos científicos y tecnológicos publicados**

Congreso: SAIB 2014, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Del 11 al 14 de noviembre de 2014. “Development of a fermentation process of EGasa1, an enzyme able to improve biodiesel quality”. Eberhardt, F., Aguirre, A. Braia, M., Peiru, S., Menzella, H.

Congreso: SAIB 2014, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Del 11 al 14 de noviembre de 2014. “An enzymatic process for the removal of steryl glucosides, major contaminants of vegetable oil derived biodiesel”. Aguirre, A., Eberhardt, F., Braia, M., Peiru, S., Menzella, H.

3er Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos 2014. Del 9 y 10 de diciembre 2014. "Optimización de la producción de la enzima EGasa1 capaz de hidrolizar esteril glucósidos en biodiesel". Eberhardt, F., Aguirre, A. Braia, M., Peiru, S., Menzella, H.

3er Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos 2014. Del 9 y 10 de diciembre 2014. "Proceso enzimático para la eliminación de esteril glucósidos, principales contaminantes del biodiesel". Aguirre, A., Eberhardt, F., Braia, M., Menzella, H., Peiru, S.

4to Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos 2014. 1 y 2 de diciembre 2016. "Efectos del uso de distintas fuentes de carbono y modificaciones post-Inducción sobre la productividad de EGasa1". Eberhardt, F., Aguirre, A. Hails, G., Peiru, S., Menzella, H.

Congreso: THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015. Diciembre de 2015. "An industrial scale process for the enzymatic removal of steryl glucosides from biodiesel". Peiru, S., Aguirre, A., Eberhardt, F., Braia, M., Cabrera, R., Menzella, H.

# Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**DO<sub>600</sub>:** Densidad óptica a 600nm

**OD:** Oxígeno disuelto

**kDa:** Kilodaltons

**IPTG:** Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

**p/v :** Peso en volumen

**v/v :** Volumen en volumen

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**g/L:** Gramos por litro

**g PS/L:** Gramos peso seco por litro

**RPM:** Revoluciones por minuto

**EG:** estéril glucósidos

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**TC:** del ingles, Total Contamination

**CSFT:** del ingles, Cold Soak Filtration Test

**FBT:** del ingles, Filter Blocking Tendency

**CSFBT:** del ingles, Cold Soak Filter Blocking Tendency

**SPE-GC-FID:** Cromatografía gaseosa capilar (CG-FID) luego de extracción en fase sólida (SPE).

**MAGs:** Monoacil glicéridos.

# Resumen

El biodiesel producido por transesterificación de aceites vegetales tiene un importante problema de calidad debido a la presencia de precipitados insolubles, compuestos en su mayoría por esteril glucósidos (EG). Recientemente nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un método enzimático para la eliminación eficiente de los EG del biodiesel, basado en la actividad de una  $\beta$ -glucosidasa de la bacteria *Thermococcus litoralis*. A partir de estos resultados, el presente trabajo, se basa en la optimización de un sistema de expresión en *E. coli* de la enzima EGasa1, enzima que hidroliza completamente los esteril glucósidos presentes en el biodiesel, mejorando notablemente su calidad. Se describe el correspondiente proceso de fermentación a alta densidad celular, de un método de recuperación de la enzima EGasa1 y finalmente el tratamiento enzimático de biodiesel. La enzima hidroliza completamente los esteril glucósidos presentes en el biodiesel, mejorando notablemente su calidad.

En el primer capítulo se describe la ingeniería de *E. coli* para obtener una elevada producción específica de la enzima EGasa1. Inicialmente se optimizó el uso de codones del gen sintético *egasa1* mediante el software Optimizer y se evaluó la expresión de dicho gen a partir de una biblioteca de promotores con distinta actividad. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar al promotor pBAD, a partir del cual se evidenció un aumento del 40% de la actividad obtenida con respecto a la actividad inicial generada desde el promotor T7, a expensas de un inductor económico como la L-arabinosa. Dado que, gran parte de la proteína permanecía en la fracción insoluble, se evaluaron diferentes combinaciones de chaperonas moleculares con la finalidad de mejorar el plegamiento. Entre ellos se seleccionó el sistema GroES-GroEL, el cual

permitió incrementar tres veces la actividad final de la enzima en la fracción soluble obtenida en cultivos en lote.

El paso siguiente fue optimizar las condiciones de crecimiento. Con este fin se analizaron variaciones en la temperatura y  $DO_{600}$  de inducción y en la concentración de L-Arabinosa. Así, se determinó que los mejores niveles de actividad se obtuvieron cuando la cepa con los plásmidos pGro7 y pKCN-BAD-EGasa1 se indujeron en la fase exponencial de crecimiento con 0,5 g/L de L-arabinosa, a 37°C.

El Capítulo 2 tiene como punto de partida a una cepa capaz de expresar de manera soluble y eficiente la EGasa1, pero con una productividad específica (mg de EGasa1/g PS células) que aún puede ser mejorada. Con lo cual el paso siguiente fue el desarrollo del crecimiento en lote alimentado, el cual permite obtener cultivos de altas densidades celulares (HCDC, high cell density culture). Este proceso permitió incrementar el título del producto (U de EGasa1/ml) y la productividad específica (mg de EGasa1/g PS).

Inicialmente se ensayó la construcción de operones que incluyan los genes que codifican para EGasa1, el sistema de chaperonas seleccionado previamente, GroES/EL, junto a genes accesorios (un transportador de glicerol (GlpF) y una enzima clave para la biosíntesis de ácidos nucleídos y aminoácidos (PrsA). La incorporación de estos genes accesorios no contribuyó significativamente a aumentar la actividad EGasa1/ml de cultivo en los ensayos realizados con respecto a la cepa que expresa a las chaperonas desde otro plásmido.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la mejor cepa para la producción de EGasa1 a gran escala es la variante que expresa la proteína EGasa1 a partir del plásmido pKCN-BAD-EGasa1, y el sistema de chaperonas

GroES-GroEL a partir del plásmido pGro7, los cuales poseen orígenes de replicación compatibles e inducibles por agregado de L-arabinosa.

El siguiente objetivo fue seleccionar la fuente de carbono que optimice el rendimiento de los lotes alimentados y disminuya los costos de producción. Los sustratos seleccionados fueron: glucosa, la fuente de carbono preferida para las fermentaciones industriales de *E. coli*, sacarosa, una materia prima económica proveniente de la caña de azúcar y glicerol, el subproducto más importante de la industria del biodiesel.

Para poder utilizar la sacarosa como fuente de carbono, previamente se incorporó el operón metabólico *cscAKB* a la cepa *E. coli* BL21 AI. Se obtuvo así la cepa NK5 que crece eficientemente a expensas de sacarosa. Si bien los resultados de las diferentes fermentaciones muestran mayores rendimientos al utilizar glucosa; si se analiza la relación costo/rendimiento, resulta conveniente el uso de glicerol como fuente de carbono para obtener el menor costo de manufactura.

El paso siguiente fue modificar el medio salino HM, con la finalidad de obtener un medio más simple y reducir los costos de producción. Para ello se eliminó el extracto de levadura y se reformuló el medio con el fin de minimizar la cantidad de componentes responsables de aportar fosfato, potasio, sodio y nitrógeno, resultando como formulación final:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y NaOH (27,8g/L y 1,32g/L respectivamente). El nitrógeno es aportado por el  $\text{NH}_4\text{OH}$  utilizado para mantener en pH 7 el medio a lo largo del proceso de fermentación.

En la siguiente etapa del proyecto se buscó determinar las condiciones de post-inducción que permitan obtener la máxima productividad volumétrica (U de EGasa1/ml/h). En primer lugar se analizaron perfiles de post-inducción

típicamente utilizados en procesos industriales de producción de enzimas recombinantes: flujo constante 8 g/L/h y 12 g/L/h, flujo lineal (inicial 10 g/L/h, pendiente 0,7 g/L/h<sup>2</sup>), y un flujo proporcional a la densidad óptica (10 g/L/h para DO=100). Se determinó que el flujo de alimentación más adecuado para producir la enzima EGasa1 a partir de un lote alimentado de *E. coli* BL21 AI es el constante de 12 g/L/h. Utilizando este flujo se obtiene la mayor productividad (13,7 U/ml/h) luego de 6 horas de inducción a 37°C.

Finalmente se determinó que la relación molar carbono-nitrógeno (C:N) óptima en la solución de alimentación es 5. Con la misma se obtuvo el mayor valor de actividad EGasa1, 466 U/ml.

Todos los resultados obtenidos sugieren que las condiciones de fermentación: medio de cultivo, fuente de carbono, método de alimentación post-inducción y relación carbono nitrógeno post inducción son factores importantes que afectan la producción de EGasa1 de *E. coli*.

En el último capítulo de este trabajo se escaló exitosamente la fermentación a 1000L. También se diseñó el procesamiento de los cultivos y posterior purificación de EGasa1. Para esto se tuvieron en cuenta las características de la enzima: proteína termofílica y asociada a membrana. De esta manera se establecieron las condiciones óptimas de lisis: calentamiento a 80°C durante 20 minutos, con el agregado de 1% de alcohol láurico etoxilado (7 moles).

Finalmente, se determinaron las condiciones de hidrólisis enzimática de EG en biodiesel. Los datos obtenidos permitieron determinar que la temperatura y pH óptimos de hidrólisis fueron 6,75 y 65°C respectivamente. Se redujo la cantidad de enzima necesaria a 7µg por gramo de biodiesel para la eliminación completa de los EG, y la cantidad de agua utilizada en la hidrólisis al 4,5% del volumen

de biodiesel tratado, lo que disminuyó la cantidad de agua residual que se genera. Además, la concentración de iones presentes en el buffer de hidrólisis se redujo, disminuyendo la concentración del buffer fosfato a 10 mM y la del NaCl a 20 mM.

El proceso de tratamiento se escaló exitosamente hasta 20 toneladas usando un reactor agitado, en el cual 7g de EGasa1 por tonelada de biodiesel eliminaron por completo las 75 ppm de EG presentes en la muestra en aproximadamente 2 h.

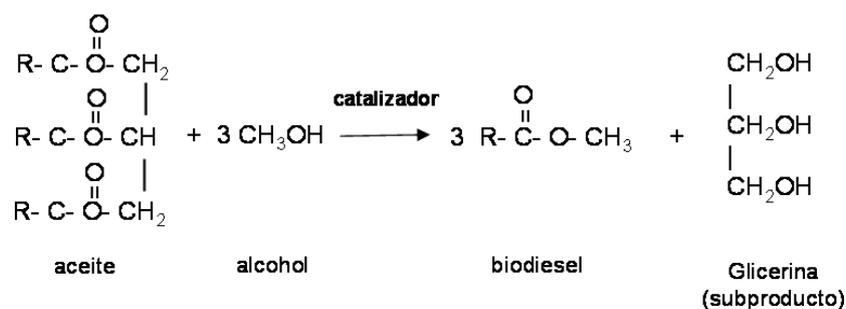
Las pruebas de calidad internacionales TC, CSFT, FBT y CSFBT realizadas con el biodiesel tratado con EGasa1 indicaron que la calidad de este biodiesel es comparable a la del biodiesel destilado.

# Introducción

## BIODIESEL

La economía mundial depende del combustible diesel derivado del petróleo para la provisión de servicios y para el transporte de materias primas y personas. Desde comienzos de la década de 1970 se ha intensificado la búsqueda de fuentes alternativas de energía renovables con el objetivo de aliviar esta dependencia. Un combustible alternativo es el biodiesel, obtenido por medio de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales con alcoholes de bajo peso molecular. El biodiesel puede reemplazar en forma directa el diesel derivado del petróleo y es el combustible líquido más eficiente que puede actualmente obtenerse de la fuente de energía más abundante en la naturaleza: la luz solar.

El biodiesel es un combustible formado por alquil (generalmente metil) monoesteres de ácidos grasos provenientes de aceites vegetales o grasas animales (Figura 1).



**Figura 1:** Representación esquemática de la síntesis de biodiesel

Sus principales ventajas son:

- (i) Es obtenido a partir de materias primas renovables
- (ii) Posee muy baja toxicidad
- (iii) Es biodegradable

## Biodiesel en Argentina

La Argentina cuenta con condiciones competitivas óptimas para ser uno de los principales productores de biodiesel a nivel mundial a partir del aceite de soja dado que:

- (i) es el primer productor de aceite de soja en el mundo
- (ii) ha logrado un equilibrio logístico, tecnológico y productivo óptimo, para la producción tanto de aceite como de biodiesel
- (iii) el centro productivo de biodiesel se encuentra dentro del complejo sojero Argentino, que es el más grande del mundo.

Es por ello que actualmente es el tercer productor de biodiesel del mundo, luego de EEUU y Alemania, y es el primer exportador de Biodiesel a nivel mundial [1]

La producción de biodiesel se incrementó en forma exponencial entre 2001 y 2015 debido al aumento de precio de los combustibles fósiles y a la posible escasez de los mismos en un futuro cercano. En el año 2015, la producción mundial de biodiesel registró un leve descenso. [2].

En lo que respecta a la Argentina, para el consumo interno para el corte obligatorio se destinaron en el primer semestre del 2016 unas 475.500 toneladas, lo que representó una caída del 9,6% respecto del año pasado. En contraste, se estima que las exportaciones de biodiesel podrían crecer hasta un 80% este año. Así las exportaciones globales de biodiesel argentino podrían incrementarse en un nivel significativo y llegar a las 1,4 millones de toneladas, tras un año de caída de envíos. [3].

Según el Instituto Nacional de Estadística, la Argentina exportó el año pasado tan sólo 800.000 toneladas de biodiesel. Las expectativas habrían cambiado en el primer semestre de este año, donde los embarques del producto alcanzaron un 150% interanual, hasta las 590.000 toneladas. En valores, se informó que entre enero y junio de este año, las exportaciones totalizaron u\$s 424 millones, un 63% más que el mismo período del año anterior. El gran impulso para el sector lo están dando las exportaciones hacia los Estados Unidos, desde que el gobierno de dicho país aprobó el año pasado un programa para evaluar los estándares de producción de Argentina, lo que está facilitando el ingreso de embarques locales. De acuerdo con datos de la Cámara Argentina de Biocombustibles (Carbio), del total de lo exportado, entre el 75% y el 80% tendría como destino los Estados Unidos.

El mercado con la Unión Europea, otro de los principales destinos de los exportadores del país, perdido desde hace tres años, podría recuperarse después del fallo de la Organización Mundial de Comercio (OMC) a favor de la Argentina y en contra de los aranceles impuestos desde 2013.

### Precipitados insolubles

Desafortunadamente, el proceso de producción del biodiesel presenta una desventaja respecto al diesel derivado del petróleo debido a la presencia de impurezas que resultan en la formación de precipitados insolubles. Estos sólidos conllevan a graves inconvenientes tanto durante el proceso de producción del biodiesel como en su almacenamiento, transporte y posterior utilización como combustible. La presencia de estas partículas resultan en el bloqueo de filtros y la formación de depósitos en los sistemas de inyección de

los motores, causando serias alteraciones en su funcionamiento [4-7]. Esto representa un importante problema debido a que puede causar interrupciones en el transporte de materias primas y en servicios diversos, así como en la utilización de vehículos privados con su consecuente impacto económico [8]

Muchos de estos precipitados están formados por ceras, se forman a bajas temperaturas y pueden ser redisueltos a temperatura ambiente. Otros representan un problema más complejo ya que se forman a temperatura ambiente y no pueden ser redisueltos. Estos últimos están formados principalmente por monoglicéridos saturados y los compuestos denominados esteril glucósidos (EG). Los EG son los principales responsables de los problemas de calidad que presenta el biodiesel, forman flóculos de 10-15  $\mu\text{m}$  de magnitud y se asocian para formar una sustancia gelatinosa que retiene metil ésteres de ácidos grasos. La presencia de EG en el biodiesel se observa a simple vista en forma de opalescencia (Figura 2) y se ha determinado una clara correlación entre dicha opalescencia a temperatura ambiente y el daño de filtros por parte del biodiesel [8, 9].



**Figura 2:** Biodiesel de soja húmedo (15% de agua) de la empresa Molinos Río de la Plata con aproximadamente 100 ppm de EG

La presencia de EG no solo provoca inconvenientes en el flujo del biodiesel en los motores sino que también causa problemas que encarecen el proceso de producción. Entre estos problemas pueden destacarse las interrupciones en los procesos de centrifugación debido al llenado de centrifugas con precipitados conteniendo EG y los costos asociados a limpieza de tanques de almacenamiento debido a la acumulación de los mencionados precipitados. Además, los EG son insolubles en la mayoría de los solventes, con excepción de unos pocos entre los que se encuentran piridina, dioxano y dimetilformamida. Así, la limpieza de la maquinaria de la cadena de producción y almacenamiento que acumula precipitados es problemática y costosa ya que dichos solventes son extremadamente tóxicos [8].

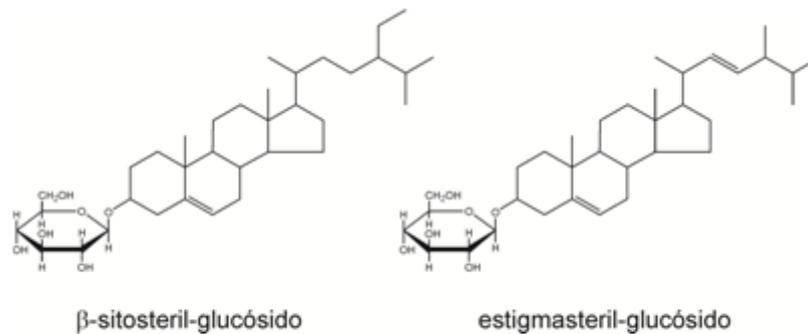
Aún a niveles relativamente bajos (32 ppm), los EG pueden ocasionar el bloqueo de filtros en motores [10]. La concentración de EG en muestras de biodiesel varía 0 y entre 160 ppm [11, 12]. Un análisis seriado de partidas de biodiesel argentino exportadas revela que la media es de 95 ppm [12].

El biodiesel exportado debe cumplir con los estándares respecto a la presencia de material insoluble. Entre estos estándares se encuentran la Norma Europea (EN) 12662:2008, que especifica un método para la determinación de contaminaciones como el contenido de sustancias no disueltas en los destilados medios hasta un 5% (V/V) de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) o FAME 100% (V/V), y la Norma de la Sociedad Americana para el testeo de Materiales (ASTM) 6751:2009, que determina las propiedades requeridas para los diesel y mezclas con biodiesel en el momento y el lugar de la entrega. Además, algunos mercados como los de Canadá y Australia son más exigentes respecto a la calidad del biodiesel, y requieren la aprobación de ensayos de filtración que el biodiesel de soja no pasa debido a la presencia de EG, imposibilitando el acceso a los mismos.

De esta manera la presencia de EG en biodiesel representa un problema cuya resolución tendrá un significativo impacto en el mejoramiento de la calidad de este producto con los consecuentes beneficios económicos para las regiones productoras de biodiesel.

El total de los EG presentes en biodiesel comprende la suma de los EG libres y los generados a partir de la transesterificación de acil-EG originalmente presentes en los aceites usados como materia prima. Los EG están constituidos por un grupo esterol, con un carbohidrato unido al grupo hidroxilo del carbono 3 (Figura 3). El D-glucósido del  $\beta$ -sitosterol es el EG más

abundante en el biodiesel derivado de soja (47%) seguido del D-glucósido del estigmasterol (25%) [11]. El contenido de EG en el biodiesel de soja es cinco veces mayor al del biodiesel derivado de aceite de maíz y alrededor de ocho veces superior al del combustible derivado del aceite de girasol. Considerando que prácticamente la totalidad del biodiesel producido en nuestro país proviene del aceite de soja, la presencia de EG tiene un impacto aún mayor y representa una desventaja competitiva respecto a aquellos países que elaboran biodiesel a partir de otros aceites.



**Figura 3:** Estructuras de  $\beta$ -sitosteril-glucósido y estigmasteril-glucósido, los esteril glucósidos más abundantes en el aceite de soja.

### Remoción física y química de los EG

Se ha observado que el uso de filtros convencionales no puede prevenir la formación de las mencionadas masas gelatinosas compuestas por EG. Más específicamente, la filtración del biodiesel con filtros de 5 micrones previo al mezclado con el diesel derivado de petróleo y con filtros de 10 micrones luego del mezclado no ha sido efectiva para prevenir el bloqueo de motores con material insoluble [8].

Se han propuesto distintas soluciones para la eliminación de EG del biodiesel. El uso de membranas de ultrafiltración hidrofílicas con un corte de 1000 D ha

demostrado ser un método efectivo en la remoción de estos compuestos [8] . Sin embargo, el proceso es económicamente inviable debido al elevado costo de las membranas. Otros métodos incluyen el uso de materiales adsorbentes, tales como carbón activado o tierras de diatomea [13]. Estos últimos métodos no sólo encarecen el proceso de producción sino que no han demostrado ser completamente eficaces en la remoción de los compuestos indeseados.

La única tecnología existente en la actualidad capaz de remover completamente los EG de biodiesel es la destilación. Para llevar a cabo este tratamiento el biodiesel debe ser previamente deshidratado y desalcoholizado. Luego se somete a una destilación de alto vacío, donde se vaporiza el biodiesel más volátil, dejando un fondo más pesado, similar al fuel oil. De esta manera se obtiene un biodiesel transparente con un 99% de pureza. El biodiesel destilado está orientado a penetrar en nichos de mercados hoy no atendidos como el mercado eléctrico argentino y la sustitución de la utilización del biodiesel a base a colza que se utiliza en Europa en las temporadas de baja temperatura. La desventaja radica en que esta técnica tiene un costo superior a 30 dólares por tonelada de biodiesel, lo que hace prohibitivo su uso para la mayoría de las aplicaciones.

Por último, el método más ampliamente utilizado es el simple almacenamiento del biodiesel en tanques a fin que los materiales insolubles precipiten. Este método de decantación presenta numerosas desventajas entre las que se cuentan:

- (i) el costo asociado al almacenamiento extendido del combustible,
- (ii) el costo asociado a la limpieza periódica de los tanques de almacenamiento, incluyendo la mano de obra, la disposición de los

deshechos y el costo del biodiesel que se descarta junto con el sedimento,

- (iii) la variabilidad en la calidad del combustible obtenido debido a la falta de estandarización en las condiciones de almacenamiento (por ejemplo variaciones de temperatura).

La obtención de un biodiesel capaz de satisfacer altos estándares de calidad en cuanto al contenido de materia sólida es un requisito fundamental para que la industria de los biocombustibles alcance su máximo potencial como alternativa renovable a los combustibles derivados del petróleo. Con este fin, desarrollar métodos eficaces para prevenir la formación de estas masas insolubles resulta esencial.

### Remoción enzimática de los EG

Esta problemática fue abordada por nuestro grupo de trabajo a través del desarrollo de degradadores enzimáticos de los EG [14-17]. La utilización de métodos enzimáticos específicos puede contribuir al desarrollo y establecimiento de procesos industriales más económicos y menos agresivos para el medio ambiente [18, 19] En la producción de biodiesel, distintos procesos que utilizan enzimas han sido recientemente implementados en escala industrial para llevar a cabo la eliminación de fosfolípidos originalmente presentes en el aceite utilizado como materia prima. El método denominado desgomado enzimático, que utiliza fosfolipasas A o C de distinto origen, ha contribuido a simplificar el proceso de eliminación de fosfolípidos (gomas) reemplazando métodos químicos obsoletos que son extremadamente trabajosos y provocan mermas en los rendimientos [20-22].

La implementación de un método enzimático económico que no requiera modificaciones sustanciales de los procesos de producción actuales ni de maquinaria adicional representará una contribución significativa para facilitar la expansión del uso de combustibles renovables.

Nuestro grupo identificó y caracterizó una familia de enzimas termoestables capaces de hidrolizar EG en medios acuosos y en emulsiones de agua/biodiesel [15]. El uso de enzimas termoestables es favorable para el tratamiento enzimático del biodiesel, ya que los EG son insolubles a temperatura ambiente [4].

LacS, una  $\beta$ -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, fue la enzima más eficiente de la familia cuando se llevó a cabo la reacción enzimática con poliglicerol polirricinoleato al 0,9% (PGPR), un potente emulsionante “agua en aceite”. LacS se localiza preferencialmente en la fase acuosa, y el agregado del emulsionante aumenta la interfaz agua/biodiesel, mejorando de esta manera el acceso al sustrato EG [15].

Desafortunadamente, el empleo de estas cantidades de emulsionante en un proceso de limpieza industrial de biodiesel aumentaría mucho su costo, y sería necesaria su remoción luego del tratamiento. Así, se comenzó una nueva búsqueda de  $\beta$ -glucosidasas con mayor rendimiento en sistemas bifásicos agua/biodiesel y con capacidad para trabajar en ausencia de agentes emulsionantes.

Inicialmente se centró la búsqueda en glucosidasas termoestables con características que prometían un mejor rendimiento en emulsiones agua/biodiesel: tolerancia a solventes orgánicos, especificidad por sustratos hidrofóbicos y/o asociaciones naturales a membranas.

La búsqueda inicial de  $\beta$ -glucosidasas termofílicas con especificidad para sustratos hidrófobos llevó a una enzima de *Pyrococcus horikoshii* (BGPh) que comparte un 46% de similitud con LacS y que exhibe una tendencia a hidrolizar  $\beta$ -glucósidos con cadenas alquílicas largas [23]. Los datos experimentales sugieren que esta enzima está asociada a la membrana bacteriana, tanto cuando su actividad se analiza en fracciones de membrana de *Pyrococcus*, como cuando se expresa de forma heteróloga en *Escherichia coli*.

Un análisis estructural de BGPh muestra una región hidrofóbica al final del sitio activo, que está rodeado por un anillo de aminoácidos con carga positiva [24]. Estas características sugieren que la región hidrofóbica podría penetrar en la membrana, lo cual estaría de acuerdo con la evidencia experimental. La estructura superficial de la membrana de BGPh difiere notablemente de la correspondiente a la región de LacS, que es soluble en agua. Por lo tanto, se hipotetizó que BGPh podría funcionar como una esterilglucosidasa en ausencia de emulsionantes.

Para ampliar la gama de candidatos, se realizó un BLAST (Tabla 1) y se seleccionaron siete secuencias de proteínas, las cuales fueron optimizadas para la expresión en *E.coli* (GenScript). Sólo EGasa1, BGTb y BGTs se expresaron con éxito, y de ellas sólo EGasa1 pudo obtenerse en la fracción soluble.

Proteína (GenBank Nº de acceso)	% Homología con BGPh	Gen sintético (Nº de acceso de GenBank)
<b>BGPh <i>Pyrococcus horikoshii</i></b> (WP_010884453.1)	100	KP772234
<b>BGPf <i>Pyrococcus furiosus</i></b> (WP_011011560.1)	96	KP772235
<b>EGasa1 <i>Thermococcus litoralis</i></b> (WP_004069094.1)	92	KP772236
<b>BGTk <i>Thermococcus kodakarensis</i></b> (WP_011250778.1)	91	KP772237

BGTs <i>Thermococcus sibiricus</i> (WP_015848865.1)	90	KP772238
BGAb <i>Aciduliprofundum boonei</i> (WP_008082059.1)	84	KP772239
BGTb <i>Thermococcus barophilus</i> (WP_013467240.1)	81	KP772240

Tabla 1. Enzimas con homología a BGPh probadas en nuestro laboratorio

Nuestro grupo ha descrito recientemente un método eficaz para la eliminación de EG del biodiesel basado en el uso de la enzima termoestable con actividad de esterilglucosidasa (EGasa1) de *Thermococcus litoralis*, expresada en *Escherichia coli* [17]. La enzima hidroliza los EG (Figura 4) sin la necesidad del agregado de emulsionantes, generando esteroides que son completamente solubles en biodiesel y glucosa que se elimina posteriormente con los lavados acuosos durante las últimas etapas del proceso de producción de biodiesel.

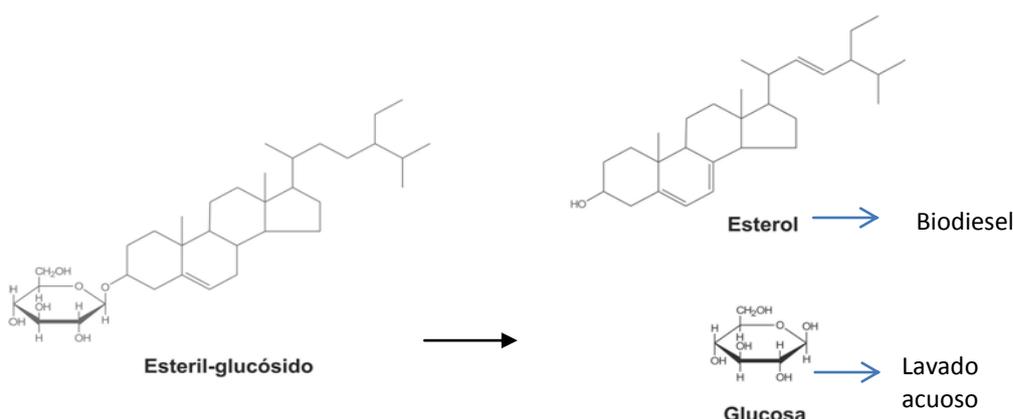


Figura 4: Hidrólisis enzimática del  $\beta$ -sitosteril-glucósido, el EG más abundante en el biodiesel derivado de aceite de soja.

El método de producción aún no ha sido optimizado, y debido a que la enzima es el principal componente en este tratamiento del biodiesel, su producción constituye un paso crítico en el desarrollo de un procedimiento rentable. En el presente trabajo se describe en primer lugar el desarrollo de un proceso de producción eficiente para la EGasa1 en *E. coli*. Finalmente, se describe el

tratamiento enzimático de biodiesel, y su escalado hasta volúmenes industriales.

## **SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

La producción de proteínas recombinantes requiere de procesos integrados que incluyen sortear desafíos que van desde la biología molecular hasta el proceso de purificación y formulación (o downstream) Generalmente el huésped elegido tiene un rol principal ya que muchas de las características del producto así como las técnicas de ingeniería genética y las estrategias de recuperación van a depender de las capacidades del organismo productor. Actualmente se dispone de una gran variedad de hospedadores incluyendo bacterias, levaduras o células animales y la elección del mismo depende de muchos factores. La velocidad de producción, rendimiento, funcionalidad y calidad de la enzima son generalmente prioritarios. Sin embargo, al momento de la selección del hospedador, prevalece la alternativa que facilite desarrollar procesos simples, que permitan obtener un producto recombinante con la calidad requerida y a un costo aceptable [25].

### **Escherichia coli como sistema de expresión bacteriano**

*E. coli* fue el primer organismo utilizado para la producción de proteínas recombinantes humanas, y en la actualidad es uno de los organismos más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas. [26-30]. Una de las razones principales es que esta especie es una de las más estudiadas y se ha generado una gran cantidad de conocimientos acerca de su fisiología, bioquímica y genética [26, 31]. Esta bacteria es fácil de cultivar y manipular

genéticamente. Es capaz de crecer hasta altas densidades celulares en fermentadores (hasta 175 g PS/L) y tiene necesidades nutricionales simples que pueden ser suplidas con medios definidos y muy económicos [27]. A nivel de síntesis de proteínas es un organismo de crecimiento rápido, de alto rendimiento y puede acumular proteínas recombinantes en una proporción que puede llegar hasta el 80% de su peso seco. Es por esta razón que *E. coli* es generalmente la primera opción al momento de la elección de un sistema de expresión [27, 28, 32, 33].

Sin embargo, *E. coli* presenta una serie de desventajas al momento de producir proteínas de gran tamaño o complejas provenientes de organismos eucariotas. La misma no es capaz de realizar modificaciones post traduccionales como glicosilaciones o acilaciones. Además, su capacidad de realizar plegamientos complejos que incluyen puentes disulfuro o activaciones proteolíticas como los organismos superiores es bastante limitada. Por otro lado, al momento de obtener proteínas de uso terapéutico una desventaja es la presencia del lipopolisacárido, generalmente referido como endotoxina, el cual resulta pirogénico en humanos y otros mamíferos. Las proteínas utilizadas con este fin deben ser purificadas en un segundo paso para eliminar este compuesto, lo cual genera un incremento del costo de producción [34]. Más allá de este inconveniente, varias cepas no patogénicas de *E. coli* de uso común como la BL21 y K12 son consideradas inocuas o GRAS (del inglés, Generally Recognized As Safe) por la FDA (del inglés, Food and Drug Administration).

Por último, otra deficiencia de la sobre-expresión en este sistema es que muchas proteínas forman agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*. Las proteínas que los conforman

generalmente se encuentran inactivas, están parcialmente plegadas y además suelen mostrar artefactos estructurales como puentes disulfuro no nativos, tanto intra como intermoleculares [35]. Diversas estrategias pueden ser utilizadas para evitar la formación de estos agregados como el cultivo a menor temperatura, la co-expresión de chaperones moleculares, fusiones de proteínas o sustitución de aminoácidos mediante ingeniería genética [36, 37].

### **Sistemas de chaperonas moleculares**

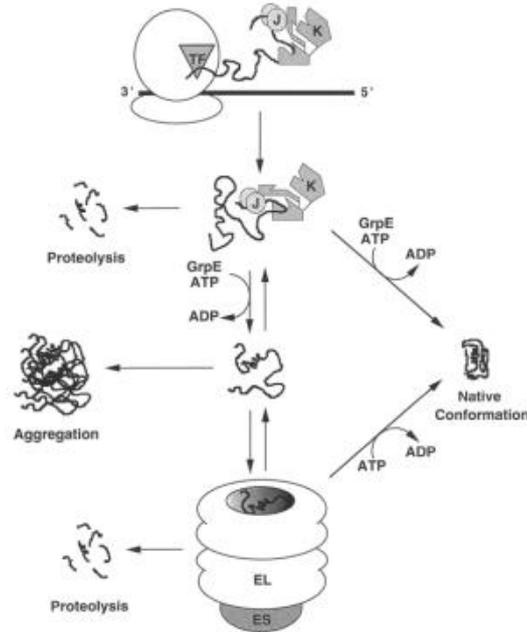
Los moduladores de plegado mejor caracterizados en el citoplasma de *E. coli* son los sistemas de chaperones moleculares DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES. Ambos conjuntos de chaperones pertenecen al regulon  $\sigma$  de shock térmico, un grupo de 20-30 chaperones moleculares, proteasas y otras proteínas asociadas al shock térmico (hsps) que están presentes en niveles relativamente abundantes bajo condiciones normales de crecimiento. La transcripción de las hsps se sobre- expresa transitoriamente cuando las células se someten a aumento de temperatura u otras formas de estrés, incluyendo la sobreproducción de proteínas recombinantes.

Una serie de estudios [38, 39] indica que DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES forman una red cooperativa de plegado de muchas proteínas, como se ilustra en la Figura 5. Tanto DnaK como GroEL se unen y liberan sustratos proteicos de una manera dependiente de ATP que está coordinada por interacciones con los cofactores DnaJ-GrpE o GroES, respectivamente. DnaJ (J) se une a polipéptidos nacientes que emergen del ribosoma, y dirige a las proteínas recién sintetizadas al reconocimiento por DnaK (K). DnaK-DnaJ exponen las regiones hidrofóbicas de la cadena polipeptídica, evitando así las interacciones

improductivas con otros intermediarios y componentes celulares. La unión del factor de intercambio de nucleótidos GrpE a DnaK cataliza la liberación de la proteína unida que puede plegarse en su conformación nativa, ser transferidos al sistema de chaperonas GroEL-GroES (EL y ES, respectivamente); o quedar mal plegado y agregarse.

Se cree que las chaperoninas GroE facilitan la isomerización productiva de proteínas que ya han alcanzado una conformación intermedia compacta [40-43]. Si la proteína descargada del complejo GroE es incapaz de plegarse en su conformación nativa, puede experimentar otro ciclo de interacción con el sistema de chaperonas o agregarse. Si el plegado adecuado no se puede lograr después de varios ciclos de interacción con chaperonas, DnaK-DnaJ-GrpE o GroEL-GroES pueden presentar sus sustratos a la maquinaria de proteasa celular [44].

Se demostró que el factor desencadenante (TF, Trigger Factor), una proteína que se une a los ribosomas y las cadenas polipeptídicas nacientes posee una actividad peptidil-prolil-cis/trans isomerasa. Existe evidencia que sugiere que el factor desencadenante actúe como un catalizador de plegado general co-transduccional y estabilice las proteínas nacientes antes de su transferencia a las chaperonas [45, 46].



**Figura 5:** Modelo propuesto para el plegamiento de proteínas asistido por chaperones en *E. coli*. [47]

### **CULTIVO DE *E. COLI* DE ALTA DENSIDAD DE CÉLULAS.**

Los procesos de fermentación pueden clasificarse en tres grupos: continuos, semicontinuos o en lote alimentado, y en lote o cultivos cerrados.

En los procesos en lote, todos los nutrientes del medio de cultivo a utilizar están presentes en el tanque de fermentación al inicio del proceso. En estos casos solo se agregan al medio de cultivo gases, como oxígeno y dióxido de carbono y ácidos o álcalis para mantener el pH en el valor deseado [48].

En los procesos continuos los nutrientes son continuamente agregados al tanque de fermentación mientras que los productos son extraídos también en forma continua. En este tipo de fermentaciones los caudales de entrada y salida son generalmente iguales de modo que se trabaja a volúmenes constantes [48].

Los denominados procesos en lote alimentado combinan los elementos antes descritos. En estos casos, una concentración inicial de nutriente se agrega al tanque al inicio del proceso. Durante esta primera etapa el cultivo es un proceso en lote donde el microorganismo crece a su máxima velocidad de crecimiento específico. En una segunda etapa uno de los nutrientes, generalmente la fuente de carbono, es agregado a la velocidad deseada para regular la velocidad de crecimiento. El producto es recogido al final del proceso [48].

En los cultivos en lote es posible alcanzar 5-10g/L de peso seco de células, mientras que en los cultivos de lote alimentado se pueden alcanzar concentraciones mayores a 50g/L de peso seco. Además en este último caso, los rendimientos volumétricos de las proteínas recombinantes pueden ser mejorados controlando la velocidad de crecimiento específica. [49, 50]

Se ha detectado que muchos componentes del medio de cultivo se convierten en inhibitorios para *E.coli* cuando son agregados a altas concentraciones [50]. Ejemplos de estos nutrientes son: la glucosa a una concentración de 50 g/L, el amonio a 3 g/L, el hierro a 1,15 g/L, el magnesio a 8,7 g/L, el fosforo a 10 g/L y el zinc a 0,038 g/L. [51].

Pueden además generarse concentraciones inhibitorias de productos. En el mecanismo mas estudiado, las concentraciones inhibitorias de productos secundarios metabólicos se generan cuando la glucosa se encuentra en exceso en el medio. Este monosacárido es metabolizado por *E. coli* a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas a piruvato. En condiciones aeróbicas, el piruvato es transformado en acetil-CoA por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa y este compuesto es luego incorporado al ciclo de los ácidos

tricarboxílicos [50, 52]. En presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, *E. coli* acumula grandes cantidades de acetil-CoA debido a la saturación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena de transporte de electrones. El exceso de acetil-CoA es metabolizado a acetil fosfato y posteriormente a acetato, en reacciones catalizadas por las enzimas acetato kinasa y fosfotransacetilasa respectivamente. El acetato se protona en el interior de la célula y atraviesa la membrana plasmática, esto ocasiona la pérdida del gradiente protomotriz necesario para la síntesis de ATP; lo que finalmente produce la detención del crecimiento [53].

La inhibición del crecimiento por acetato puede ser producida por varias fuentes de carbono. Esto explica por qué no puede mejorarse sustancialmente el rendimiento de un cultivo en lote por medio del simple incremento de la concentración de nutrientes en el caldo de cultivo.

El control de la velocidad de crecimiento mediante la regulación del suministro de sustratos permite controlar la velocidad de consumo de otros nutrientes, incluido el oxígeno y la generación de calor. En particular la concentración de oxígeno disuelto puede convertirse rápidamente en una limitante en el crecimiento a altas densidades de células, como resultado de la limitación en la transferencia de masa.

### Métodos de alimentación

Existen diversos métodos de suministro de la fuente de carbono que permiten mantener la concentración de acetato en bajos niveles. Estos métodos están basados en modelos matemáticos que describen patrones de crecimiento y la demanda de nutrientes esperada. [27]. Se han utilizado estrategias simples de

alimentación, tales como la alimentación a velocidad constante, una alimentación que se incrementa linealmente, o la alimentación exponencial, para obtener exitosamente altas densidades celulares en *E. coli* [54-56]. La alimentación exponencial permite que las células alcancen una velocidad de crecimiento específica constante utilizando fuentes de carbono como nutriente limitante del crecimiento [27].

Se ha determinado que la formación de ácido acético puede minimizarse controlando la velocidad de crecimiento específica por debajo de un cierto valor ( $\mu=0,35 \text{ h}^{-1}$  en el caso de utilizar medios mínimos) [27]. En estos procesos la concentración de la fuente de carbono en el cultivo se mantiene cerca de cero durante la alimentación exponencial, y por lo tanto, no perturba el metabolismo del carbono en las células.

Se han desarrollado otros métodos de alimentación con control de retroalimentación. El método de pH o OD-stat se basa en la detección de cambios en el pH o el OD cuando la fuente de carbono principal se agota en los medios de cultivo. El incremento en el pH o el OD debido al agotamiento de la fuente de carbono, indica que una cantidad predeterminada de solución de alimentación debe ser agregada al biorreactor. Estos métodos controlados por retroalimentación proporcionan una gran ventaja, la de prevenir la sobrealimentación que lleva a la formación de acetato [57-59].

La selección de una estrategia óptima de alimentación post-inducción es muy importante para la producción eficiente de proteínas recombinantes, en el caso de utilizar un sistema de expresión inducible [56]. La productividad de una proteína recombinante varía dependiendo de la cepa huésped de *E. coli* y del tipo de proteína recombinante a producir, por lo que no existe una regla general

en la selección de una estrategia de alimentación adecuada para producir una proteína dada y garantizar su máxima productividad.

### **SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE GENES HETERÓLOGOS EN *E. COLI*.**

En los cultivos de alta densidad de células de *E. coli* recombinante, la máxima productividad a menudo se logra cuando el crecimiento y la producción se separan temporalmente [49]. En cultivos alimentados, la separación de las fases se puede lograr retrasando el tiempo de inducción hasta que la densidad de células alcance un valor adecuado. Se han desarrollado muchos promotores que pueden ser inducidos por diversos mecanismos tales como cambio de temperatura (pL y pR) [60], cambio de pH o la adición de inductores químicos. Entre los promotores inducibles, los más frecuentemente usados son los derivados de T7 o lac: pTAC [61], pTRC [62], pLAC [63], y pT7 [64], inducidos por el agregado de IPTG o lactosa. Dentro de los promotores inducibles también se encuentra el pBAD, que contiene el promotor del operón que codifica para la enzimas que metabolizan L-arabinosa asociado a su activador transcripcional *araC* [64].

### **BIOLOGÍA SINTÉTICA**

Desde hace varios años, nuevos desarrollos tecnológicos han permitido que el ADN pueda ser sintetizado en forma eficiente y económica. Por otra parte, las secuencias de ADN pueden obtenerse más fácilmente en forma digital que en forma física ya que las mismas se encuentran disponibles en diversas bases de datos. Debido a estos adelantos tecnológicos, el uso de ADN sintético se ha

expandido rápidamente en los últimos años para constituirse en el pilar fundamental de una disciplina denominada “biología sintética” [65-68].

La biología sintética es una disciplina emergente que tiene como objetivo crear organismos nuevos con circuitos genéticos de diseño. [69]. Contribuye fuertemente al avance de la ingeniería genética reduciendo los tiempos de desarrollo de organismos modificados con respuestas predecibles. De esta manera, el progreso realizado en este campo permite no sólo el diseño y la obtención de organismos capaces de producir novedosos compuestos sino también la optimización de los rendimientos de procesos de producción existentes, generando como consecuencia una disminución en los costos de manufactura [70, 71].

## **OPTIMIZACION DEL USO DE CODONES**

Las variaciones especie-específicas en el uso de codones a menudo se citan como una de las principales causas que afectan a los niveles de expresión de proteínas [72, 73]. La presencia de codones raros, que se correlacionan con los bajos niveles de sus especies de tRNAs en la célula, puede reducir la eficiencia de la traducción e incluso inducir errores en la misma con un impacto significativo en la economía del proceso de producción [74, 75].

A pesar de que un gran número de genes han sido rediseñados para aumentar su nivel de expresión [76-78] el diseño de un gen para la expresión óptima requiere elegir entre un gran número de posibles secuencias de ADN. Típicamente, se han utilizado dos estrategias para la optimización de codones. La primera, conocida como "un codón-un aminoácido", asigna el codón más

abundante del huésped o de un conjunto de genes seleccionados, a todos los aminoácidos en la secuencia a expresar [73]; [79]. La segunda estrategia, "randomización de codones", utiliza tablas basadas en la distribución de frecuencias de los codones en un genoma completo o un subconjunto de genes altamente expresados, otorgando un peso a cada codón. En este caso, los codones se asignan al azar con una probabilidad dada por su peso [79, 80]. Varios resultados obtenidos por nuestro y otros grupos de trabajo [15, 71, 81-85] indican que el método "randomización de codones" es una estrategia superior para la optimización de codones.

## **ENZIMAS TERMÓFILAS**

Los componentes celulares de organismos termófilos (enzimas, proteínas y ácidos nucleicos) son, naturalmente, termoestables. En general, además de la alta temperatura, también resisten condiciones de desnaturalización generadas por condiciones extremadamente ácidas y alcalinas [86, 87]. Las enzimas termoestables tienen un importante potencial para muchas aplicaciones industriales. Se está estudiando ampliamente el uso de tales enzimas para optimizar procesos químicos en la industria de alimentos, papel, detergentes, fármacos y eliminación de residuos tóxicos. Las enzimas se pueden producir a partir de organismos termófilos a través de su fermentación optimizada o mediante la clonación de los genes correspondientes en microorganismos mesófilos de rápido crecimiento mediante la tecnología del ADN recombinante [88]. Sin embargo la transferencia de los genes codificantes de las enzimas de organismos extremófilos debe sufrir ciertas modificaciones para ajustarse a la

maquinaria de expresión del microorganismo productor. Entre estas modificaciones se encuentra la optimización del uso de codones [89].

Existe una demanda creciente de nuevas enzimas termoestables con un rendimiento mejorado y / o nuevas funcionalidades que proporcionan ahorros en tiempo, dinero y energía para procesos industriales químicos y otras aplicaciones biotecnológicas industriales o "blancas" [90].

### **LISIS CELULAR.**

*E. coli* presenta una gran desventaja como hospedador de proteínas heterólogas, ya que por lo general no secreta altos niveles de proteína al medio de cultivo. La ingeniería genética de las células se ha aplicado con éxito para aumentar el título de la proteína recombinante durante la fase de cultivo. Sin embargo, el aumento en el título no siempre se puede transferir directamente al producto final debido a dificultades que surgen durante el procesamiento del cultivo. Así, el cuello de botella de las mejoras en la productividad suele estar en el procesamiento o downstream de los cultivos [91].

### Técnicas actuales de disrupción celular

La disrupción celular puede conseguirse mediante una diversidad de operaciones [92, 93], y los métodos disponibles pueden clasificarse en mecánicos y no mecánicos.

En algunos casos, los mismos pueden combinarse para aumentar la eficiencia global de la disrupción [94, 95]. Los métodos mecánicos incluyen molinos de perlas, homogeneizadores de alta presión y cavitación (Harrison 1991). Los

métodos no mecánicos incluyen tratamientos químicos, lisis celular usando enzimas, tratamiento térmicos o alcalinas, choque osmótico, ciclos de congelación/descongelación o la ingeniería celular usando genes estrictamente regulados, como el gen 'Kil' [96]. La proteína Kil es una bacteriocina, o toxina bacteriana. La expresión plasmídica regulada del gen *kil* provoca la liberación específica de las proteínas periplasmáticas al medio celular sin causar la muerte de la célula [97]. Steidler y Fiers [98] describieron un sistema para la liberación controlada de proteínas periplasmáticas de *E. coli* aplicable a todas las cepas, basado en la inducción de gen *kil* clonado bajo del promotor pL del fago  $\lambda$ .

### Técnicas utilizadas a gran escala

Aunque se dispone de una variedad de técnicas para la liberación de productos intracelulares, los procesos de escala comercial utilizan principalmente los métodos mecánicos en comparación con los no mecánicos, ya que estos últimos tienen limitaciones económicas para su escalabilidad. Los molinos de perlas y los homogeneizadores de alta presión tienden a utilizarse en gran escala, mientras que otros métodos no mecánicos se utilizan en escala de laboratorio, con excepciones como la lisis por calor.

Las desventajas del uso de molinos de cuentas y homogeneizadores incluyen una liberación no selectiva del producto (es decir, la co-liberación de contaminantes), el considerable gasto de energía y la micronización de los desechos celulares.

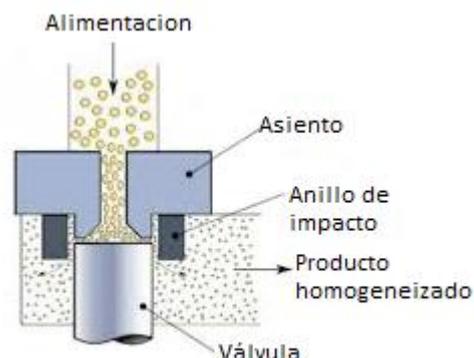
Los métodos químicos y enzimáticos se han limitado a la escala de laboratorio debido principalmente a los costos de las enzimas necesarias para la lisis a gran escala, pero también debido a las dificultades en la eliminación de los

productos químicos exógenos o a la desnaturalización potencial del producto de interés en la exposición a productos químicos específicos [99].

- **Homogeneizadores de alta presión**

El homogeneizador de alta presión ha sido utilizado para romper células bacterianas por muchos años [93]. Con la excepción de microorganismos filamentosos, este método es el adecuado para una amplia variedad de bacterias y levaduras. [32, 100, 101].

El diseño básico del homogeneizador consiste en una bomba de desplazamiento positivo que fuerza a una suspensión de células a pasar a través del centro de un asiento de válvula y radialmente a través de la cara del asiento (Figura 6). La presión se controla ajustando la fuerza sobre la válvula, que es de resorte o de control hidráulico. El fluido fluye radialmente a través de la válvula y golpea un anillo de impacto. La suspensión sale entonces del conjunto de la válvula y fluye a una segunda válvula o a una descarga.



**Figura 6:** Esquema de un homogeneizador a alta presión.

- **Termólisis**

Las especies hipertermófilas representadas por bacterias y arqueas crecen óptimamente a temperaturas entre 80 y 110 °C. Las enzimas de estos organismos (enzimas hipertermófilas) son más rígidas que sus homólogas mesófilas, con propiedades de estructura-función únicas como alta termoestabilidad y actividades óptimas a temperaturas por encima de 70 °C [102].

La termólisis a gran escala es utilizada cada vez con mayor frecuencia, especialmente para la liberación y purificación de proteínas recombinantes provenientes de organismos termófilos. En esta técnica, las bacterias Gram negativas tales como *E. coli* se calientan a 50-55°C para disrumpir la membrana externa y liberar proteínas periplásmicas. Las proteínas citoplasmáticas también pueden liberarse pero a temperaturas más altas. Las proteínas citoplasmáticas de bacterias se liberan al medio luego de aproximadamente de 10 minutos de tratamiento a 90°C, dependiendo del tipo de organismo y de su fase de crecimiento [103]. Se observó un incremento en la cantidad de proteínas en el medio cuando las células fueron crecidas hasta fase estacionaria con respecto a las proteínas de células en fase exponencial, tanto para cultivos de *E. coli*, como de *B. megaterium* [104]. Los resultados también dependen de la temperatura de almacenamiento previo a las lisis. Una preincubación a bajas temperaturas, por ejemplo 0-5 °C, conduce a una resistencia incrementada al tratamiento térmico en *E. coli*. Esto se debe a cambios en la composición de ácidos grasos en las membranas bacterianas.

La técnica tiene varias ventajas para su uso a escala industrial. Primero, se elimina al hospedador, evitando así la liberación de organismos recombinantes al medio ambiente. Segundo, se logra la desnaturalización de proteasas, dando

lugar a una mayor estabilidad del producto. En tercer lugar, la mayoría de la proteínas contaminantes se desnaturalizan y precipitan, por lo que pueden separarse fácilmente del producto final, el cual se mantiene soluble [104].

La arquea termofílica *Thermococcus litoralis* crece en el rango de temperaturas de 55-100°C siendo la temperatura óptima entre 85-88°C. El gen sintético de *egasa1* proveniente de *T. litoralis* fue clonado en *E. coli* y codifica para una  $\beta$ -glucosidasa termofílica, utilizada en este trabajo para hidrolizar EG. Debido a que esta enzima tiene un gran valor potencial para uso industrial, el desarrollo de un bioproceso sencillo y económico para la producción de esta esterilglucosidasa termofílica es un requisito esencial [105, 106].

## **EXTRACCION DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA CON DETERGENTES**

Las proteínas de membrana requieren la utilización de detergentes para su extracción y solubilización. Los detergentes son moléculas anfipáticas, como tales, son capaces de interactuar tanto con agua como con lípidos.

Cuando se agrega detergente a un cultivo de bacterias que ha sido procesado con un homogeneizador, el detergente se une a la membrana lipídica hasta que se alcanza la saturación en la relación tensioactivo/lípido. La adición de más tensioactivo conduce a la formación de micelas mixtas que contienen lípidos de membrana. Esto continúa hasta que todo el lípido está contenido dentro de las micelas. La adición de surfactante, más allá de este punto, conduce a la formación de micelas de surfactante.

Las interacciones proteína-tensioactivo también son descritas por una serie de pasos que conducen a una proteína recubierta de surfactante. Los resultados

son dependientes de la concentración del detergente y varían de acuerdo con la concentración micelar crítica del detergente [107]

Además, las proteínas de membrana tienden a formar agregados incluso en presencia de detergentes, lo cual reduce la eficiencia de todas las técnicas separativas [93]. Es por eso que resulta esencial la selección de un detergente que solubilice pero no resulte desnaturizante para la proteína.

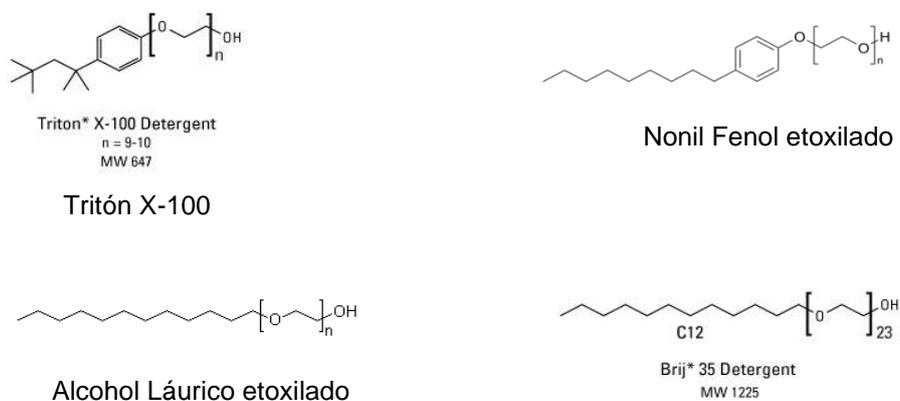
Existe una importante variedad de detergentes capaces de solubilizar las membranas celulares.

Los detergentes pueden ser clasificados con respecto a sus porciones hidrofóbicas o hidrofílicas. Las estructuras hidrofílicas de los detergentes pueden ser no iónicas (Brij y Triton X), aniónicas (SDS), catiónicas (tetra alquilo sales de amonio) o zwitteriónicas. Los detergentes no iónicos son los más usados en la purificación de proteínas de membranas.

La porción hidrofóbica puede ser clasificada con respecto a su tamaño y flexibilidad. Los más flexibles son los hidrocarburos lineales de diversos largos de cadena (típicamente entre 8 y 16 C). Dentro de los detergentes con cadenas alquílicas lineales, aquellos con las cadenas más largas tienen mayor tendencia a actuar como agentes desnaturizantes. Los menos flexibles son hidrocarburos ramificados y aromáticos (Triton) y anillos alifáticos (Tween).

El índice HLB (del inglés Hydrophilic-Lipophilic Balance) de un detergente es una medida del grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad. Existe una escala arbitraria de valores para clasificar a los tensoactivos entre lipófilos, con valores de HLB bajos (de 1-9), e hidrófilos, con valores de HLB altos (10-18) [108]

La mayoría de las proteínas se desnaturalizan con detergentes iónicos como SDS mientras que Triton X-100 y otros detergentes no iónicos generalmente se utilizan para solubilizar proteínas integrales de membrana sin una pérdida de actividad. Particularmente el Triton X-100 actúa específicamente sobre la membrana citoplasmática de *E. coli*, ya que la membrana externa es muy resistente a la solubilización con este detergente [109]. En la Figura 7 se pueden observar las estructuras químicas de algunos de los detergentes no iónicos.



**Figura 7:** Estructura química de los detergentes Tritón X-100, Nonilfenoletoxilado (NF), Alcohol láurico etoxilado y Brij\*35.

Como ejemplo se puede mencionar la extracción de la  $\beta$ -glucosidasa de membrana (BGPh) de *Pyrococcus horikoshii*, una proteína 92% homóloga a EGasa1, la cual es solubilizada con 2,5% del detergente no iónico Tritón X-100. [23]

## BIOCATÁLISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

La biocatálisis, también conocida como catálisis enzimática o biotransformación, es el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas. El

campo de la biocatálisis sigue creciendo mientras los químicos se esfuerzan por encontrar procesos más eficaces y sustentables, con una concomitante reducción de costos [88].

Si bien los medios acuosos son los medios tradicionales para las biocatálisis, desde hace unos años se comenzaron a utilizar medios orgánicos [110].

El uso de medios orgánicos en la biocatálisis va en continuo aumento para diversas aplicaciones. Muchos procesos biocatalíticos difícilmente pueden realizarse en soluciones acuosas, debido a las extremadamente bajas solubilidades de los sustratos, y el desplazamiento del equilibrio de reacción en agua.

Sin embargo, los solventes orgánicos pueden actuar como desnaturalizantes y esto juega un papel fundamental en la falta de aceptación de esta tecnología. Las enzimas pueden desactivarse irreversiblemente tras la exposición por corto tiempo a sustancias químicas orgánicas (disolventes orgánicos miscibles en agua). Además, la tasa de transferencia de masa en sistemas disolventes inmiscibles en agua puede ser baja debido a la pequeña área interfacial agua/sustancia orgánica, la que puede ser aumentada con condiciones de agitación intensivas, aunque nuevamente provocan un incremento en la desnaturalización de las enzimas. Debido a este conjunto de características el uso de biocatalizadores en estos ambientes se encuentra limitado.

Sin embargo, surgen como alternativas las enzimas de extremófilos, que muestran actividad y estabilidad a temperaturas extremas, baja actividad de agua y alta presión hidrostática. Así, los medios acuosos/orgánicos y no acuosos permiten la modificación de los equilibrios de reacción y la

especificidad enzimática, permitiendo nuevos mecanismos para sintetizar o hidrolizar compuestos [111].

# Objetivos

## Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis es desarrollar un método de manufactura de alta eficiencia para la enzima EGasa1 utilizando un proceso de fermentación a un costo que haga viable su implementación industrial. De esta manera, se espera que el proceso enzimático de limpieza e biodiesel sustituya el precario método de almacenamiento en tanques, a fin de producir un biodiesel de calidad superior sin un incremento de costo adicional para los productores.

## Objetivos específicos

1. Desarrollar un sistema de expresión eficiente de EGasa1 en *E. coli*.
  - ♥ Rediseñar el gen que codifica para la EGasa1 optimizando el uso de codones a fin de maximizar su expresión en *E. coli*.
  - ♥ Evaluar la expresión del gen utilizando una batería de promotores de distinta fuerza.
  - ♥ Evaluar la co-expresión de sistemas de chaperonas moleculares a fin de obtener altos niveles de proteína de la fracción soluble.
  
2. Desarrollar un proceso de crecimiento a altas densidades celulares
  - ♥ Seleccionar la fuente de carbono óptima y más económica para los procesos en lote alimentado.
  - ♥ Reformular el medio mínimo utilizado para los cultivos de alta densidad de *E. coli*.

- ♥ Analizar el perfil de los caudales de alimentación post-Inducción típicamente usados: flujo constante y flujo lineal.
  - ♥ Determinar la relación carbono-nitrógeno en la solución de alimentación post-Inducción.
  - ♥ Escalar el proceso de producción a 1000L.
3. Desarrollar un método para la recuperación de EGasa1.
4. Determinar las condiciones óptimas para la hidrólisis de EG en biodiesel.
- ♥ Escalar el tratamiento enzimático.
  - ♥ Analizar la calidad del biodiesel a través de pruebas internacionales.



# **Materiales y Métodos**

## GENERAL

Las enzimas se obtuvieron de New England Biolabs (USA) y se utilizan como recomienda el proveedor. Para la propagación del plásmido durante las etapas de clonado se utilizó *E. coli* Top10 (Invitrogen), *E.coli* BL21 (DE3) o *E.coli* BL21 (AI) para la expresión de proteínas recombinantes. Las cepas de *E. coli* se hicieron competentes químicamente con un kit de Zymo Research (EE.UU.). Las concentraciones de kanamicina y cloranfenicol utilizadas fueron 50 mg/L y 20 mg/L, respectivamente.

Para detectar actividad  $\beta$ -galactosidasa en medios sólidos se utilizó el indicador X-Gal a una concentración igual a 40 mg /L.

## MEDIOS DE CULTIVO

Las distintas cepas de *E. coli* fueron cultivadas en los medios que se describen a continuación.

### Medio Luria-Bertani (LB) [112]

Triptona 10,0 g /L

Extracto de levadura 5,0 g /L

NaCl 5,0 g /L

### Medio de fermentación HM [113]

Glucosa 20,0 g /L

Extracto de levadura 0,5 g /L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4,0 g /L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20,8 g /L

KOH 3,25 g /L

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  3,0 g /L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,0 g /L

Elementos trazas 3,0 mL/L

### Fantasia (En este trabajo)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  27,8 g /L

NaCl 2,32 g /L

Elementos trazas 3,0 mL/L

Composición de elementos trazas en g/L: HCl 5 M:  $\text{FeSO}_4$  10,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  5,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.

Para la elaboración de medios sólidos se trabajó con las mismas composiciones de nutrientes agregándose agar al 2%.

## **GENES SINTÉTICOS**

Los genes sintéticos utilizados en este trabajo fueron provistos por Genescript (NJ, USA).

## **CONSTRUCCIÓN DE VECTORES**

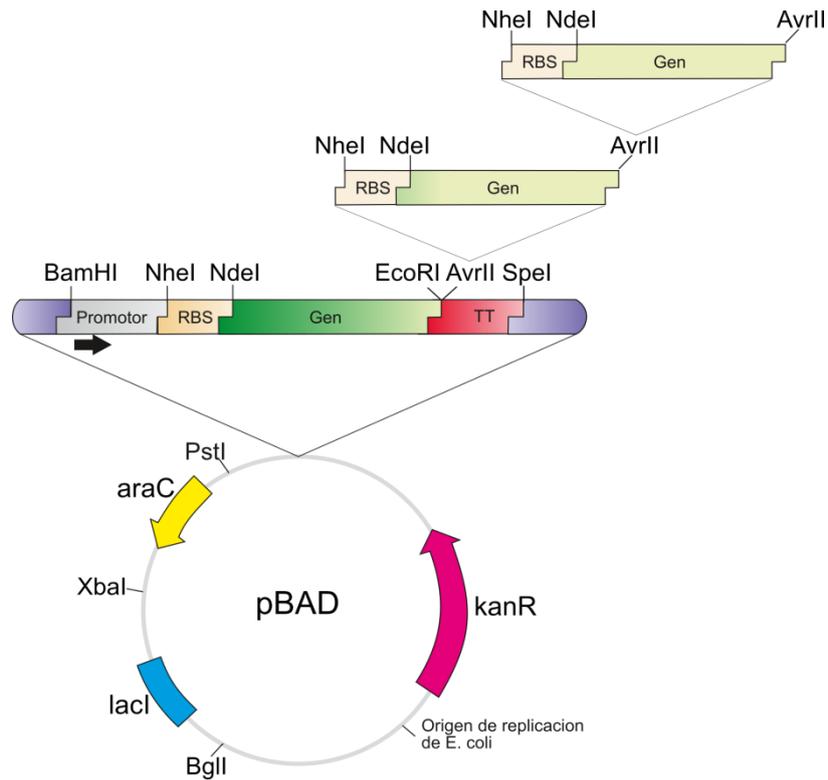
Construcción de plásmidos con diferentes promotores

Los vectores de expresión construidos se basaron en el plásmido pET24a (Novagen), y las regiones promotoras se integraron en la misma ubicación en todos los casos. Los cebadores de PCR usados para amplificar las regiones promotoras se describen en la Tabla 2. Los productos de la PCR y el vector pET24a fueron digeridos con *Bgl*II y *Nde*I y se ligaron para generar todos los vectores de la serie pKCN. El gen sintético de EGasa1 (WP\_011011560.1) de *T. litoralis* se insertó en cada vector con los diferentes promotores entre los sitios de restricción *Nde*I y *Hind*III. Los plásmidos resultantes se listan en la Tabla 3.

#### Construcción de operones en el vector pKCN-BAD

Como se observa en la Figura 8 el vector pKCN-BAD permite la rápida construcción de operones. Estos se obtuvieron mediante el clonado de un gen en los sitios *Nde*I-*Eco*RI, posterior escisión del fragmento *Nhe*I-*Avr*II y ligación en el sitio *Avr*II de otro vector. Una digestión con *Nhe*I y *Avr*II genera extremos cohesivos compatibles, por lo tanto, una ligación en orientación correcta permite obtener un operón donde el sitio *Avr*II es restituido, de manera que puede utilizarse en forma recursiva para la inserción de genes adicionales.

De esta manera se construyó una serie de vectores que incluyen a *egasa1* y otros genes accesorios en diferentes combinaciones. (Tabla 3)



**Figura 8:** Representación esquemática de la estrategia de clonado utilizada para construir los operones en pBAD.

Nombre	Secuencia (5'--- 3')	Referencias
Cp8fwBgIII	AGGAGATCTCATTCTTTAGTTTA	[114]
Cp8revNdel	AGGCATATGAACAGTACTCACCT	
LacfwBgIII	AGGAGATCTTAACCAGGCTTTAC	[115]
LacrevNdel	AGGCATATGGGATCCTTCCACAC	
TacfwBgIII	AGGAGATCTGACTTCATATACCC	[116]
TacrevNdel	AGGCATATGGGATCCATTATACG	
BADfwBgIII	AGGAGATCTCTGACGCTTTTTAT	Thermo Fisher Scientific
BADrevNdel	AGGCATATGCAGTAGAGAGTTGC	
T5fwBgIII	AGGAGATCTTAAAATTCAAAA	[117]
T5revNdel	AGGCATATGGGATCGAATCT	
T710%fwBgIII	AGGAGATCTGAATTCGAAATTAATACGG	[118]
T710%revNdel	AGGCATATGGTACCAAGCTTTCT	
T725%fwBgIII	AGGAGATCTGAATTCGAAATTAATACGT	
T725%revNdel	AGGCATATGGTACCAAGCTTTCT	
GroESL up	GCGCATATGAATATTCGTCCATTGC	Este trabajo
GroESL do	ATTAAGCTTACATCATGCCGCCCATGCC	Este trabajo
glpF up	AGGCATATGAGTCAAACATCAACCTTGA AAGG	[119]
glpF do	AGGCCTAGGTTACAGCGAAGCTTTTTGT TCTGAAGG	
prsA up	AGACATATGCCTGATATGAAGCTTTTTG CTGG	
prsA do	ATACCTAGGTTAGTGTTCGAACATGGCA GAGATCG	
Cm pKD3 Fw SacI	AAAAGAGCTCCATGGGAATTAG	Este trabajo
Cm pKD3 Rv SacI	CGAGCTCGATTACACGTCTTG	Este trabajo

**Tabla 2:** Oligonucleótidos utilizados

Plásmidos	Propiedades Relevantes	Resistencia <sup>a</sup>	Referencias
pET24a-EGasa1sc	$P_{T7lac}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pET24a-EGasa1ec	$P_{T7lac}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-cp8-EGasa1	$P_{CP8}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-lacUV5-EGasa1	$P_{lac}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-tac-EGasa1	$P_{tac}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-BAD-EGasa1	$P_{BAD}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo

pKCN-T5-EGasa1	$P_{T5}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-T7 <sub>25%</sub> -EGasa1	$P_{T725\%}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN-T7 <sub>10%</sub> -EGasa1	$P_{T710\%}:: egasa1^b$	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
pTf16	$P_{araB}:: tig^c$	Cm <sup>R</sup>	Takara <sup>c</sup>
pG-Tf2	$P_{Pzt-1}:: groEL/ES/tig^c$	Cm <sup>R</sup>	Takara
pGro7	$P_{araB}:: groEL/ES^c$	Cm <sup>R</sup>	Takara
pG-KJE8	$P_{araB}:: dnaK/J. P_{Pzt-1}:: groEL/ES^c$	Cm <sup>R</sup>	Takara
pKJE7	$P_{araB}:: dnaK/J^c$	Cm <sup>R</sup>	Takara
pCSCx	$P_{csc}:: cscAKB$	Kan <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup>	[120]
pKCN331	$P_{csc}:: cscAKB$	Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN196	$P_{BAD}:: egasa1/groESL^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN197	$P_{BAD}:: glpF^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN198	$P_{BAD}:: prsA^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN199	$P_{BAD}:: egasa1/glpF^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN200	$P_{BAD}:: egasa1/prsA^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN201	$P_{BAD}:: egasa1/groESL/prsA^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN203	$P_{BAD}:: egasa1/groESL/glpF^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN204	$P_{BAD}:: egasa1/prsA/glpF^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN207	$P_{BAD}:: egasa1/groESL/glpF/prsA^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN246	$P_{BAD}:: egasa1/prsA/groESL^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pKCN247	$P_{BAD}:: egasa1/prsA/glpF/groESL^b$	Km <sup>R</sup>	Este trabajo

**Tabla 3.** Plásmidos

<sup>a</sup> Kan<sup>R</sup>, Resistencia a kanamicina; Cm<sup>R</sup>, resistencia a cloranfenicol, Amp<sup>R</sup>, resistencia a ampicilina.

<sup>b</sup> Los plásmidos contienen el origen de replicación de pBR322 y el en de la EGasa1 bajo control de los promotores indicados.

<sup>c</sup> Los plásmidos contienen el origen de replicación de pACYC184 y los genes que codifican chaperonas bajo control de los promotores indicados.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Cada reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50µL, utilizando 25 pmoles de cada oligonucleótido cebador y 20 ng de ADN molde. Se utilizó ADN polimerasa Taq o Pfu siguiendo las indicaciones del proveedor (Gibco, USA).

## **SECUENCIACIÓN DE ADN**

La secuenciación de las construcciones obtenidas fue realizada mediante el servicio de Macrogen (Korea).

## **PREPARACIÓN PLASMÍDICA**

Los plásmidos fueron obtenidos a partir de cultivos de *E. coli* mediante el kit de Axygen Biosciences Axy-Prep™ Plasmid Minipreps Kit.

## **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)**

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida monodimensionales utilizando equipos Miniprotean III (Bio-Rad). En todos los casos, la relación acrilamida: bisacrilamida utilizada en la preparación de los geles fue de 30:0,8. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con una intensidad de corriente constante de 30 mA. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron fijadas sumergiendo los geles en una solución de ácido acético 10% (v/v) durante 5 min y teñidas utilizando una solución de Azul de Coomassie R250 1% (p/v) en etanol:ácido acético:agua (50:10:40). Las muestras proteicas fueron incubados en baño de agua a temperatura de ebullición, (100°C) o a 37°C durante 10 min en una solución de desnaturalización conteniendo 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,1% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,5 mg/mL de azul de bromofenol, y posteriormente sembrados en los geles.

## **ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

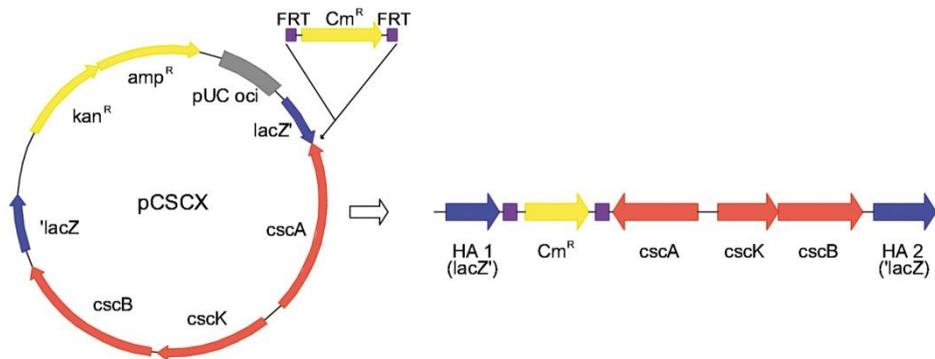
Las electroforesis de ADN en geles de agarosa se llevaron a cabo en sistemas de tipo submarino. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) según el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE (40 mM Tris-Ac pH=8, 1 mM EDTA) y luego de finalizada la corrida fueron teñidos con bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron con la misma solución, a un voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización del ADN se utilizó un transiluminador de luz UV Vilver Lourmat. Las muestras de ADN se sembraron utilizando solución de siembra (azul de bromofenol 0,25%, xilene cyanol FF 0,25%, glicerol 30%) en una proporción 6:1. Los tamaños de los fragmentos se estimaron utilizando como marcador 1Kb Ladder de New England Biolabs.

## **INTEGRACION CROMOSOMAL DEL OPERÓN CATABÓLICO DE SACAROSA EN LA CEPA INDUSTRIAL**

El plásmido pCSCx [120] posee el operon *cscAKB*, que codifica la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de la sacarosa proveniente de *E.coli* W. Estos genes están flanqueados por dos regiones del gen *lacZ*, las cuales posibilitaran la integración al cromosoma de la cepa industrial, BL21 AI, por recombinación homóloga (Figura 9).

Para llevar a cabo la integración cromosomal de este cassette con los genes del metabolismo de la sacarosa, en primer lugar se amplificó por PCR el gen Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) flanqueado por sitios FRT (FLP Recognition Target), del plásmido pKD13 [121], con los oligos Cm pKD3 Fw

SacI y Cm pKD3 Rv SacI (Tabla 2). Estos oligonucleótidos permitieron incorporar el sitio de restricción SacI. El cassette se clonó en pCSCx a través del sitio SacI entre el gen *cscA* y la región 5' de *lacZ* (Figura 9).



**Figura 9.** Transferencia del cassette que permite utilizar sacarosa a *E. coli* BL21 AI. Los genes *cscAKB* son provenientes de *E. coli* W y los mismos están bajo su promotor nativo. El cassette utilizado para la recombinación homóloga se construyó clonando el gen de la resistencia a cloranfenicol (*Cm<sup>R</sup>*) flanqueado por los sitios *FRT*, reconocidos por la FLP recombinasa en el pCSCx (creando el pKCN 331). El cassette fue integrado por recombinación homóloga en *E. coli* BL21 AI en el locus *lacZ* [120].

Del plásmido resultante, pKCN331, se amplificó la región **lacZ'-FRT-Cm-FRT-cscAKB-lacZ'** en la cual se encuentran los genes *cscAKB* y la resistencia a cloranfenicol, utilizando los oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rev, los cuales hibridan en las diferentes regiones del gen *lacZ*. El producto de PCR fue tratado con *DpnI* para degradar el molde de la reacción, y el producto de PCR fue purificado y concentrado por precipitación unas 20 veces.

La inserción se llevó a cabo según el método descrito por Datsenko [121], en la región cromosomal del gen *lacZ*.

Para ello, células de *E. coli* BL21 AI con el plásmido helper pKD46 fueron crecidas en 50 ml de medio LB con Ampicilina a 30°C hasta una  $DO_{600}$  de 0,4 y se indujeron con 10 mM de L-Arabinosa durante 1 hora, y luego se usaron para

preparar células electrocompetentes. La electroporación fue llevada a cabo con 50  $\mu$ L de células con 10-100 ng del producto de PCR purificado usando el equipo GenePulser (BioRad) y una cubeta de 1 mm a 1800 V, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Inmediatamente después se agregó 1 ml de medio LB con 0,5 % de glucosa y se incubó 2 horas a 37 °C.

La recombinación homóloga ocurrió en el gen *lacZ*, resultando en la formación de colonias resistentes a cloranfenicol (25  $\mu$ g/ $\mu$ L) y de color blanco cuando se las crece en presencia de IPTG (120  $\mu$ g/ $\mu$ L) y X-gal (80  $\mu$ g/ $\mu$ L). Estas colonias blancas fueron repicadas en placas con los antibióticos Kanamicina y Ampicilina para descartar contaminación con el plásmido molde y en placas LB con cloranfenicol a 37°C para curar el plásmido pKD46, el cual posee un origen de replicación termosensible. La cepa resultante fue llamada NK5.

Tres clones transformados independientemente fueron seleccionados para los ensayos de expresión. Previamente, la utilización de sacarosa fue verificada creciendo las cepas en medio HM suplementado con 2 % de sacarosa.

## **CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN MICROPLACAS**

Las cepas se crecieron desde los stock a -80°C en placas de LB agar, durante toda la noche a 37°C. Las colonias aisladas se usaron para inocular 5 ml de medio HM suplementado con la fuente de carbono apropiada en tubos de vidrio de 50 ml y se incubaron toda la noche a 37 °C a 200 rpm.

Se prepararon las microplacas (Thermo Fisher Scientific) agregando a cada pocillo 190  $\mu$ L de medio mínimo HM suplementado con 1 % de la fuente de

carbono apropiada en cada caso y los antibióticos necesarios, y se inocularon con 10  $\mu$ L del cultivo centrifugado y lavado dos veces con el medio HM. Las microplacas se incubaron durante 12 horas a 37 °C con agitación continua en el lector de microplacas Synergy HT, y se registraron los valores de  $DO_{600}$  cada 30 minutos.

## **CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN TUBOS**

Las cepas recombinantes de *E. coli* se crecieron a 37 °C durante toda la noche en 2 ml de LB suplementado con el antibiótico apropiado. Para los experimentos de expresión, 5 ml de medio HM, se inoculó con el cultivo centrifugado y lavado dos veces con el medio HM a una  $DO_{600}$  inicial = 0,1. El cultivo se incubó a 200 rpm, 37 °C, y la expresión de proteínas se indujo a  $OD_{600} = 1$  con 0,12 g/L isopropil  $\beta$ -D-glucopiranosido (IPTG), o 0,5 g/L (o la concentración indicada) de L-arabinosa para el promotor *araBAD*. El crecimiento se continuó durante 6 horas adicionales a 20, 25, 30, 37, 42 o 46 °C.

## **DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO**

El crecimiento microbiano fue determinado midiendo densidad óptica de una dilución de cada cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro NovaspecIII de General Electric, de modo de obtener siempre un valor entre 0.2 y 0.7 UA. Para determinar la  $DO_{600}$  se multiplicó el valor obtenido (restando el blanco) por el factor de dilución. Para determinar el peso seco se centrifugó 1 mL de cultivo

durante 1 min a 13000 rpm, se lavaron las células sedimentadas con agua destilada y luego se secaron durante 12 h a 105°C antes de pesarse. Se determinó que 1 unidad de  $DO_{600}$  era equivalente a 0,36 g PS/L.

## **DISRUPCIÓN CELULAR Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

Las células y los sobrenadantes de los cultivos en batch se separaron mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en buffer citrato 20 mM (pH 6,0), y NaCl 20 mM, en un volumen tal que la  $OD_{600}$  final = 4. Estas células se lisaron en baño de hielo-agua en un sonicador de ultrasonido GEX 600. Los extractos celulares obtenidos se separaron por SDS-PAGE como se describió anteriormente.

## **ENSAYOS DE ACTIVIDAD**

Se midió la actividad  $\beta$ -glucosidasa de cada una de las construcciones utilizando el sustrato p- nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) [15]. La mezcla de reacción se compone de 465  $\mu$ l de buffer citrato 25 mM, Tritón X-100 0,1% y NaCl 20 mM (pH 6,5), 25  $\mu$ l de pNPG 20 mM, y 10  $\mu$ l de la dilución apropiada de la muestra que contiene la enzima en el mismo buffer. Después de la incubación a 80 °C durante 5 min exactos, la reacción se detuvo por la adición de 1 ml de carbonato de sodio 200 mM frío. La actividad se estimó espectrofotométricamente mediante la lectura de la absorbancia del p-nitrofenol liberado a 405 nm ( $\epsilon = 18700/\text{mol}$ ). Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para la hidrólisis de 1  $\mu$ mol pNPG/min, bajo las condiciones del ensayo.

## FERMENTACIÓN DE ALTA DENSIDAD CELULAR

El inóculo con la cepa indicada en cada caso, se preparó en un Erlenmeyer de 1 L conteniendo 0,1 L de LB y se incubó a 37 °C y una agitación de 200 rpm. La fermentación se llevó a cabo en un fermentador de 2 L (New Brunswick Bio Flo 115 EE.UU.) con 1 L del medio indicado en cada caso. La temperatura, agitación y pH se mantuvieron a 37 °C, 1.200 rpm y 7 (mediante la adición de 25% (p/v) de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), respectivamente. La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantuvo a niveles mayores o iguales a 30% del valor de saturación con aire, enriqueciendo la corriente de aire con oxígeno puro de ser necesario. La solución de alimentación contenía 800 g/L de glicerol y 20 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 600 g/L de glucosa y 20 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , o de 500 g/L de sacarosa y 20 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . La velocidad de crecimiento específico se mantuvo a 0,25 1/h (o en los valores indicados en cada caso).

La expresión de los genes *egasa1*, *groES* y *groEL* se indujo a  $\text{OD}_{600} = 100$  mediante la adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,5 g/L. Después de la inducción, la velocidad de alimentación se mantuvo en 10 g/L/h excepto en los ensayos de optimización de la post-inducción.

## HOMOGENEIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN PARA CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD

Una vez finalizada la fermentación, las células se rompieron dos veces en hielo a una presión de 1000 bar con un homogeneizador de alta presión (GEA Niro Soavi, Panda Plus 2000).

## **PURIFICACIÓN**

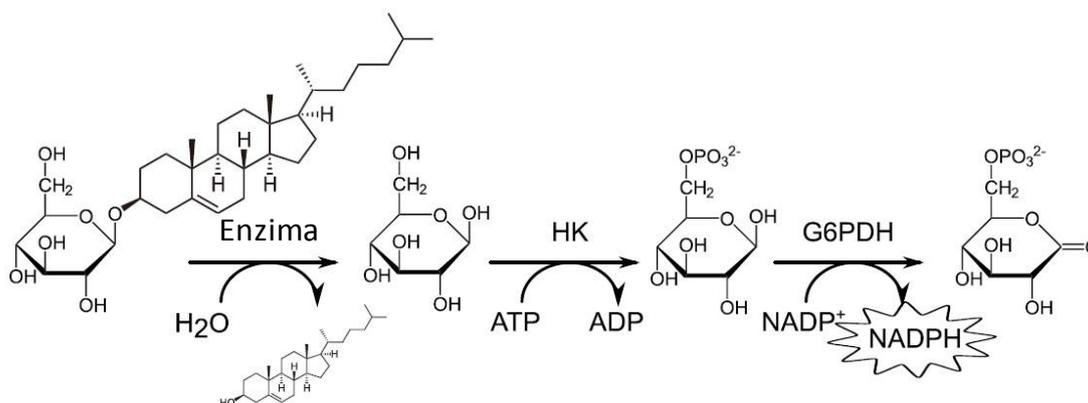
El lisado celular se calentó a 80°C durante 10-20 min y luego se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga de mesa (Eppendorf 5804R). La concentración de EGasa1 obtenida se estimó tanto por la actividad  $\beta$ -glucosidasa como por cuantificación densitométrica en SDS-PAGE usando un escáner y una curva estándar (1, 0,75, 0,5 y 0,25  $\mu$ g/pocillo) de proteína His<sub>6</sub>-EGasa1 purificada por cromatografía de afinidad (pureza > 90% por SDS PAGE) incluida en cada gel. El software ImageJ fue utilizado para realizar la cuantificación de las imágenes escaneadas.

## **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE EG EN BIODIESEL**

Se agregaron 1,95 ml de solución buffer con diferentes pHs y concentraciones a 13 g de biodiesel crudo comercial con una concentración de EG conocida, o biodiesel destilado con 100 ppm de EG, conteniendo NaCl y enzima EGasa1. La mezcla se agitó a 400 rpm en un agitador magnético VP 710 (V&P Scientific, San Diego, USA) a diferentes temperaturas para optimizar las condiciones de reacción. A diferentes tiempos de incubación, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L para la cuantificación de glucosa como indicador de la hidrolisis de EG. Las mejores condiciones de reacción determinadas se utilizaron para eliminar EG de biodiesel en ensayos en escala piloto (15 L) e industrial (20 toneladas), como se detalla en la sección Resultados.

## ANÁLISIS DE LA HIDRÓLISIS DE EG

La hidrólisis de EG fue determinada por la formación de glucosa, uno de los productos de reacción, como se describió previamente [14]. Debido a que la cantidad de glucosa liberada de los EG se particiona cuantitativamente en la fase acuosa de las emulsiones de agua/biodiesel, este método puede usarse tanto en reacciones acuosas como en agua/biodiesel. La glucosa se convirtió a 6-fosfatogluconato en una reacción enzimática acoplada (hexoquinasa, Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) como se muestra en la Figura 10, con formación de NADPH, el cual se determinó fluorométricamente a 340 nm en un lector de microplacas Synergy 2 (BioTek). La curva de calibración fue obtenida con cantidades conocidas de glucosa.



**Figura 10:** Esquema de la reacción enzimática acoplada para la cuantificación del grado de hidrólisis de EG por EGasa1.

La hidrólisis de EG también fue analizada por SPE-GC-FID basada en la determinación anteriormente descrita [14]. Las muestras de biodiesel fueron suplementadas con 50 ppm de colesteril glucósido (Sigma 28609) como patrón interno.

## **PRUEBAS DE CALIDAD DE BIODIESEL**

Se realizaron las pruebas de Contaminación Total (TC), prueba de filtración en frío (del inglés Cold Soak Filtration Test, CSFT), tendencia al bloqueo de filtros (Filter Blocking Tendency, FBT), y la tendencia de bloqueo de filtros en frío (Cold Soak Filter Blocking Tendency, CSFBT) de acuerdo con los procedimientos descritos en la norma EN 12662, ASTM D7501, ASTM D2068 y CAN/CGSB-3.524-2011, respectivamente, en un laboratorio acreditado basado en la norma ISO 17025. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

# **Resultados y Discusión:**

## **CAPÍTULO 1**

## INTRODUCCION

Las enzimas de microorganismos termofílicos juegan un rol cada vez más importante en biología molecular y en aplicaciones industriales [122]. Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación del DNA en los últimos años, se evidencia un incremento en los genomas secuenciados de bacterias extremófilas termofílicas [123] y como consecuencia también se ve aumentada la producción de proteínas recombinantes de organismos termofílicos en hospedadores mesófilos,

Se debe tener en cuenta que ambas especies presentan diferentes usos de codones, por lo que resulta fundamental recurrir a la biología sintética a fin de rediseñar los genes, para que puedan ser expresados exitosamente en los microorganismos mesófilos.

*E. coli* es uno de los organismos procariontas más extensamente usados para realizar manipulaciones genéticas y subsecuentes producciones a gran escala de diversos productos. Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas recombinantes en el citoplasma de *E.coli* puede resultar en la formación de agregados insolubles, los cuales representan la principal limitante en la producción de proteínas recombinantes en este microorganismo [28, 33, 124]. La obtención de productos biológicamente activos a partir de agregados insolubles se lleva a cabo utilizando agentes caotrópicos, seguido de dilución o diálisis en buffers de replegado apropiados. Sin embargo, la compleja optimización de los procesos de replegado, en general, no provee grandes rendimientos [125]. De esta manera, maximizar la expresión de las proteínas recombinantes en una forma soluble y activa *in vivo* es una condición que genera un gran impacto en la economía de estos procesos. Desde una

perspectiva industrial, los bajos rendimientos y altos costos de recuperación de un producto obtenido desde una fuente microbiana no son aceptables, y se deben explorar las condiciones en las cuales el balance entre la producción y la fisiología del hospedador maximicen el rendimiento del producto. En la literatura se describen diversos enfoques para evitar la formación de agregados insolubles. Algunos de estos métodos incluyen la modificación de las condiciones de cultivo, el cambio del hospedador y el uso de proteínas de fusión [126]. Por otra parte, el uso de chaperonas moleculares ha sido extensamente utilizado para catalizar el plegamiento de proteínas. Los efectos de la co-expresión de chaperonas moleculares *in vivo* sobre la solubilidad de proteínas blanco han sido ampliamente reportados [127-132]. Sin embargo, el éxito de la co-expresión de las chaperonas depende de las afinidades relativas de los sistemas de chaperonas con las proteínas parcialmente plegadas, y de la cinética de agregación de esas especies. Por lo tanto, es necesario ajustar la expresión tanto de la proteína de interés como del sistema de chaperonas para aumentar la cantidad proteína soluble.

En la primera etapa de este trabajo se describe la utilización de diferentes estrategias con el objetivo de mejorar la producción de EGasa1 en *E. coli*, basadas en modificaciones en el rediseño del gen codificante, la mejora del sistema de expresión, la co-expresión de chaperones moleculares y la optimización de condiciones de proceso/crecimiento.

## RESULTADOS

### ***Optimización de la expresión de EGasa1.***

Previo a este trabajo de tesis, en el laboratorio se llevaron a cabo ensayos preliminares para producir EGasa1 de *Thermococcus litoralis* mediante expresión heteróloga en *E. coli*. En esos ensayos se utilizó un vector derivado del pET24a, bajo el promotor T7, en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) como huésped. Ese sistema permitió alcanzar, después de 6 horas de inducción a 30°C, una actividad  $\beta$ -glucosidasa final de 1,3 U/mL. Esto representa tan solo 27 mg/L de EGasa1, un rendimiento muy inferior al necesario para permitir implementar el uso de esta enzima a escala industrial, según los cálculos de costos realizados por nuestro grupo con la ayuda de consultores especializados en procesos para la industria del biodiesel. Los intentos de producir EGasa1 en huéspedes alternativos con sistemas de secreción para la expresión de proteínas, tales como *Pichia pastoris* y *Corynebacterium glutamicum*, no tuvieron éxito. Por lo tanto, se centraron los esfuerzos en la mejora de la productividad en *E. coli* para aumentar los rendimientos de EGasa1 a través de diferentes estrategias.

#### **1. Rediseño del gen que codifica para la EGasa1: optimización del uso de codones.**

Con el fin de maximizar la expresión del gen *egasa1* en *E. coli*, su secuencia fue optimizada para dicho microorganismo, utilizando el programa Optimizer [133]. Este programa acepta secuencias de aminoácidos y entrega secuencias de ADN automáticamente diseñadas en base a tablas de uso de codones provistas por el usuario. Intuitivamente, la forma más simple de diseñar un gen

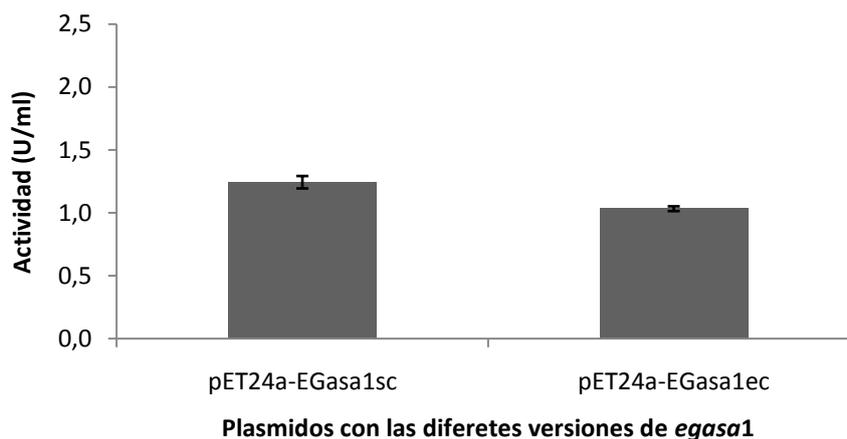
para obtener altos niveles de expresión sería asignar el codón más abundante a cada uno de los aminoácidos de la secuencia. Sin embargo, a partir de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se ha demostrado que esta estrategia de diseño “un codón-un aminoácido” no es necesariamente la mejor [81]. En primer lugar un gen de estas características con un elevado nivel de transcripción puede generar un desequilibrio en el “pool” de tARNs intracelular, afectando el crecimiento y la viabilidad del microorganismo productor en detrimento de la producción final de la proteína deseada. En segundo lugar, sin flexibilidad en el uso de codones no es posible evitar que en el diseño se generen ciertas secuencias indeseadas, tales como estructuras secundarias de mRNA que afecten la traducción, o secuencias de Shine-Dalgarno internas. Finalmente, con un uso de codones rígido no es posible agregar o eliminar sitios de restricción que faciliten la manipulación de la secuencia de ADN. Debido a esto, para optimizar el uso de codones se utilizó una tabla, en la cual a cada codón se le asigna una frecuencia idéntica a aquella con la que aparece en el genoma de cada microorganismo, proceso designado “randomización de codones”, el cual ha dado excelentes resultados en numerosos experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo [78, 134, 135]. La síntesis de ADN fue encargada a una compañía especializada (Genescript).

Es importante mencionar que independientemente de todos los recaudos tomados en su diseño, existen factores desconocidos que pueden afectar la expresión de un gen no natural [136].

Se diseñaron, sintetizaron y evaluaron dos versiones del gen *egasa1*, uno de ellos con el uso de codones optimizado para *E. coli*, y el otro con uso de

codones consenso optimizado tanto para la expresión en *Sacharomyces cereviciae* como para la expresión en *E. coli*.

Como se observa en la Figura 11 la mayor actividad de EGasa1 se obtuvo de la expresión del gen con uso de codones fue optimizado tanto para *E.coli* como para *S. cereviciae* (pET24a-EGasa1sc).



**Figura 11:** Perfiles de expresión de EGasa1 determinados por la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *E.coli* BL21 (DE3) bajo diferentes versiones del gen *egasa1*, una con el uso de codones optimizado para su expresión en *E. coli* (*egasa1ec*) y otra versión con uso de codones mixto optimizado tanto para *E. coli* como para *S. cereviciae* (*egasa1sc*)

Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

## **2. Selección del promotor óptimo para la expresión de la proteína**

### ***EGasa1***

En general, el desarrollo de protocolos eficientes para la expresión de genes recombinantes es y dependiente del gen en estudio [137]. Para la selección del promotor óptimo se dispone de muchas alternativas con diferentes sistemas de inducción (es decir, promotor constitutivo, regulado positiva y negativamente), los cuales además presentan fuerzas variables.

Para seleccionar el promotor más eficaz para la expresión de *EGasa1*, se construyeron diferentes vectores, en los cuales la transcripción se controla mediante distintos tipos de promotores, algunos inducibles: *Lac*, *Tac*, *araBAD*, *T5*, *T7* (y sus versiones atenuadas *T7*<sub>25%</sub> y *T7*<sub>10%</sub>), y uno constitutivo, el *CP8* (Tabla 3). Para reducir los efectos potenciales sobre la expresión, no relacionados con las características de los promotores en sí mismos, todos los vectores utilizados fueron diseñados de tal manera que los formatos de los vectores sean idénticos y los genes a expresar fueron en todos los casos integrados en el mismo lugar.

La cepa de *E. coli* BL21AI se utilizó como huésped para el plásmido pKCN-BAD-*EGasa1*. Esta cepa tiene una inserción cromosómica del gen que codifica la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (*T7RNAP*) en el locus *araB* del operón *araBAD*, quedando la T7 RNAP bajo el control del promotor *araBAD* inducible por arabinosa. Si bien el plásmido pKCN-BAD-*EGasa1* no requiere la *T7RNAP* para la expresión del gen *EGasa1*, esta cepa es incapaz de catabolizar L-arabinosa, ya que tiene inactivado el gen *araB*, transformándolo de esta manera en un inductor no metabolizable. Para el resto de los plásmidos construidos se utilizó *E. coli* BL21 (DE3), la cual contiene el lisógeno  $\lambda$ DE3 que

lleva la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor lacUV5 (inducido por IPTG) [115].

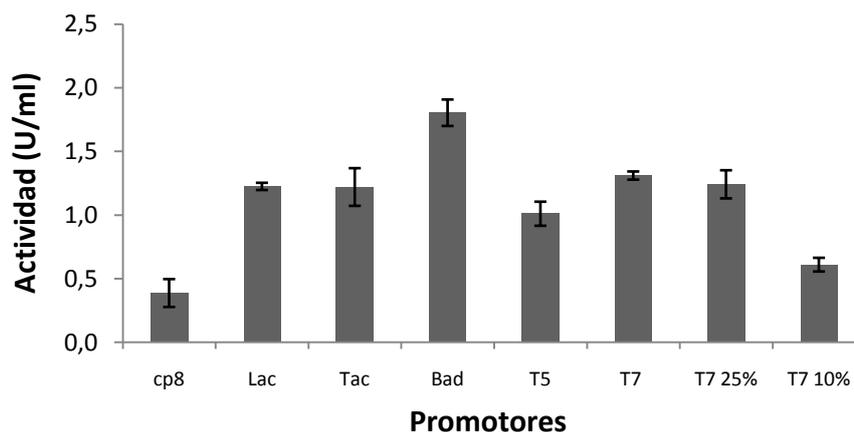
Se transformó con cada uno de los plásmidos en el hospedador correspondiente, y con las cepas resultantes se hicieron ensayos de expresión en cultivos (5ml). Se incubaron a 30°C, y la expresión de la enzima se indujo mediante la adición del inductor correspondiente.

En todos los casos, la DO<sub>600</sub> final alcanzada después de 6 h de incubación fue similar (Tabla 4).

	<i>cp8</i>	<i>Lac</i>	<i>Tac</i>	<i>Bad</i>	<i>T5</i>	<i>T7</i>	<i>T7 25%</i>	<i>T7 10%</i>
<b>DO<sub>600</sub></b>	2,85±0,21	2,48±0,10	2,58±0,25	3,15±0,20	2,95±0,21	3,20±0,40	2,95±0,45	2,62±0,20

**Tabla 4.** Densidades ópticas finales del ensayo de expresión con distintos promotores. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

La producción de EGasa1 se midió mediante el análisis de su actividad  $\beta$ -glucosidasa en los extractos obtenidos a partir de cultivos normalizados a una DO<sub>600</sub> final=4, y los resultados obtenidos muestran que la actividad más alta se alcanzó usando el promotor *araBAD* (Figura 12). La actividad obtenida con esta cepa representa un aumento del 40% comparado con la expresión inicial a partir del promotor T7. Además del mayor rendimiento, el uso de promotor *araBAD* tiene una gran ventaja sobre los promotores inducibles para producir EGasa1 a escala industrial, porque el costo de la L-arabinosa es aproximadamente 10 veces menor que el del IPTG. La actividad obtenida a partir de la cepa con promotor constitutivo fue la más baja de todas las evaluadas.



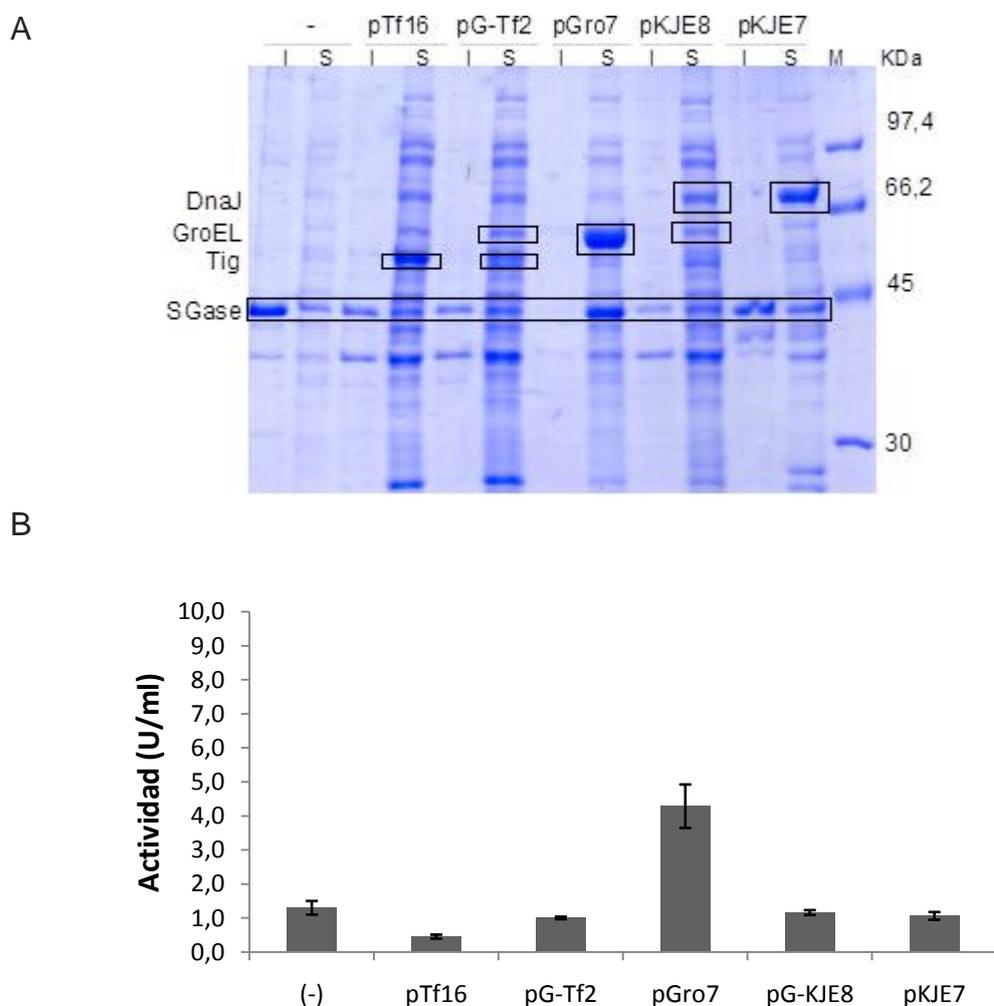
**Figura 12:** Perfiles de expresión de EGasa1 determinados por la actividad  $\beta$ -glucosidasa en cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) o BL21 AI bajo diferentes promotores. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

### 3. Co-expresión de EGasa1 con chaperonas moleculares

El análisis de las fracciones de proteínas solubles e insolubles obtenidos a partir de *E. coli* BL21AI transformada con el plásmido pKCN-BAD-EGasa1 revela que, a pesar de que esta cepa presenta mayor expresión, la mayor parte de la proteína EGasa1 sintetizada se encuentra en agregados insolubles (Figura 13A).

La co-expresión de proteínas recombinantes con chaperonas moleculares se ha utilizado anteriormente para reducir eficazmente la formación de agregados insolubles [138, 139]. Sin embargo, la complejidad de la predicción del sistema de chaperonas óptimo para una proteína particular requiere experimentos de prueba y error [140]. Por esta razón, se evaluó el efecto de la co-expresión de EGasa1 con diferentes combinaciones de chaperonas expresadas a partir de cinco plásmidos diferentes, pG-KJE8, pGro7, pKJE7, PG-Tf2 o pTF16. Las chaperonas codificadas en cada plásmido se detallan en la Tabla 3 de la sección Materiales y Métodos. Todos estos plásmidos contienen orígenes de replicación y marcadores de selección compatibles con el vector de expresión pKCN-BAD-EGasa1.

Se co-transformó *E. coli* BL21AI con el vector pKCN-BAD-EGasa1 y cada uno de los plásmidos codificantes para chaperonas, y se evaluó la expresión de EGasa1 en cultivos de las cepas resultantes. El análisis de la actividad  $\beta$ -glucosidasa reveló que la producción de EGasa1 aumentó más de 3 veces cuando la expresión de la misma se llevó a cabo en presencia de las chaperonas GroES/EL proporcionada por el plásmido pGro7 (Figura 13B). El incremento en la actividad puede ser explicado por el aumento en la solubilidad de EGasa1 debido a la sobreexpresión de GroES/EL, como se muestra en el análisis por SDS-PAGE (Figura 13A).



**Figura 13:** Expresión de EGasa1 en *E.coli* BL21AI asistida por diferentes chaperonas. (A) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones proteicas de las cepas conteniendo los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y cada uno de los cinco plásmidos que codifican para las diferentes combinaciones de chaperonas. M: Marcador de Peso Molecular. S: Fracción soluble. I:

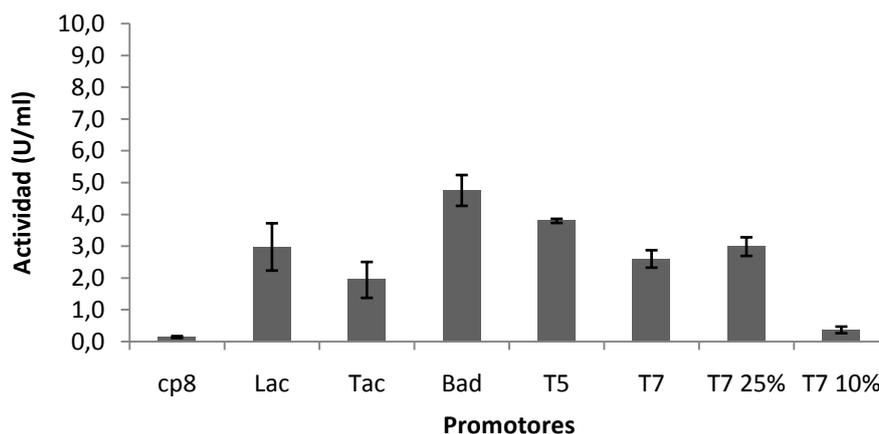
Fracción Insoluble. (B) Perfiles de expresión de EGasa1 determinado por actividad  $\beta$ -glucosidasa. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Este análisis también revela que la co-expresión de algunas chaperonas, tales como los presentes en pG-TF2, pKJE7 y pG-KJE8, puede influir negativamente en el rendimiento total de la proteína blanco producida. Previamente se han observado estos efectos secundarios de la co-expresión de chaperonas y se relacionan con la inhibición del crecimiento celular (Tabla 5) y la proteólisis de la proteína recombinante [126, 128].

Muestras	pTf16	pKJE7	pG-KJE8	pG-Tf2	pGro7	(-)
DO <sub>600</sub>	3,03±0,11	1,75±0,16	2,76±0,17	2,98±0,01	2,28±0,60	3,15±0,13

**Tabla 5.** Densidades ópticas finales del ensayo de co-expresión de pKCN-BAD-EGasa1 con diferentes sistemas de chaperonas.

El uso de un solo inductor para conducir la expresión de proteínas de pGro7 y pKCN-BAD-EGasa1 es muy ventajoso en términos de costos y operaciones. Sin embargo, debido al marcado efecto de GroES/EL sobre la producción EGasa1, se planteó si pGro7 podría ejercer un efecto aún mayor sobre la expresión EGasa1 cuando ésta se expresa desde otros promotores. Para probar esto, las cepas utilizadas en la sección anterior (Figura 11) se transformaron con pGro7, y se ensayó la producción EGasa1 como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en la Figura 12 (Figura 14 y Tabla 6), lo que confirma *araBAD* como el promotor preferido para la expresión EGasa1.



**Figura 14:** Niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa en *E.coli* BL21AI bajo diferentes promotores co-expresados con pGro7. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

	<i>cp8</i>	<i>Lac</i>	<i>Tac</i>	<i>Bad</i>	<i>T5</i>	<i>T7</i>	<i>T7</i> 25%	<i>T7</i> 10%
<b>DO<sub>600</sub></b>	2,91±0,40	3,08±0,21	2,65±0,33	3,22±0,52	2,84±0,10	2,42±0,10	2,80±0,15	2,82±0,20

**Tabla 6.** Densidades ópticas finales del ensayo de co-expresión de pGro7 con EGasa1 expresada desde diferentes promotores.

#### 4. Optimización de las condiciones del proceso.

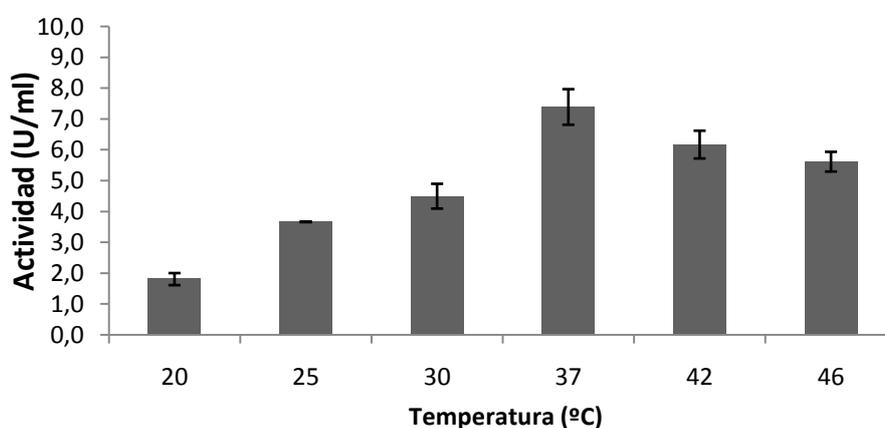
La reducción de las temperaturas de crecimiento es una estrategia conocida para disminuir los niveles de agregación *in vivo* de proteínas recombinantes. La velocidad de síntesis de proteínas y las interacciones hidrofóbicas, dependen fuertemente de la temperatura y a su vez determinan el grado de agregación [125, 141]. Los experimentos descritos anteriormente se llevaron a cabo a una temperatura de inducción fijada en 30°C, a fin de proporcionar una velocidad de crecimiento compatible con un proceso industrial.

Para determinar el efecto de la temperatura de incubación sobre la expresión de EGasa1, *E. coli* BL21 AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 fue inducida en cultivos en lote que se incubaron a 37, 30, 25 y 20°C.

Los resultados obtenidos mostraron que las temperaturas más bajas no aumentan la producción de EGasa1, mientras que los niveles más altos de

actividad  $\beta$ -glucosidasa se observaron a una temperatura de inducción de 37 °C (Figura 15). Un comportamiento similar fue reportado previamente [142] utilizando cuatro enzimas termófilas expresadas en *E. coli*, siendo posible su expresión en la fracción soluble sólo a 46°C.

Cuando la expresión EGasa1 se ensayó a 42 y 46°C después de la inducción, la actividad  $\beta$ -glucosidasa no aumentó en comparación con la obtenida a 37°C (Figura 15) y, como era de esperar, la velocidad específica de crecimiento fue menor (Tabla 7), por lo tanto, se redujo la productividad volumétrica.



**Figura 15.** Perfiles de expresión de EGasa1 determinados por la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *E.coli* BL21AI a diferentes temperaturas de inducción. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Temperatura (°C)	20	25	30	37	42	46
$\mu$ (1/h)	0,29±0,02	0,38±0,03	0,46±0,05	0,56±0,01	0,16±0,10	0,08±0,01

**Tabla 7.** Velocidades de crecimiento para los ensayos de expresión de EGasa1 a diferentes temperaturas.

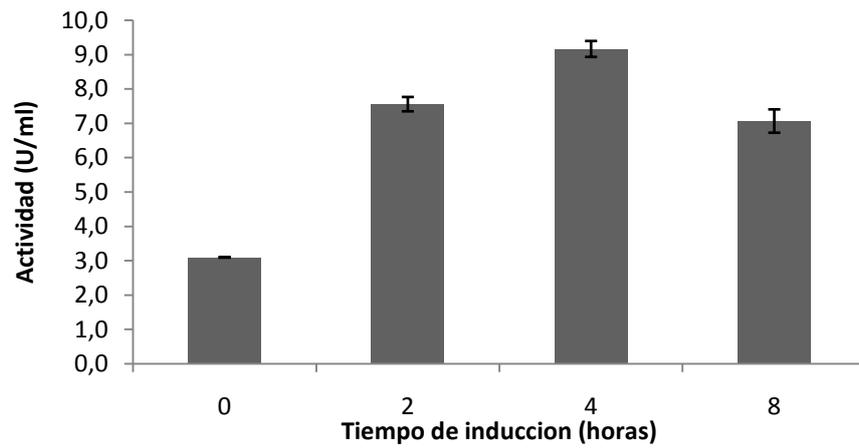
Debido a que tanto los genes *egasa1* y *groES-groEL* están regulados por el promotor *araBAD*, es necesario analizar la etapa óptima de cultivo en la que se debe agregar el inductor y la concentración óptima del mismo para alcanzar los rendimientos máximos de proteínas, con los menores costos de producción.

Para determinar en qué momento del cultivo se debe agregar el inductor, se añadieron 0,5 g/L de L-arabinosa a cultivos en lote de *E. coli* BL21AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 a DO<sub>600</sub> 0,15 (0 hs de cultivo), 0,80 (2 hs de cultivo), 2,00 (4 hs de cultivo) y 4,00 (8 hs de cultivo), lo que representa la etapa inicial del cultivo, pre, media, y post crecimiento exponencial de *E. coli*, respectivamente.

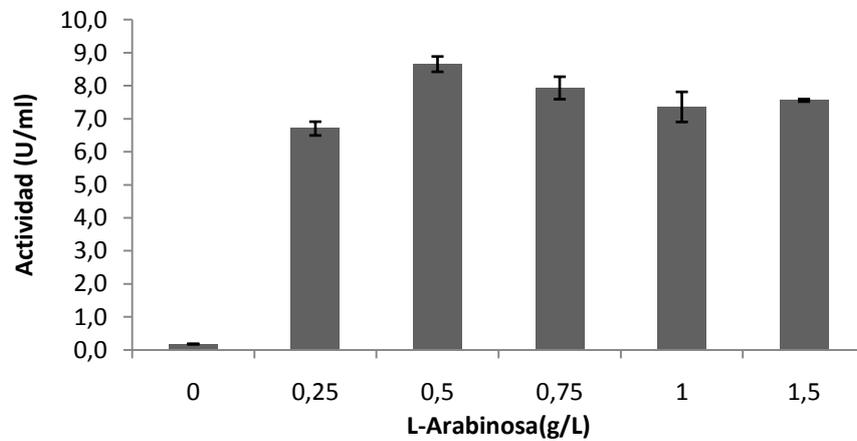
Los niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa observados en las diferentes DO<sub>600</sub> de inducción indican que la mejor productividad EGasa1 del sistema se alcanza cuando se induce la expresión en la mitad de la etapa de crecimiento exponencial (DO<sub>600</sub>= 2, 4 hs de cultivo) (Figura 16A).

En cuanto a la determinación de la concentración óptima de inductor requerida para la producción de EGasa1, se realizaron cultivos en lote de la cepa productora inducidos en la mitad de la etapa de la fase de crecimiento logarítmico a 37°C con 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 y 1,5 g/L de L-arabinosa. Los resultados obtenidos indican que el sistema de expresión aumenta su productividad con la concentración de L-arabinosa, hasta alcanzar una meseta a 0,5 g/L (Figura 16B).

A



B



**Figura 16:** Perfiles de expresión de EGasa1 determinados por la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *E. coli* BL21AI inducida en diferentes momentos (A), y a diferentes concentraciones de arabinosa (B). Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

La enzima recombinante EGasa1 de *Thermococcus litoralis* fue expresada previamente en forma funcional en *E. coli* por nuestro grupo [17]. Esta enzima es capaz de hidrolizar eficientemente los esteril glucósidos presentes en el biodiesel lo cual le confiere un enorme potencial para la mejora de la calidad de este combustible a nivel industrial. Sin embargo, los niveles de expresión fueron bajos, detectándose agregación de la proteína recombinante al sobre-expresarla en *E. coli* desde un promotor T7.

En este trabajo de Tesis se probaron inicialmente dos versiones del gen sintético *egasa1*, una con el uso de codones optimizado para su expresión en *E. coli* (*egasa1ec*) y otra versión con uso de codones mixto optimizado tanto para *E. coli* como para *S. cerevisiae* (*egasa1sc*). La mayor actividad EGasa1 se obtuvo a partir de la expresión del gen con uso de codones optimizado tanto para *E. coli* como para *S. cerevisiae* (pET24a-EGasa1sc). Probablemente el transcripto generado posea ciertas secuencias indeseadas tales como estructuras secundarias del mRNA o secuencias Shine-Dalgarno internas que afecten la traducción. De cualquier manera las actividades enzimáticas resultantes de la expresión de ambos genes son similares considerando las desviaciones estándar de las medidas efectuadas.

Como paso siguiente se ensayó una batería de promotores disponibles en el laboratorio. Entre ellos, se seleccionó al promotor pBAD, ya que proporcionó los mejores resultados, y además posee características importantes para la producción industrial de enzimas recombinantes, tales como el bajo costo de inducción. Se pueden inducir cultivos de alta densidad por agregado de bajas

concentraciones de L-arabinosa de calidad industrial, cuyo costo tendrá bajísima incidencia en el costo final del medio de cultivo.

La siguiente estrategia ensayada, en busca de evitar la formación de precipitados insolubles, fue la co- expresión de chaperonas [50]. Algunas proteínas de *E. coli* expresadas en respuesta a estrés por calor han demostrado ser necesarias para el correcto plegamiento de muchas proteínas recombinantes. Las chaperonas más abundantes y fisiológicamente más importantes en *E. coli* son: DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES y el sistema TF [139].

Se piensa que el conjunto de chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE mantiene las proteínas nacientes o preexistentes en estados desplegados, mientras que el conjunto GroEL-GroES puede interaccionar con polipéptidos parcialmente plegados y asistir en el plegado adicional[127]. Con respecto al Factor desencadenante (TF) se encontró que la co- expresión del mismo con proteínas recombinantes de *E. coli* previene la agregación. TF se une al ribosoma y a las cadenas de polipéptidos nacientes actuando como un catalizador del plegado. Sin embargo el efecto de TF puede ser distinto dependiendo de la proteína usada [143].

La co- expresión de estos sistemas de chaperonas, solos o combinados, permitió determinar que únicamente la sobreexpresión de las chaperonas moleculares GroES/EL a partir del plásmido pGro7 incrementó más de 3 veces la actividad de la enzima respecto al control. Estas condiciones mostraron un aumento de la EGasa1 en la fracción soluble de los extractos crudos, analizados mediante SDS-PAGE, sugiriendo un mejor plegamiento de la proteína.

La disminución de la temperatura de crecimiento es una estrategia conocida para reducir la agregación *in vivo* de proteínas recombinantes [144]. En el sistema en estudio, la disminución de la temperatura no aumentó la actividad recuperada de EGasa1, y los mayores niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa se observaron para una temperatura de inducción de 37°C. Dado que, fue reportado previamente el incremento en el plegamiento de proteínas recombinantes provenientes de organismos termófilos en *E.coli* a 46°C [142], se analizó la expresión de la EGasa1 a temperaturas de inducción de 42 o 46°C. Los resultados obtenidos no mostraron aumento en la actividad  $\beta$ -glucosidasa con respecto a la alcanzada a 37°C, y además disminuyeron las velocidades de crecimiento.

Finalmente, debido a que tanto los genes de GroES-GroEL como el de la EGasa1 están localizados bajo el promotor del *araBAD*, se propuso determinar el momento óptimo de inducción. La adición de L-arabinosa es el punto crucial para lograr una expresión eficiente de ambos genes, lograr su correcto plegamiento, y determinar la concentración mínima de inductor necesaria.

Como resultado de esta etapa del trabajo de tesis se obtuvo una cepa capaz de expresar eficientemente 9 U/ml de EGasa1 en lote, unas 7 veces más que la actividad inicial. Las condiciones óptimas de producción determinadas en estos experimentos fueron: co-expresión del gen sintético *egasa1* optimizado para *E. coli* y *S. cerevisiae* expresado a partir del promotor *araBAD*, y del sistema de chaperonas GroES/GroEL a partir del plásmido pGro7 inducidos en la fase exponencial del cultivo con 0,5 g/L de L-arabinosa, e incubados a 37°C.

# **Resultados y Discusión:**

## **CAPÍTULO 2**

## INTRODUCCIÓN

### Cultivos de alta densidad de células

Para que la producción de enzimas industriales resulte económicamente viable, es esencial poder obtener cultivos de altas densidades celulares, a fin de obtener una elevada producción volumétrica (U de EGasa1/ml/h). En *E. coli*, la mayor limitante para obtener cultivos en lote de altas densidades celulares es la alta concentración de sustrato inicial. Un medio definido que contiene la máxima concentración de nutrientes que no generan inhibición permite crecer *E. coli* sólo hasta una densidad de unos 15 g/L [27, 52]

En consecuencia, para obtener un cultivo de *E. coli* con altas densidades celulares es necesario tener un medio de cultivo diseñado para evitar la toxicidad por altas concentraciones de sustrato y una estrategia de alimentación que maximice la velocidad de crecimiento. La alimentación puede ser constante o intermitente, pero debe satisfacer la demanda de fuentes de energía, carbono y nitrógeno para un crecimiento exponencial o lineal de *E. coli*.

El medio de fermentación conforma el medioambiente químico para el cultivo. Comprende una mezcla de sustratos esenciales para el crecimiento celular y la formación de productos deseados. En éste, los macroelementos son carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y fósforo, y una vez asimilados constituyen alrededor del 95% del peso celular. Los microelementos, tales como el magnesio, el azufre y el potasio son requeridos a concentraciones más bajas (<1%). Los elementos traza son frecuentemente activadores de reacciones enzimáticas y son requeridos en muy bajas concentraciones [145].

Un medio complejo contiene fracciones indefinidas de los componentes, y están conformados generalmente por extracto de levadura, hidrolizados de proteínas [146] o materias primas lignocelulósicas [147, 148] [131]. En un medio definido se conoce la composición química exacta, esto permite controlar y analizar el crecimiento y provee ventajas en cuanto al escalado o posterior tratamiento de los procesos.

Un medio mínimo es un medio definido con las cantidades mínimas necesarias de cada uno de los componentes, y es comúnmente usado para producción de proteínas recombinantes tanto a escala de laboratorio como industrial [145].

Los medios mínimos típicos para la producción de proteínas recombinantes en fermentaciones contienen sales minerales, elementos traza, glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno.[53].

### **Glicerol crudo como única fuente de carbono y energía**

El rápido desarrollo de la tecnología de la producción de biodiesel ha conducido a la generación de grandes cantidades de glicerol, como el principal subproducto del proceso. Estequiométricamente, se ha calculado que por cada 100 kg de biodiesel, se producen 10 kg de glicerol. Dependiendo de la tecnología utilizada en distintas plantas de biodiesel, el glicerol crudo puede contener numerosos tipos de impurezas tales como metanol, sales, jabones, metales pesados, y los ácidos grasos residuales. Este hecho, a menudo hace que la purificación de la glicerina derivada de biodiesel no sea rentable. Por lo tanto, la biotransformación de glicerol crudo representa una alternativa prometedora para la gestión eficaz de este tipo de residuos industriales [149]

El interés sobre la valorización del glicerol crudo derivado de biodiesel a través de procesos biotecnológicos se refleja en la reciente aparición de diversos estudios en la literatura internacional, con el objetivo de evaluar la capacidad de utilización de glicerol como sustrato para numerosos bioprocesos [150-152]

De esta manera, desarrollar una cepa que pueda crecer eficientemente a expensas de glicerol crudo podría ser clave en el desarrollo de un proceso de manufactura económico. Si bien *E. coli* es naturalmente capaz de crecer en glicerol, se ha reportado [119] que la sobreexpresión del gen *glpF*, que codifica para la permeasa que facilita la captación de este sustrato, le confiere a este microorganismo la capacidad de crecer con mayor eficiencia en glicerol.

De esta manera, se especuló que la co- expresión de la proteína del transportador con la proteína de interés en la cepa industrial, resulte en una herramienta que aumente la productividad y disminuya los costos de producción.

### **Sacarosa como única fuente de carbono y energía**

Comúnmente, las fuentes de carbono utilizadas en las fermentaciones son azúcares simples. El objetivo a futuro es ser capaces de utilizar estos azúcares simples a partir de la degradación de biomasa lignocelulósica barata y abundante. Sin embargo, el desarrollo de esta fuente de carbono como materia prima de fermentación ha sido lento debido a la resistencia de la lignocelulosa a la sacarificación para la producción de azúcares fermentables. Además, los productos contienen generalmente inhibidores que interfieren con la fermentación microbiana [153].

La sacarosa de la caña de azúcar ha sido identificada como una de las materias primas de carbono más baratas disponibles para la fermentación industrial (Tabla 8). En comparación con la glucosa del maíz, la sacarosa de la caña de azúcar es también favorable desde un punto de vista del medio ambiente debido a que se necesita menor energía para su producción y el efecto invernadero por las emisiones de gases también es menor [154, 155].

<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Costo (Dólares por tonelada)*</b>
<b>Glucosa</b>	700-1000
<b>Glicerina Refinada</b>	600-700
<b>Glicerina Cruda</b>	200-300
<b>Sacarosa (caña de azúcar)</b>	150-250

**Tabla 8.** Costos de las diferentes fuentes de carbonos disponibles para crecer *E.coli*

\*Fuente: <http://www.alibaba.com>. Julio 2016

El rendimiento de azúcares fermentables a partir de la caña de azúcar es muy alto, y los residuos de fibra de la extracción (bagazo) se pueden utilizar como una fuente de energía durante el procesamiento. Por estas dos razones, es la fuente de carbono preferida en regiones tropicales y sub-tropicales, donde la caña de azúcar es fácil de cultivar y está fácilmente disponible.

### **Perfiles de alimentacion**

Los procesos de producción de enzimas recombinantes en *E. coli* se dividen típicamente en tres etapas: (i) fase de lote, en la cual se agrega una cantidad limitada de fuente de carbono y el microorganismo crece a velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) máxima seguida de (ii) una etapa de alimentación adonde el  $\mu$  está regulado por la velocidad de suministro de la fuente de carbono, administrada en forma exponencial; y (iii) la etapa de alimentación post- inducción.

Si bien existe un consenso generalizado respecto a la cantidad de fuente de carbono a adicionar en la etapa (i) y al perfil de alimentación de la etapa (ii), una de las variables que mayor impacto tiene en la producción de proteínas recombinantes es el perfil de alimentación post-inducción [56, 156-158].

## RESULTADOS

### **1. Ingeniería genética de *E. coli* a fin de que pueda crecer eficientemente utilizando glicerol como única fuente de carbono y energía**

Un análisis combinado de transcriptoma y proteoma de un cultivo de *E. coli* a altas densidades de células mostró que la expresión de muchos genes de enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico, NADH-deshidrogenasa, y ATPasa se encuentran sobre-expresados durante el período de alimentación exponencial y disminuyen su expresión después de este período. Por otro lado, la expresión de la mayoría de los genes de biosíntesis de aminoácidos se redujo a medida que aumentó la densidad celular [159].

A partir de estudios realizados por Choi y colaboradores [96], se seleccionaron dos genes cuyos niveles de expresión se encuentran drásticamente reducidos durante el crecimiento a altas densidades celulares con glicerol como fuente de carbono y energía, *glpF* y *prsA*. GlpF un transportador de glicerol, que es el primer paso de la utilización del glicerol y PrsA, fosforribosil pirofosfato sintetasa, una enzima clave para la biosíntesis del precursor 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), involucrada en el paso más importante de la ruta biosintética de nucleótidos y aminoácidos. El objetivo fue sobre- expresarlos en forma conjunta a la *egasa1* y las chaperonas *groES-groEL*.

Los genes *glpF*, *prsA* y, *groES-groEL* con su región intergénica, fueron amplificados a partir del genoma de *E.coli* DH5 $\alpha$ . Luego fueron clonados en un vector disponible en el laboratorio que permite obtener rápidamente

construcciones que expresan en simultáneo varios genes bajo el control del promotor *araBAD*.

El objetivo principal fue construir un operon con los genes anteriormente mencionados que mejore los niveles de expresión obtenidos de la expresión de las cepas con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 que expresan la EGasa1 y el sistema de chaperonas por separado. Las construcciones realizadas se listan en la Tabla 9.

Construcción	Nombre
<b>egasa1-groES-groEL</b>	pKCN196
<b>glpF</b>	pKCN197
<b>prsA</b>	pKCN198
<b>egasa1-glpF</b>	pKCN199
<b>egasa1-prsA</b>	pKCN200
<b>egasa1-groES-groEL-prsA</b>	pKCN201
<b>egasa1-groES-groEL-glpF</b>	pKCN203
<b>egasa1-prsA-glpF</b>	pKCN204
<b>egasa1-groES-groEL-glpF-prsA</b>	pKCN207
<b>egasa1-prsA-groES-groEL</b>	pKCN246
<b>egasa1-prsA-glpF-groES-groEL</b>	pKCN247

**Tabla 9:** Construcciones con genes accesorios para optimizar el crecimiento a expensas de glicerol y la expresión de la EGasa1

Los plásmidos resultantes fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21 AI. A continuación, se midió actividad  $\beta$ -glucosidasa de los cultivos crecidos en glicerol de cada cepa después de inducir con L-arabinosa a 37°C, como se detalló anteriormente (Figura 17 B). Los mejores niveles de actividad se obtuvieron en primer lugar con la cepa control, que expresa EGasa1 y GroES-GroEL desde plásmidos diferentes, y luego de las cepas con las construcciones pKCN196 y pKCN207, con ambos genes desde el mismo promotor en el mismo

plásmido, y con *egasa1-groES-groEL-glpF-prsA* desde el mismo promotor en el mismo plásmido, respectivamente.

Además, se analizaron por SDS-PAGE las fracciones solubles e insolubles de los extractos, para evaluar las expresiones de cada uno de los genes a partir de las diferentes construcciones (Figura 17A). Se observó que en los cultivos de las cepas que no incluyen el complejo de chaperonas GroES- GroEL se obtuvieron grandes cantidades de EGasa1 en la fracción insoluble.

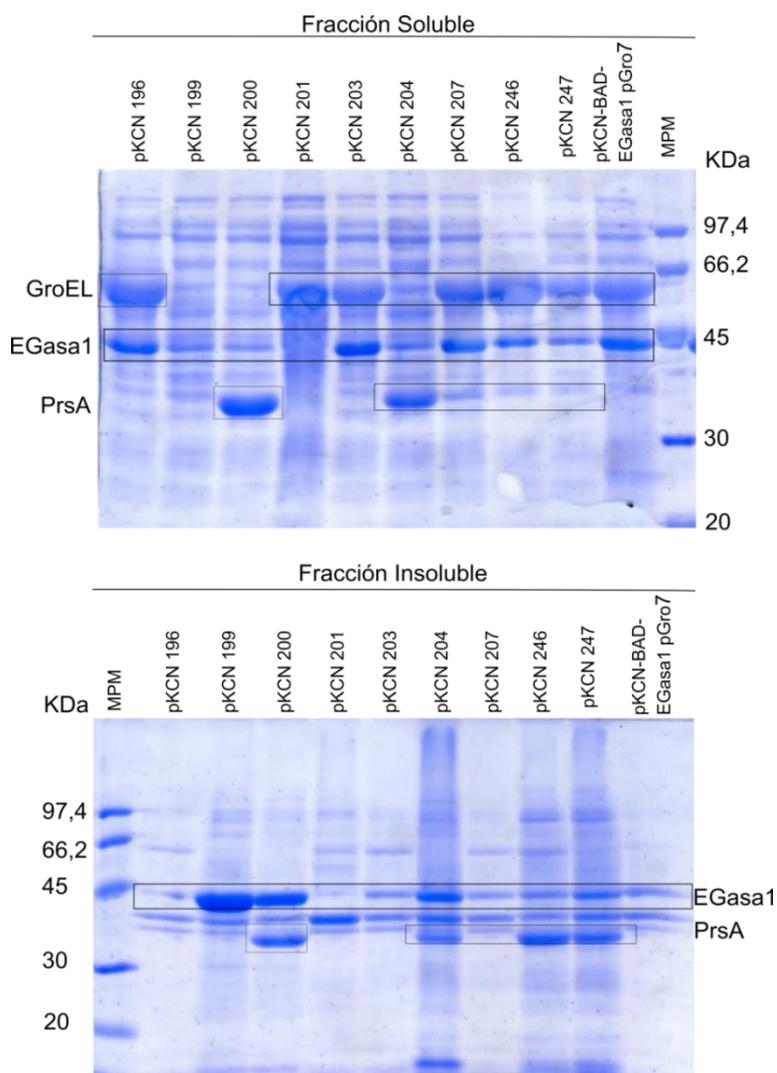
No se detectó la expresión de la proteína GlpF (32 KDa), es posible que sus niveles de expresión sean bajos ya que se trata de una proteína asociada a membrana.

Ademas, tal como se observa en los SDS-PAGE, los genes localizados en cuarto o quinto lugar en los operones construidos se expresan con menor intensidad que cuando están ubicados en primer o segundo lugar. Como ejemplo se observa la disminución de intensidad de la banda correspondiente a GroEL en la construcción pKCN247 con respecto a la pKCN196, y la disminución de la expresión de la proteína PrsA desde el plásmido pKCN207, respecto a la misma desde pKCN200 (Figura 17A).

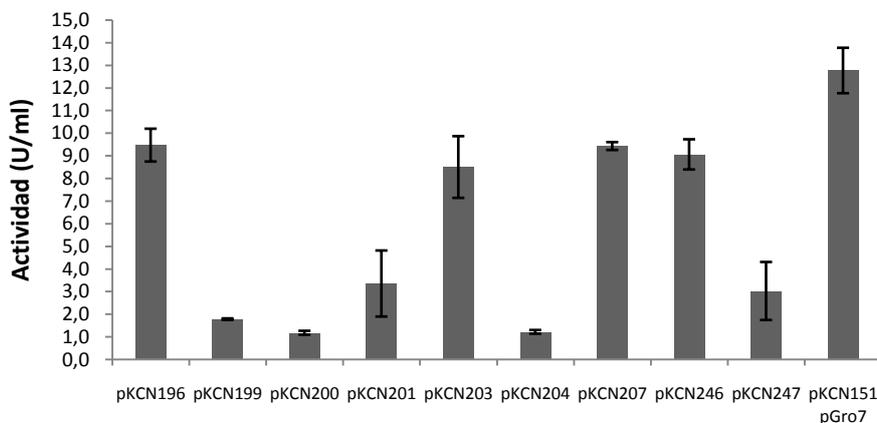
Como se observa en la Figura 16B, la co-expresión de los genes accesorios *glpF* y *prsA* no contribuyó significativamente a aumentar la actividad EGasa1.

A partir de estos resultados, se decidió evaluar el impacto de la expresión de los genes accesorios en cultivos de alta densidad (Capítulo 2. Sección 3.B), dado que los genes *glpF* y *prsA* (pKCN207) normalmente se encuentran reprimidos en condiciones de alta densidad celular.

A



B



**Figura 17:** Co-Expresión de EGasa1 en *E.coli* BL21AI con las proteínas GlpF, PrsA y GroES/EL. (A) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles obtenidas de los cultivos de BL21AI transformada con las distintas construcciones. MPM: Marcador de Peso Molecular. (B) Actividad  $\beta$ -glucosidasa proveniente de los extractos de dichos cultivos. Los

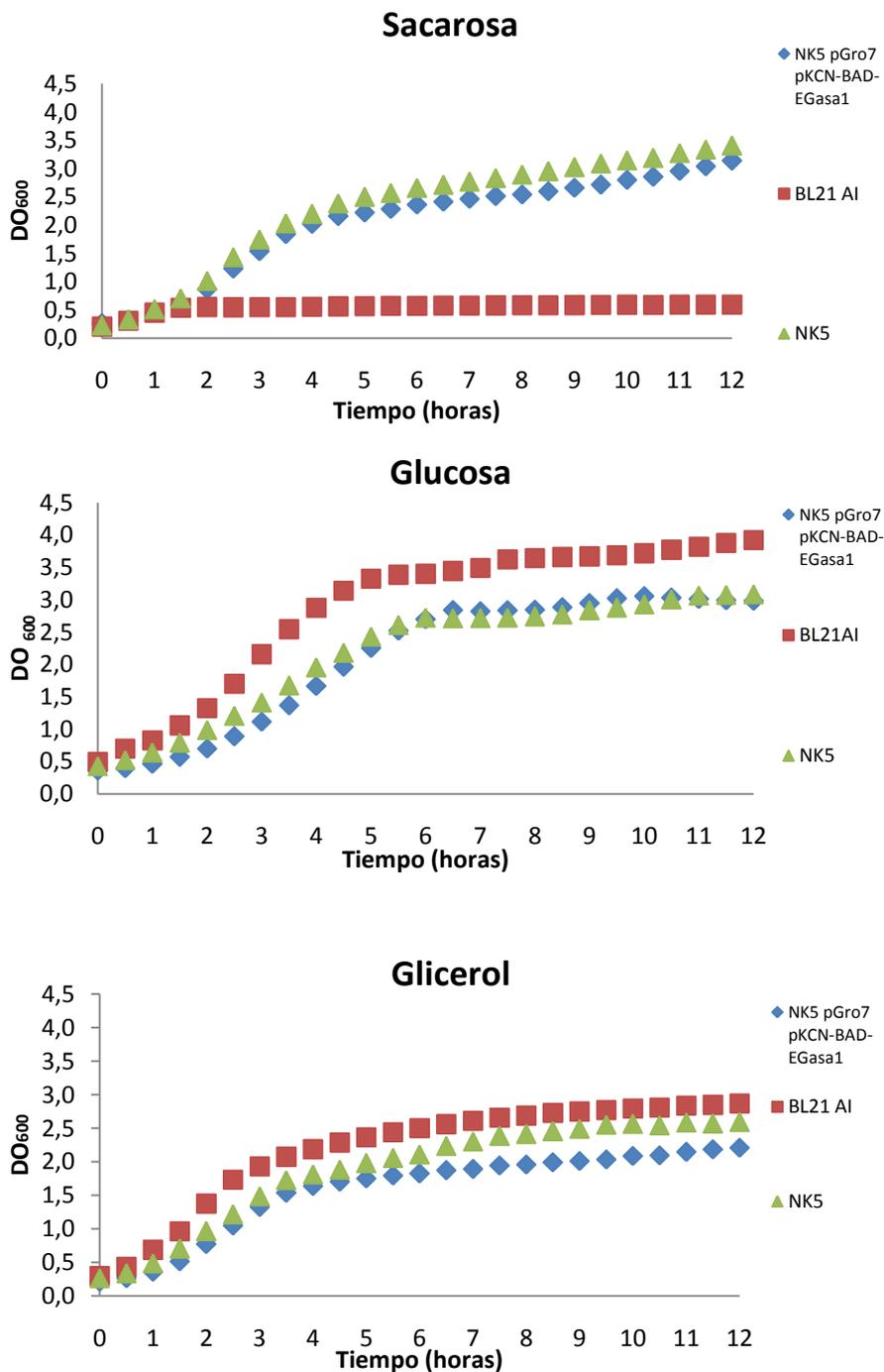
resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

## **2. Incorporación del operón *cscAKB* conteniendo los genes de catabólismo de sacarosa a *E. coli* BL21 AI**

La mayoría de las cepas de *E. coli* industriales no pueden utilizar sacarosa naturalmente. En los últimos años, se han reportado métodos para conferir una eficiente capacidad de utilización de sacarosa a cepas de *E. coli* que no pueden utilizar este compuesto de forma natural [120]. El método se basa en la transferencia del operón catabólico de sacarosa de *E. coli* W, una cepa muy eficiente en la utilización de este disacárido.

Para obtener un cassette que permita la utilización de sacarosa, se seleccionaron los genes *csc* de *E. coli* W [160]. No se incluyó el gen *cscR*, que codifica para una proteína represora que inactiva al operón *csc* a bajas concentraciones de sacarosa (<1%), pero se mantuvo el promotor nativo *csc* y la orientación de los genes *csc* relativa al promotor. Los genes *cscAKB* fueron transferidos al cromosoma de *E. coli* BLI 21 AI generando una nueva cepa, NK5, que puede utilizar sacarosa eficientemente (Figura 8, Materiales y Métodos).

A continuación se realizaron experimentos en microplacas para determinar la velocidad de crecimiento de las cepas BL21 AI y NK5 en medio HM suplementado con sacarosa, glucosa o glicerol. Para cada cepa se utilizaron tres clones independientes. Los valores de absorbancia a 600nm fueron registrados cada 30 minutos, obteniéndose las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 18.



**Figura 18:** Curvas de crecimiento obtenidas de los experimentos en microplacas con las cepas BL21 AI, NK5, y NK5 con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7. Las cepas fueron crecidas en sacarosa (A), glucosa (B) y glicerol (C). Los valores son un promedio de dos experimentos diferentes, y las desviaciones estándar fueron menores al 10% en todos los casos.

A partir de estas curvas fue posible obtener la velocidad de crecimiento específica y la  $DO_{600}$  final alcanzada por las diferentes cepas en los medios con sacarosa, glucosa y glicerol como única fuente de carbono. Esto se resume en la Tabla 10.

Fuente de Carbono	NK5 pKCN-BAD-		
	BL21 AI (control)	NK5	EGasa1 pGro7
<b><math>DO_{600nm}</math></b>			
<b>Sacarosa</b>	0,61±0,03	3,45±0,13	3,58±0,08
<b>Glucosa</b>	3,93±0,03	3,08±0,10	2,98±0,30
<b>Glicerol</b>	3,70±0,15	3,15±0,15	3,08±0,08
<b><math>\mu</math> (hora<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Sacarosa</b>	-	0,31	0,35
<b>Glucosa</b>	0,42	0,37	0,40
<b>Glicerol</b>	0,39	0,27	0,28

**Tabla 10:** Parámetros de crecimiento de las cepas BL21 AI (control), NK5, y NK5 con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 en microplacas con medio mínimo.

\*Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes

La cepa BL21 AI mostro el mismo comportamiento en medios de cultivo con glucosa o glicerol como fuentes de carbono. Sólo las cepas que llevan el operón del metabolismo de sacarosa, NK5 con o sin plásmidos, fueron capaces de crecer utilizando sacarosa como única fuente de carbono hasta una  $DO_{600}$  comparable a la alcanzada con glucosa o glicerol.

Como se muestra tanto en la Figura 18 como en la Tabla 10, las cepas NK5 con o sin plásmido son además capaces de crecer eficientemente en glucosa y glicerol. Además, la presencia e inducción de los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 no afectó las  $DO_{600}$  finales alcanzadas ni las velocidades de crecimiento obtenidas independientemente de la fuente de carbono utilizada.

Para evaluar la actividad EGasa1 de las diferentes cepas crecidas en glucosa, sacarosa o glicerol, se realizaron experimentos en pequeños volúmenes de cultivo (5 ml) que permitieron caracterizar el nivel de expresión de cada cepa.

Las cepas NK5 y BL21 AI fueron crecidas en medio HM conteniendo sacarosa, glucosa, glicerol o glicerol crudo, fueron inducidas a  $DO_{600}=1$  mediante el agregado de L-arabinosa, que permitió sobre-expresar tanto la EGasa1 como la chaperona GroES/EL. Se midió  $DO_{600}$  final alcanzada y actividad. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Fuente de Carbono	$DO_{600nm}$	Actividad EGasa1 (U/ml DO)*
Sacarosa (NK5)	4,20±0,04	2,80±0,34
Glucosa (BL21 AI)	4,33±0,30	3,46±0,02
Glicerol (BL21 AI)	3,30±0,20	2,90±0,40
Glicerol crudo (BL21 AI)	3,38±0,02	3,50±0,30

**Tabla 11:** Crecimiento de las cepas BL21 AI y NK5 con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 en tubos conteniendo medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.

\*Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes.

En este ensayo, al igual que los anteriores, se evidencia la capacidad de la cepa NK5 de crecer eficientemente en un medio mínimo con sacarosa como única fuente de carbono. Además, la  $DO_{600}$  final alcanzada por NK5 en sacarosa es comparable a la obtenida por la BL21 AI en glucosa.

Como se observa en la Tabla 11 las mayores actividades se obtuvieron con la cepa BL21 AI crecida en glucosa y en glicerol crudo. La actividad obtenida por NK5 en sacarosa fue un 20% menor con respecto a esta última.

### **3. Estudio de la producción en lote alimentado.**

#### **A. Efecto de la utilización de diferentes fuentes de carbono en cultivos en lote alimentado a alta densidad de células.**

Para maximizar la concentración de producto final, se evaluó un proceso de fermentación en lote alimentado, utilizando glucosa, sacarosa o glicerol en cantidades limitantes.

Las fermentaciones fueron realizadas como se describe en Materiales y Métodos. La temperatura se mantuvo a 37°C. El fermentador se configuró para mantener el OD en valores mayores al 30%. El pH se reguló en valor igual a 7 con el agregado de una solución de NH<sub>4</sub>OH 23%, el cual es utilizado además como fuente de nitrógeno.

Las curvas de crecimiento y evolución de la expresión de EGasa1 obtenidas de los experimentos se muestran en la Figura 19.

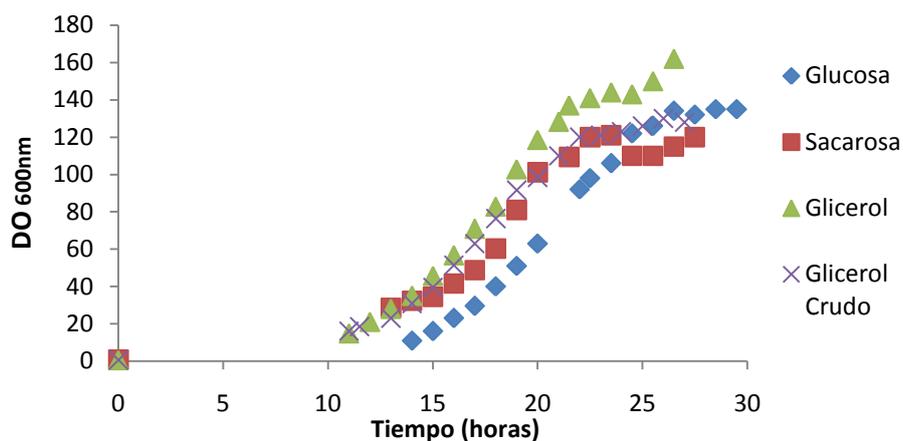
El proceso llevado a cabo utilizando la cepa NK5 con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 con sacarosa como única fuente de carbono tuvo una duración de 28,5 horas. El cultivo se indujo a DO<sub>600</sub>=100 (aproximadamente 6 horas de comenzada la alimentación) con L-arabinosa a una concentración final de 0,5 g/L, y posteriormente se midió actividad EGasa1 cada una hora, finalizándose el proceso de fermentación luego de obtener dos medidas consecutivas iguales. La DO<sub>600</sub> final alcanzada por el proceso fue 120 UA, unas 26 veces mayor a la obtenida en cultivos en lote, mientras que la actividad EGasa1 máxima alcanzada fue de 230 UI/ml, más de 70 veces superior a la alcanzada en cultivos en lote. En base a estos datos, la productividad

específica (g producto/g biomasa) se incrementó más de 3,2 veces al pasar de un crecimiento en lote a lote alimentado, donde la velocidad de crecimiento es controlada por la alimentación. La productividad volumétrica del proceso fue de 8,1 U/ml/hora.

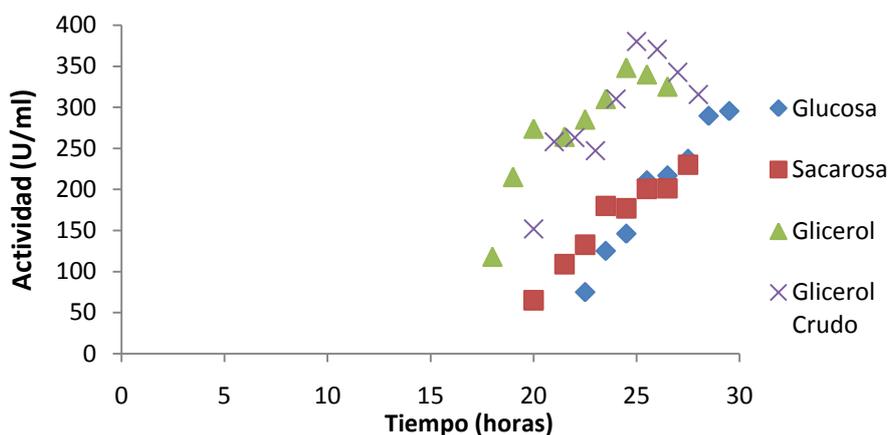
Para la cepa BL21 AI transformada con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 crecida en medio mínimo con glucosa, el proceso tuvo una duración total de 29,5 horas. La  $DO_{600}$  final alcanzada fue 135 UA, y la actividad EGasa1 máxima fue 295 U/ml. La productividad específica de la cepa *E. coli* BL21AI pKCN-BAD-EGasa1+pGro7 crecida en glucosa se incrementó 2,8 veces comparada con la obtenida en el lote al lote alimentado. La productividad volumétrica del proceso fue 10 U/ml/hora, mayor a la obtenida con sacarosa.

Finalmente, se llevaron a cabo fermentaciones en lote alimentado de *E. coli* BL21AI con pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 con glicerol tanto refinado como crudo. En este caso la productividad específica aumentó 2,5 veces con respecto al crecimiento en lote. La duración del proceso fue de 26,5 horas para el glicerol refinado y de 28 horas para el crudo. La  $DO_{600}$  final alcanzada fue 162 UA y 128 UA, la actividad EGasa1 máxima resultó 325 U/ml y 315U/ml, siendo el primer valor para el glicerol refinado y el segundo para el crudo. Las productividades volumétricas fueron las máximas en relación a los valores obtenidos con las diferentes fuentes de carbono analizadas, 12,2 U/ml/hora para glicerol refinado y 11,2 U/ml/hora para crudo.

A



B



**Figura 19:** Curvas de crecimiento (A) y evolución de la expresión de EGasa1 (B) en fermentaciones de lotes alimentados en medio mínimo con sacarosa (cepa NK5), glucosa, glicerol o glicerol crudo (cepa BL21 AI) como única fuente de carbono. Las mismas llevan los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7. Las fermentaciones fueron hechas por duplicado y la figura muestra el promedio de ambas, con menos del 10% de desviación estándar.

### ***B. Selección de las cepas recombinantes con mayores niveles de expresión***

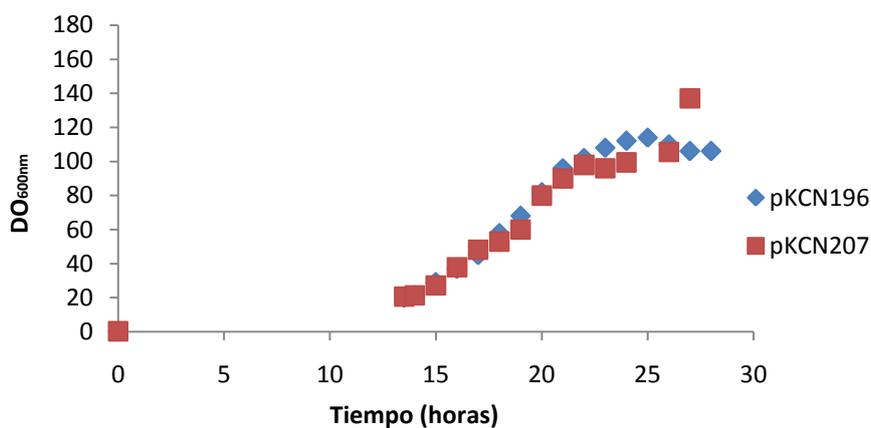
A continuación se decidió evaluar el efecto de los genes accesorios (Capítulo 2, Punto 1) en cultivos de altas densidades de células.

Se llevaron a cabo los crecimientos en lote alimentado a escala piloto de las cepas que exhibieron mayores niveles de expresión, BL21 AI conteniendo los plásmidos: pKCN196 y pKCN207.

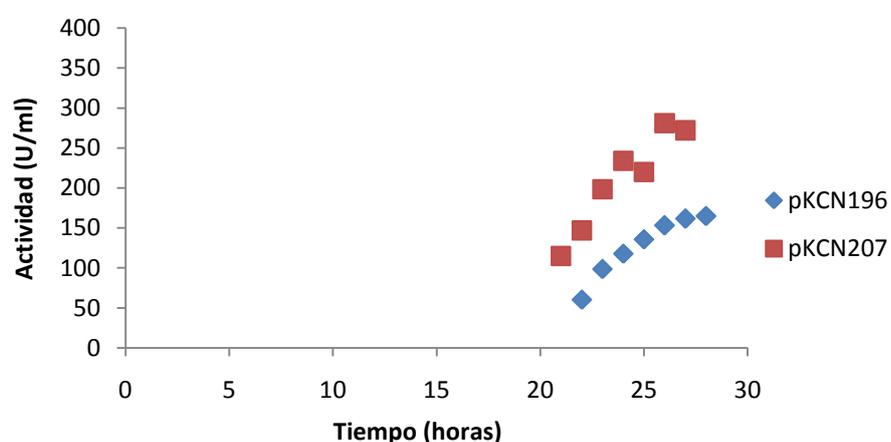
Los cultivos en lote alimentado se llevaron a cabo con un litro inicial de medio salino HM. Como única fuente de carbono se utilizó glicerol. Los resultados se muestran en la Figura 20. Para *E. coli* BL21AI conteniendo el plásmido pKCN196 la duración total del proceso fue de 27 horas. La fase de crecimiento en lote duró 13,5 horas y alcanzó una  $\mu_{\max}=0,51 \text{ h}^{-1}$ . La densidad óptica final alcanzada fue 110 UA, equivalente a 39,6 g/L de peso seco, y la actividad EGasa1 máxima en este caso fue de 165 U/ml, menos de la mitad de la obtenida en el proceso llevado a cabo con los genes expresados a partir de dos plásmidos diferentes.

El lote alimentado para la cepa que contiene el plásmido pKCN207 tuvo una duración de 27 horas. El lote tuvo una duración, al igual que el proceso 2, de 13,5 horas y alcanzó una  $\mu_{\max}=0,47 \text{ h}^{-1}$ . La  $\text{DO}_{600}$  final alcanzada en el proceso fue 137 UA, 49,3 g/L de peso seco; y la actividad EGasa1 máxima resultó 272 U/ml, menor que en el proceso de referencia (pGro7 y pKCN-BAD-EGasa1, con glicerol).

A



B



**Figura 20:** Curvas de crecimiento (A) y evolución de la expresión de EGasa1 (B) en fermentaciones lotes alimentados en medio mínimo con glicerol para las cepas BL21 AI conteniendo los plásmidos pKCN196 y pKCN207. Las fermentaciones fueron hechas por duplicado y la figura muestra el promedio de ambas, con menos del 10% de desviación estándar.

Las productividades volumétricas de los lotes alimentados para las cepas que llevan los plásmidos pKCN196 y pKCN207 fueron 6,1U/ml/hora y 10U/ml/hora respectivamente. Si bien con la cepa que sobre-expresa *glpF-prsA* se obtuvo mayor productividad que con la que solo sobre-expresa *egasa1* y *groESL*, no se superó la productividad máxima, por lo que los pasos siguientes de optimización se llevaron a cabo con la cepa BL21 AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7, utilizando glicerol como única fuente de carbono.

### **C. Reformulación del medio mínimo utilizado para los cultivos de alta densidad de *E. coli***

El objetivo de esta etapa fue rediseñar el medio salino HM con la finalidad de simplificarlo para reducir los costos de producción. Para ello se disminuyó la concentración y cantidad de las sales buscando compensar el aporte de las mismas, basándose en la comparación del medio HM con la composición elemental de *E. coli* [161].

Los componentes del medio salino HM se resumen en la Tabla 12 y la composición elemental de *E. coli* en la Tabla 13.

Componente	Peso Molecular	Concentración (g/L)	Moles Fosfato	Moles de Sodio	Moles Potasio	Moles Amonio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	20,80	0,15	-	0,15	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	132,07	3,00	0,02	-	-	0,05
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120,00	4,00	0,03	0,03	-	-
KOH	56,00	3,25	-	-	0,06	-
Extracto de Levadura	ND	0,50	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	<b>0,21</b>	<b>0,03</b>	<b>0,21</b>	<b>0,05</b>

**Tabla 12.** Componentes del medio HM. Elementos traza 3 ml/L (composición el Materiales y Métodos)

En la Tabla 13, se estimó la cantidad mínima necesaria de cada macro elemento, tanto en gramos como en moles, para lograr un crecimiento hasta DO<sub>600</sub>=20, es decir hasta finalizar la etapa de lote. *E. coli* en fase exponencial de crecimiento (limitado por glucosa), tiene un peso seco de 278 fg por célula.

Elemento	Peso molecular	Gramos por célula	Gramos para DO <sub>600</sub> =20	Moles para DO <sub>600</sub> =20
C	12	1,3395E-13	2,51	0,21

<b>H</b>	1	1,71E-14	0,32	0,32
<b>N</b>	14	3,99E-14	0,75	0,05
<b>O</b>	16	6,555E-14	1,23	0,08
<b>Na</b>	23	6,52E-15	0,12	<b>0,01</b>
<b>P</b>	35	1,17E-14	0,22	<b>0,01</b>
<b>K</b>	39	1,17E-14	0,22	<b>0,01</b>

**Tabla 13.** Composición elemental de *E.coli*.

Considerando que la cepa de *E. coli* BL21 AI no posee auxotrofías, se decidió eliminar el extracto de levadura del medio ya que además de tener un costo elevado (aproximadamente US\$ 5000 la tonelada), no permite definir el medio de cultivo exactamente, convirtiéndolo en un medio complejo.

Luego se reformuló el medio de manera que en lugar de agregar cuatro componentes diferentes que aporten fosfato, potasio, sodio y nitrógeno, se agreguen sólo dos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaOH}$ . El nitrógeno puede ser aportado por el  $\text{NH}_4\text{OH}$  utilizado para mantener el  $\text{pH} = 7$  en el medio a lo largo del proceso de fermentación. En la Tabla 14 se encuentran las cantidades molares aportadas por cada uno de los componentes del medio reformulado, llamado Fantasía.

<b>Medio</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentración</b>	<b>Moles</b>	<b>Moles de</b>	<b>Moles</b>
<b>Fantasía</b>	<b>Molecular</b>	<b>(g/L)</b>	<b>Fosfato</b>	<b>Sodio</b>	<b>Potasio</b>
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	136,09	<b>27,80</b>	0,21	-	0,21
<b>NaOH</b>	40	<b>1,32</b>	-	0,03	-
<b>Total</b>	-	-	0,21	0,03	0,21

**Tabla 14.** Componentes de medio mínimo Fantasía. Elementos traza 3 ml/L (composición el Materiales y Métodos)

Para comprobar la factibilidad del nuevo medio mínimo propuesto, se llevaron a cabo tres fermentaciones en paralelo con la cepa BL21 AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7, en fermentadores con un litro de volumen inicial de medio HM (Tabla 12), un litro de medio HM sin extracto de levadura, o un litro de medio mínimo Fantasía (Tabla 14).

Para todos los medios se alcanzaron valores de actividad y DO final similares: 340U/ml y 160UA con el medio HM; 376 U/ml y 142 UA con HM sin extracto de levadura; y 325U/ml y 150UA para el medio Fantasía.

La diferencia más significativa se encontró en el tiempo de duración del proceso. Mientras que la etapa inicial de lote la duración fue de 11 horas en el primer caso (medio HM), el proceso se extendió a unas 12 horas en el medio HM sin extracto de levadura y unas 16 horas con el medio Fantasía.

De aquí en adelante se continuó utilizando el medio Fantasía en los siguientes ensayos en lote alimentado.

#### ***D. Perfiles de alimentación Post- Inducción.***

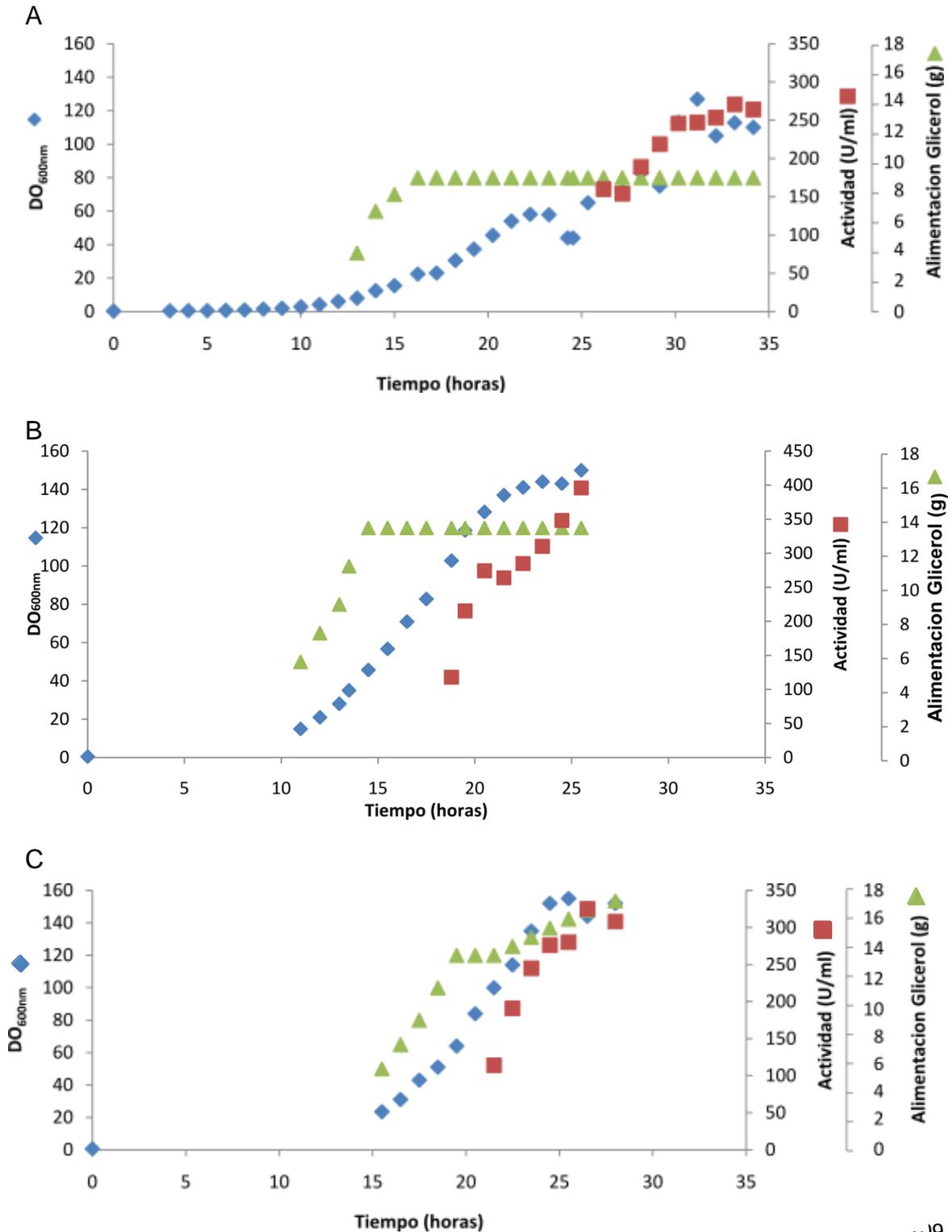
Se enfocó la siguiente etapa de esta tesis en determinar las condiciones post-inducción que permitan obtener la máxima productividad volumétrica de EGasa1. Para la optimización se trabajó sobre dos parámetros:

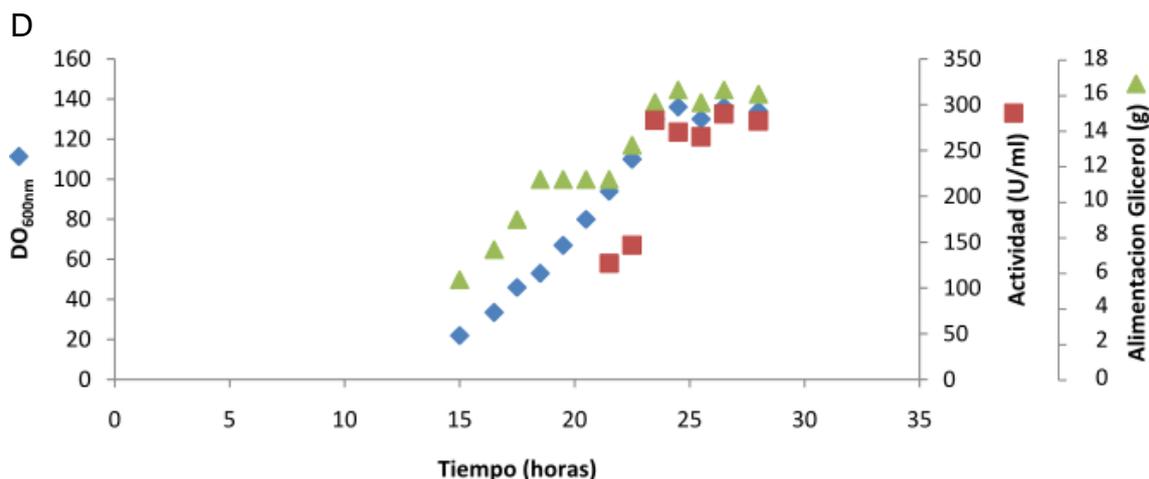
##### ***I. Análisis de perfil de caudales de alimentación.***

Se analizaron dos perfiles de alimentación post- inducción típicamente utilizados en procesos industriales de producción de enzimas recombinantes: flujo constante y flujo lineal [56, 113].

Se escogieron dos valores de flujos constantes: 8 g/L/h y 12 g/L/h, un flujo con incremento lineal seleccionado en base a la bibliografía [56], 0,56 g/L/h<sup>2</sup>, y un flujo con un incremento proporcional a la densidad óptica (10 g/L/h, para DO=100). En la Figura 21 se muestran las curvas de crecimiento, los flujos de

alimentación empleados y la evolución de la actividad EGasa1. A partir de éstas, se obtuvieron parámetros tales como la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) pre y post inducción, la actividad y densidad óptica final alcanzada, y la productividad volumétrica (U EGasa1/ml/hora).





**Figura 21:** Lotes alimentados con flujo exponencial hasta el momento de la inducción; y flujo constante de 8 g/L/h (A), de 12 g/L/h (B), flujo lineal con una pendiente de 0,56 g/L/h<sup>2</sup> (C) o un flujo proporcional a la DO (D) post Inducción. Las fermentaciones fueron hechas por duplicado y la figura muestra el promedio de ambas, con menos del 10% de desviación estándar.

Después de la inducción, el crecimiento y la actividad metabólica del hospedador se ven influenciados por la expresión de las proteínas recombinantes en las células [56]. De acuerdo a lo esperado, en todas las fermentaciones, la velocidad de crecimiento pre-inducción es la misma ( $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ ) y desciende bruscamente luego de la inducción,  $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$  para el flujo 8 g/L/h,  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$  para 12 g/L/h,  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  para flujo lineal con una pendiente de 0,56 g/L/h<sup>2</sup> y  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$  para un flujo proporcional a la DO<sub>600</sub>.

Las densidades ópticas a 600 nm finales fueron: 125 para el flujo constante 8 g/L/h, 150 para el flujo constante 12 g/L/h, 152 para para flujo lineal y 134 para el flujo proporcional a la DO<sub>600</sub>.

Los resultados más destacados se obtuvieron al medir la actividad EGasa1. El mayor valor se obtuvo con el flujo post inducción fijo de 12 g/L, 396 U/ml. Para los flujos 8 g/L, lineal y el flujo proporcional a la DO<sub>600</sub>, los valores resultaron ser considerablemente menores: 264 U/ml, 308 U/ml y 282 U/ml, respectivamente.

Para determinar cuál de los flujos de alimentación evaluados es el más conveniente, finalmente se calcularon los rendimientos específicos y las productividades para cada caso (Tabla 15).

	EGasa1 (mg)	Peso Seco (g)	$Y_{EGasa/PS}$ (mg/g)	Productividad (U/ml/hora)
Flujo Constante 8 g/L/h	7107±240	45,3±1,8	156,9±11,5	7,8±0,1
Flujo Constante 12 g/L/h	10661±269	54,0±2,2	197,4±13,0	13,7±0,7
Flujo Lineal 0,7 g/L/h <sup>2</sup>	8292±185	54,7±3,0	151,6±11,7	11,0±0,8
Flujo proporcional a DO <sub>600</sub>	7592±205	48,2±1,6	157,5±9,5	10,7±0,6

**Tabla 15.** Rendimientos específicos ( $Y_{EGasa/PS}$ ) y productividades obtenidas usando diferentes estrategias de alimentación Post- Inducción.

Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes.

A partir del análisis de todos los datos obtenidos, se determinó que el flujo de alimentación más adecuado para producir la enzima EGasa1 a partir de un lote alimentado de *E. coli* BL21 AI es el flujo constante de 12 g/L/h. La utilización de este flujo permite obtener tanto la mayor productividad volumétrica (13,7 U/ml/h) en 6 horas de inducción a 37°C, como el mayor rendimiento específico (197,4 mg EGasa1/g Peso seco).

## **II. Determinación de la relación carbono-nitrógeno (C:N) óptima en la solución de alimentación.**

El concepto de relación molar C:N es un importante factor que afecta el crecimiento celular y la producción de proteínas recombinantes.[162, 163]

Para evaluar como afectan diferentes relaciones molares C:N la productividad de *E. coli* para la EGasa1 se seleccionaron en base a reportes de la literatura [157] cuatro relaciones molares C:N: 4:1, 5:1; 7,5:1; 9:1.

En todos los casos los cultivos se crecieron en un fermentador con un litro inicial de medio mínimo Fantasía hasta el punto de inducción,  $DO_{600}=100$ , tal como se describió en los casos anteriores. A diferencia de los experimentos anteriores, donde la adición de la fuente de nitrógeno fue automática, llevada a cabo con el corrector de pH  $NH_4OH$ , en estos nuevos experimentos se desacopló la adición de carbono y nitrógeno. Para esto, se utilizó durante la fase de inducción glicerol como fuente de carbono y fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se mantuvo el perfil de agregado de glicerol y se ajustó el agregado de fosfato de amonio variando la relación molar a fin de determinar la relación C:N óptima. La temperatura se mantuvo a  $37^{\circ}C$  y el OD en valores mayores a 30%. El pH se reguló a 7 con el agregado de una solución de  $NaOH:KOH$  4M en relación molar 1:2 en lugar de  $NH_4OH$  25% para poder regular la cantidad de fuente de nitrógeno agregada. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 16.

Relación C:N*	$DO_{600}$ Final	Actividad EGasa1 (U/ml)	Glicerol Residual (g/L)	Amonio Residual (g/L)	Duración del proceso (h)	Productividad (U/ml/hora)
4:1	94±2	376±3	0,1±0,0	0,36±0,02	28,5±0,5	13,2±0,3
5:1	115±2	466±2	0,6±0,2	0,25±0,01	30,0±1,0	15,5±0,6
7,5:1	100±4	425±3	1,6±0,1	0,22±0,03	29,0±1,0	14,6±0,6
9:1	84±4	365±5	1,3±0,3	0,13±0,02	27,5±0,5	10,4±0,3

**Tabla 16.** Efecto de la relación C:N sobre la producción de EGasa1.

Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes.

Se observa que la mejor relación C:N de alimentación post-Inducción fue 5. Los valores de actividad EGasa1 final y de productividad volumétrica son los mayores obtenidos hasta el momento, 466 U/ml y 15,5 U/ml/hora respectivamente.

## DISCUSIÓN

En el presente capítulo se optimizaron las condiciones de producción de EGasa1 en cultivos de alta densidad de células en fermentadores: selección de la capa óptima, elección de la mejor fuente de carbono, y condiciones de post-Inducción.

Se seleccionaron [119] los genes *glpF* y *prsA* en cultivos en lote alimentado, utilizando glicerol como fuente de carbono y energía. Los mismos se sobre-expresaron junto con *egasa1* y *groES-groEL*, agrupándolos en un operón cuya transcripción se induce por agregado de L-arabinosa. En estos ensayos, las mayores actividades EGasa1 se obtuvieron con las construcciones pKCN207 (*egasa1-groES-groEL-glpF-prsA*) y pKCN196 (*egasa1-groES-groEL*), aunque ninguna mejoró el nivel de actividad obtenido por la expresión a partir de los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 por separado.

La expresión de los genes del complejo de chaperonas GroES/EL y *egasa1* a partir del mismo plásmido, en busca de simplificar el sistema, fue contraproducente. Probablemente la relación entre el número de copias del complejo de chaperonas y el número de copias de EGasa1 obtenidas como resultado de la expresión desde el mismo promotor no sea la óptima, y quizás por ello la expresión desde distintos plásmidos resulte más conveniente.

Por otra parte, contrario a los resultados obtenidos por Choi [96], los genes accesorios *glpF* y *prsA* sobre-expresados no contribuyeron a aumentar la actividad EGasa1/ml de cultivo en los ensayos realizados en 5 ml de medio, ni en los cultivos de altas densidades celulares en fermentadores.

En cuanto a la selección de la fuente de carbono los sustratos evaluados fueron: glucosa, la fuente de carbono más utilizada para las fermentaciones de *E. coli*, glicerol, el subproducto más importante de la industria del biodiesel, y sacarosa, una materia prima económica proveniente de la caña de azúcar. Para poder utilizar la sacarosa como sustrato, previamente se incorporó el operón metabólico *cscAKB* [120] a la cepa *E. coli* BL21 AI. Se obtuvo así la cepa NK5.

A partir de los resultados obtenidos en las fermentaciones utilizando diferentes fuentes de carbono (Capítulo 2, sección 3.A, Figura 17), claramente se pudo ver cómo el paso de crecimiento en lote a lote alimentado permitió incrementar el rendimiento específico de ambas cepas para todas las fuentes de carbono probadas.

Así, los procesos en lote alimentado son frecuentemente utilizados para alcanzar altas concentraciones celulares y mejorar la productividad, mientras que minimizan problemas como la inhibición por sustrato o nutriente, la formación de productos secundarios y las limitaciones de oxígeno disuelto en los cultivos aeróbicos. [50].

Para definir cuál es la fuente de carbono más conveniente para la producción de EGasa1, una enzima a ser utilizada en la industria del biodiesel en grandes volúmenes y con un margen de ganancia estrecho, resulta de vital importancia considerar el costo de cada fuente de carbono (Tabla 8).

Debido a la ventaja económica que genera, a que los rendimientos tanto en su forma cruda como refinada son similares y los mayores obtenidos, y a que de esta manera se está utilizando el producto residual de la transesterificación de

los aceites con metanol para producir biodiesel, se decidió en adelante utilizar glicerol como fuente de carbono para las fermentaciones.

Posterior a la selección de la fuente de carbono se rediseñó el medio salino HM, con la finalidad de obtener un medio más simple y reducir los costos de producción. Para ello se eliminó el extracto de levadura y se reformuló el medio con el fin de minimizar los componentes responsables del aporte de fosfato, potasio, sodio y nitrógeno, seleccionando sólo dos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaOH}$  (27,8g/L y 1,32g/L respectivamente). El nitrógeno es aportado por el  $\text{NH}_4\text{OH}$  utilizado para llevar el medio a pH 7. Con este nuevo medio, denominado Fantasía, se logró obtener valores similares de  $\text{DO}_{600}$  y actividad EGasa1 finales, pero se aumentó en unas 4-5 horas la duración del proceso. Esta variación podría deberse a la eliminación al extracto de levadura. Esta fuente de nitrógeno compleja brinda aminoácidos u oligopéptidos, los cuales deben ser sintetizados por *E. coli* en el medio Fantasía.

Finalmente se enfocó la siguiente etapa del proyecto en determinar las condiciones de post-Inducción que permitan obtener la máxima productividad volumétrica (actividad EGasa1 por unidad de volumen por tiempo).

Los cultivos que expresan proteínas recombinantes manifiestan importantes cambios en la fisiología celular, la velocidad de crecimiento y el metabolismo frente a la inducción. Se sobreexpresan genes en respuesta al estrés y se reprimen muchos genes housekeeping del hospedador [158]. Los cambios en la expresión génica y los flujos metabólicos también resultan en cambios en parámetros macroscópicos como la velocidad específica de crecimiento y los coeficientes de rendimiento. De esta forma, es difícil mantener una velocidad

de crecimiento y una productividad constante usando la misma estrategia de alimentación que antes de la inducción.

En primer lugar se analizaron perfiles de post-inducción típicamente utilizados en procesos industriales de producción de enzimas recombinantes: flujo constante a 8 g/L/h y 12 g/L/h, flujo lineal (inicial 10 g/L/h, pendiente 0,7 g/L/h<sup>2</sup>), y un flujo proporcional a la densidad óptica (10 g/L/h para DO=100).

Para el flujo constante de 8 g/ L se obtuvo la menor DO<sub>600</sub> y actividad EGasa1, con lo cual se puede suponer que la cantidad de glicerol agregada con este flujo constante no es suficiente para alcanzar el máximo rendimiento.

En el caso de los flujos no constantes se comienza a acumular glicerol luego de la cuarta hora de la inducción. En este caso la disminución en la velocidad de crecimiento no se debería a una limitación en la disponibilidad de la fuente de carbono sino a la acumulación de acetato por sobreflujo metabólico o a la lisis celular [164].

Se ha observado que niveles excesivos de fuente de carbono o nitrógeno o altos niveles de acumulación de acetato llevan a reducir la productividad de la proteína recombinante [165]. Esto puede explicar el bajo nivel de actividad obtenido con los flujos lineal y proporcional a la DO<sub>600</sub>.

En conclusión, se determinó que el flujo de alimentación más adecuado para producir la enzima EGasa1 a partir de un lote alimentado de *E. coli* BL21 AI es el constante de 12 g/L/h. Utilizando este flujo se obtiene tanto la mayor productividad (13,7 U/ml/h) luego de 6 horas de inducción a 37°C, como el mayor rendimiento específico (197,5 mg EGasa1/g Peso seco).

Se ha reportado que la relación C:N es más importante que la concentración de nitrógeno para incrementar la densidad celular y la concentración de productos al final de una fermentación [166]

Cuando la relación molar C:N en la alimentación post-inducción fue 5:1, tanto la actividad como la densidad óptica fueron las más altas entre las cuatro estrategias propuestas. El resultado es comparable al reportado en la bibliografía [157] y se logra aumentar la actividad enzimática un 17% con respecto al caudal constante de 12 g/L sin control del agregado de la fuente de nitrógeno.

Para las relaciones mayores a 5 se observó que a medida que la relación aumenta, la cantidad de glicerol remanente se incrementa y la actividad EGasa1 comienza a disminuir. Esto podría deberse a que por arriba de 5:1 el exceso de glicerol se convierte en ácido acético, afectando en primer lugar el crecimiento bacteriano y luego la producción de proteínas.

De esta manera se determinó que la relación carbono-nitrógeno (C:N) óptima en la solución de alimentación es 5. Con la misma se obtuvo el mayor valor de actividad EGasa1, 466 U/ml.

Todos estos resultados indican que optimizando las condiciones de crecimiento en lote alimentado para la cepa de *E. coli* BL21 AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7, con glicerol como única fuente de carbono, un flujo de alimentación constante post-inducción de 12 g/L y una relación C:N post-inducción 5, se logró incrementar la productividad de la EGasa1 hasta 15,5 U/ml/h.

# **Resultados y Discusión:**

## **CAPÍTULO 3**

## INTRODUCCIÓN

### ***Escalado del proceso de fermentación***

El objetivo de la optimización de un proceso de fermentación es incrementar el rendimiento del producto final. Para aumentar el rendimiento del producto y asegurar su calidad, es clave mantener las condiciones de reacción óptimas y homogéneas minimizando el estrés microbiano y aumentando la concentración de los productos deseados.

Para el escalado de cada producto deben llevarse a cabo estrategias adecuadas que dependen de la caracterización detallada del proceso. Se deben identificar los parámetros más importantes que influyen en el rendimiento y la calidad del producto, y establecerlos como parámetros escalables, es decir, que se mantengan constantes [167].

La gran mayoría de los procesos de producción heteróloga de proteínas recombinantes utilizan: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* u hongos filamentosos. Existen procesos estandarizados para cada organismo que se describen en los libros de texto y sirven de base para el desarrollo de un proceso de manufactura particular [168].

Sin embargo, como las instalaciones de fermentación usualmente no están estrictamente diseñadas de acuerdo con los criterios de escalado, las condiciones del proceso pueden diferir significativamente y las estrategias o modelos solo se ajustan parcialmente.

El escalado exitoso en la mayoría de los casos no es el resultado de una estrategia experimental, sino el resultado de un proceso separado de desarrollo y optimización en cada escala [167].

***Procesamiento de los cultivos del lote alimentado. Purificación de EGasa1***

Aunque existe una amplia variedad de hospedadores para la producción de proteínas de interés comercial, *E. coli* continúa siendo la primera elección para procesos en gran escala [25]. Sin embargo, la misma tiene una gran desventaja, no secreta altos niveles de proteínas al medio. Consecuentemente, es necesario implementar métodos para liberar el producto de las células luego de la fermentación. [93]. Inicialmente, para este propósito se utilizó un homogenizador de alta presión (GEA Niro Soavi) una vez finalizada la producción de EGasa1 por fermentación en cultivos de lote alimentado. Estos equipos son los más ampliamente utilizados para la disrupción celular a gran escala. Poseen una bomba de alimentación (1-10 bar) que transporta la suspensión a la bomba de alta presión donde es comprimida hasta 500-1000 bar. La válvula se abre cuando la presión excede cierto valor y la suspensión es liberada a gran velocidad chocando contra un anillo de impacto. En la válvula las células se someten a turbulencia, cavitación y esfuerzos de corte líquido. La fuerza del choque sobre el anillo es la causa principal del rompimiento [100].

## RESULTADOS

### 1. Escalado de la fermentación

Para probar la robustez del proceso de producción de EGasa1 utilizando la cepa de *E. coli* diseñada, y con el objeto de obtener una cantidad suficiente de enzima para realizar ensayos a nivel industrial, se realizó el escalado del proceso de fermentación en lote alimentado a un biorreactor de 1000 L (Figura 21).

A



B



**Figura 21:** Vista externa del fermentador de 1000L utilizado para el escalado de la producción de EGasa1 (A). Vista interna del fermentador, donde se puede apreciar uno de los mezcladores y el cultivo post- fermentación (B).

Para llevar a cabo este proceso se dispuso de un fermentador de 1300 L totales con 1000 L de capacidad útil, relación:altura diámetro 3:1, una velocidad de agitación máxima de 180 rpm y una capacidad de disipar calor de 28 Kcal/Lh.

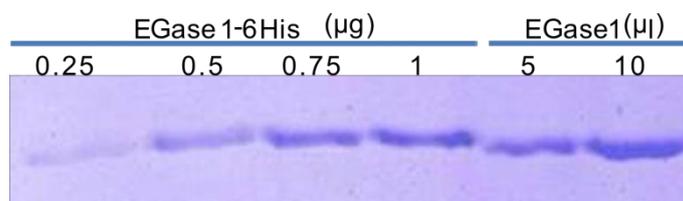
La estrategia de escalado utilizada fue la de la velocidad de la punta de paleta, basándose principalmente en las litaciones impuestas por el tanque [169].

La cepa recombinante *E. coli* BL21AI con los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 se cultivó a 37°C en 700 L de medio HM usando glicerol 10 g/L como fuente de carbono. Se obtuvo una  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,36 h<sup>-1</sup>. Después del consumo de la cantidad inicial de glicerol, se utilizó una ecuación de balance de masa para determinar la velocidad de alimentación con el fin de mantener la tasa de crecimiento específico a 0,20 h<sup>-1</sup>. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 75, se añadieron 0,5 g/L de L-arabinosa para inducir la expresión de GroES/EL y EGasa1. La temperatura se mantuvo a 37°C, y la velocidad de alimentación se mantuvo a un valor constante de 8 L de solución de alimentación por hora (6,4 g de glicerol/l/h). Si bien éste no es el flujo de alimentación óptimo determinado previamente, el metabolismo asociado a un flujo mayor hubiese generado una cantidad de calor imposible de disipar con el equipo disponible en la planta industrial para el reactor de 1000L.

La expresión basal de la EGasa1 fue 160 U/ml a la DO<sub>600</sub> de inducción y después del agregado de L-arabinosa la producción de EGasa1 aumentó continuamente, hasta que se alcanzó una actividad máxima de 266 U/ml 11 horas después de la inducción, obteniéndose así una productividad de 7,1 U/ml/hora.

La productividad de EGasa1, el perfil de crecimiento y el consumo de glicerol fueron similares en más de cinco experimentos de fermentación diferentes, confirmando la estabilidad de este sistema de expresión y su factibilidad para ser utilizado en un proceso industrial.

La cuantificación de proteínas de los extractos obtenidos en estos procesos de fermentación indica una concentración final de EGasa1 de 7 g/L (Figura 22).



**Figura 22:** SDS-PAGE de extractos de células purificados con tratamiento térmico, obtenidos a partir del proceso de fermentación a escala industrial. Las calles 1-4 tienen cantidades crecientes de un estándar de His6–Egasa1 purificada previamente cuantificada (nótese que tiene un PM ligeramente superior debido a la presencia de la cola de hexa-histidina). En las calles 5-6 se sembraron 5 y 10 µl de la fermentación (muestras diluidas 1/60) respectivamente, luego de realizar el tratamiento térmico que se describe en el punto siguiente. La cuantificación densitométrica de las imágenes escaneadas se hizo con el software ImageJ e indica una concentración de 7 g/L de EGasa1 en el extracto celular.

## **2. Procesamiento de los cultivos del lote alimentado. Purificación de EGasa1**

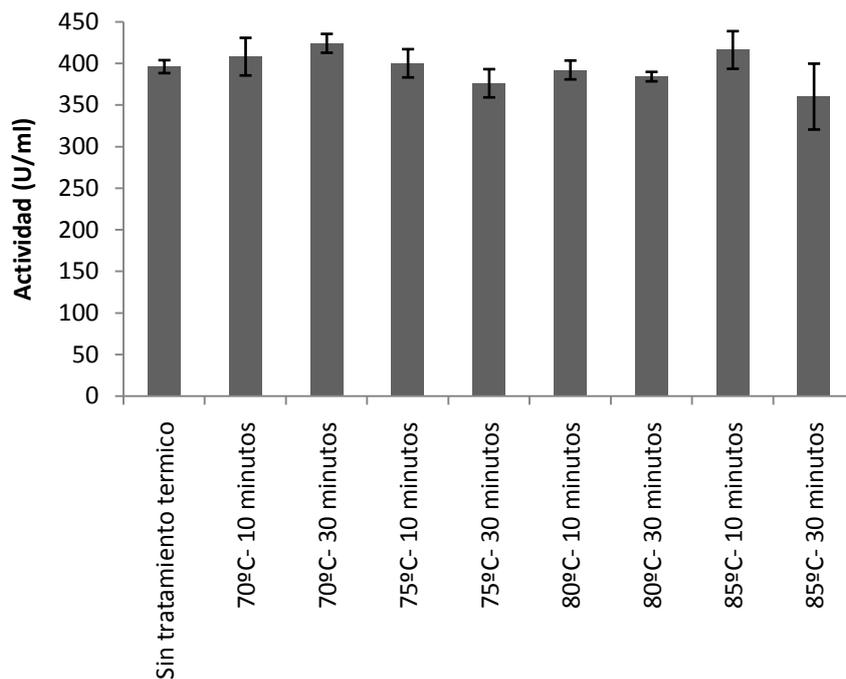
Teniendo en cuenta que EGasa1 es termoestable, se propuso reemplazar el paso de lisis con homogeneizador por lisis térmica, como se ha reportado previamente para otras proteínas provenientes de microorganismos hipertermófilos [106]. Además, este tratamiento permitirá purificar la enzima de las proteínas del hospedador debido a que las proteínas del mesófilo *E. coli* son termolábiles, produciéndose su desnaturalización y precipitación.

Para ello se probaron diferentes temperaturas y tiempos de incubación para un cultivo de alta densidad de células de la cepa *E. coli* BL21 AI con los plásmidos

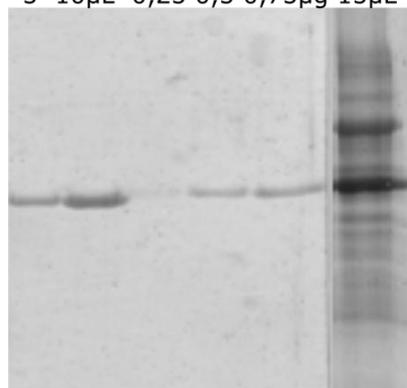
pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 expresando EGasa1 con una actividad final de 396U/ml.

Como se observa en la Figura 23 A la actividad EGasa1 sólo se ve levemente disminuida al incubar los cultivos a 85°C por 30 minutos.

A



EGasa1 EGasa1-6His S  
5 10µL 0,25 0,5 0,75µg 15µL



**Figura 23:** Actividad EGasa1 luego del calentamiento del cultivo a distintas temperaturas y tiempos determinada por actividad  $\beta$ -glucosidasa. (A) Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. SDS-PAGE de extractos de células purificados con tratamiento térmico (calles 1 y 2) y del extracto soluble sin tratamiento térmico (S, calle 6) (B). Las calles 3-5 tienen cantidades crecientes de un estándar de His6-EGasa1 purificada previamente cuantificada. Las calles 1 y 2 tienen 5 y 10  $\mu$ l de la

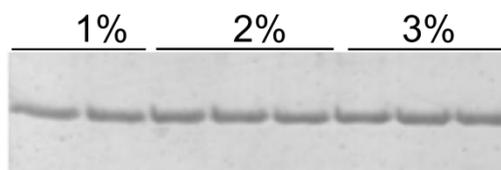
fermentación (muestras diluidas 1/60), luego de realizar el tratamiento térmico y la calle 6 tiene 15µl de la fermentación lisada con homogeneizador sin tratamiento térmico.

De esta manera se fijaron las condiciones de lisis en 80 °C durante 20 minutos con agitación mecánica.

### **3. Puesta a punto de la extracción de EGasa1 con diferentes detergentes**

En los ensayos iniciales, como se detalla en Materiales y Métodos, para extraer a la proteína EGasa1 de la membrana de la cepa de *E. coli* productora, se utilizó el detergente Tritón X-100 siguiendo el protocolo utilizado por Matsui y colaboradores con la proteína de *Pyrococcus horikoshii* 90% homóloga a EGasa1.

El primer objetivo fue determinar si la concentración propuesta era suficiente para extraer toda la proteína en la fracción soluble, para lo cual se probaron tres concentraciones de Triton X-100, 1%, 2% y 3%.



**Figura 24:** SDS-PAGE de extractos de células purificados con tratamiento térmico y diferentes concentraciones de Triton X-100. Se sembraron 10 µl de la fermentación (muestras diluidas 1/60) por duplicado 1% y triplicado 2 y 3%.

Como se observa en la Figura 24, el aumento de la concentración del detergente, no mejora la extracción de la proteína EGasa1 por lo que se decidió continuar trabajando con 1% de detergente en las soluciones de extracción.

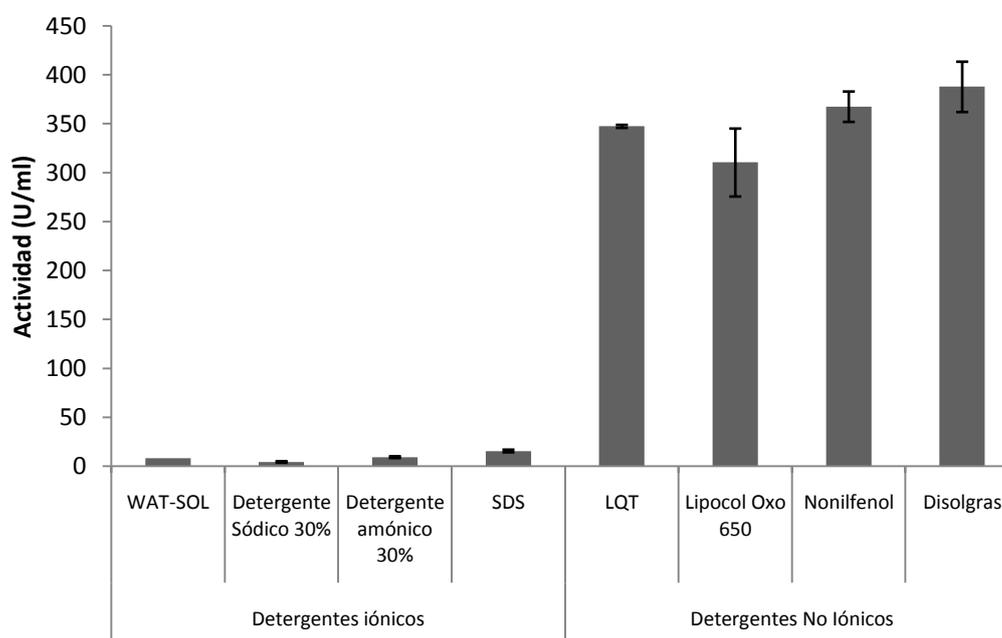
Por otra parte y debido al elevado costo del Triton X-100, se buscó explorar alternativas más económicas que pudieran ser utilizadas a escala industrial (Tabla 17).

Clasificación de acuerdo a su porción hidrofílica	Detergente	Características	Precio (U\$/kg)	Índice HLB
No iónico	Nonilfenol Etoxilado 10 moles	Similar al Tritón X-100, aunque fue prohibido por la directiva 2003/53/CE del Parlamento europeo	4,90	13,4
No iónico	Alcohol laurico etoxilado 7 moles	Líquido. Utilizado frecuentemente para reemplazar a NF Etox.	3,70	12,3
No iónico	Alcohol laurico etoxilado 9 moles	Presentación en forma de pasta	63,60	13,4
No iónico	Oleosol SN 700	Poli éteres glicosilados grasos	4,24	ND
No iónico	Lipocol Oxo 650 (6-7 moles de óxido de etileno)	Mezcla de alcoholes etoxilados	3,40	ND
Aniónico	SDS	Sólido	1043,00	ND
Cationico	Detergente amónico	Líquido	9,00	ND
Aniónico	Detergente sódico-QP TENSOL S30	Líquido	31,00	ND
No iónico	Disolgras	Mezcla de glicoles, tensioactivos no iónicos, EDTA, hidróxido sódico, agua, antiespumantes	4,16	ND
Aniónico	WAT-SOL	Solución de tensioactivos aniónicos, sales alcalinas débiles y solventes del tipo glicol y éter de glicol.	ND	ND
No-iónico	LQT		119,00	ND
No- iónico	Tritón X-100		200,00	ND

**Tabla 17:** Detergentes  
ND: No determinado

En primer lugar, para descartar un posible efecto negativo de los detergentes sobre la actividad o estabilidad enzimática se incubó un preparado de la enzima EGasa1 con detergentes iónicos y no iónicos, durante 30 minutos a 80

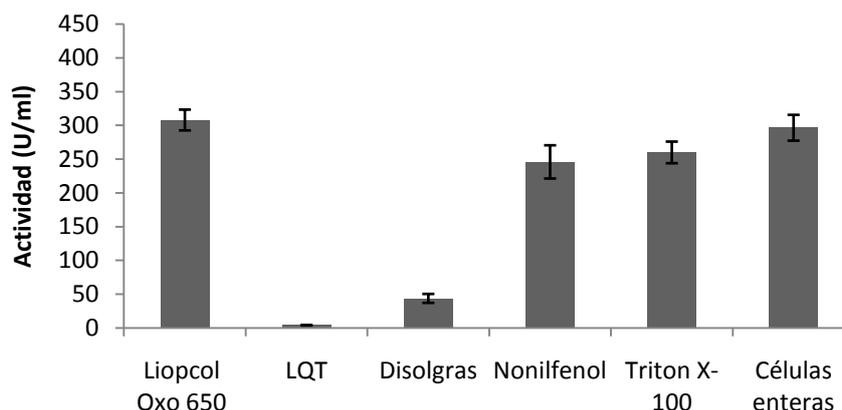
°C y luego se midió la actividad recuperada. Los resultados se muestran en la Figura 25.



**Figura 25:** Perfiles de actividad luego de incubar preparados de la enzima EGasa1 con una concentración final de 1% (P/V) de cada detergente durante 30 minutos a 80°C. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 25, los detergentes iónicos disminuyeron significativamente los valores de actividad EGasa1, probablemente por desnaturalización de la proteína.

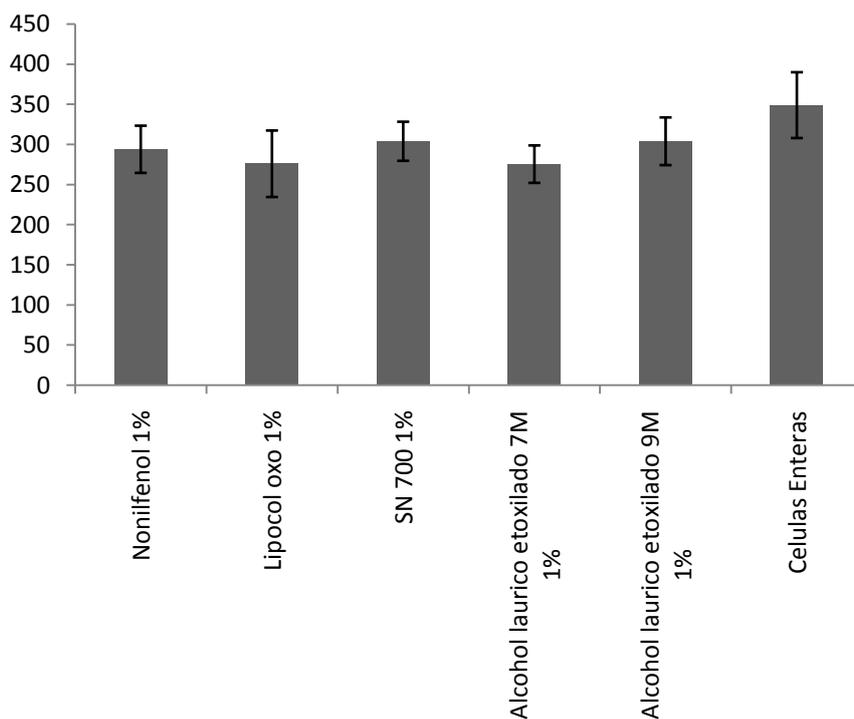
Como próximo paso se ensayó la extracción de la EGasa1 con los detergentes que no afectaron la actividad EGasa1 (Figura 25). Para ello se utilizó un cultivo de alta densidad de células de la cepa *E.coli* BL21 AI con los plásmidos pKCK-BAD-EGasa1 y pGro7 expresando EGasa1 con una actividad final de 349U/ml, tratado con lisis térmica. La Figura 26 muestra las actividades recuperadas en presencia de 1% (P/V) de cada uno de los detergentes.



**Figura 26:** Recuperación de EGasa1 a partir del cultivo, determinado por actividad  $\beta$ -glucosidasa en presencia de distintos detergentes. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Los detergentes LQT y Disolgras no extraen la EGasa1. Tanto con Lipocol Oxo 650 como con Nonilfenol se obtienen buenos niveles de actividad EGasa1, comparables a los obtenidos con Tritón X-100.

El uso del Nonilfenol se encuentra prohibido por la directiva 2003/53/CE del Parlamento europeo, por su impacto sobre el medio ambiente, y el Lipocol Oxo 650 es una mezcla comercial de preparados a base de alcoholes etoxilados, pero de composición desconocida. Es por ello que se buscaron nuevas alternativas de alcoholes etoxilados para reemplazar estos detergentes reteniendo los niveles de actividad recuperados. Se comparó entonces la extracción de EGasa1 utilizando los detergentes que habían dado mejor resultado en el ensayo anterior con alcohol laurico etoxilado con 7 y 9 moles (Figura 27).



**Figura 27:** Extracción de EGasa1 luego del calentamiento del cultivo en presencia de distintos detergentes. Los resultados son valores promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 27, se obtuvieron valores similares de actividades con todos los detergentes. Se decidió seleccionar Alcohol Láurico Etoxilado de 7 moles por encima de las mezclas de composición desconocida, con el objetivo de no depender del proveedor, y por sobre el Alcohol Láurico Etoxilado de 9 moles, que se presenta en forma de pasta dificultando su manipulación.

#### **4. Evaluación y optimización de la actividad de la EGasa1 en biodiesel**

Una vez optimizada la producción de la EGasa1 mediante fermentación en lote alimentado y posterior tratamiento térmico en presencia de detergente, se decidió buscar las mejores condiciones del tratamiento del biodiesel con la enzima en busca de reducir costos y aumentar la eficiencia del proceso, para favorecer su implementación a nivel industrial.

Se determinó la influencia de diferentes factores, incluyendo el pH, la composición de la solución buffer, la relación agua/biodiesel, temperatura de reacción y la concentración de la enzima.

Los ensayos se realizaron utilizando una muestra industrial de biodiesel de soja crudo conteniendo 75 ppm de EG en frascos de 20 mL, con agitación magnética.

La Figura 28A ilustra el comportamiento de EGasa1 a diferentes pHs, ajustado con soluciones buffer de citrato o fosfato. Los resultados muestran que la enzima es más activa a valores de pH en el rango 5,5-7,5, y presenta un rendimiento máximo alrededor de pH 6,75 utilizando buffer fosfato.

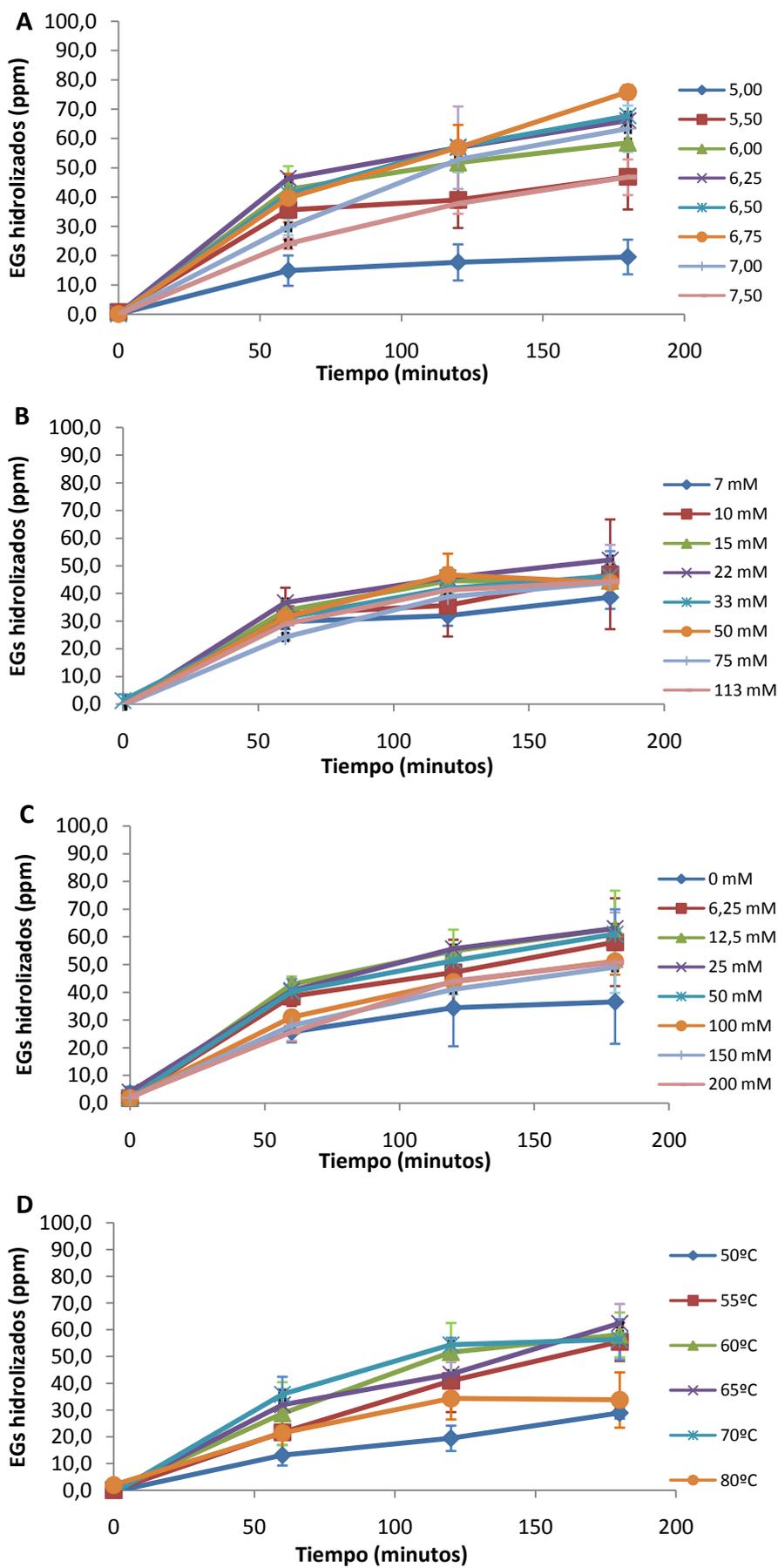
Para establecer las condiciones óptimas para el proceso se analizaron varias concentraciones de buffer fosfato. La Figura 28B muestra que la concentración de fosfato podría reducirse a 10 mM sin alterar el rendimiento de la enzima.

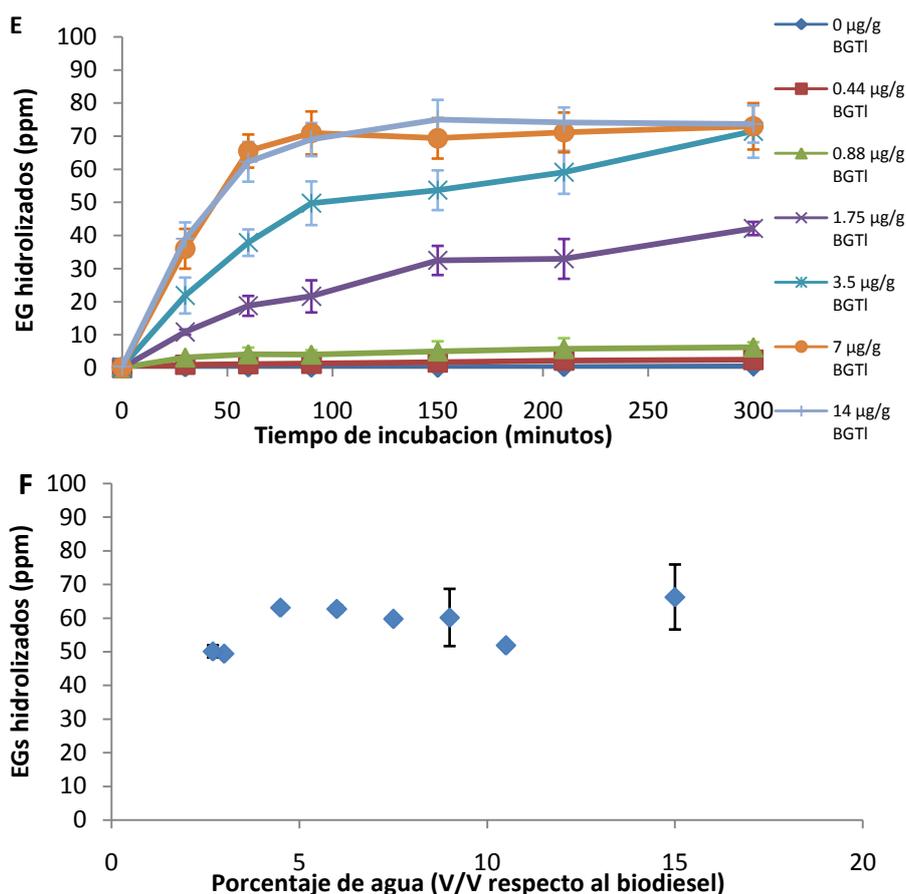
De la misma forma, se analizó la concentración óptima de NaCl. La Figura 28C muestra que las mejores condiciones de reacción se obtuvieron para los valores entre 6 y 50 mM, siendo la concentración óptima 20 mM de NaCl.

El efecto de la temperatura en la hidrólisis de EG por EGasa1 se ilustra en la Figura 28D. Los datos muestran que la enzima presenta una actividad máxima a 65°C.

Finalmente, se ensayó la concentración mínima de EGasa1 necesaria para eliminar completamente los EGs del biodiesel. La Figura 28E muestra que 7 µg de enzima por gramo de biodiesel es suficiente para lograr este objetivo en un plazo de 2 h, un tiempo razonable para el proceso.

Los ensayos anteriores se realizaron con una cantidad de agua arbitrariamente fijada en 15 mL por 100 g de biodiesel. Debido a que la cantidad agua en un proceso industrial se relaciona directamente con los efluentes producidos, se probó la reacción de EGasa1 con cantidades variables de buffer en biodiesel crudo (Figura 28F). Se observó que el contenido de agua necesario para obtener hidrólisis completa de EG puede reducirse a 4,5 mL por 100 g de biodiesel, manteniendo al mismo tiempo el rendimiento enzimático.





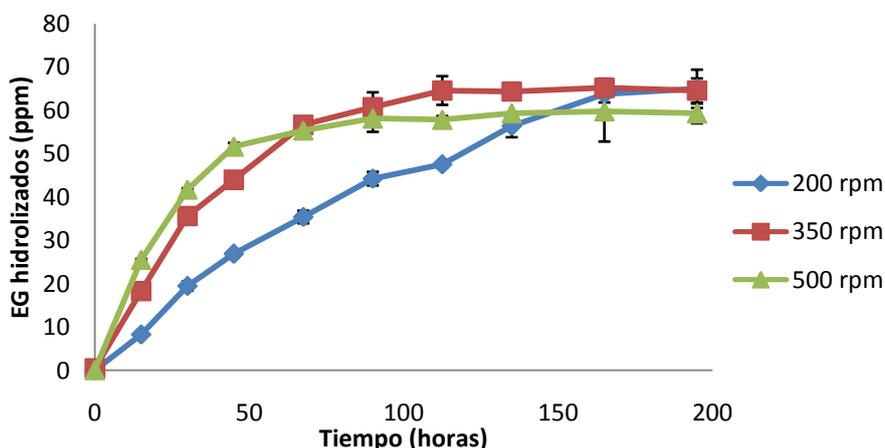
**Figura 28.** Optimización del tratamiento enzimático. Influencia de los factores de reacción sobre la eficiencia de la hidrólisis de EG mediada por EGasa1 en mezclas de biodiesel de soja crudo/agua. Condiciones experimentales: **A.** Mezclas biodiesel/agua 100:15, 5µg de enzima/g biodiésel, 70°C y buffer fosfato o citrato 50 mM de diferentes pHs, **B.** Mezclas de biodiesel/agua 100:15, 5µg de enzima/g de biodiesel, 70°C, buffer fosfato (pH 6,75) a diferentes concentraciones, **C.** Mezclas de biodiesel/agua 100:15, 5 µg de enzima/g de biodiesel, buffer fosfato 20 mM (pH 6,75), 70°C y diferentes concentraciones de NaCl, **D.** Mezclas de biodiesel/agua 100:15, 5 µg de enzima/g de biodiesel, buffer fosfato 20 mM (pH 6,75), NaCl 20 mM, a diferentes temperaturas, **E.** Mezclas de biodiesel/agua 100:15, buffer fosfato 20 mM (pH 6,75), NaCl 20 mM, 65°C y diferentes concentraciones de EGasa1, **F.** Mezclas de biodiesel/agua con diferentes contenidos de agua, 5 µg de enzima/g de biodiesel, 20 mM buffer fosfato (pH 6,75), 20 mM NaCl, 65°C. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres ensayos independientes

### 5. Tratamiento enzimático a gran escala

Con el fin de validar el proceso enzimático para su posterior implementación en plantas de producción de biodiesel, se realizaron a continuación experimentos en un reactor de 15 litros con una relación altura/diámetro de 3:1 y equipado con tres agitadores tipo Rushton (de seis palas) y cuatro deflectores. El

diámetro de los agitadores Rushton fue de 8,5 cm y el espaciado de 13 cm. Este reactor fue elegido por su similitud geométrica con un reactor industrial disponible en la planta de biodiesel “El Albardón”, para facilitar el posterior escalado.

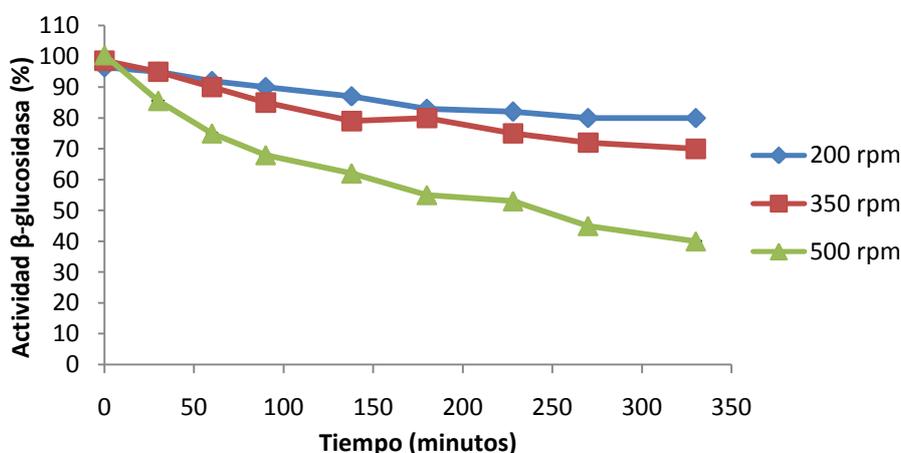
La temperatura se fijó a 65°C y el reactor fue cargado con 10 litros de biodiesel crudo que contenía 65 ppm de EG, 0,45 litros de solución de fosfato 20 mM a pH 6,7, NaCl 20 mM y 7 mg de enzima EGasa1/ kg de biodiesel. La Figura 29 muestra la evolución de la reacción en el tiempo, en tres ensayos en los cuales se varió la velocidad de agitación. Los mejores resultados fueron obtenidos cuando la velocidad de agitación fue 350 rpm (impulsor con velocidad de punta de 1,56 m/s), hidrolizándose completamente los EG en 2 horas. Las velocidades bajas de agitación extendieron el tiempo necesario para eliminar las EG, mientras que velocidades de agitación superiores a 350 rpm condujeron a hidrólisis incompletas.



**Figura 29:** Evolución de la reacción de hidrólisis de EG mediada por EGasa1 en mezclas de biodiesel de soja crudo/agua. Condiciones experimentales: mezclas biodiesel/agua 100:4,5, 7µg de enzima/g biodiésel, 65°C y buffer fosfato o citrato 20 mM de diferentes pH 6,7, NaCl 25mM.

El análisis de la estabilidad proteica reveló que la actividad de EGasa1 disminuye notablemente a una velocidad de agitación de 500 rpm (Figura 30).

Este resultado marca un límite para la velocidad de mezcla debido a la inestabilidad de la enzima.



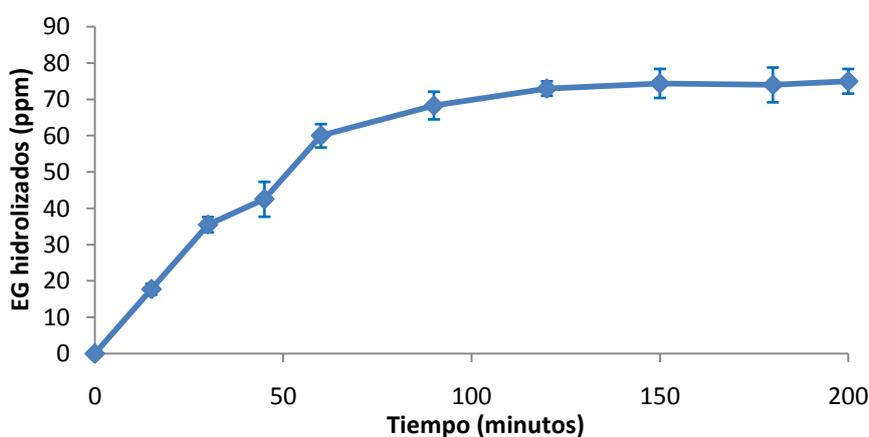
**Figura 30:** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de EGasa1 en mezclas de biodiesel de soja crudo/agua. Actividad  $\beta$ -Glucosidasa recuperada de la fase acuosa durante el curso de la hidrólisis de EG catalizada por EGasa1. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres ensayos independientes.

El proceso fue finalmente escalado hasta 20 toneladas manteniendo la velocidad de punta de paleta constante, ya que éste ha sido reportado como el mejor criterio de escalado para dispersiones líquido-líquido en reactores agitados, como los que se utilizaron en estos experimentos [170, 171]. El reactor industrial utilizado tiene una relación de altura:diámetro de 3,5: 1 y contiene tres paletas tipo Rushton (68 cm de diámetro) con seis palas cada una y cuatro deflectores. La mezcla de biodiesel, solución de fosfato, y enzima se preparó como se ha descrito anteriormente, se mantuvo la temperatura a 65°C, y la velocidad de agitación se fijó en 43 rpm (velocidad de la punta del impulsor de 1,53 m/s).

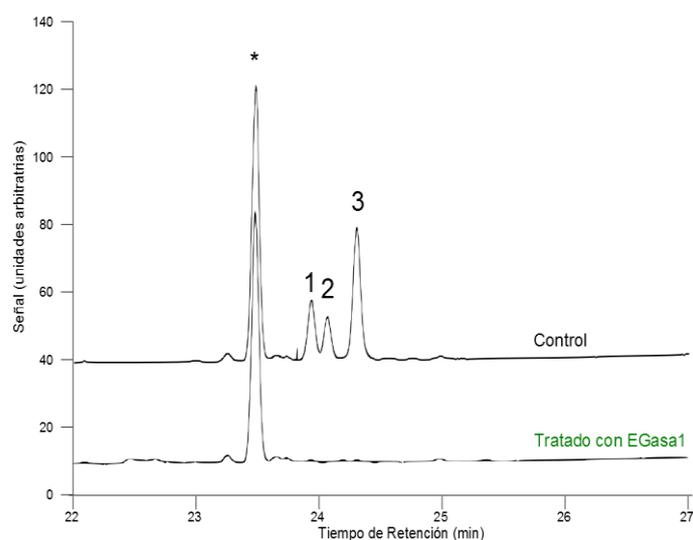
El contenido de EG inicial fue de 75 ppm. La Figura 31A muestra que la evolución de la reacción en el tiempo, en escala industrial, es similar a la obtenida con el reactor de 15 L, indicando el éxito de la estrategia de escalado.

Se realizó un análisis SPE-GC-FID de EG de las muestras tratadas y no tratadas para dar soporte a los datos obtenidos fluorométricamente. No se observaron señales correspondiente a los tres principales tipos de EG en los cromatogramas de las muestras (figura 31B), lo que confirma la eficacia de la tratamiento en un proceso de escala de varias toneladas.

A



B



**Figura 31:** Eliminación de EG mediada por EGasa1 en un reactor industrial de 20 toneladas. Evolución de la reacción de hidrólisis de EG (expresado como % de conversión) en un biodiesel comercial que contiene 75 ppm de EG, con mezclas biodiesel/agua 100:4,5, 7 $\mu$ g de enzima/g biodiésel, 65°C y buffer fosfato o citrato 20 mM de diferentes pH 6,7, NaCl 25mM. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres ensayos independientes. (A) Análisis SPE GC-FID de muestras de biodiesel tratadas. Las huellas se desplazan en y para mayor

claridad (B) Los picos se marcan como sigue: \*Std estándar, glucósido de colesteroil; 1 campesteril glucósido; 2 de estigmasterilglucósido y 3  $\beta$ -sitosteril glucósido.

## **6. Impacto en las pruebas de calidad del biodiesel**

El biodiesel debe cumplir con los diferentes estándares de calidad especificados por cada país consumidor de este biocombustible. Aunque ninguna de estas especificaciones estipula un valor que limita el contenido de EG, el biodiesel con concentraciones de EG superiores a las 20 ppm por lo general no cumple con los estándares de las pruebas de filtrabilidad [10, 172, 173]. Sin embargo, la influencia real de los EG en el taponamiento de los filtros sigue siendo controvertida, y la formación de precipitados se atribuye también a la presencia de MAGs [174]. El biodiesel tratado con EGasa1 representa un excelente material con el que evaluar específicamente la influencia de los EG en los ensayos de calidad, ya que su concentración se reduce por debajo de 3 ppm sin alterar otros componentes presentes en la matriz de biodiesel.

Por lo tanto, se evaluó el biodiesel de soja tratado con EGasa1 y secado, en las siguientes pruebas: contaminación total (CT), prueba de filtración en frío (del inglés Cold Soak Filtration Test, CSFT), tendencia al bloqueo del filtro (Filter Blocking Tendency, FBT), y tendencia al bloqueo del filtro en frío (Cold Soak Filter Blocking Tendency, CSFBT) en paralelo.

Los resultados se muestran en la Tabla 18, demostrándose un mejoramiento en el desempeño del biodiesel en todas las pruebas, ya que alcanza valores marcadamente inferiores a los límites especificados para cada prueba. Además, el biodiesel tratado con EGasa1 se comportó de forma similar al biodiesel destilado, incluso para el riguroso ensayo CSFBT. Es importante

destacar que el contenido de MAGs en todas las muestras de biodiesel fue 0,1%, lo que indica que en ausencia de EG, incluso altas concentraciones de MAGs no afectan la calidad del biodiesel de soja.

**Tabla 18.** Resultados de los test de calidad del biodiesel

Muestra	CT (ppm)	CSFT (seg)	FBT	CSFBT
Biodiesel sin Tratar	60±4,5	458±43	4,3±1,0	6,5±1,0
Biodiesel tratado con EGasa1	0,5±0,2	80±3	1,0±0,0	1,0±0,0
Biodiesel Destilado	0±0	70±2	1,0±0,0	1,0±0,0
Especificaciones	<24	<360	<1,8	<1,8

Adicionalmente, como se observa en la Figura 32, el aspecto visual del biodiesel, que es importante para su comercialización, mejora notablemente luego del tratamiento con la enzima, desapareciendo la turbidez característica del biodiesel crudo.



**Figura 32:** Biodiesel de soja seco tratado con EGasa1 (izquierda) y biodiesel de soja seco previo al tratamiento enzimático.

**Discusión:**

Como punto de partida de este Capítulo se logró llevar a cabo exitosamente la producción de la EGasa1 en un volumen de 1000L. Si bien los valores de actividad y DO<sub>600</sub> finales resultaron inferiores, se logró trabajar con un volumen industrial, lo que permitió tener una aproximación real de costos, dificultades y necesidades para la implementación del proceso como una alternativa enzimática para el tratamiento del biodiesel.

El escalado se llevó a cabo adaptando el proceso a un reactor previamente diseñado, el cual no cumplió con todos los requisitos para llevar a cabo un escalado eficiente. Por ejemplo, la agitación y el sistema de enfriamiento resultaron insuficientes para la demanda del proceso optimizado, por lo que el OD, por momentos fue menor al 30%. El caudal de alimentación tuvo que ser disminuido hasta un valor en el cual la cantidad de calor generado no excediera la capacidad de refrigeración del reactor (28 Kcal/L.hora) para regular la temperatura.

Posteriormente se diseñó un método de procesamiento del cultivo rápido, efectivo y de bajo costo, compatible con los requerimientos industriales. Teniendo en cuenta reportes previos [23] se utilizaron altas temperaturas para lisis de las células (80°C) lo cual permite además eliminar al hospedador y desnaturalizar sus proteínas obteniendo un extracto altamente purificado. Debido a la naturaleza de la EGasa1, proteína periférica de membrana, se utilizó adicionalmente un detergente, alcohol laurico etoxilado de 7 moles al 1%, en las soluciones de extracción.

Luego de probar la factibilidad y robustez del escalado de la producción de la EGasa1 por un lado, y optimizando y escalando hasta volúmenes industriales

el tratamiento enzimático del biodiesel por otro, hemos determinado que la cantidad de caldo de fermentación requerido para la eliminación enzimática de EG es de aproximadamente 1L por tonelada de biodiesel crudo industrial de soja. Según estudios de costos realizados por nuestro grupo, el costo de la producción industrial de EGasa1 por fermentación en *E. coli* y extracción-purificación por termólisis en presencia de alcohol láurico etoxilado y posterior centrifugación estaría muy por debajo de US\$ 1 por litro.

La Tabla 19 describe un análisis simplificado de costos para un proceso de producción donde puede observarse que el uso de un fermentador de 10 mil litros podría abastecer la necesidad total de enzima para limpiar el 80% de la totalidad de biodiesel producido en nuestro país (considerando 2 millones de toneladas anuales) utilizando la tecnología propuesta. El modelo considera que la planta podría realizar 165 fermentaciones anuales, con un ciclo de duración, considerando tiempos muertos, es de 2 días y 35 días de parada de planta; estándares de producción alcanzables en base a nuestra experiencia.

Los costos de las instalaciones de fermentación están comprendidos dentro del rubro "costo de capital".

Insumos	0,19	Cantidad Egasa necesaria para limpiar una tonelada de Bio (g)	7,00
Staff	0,11	Redimiento de fermentacion (g Enzima/L)	7,00
Consumibles	0,07	Cantidad de fermentaciones anuales	165,00
Capex	0,12	Salarios Staff	184.000
Energia	0,09	Vol fermentador	10.000
Costo por litro de fermentación procesado	0,59	Costo capital	2.000.000
		Amortizacion equipos (años)	10,00
Costo produccion EGasa1 para limpiar una tonelada de bio	0,59	Consumibles anual (filtros, electrodos, repuestos varios, etc. Incluye mantenimiento de equipos)	120.000
		Duracion ciclo fermentacion, limpieza y esterilización (dias)	2,00
		Produccion EGasa1 anual (kg)	11.550
		Toneladas de Bio que pueden tratarse	1.650.000
		Fraccion del año que dura la campania	1

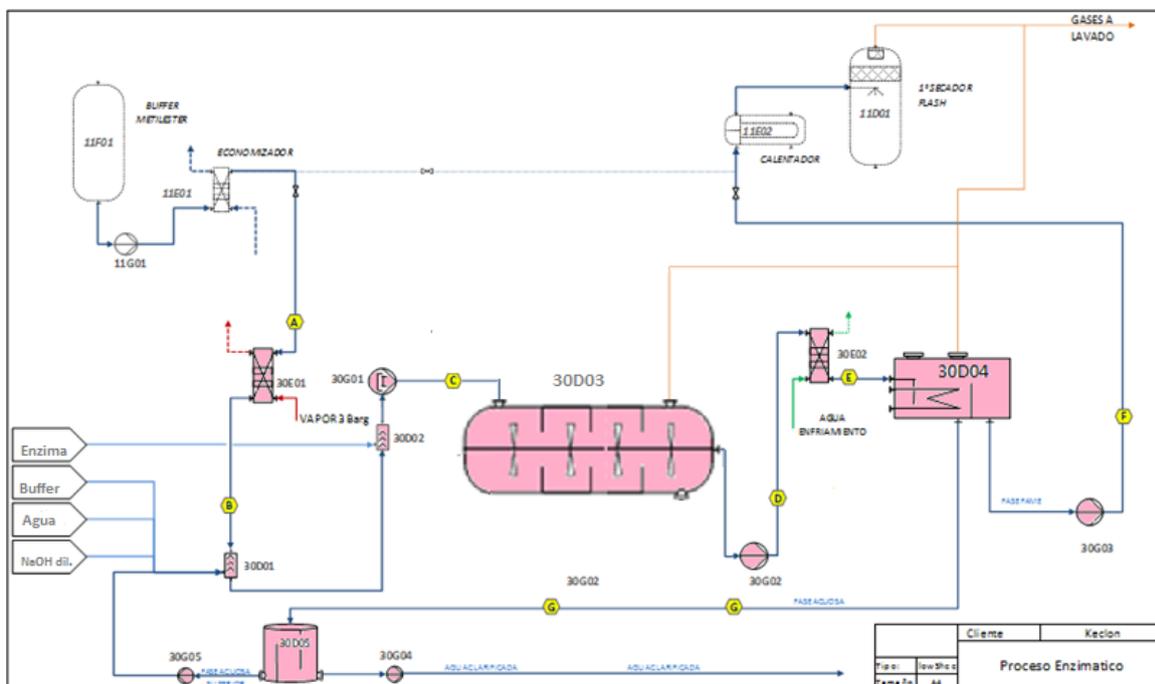
**Tabla 19.** Análisis de costo (en dólares estadounidenses) para el proceso de producción propuesto para EGasa1.

Considerando que el costo de la eliminación de EG por destilación se encuentra entre US\$20 y US\$35 por tonelada, el proceso de remoción enzimático utilizando EGasa1 presentado resulta una alternativa altamente rentable para la implementación de este proceso ecológico a escala industrial.

La optimización de las condiciones de trabajo redujo, además de la cantidad de enzima necesaria para la eliminación completa del contaminante EG, la cantidad de agua utilizada en la hidrólisis al 4,5% del volumen de biodiesel tratado, lo que disminuyó la cantidad de agua residual que se genera. Además, la concentración de iones presentes en el buffer de hidrólisis se redujo para producir un biodiesel que cumple con los requisitos de la norma ASTM D6751 y Norma EN14214.

La temperatura óptima de hidrólisis, 65°C, coincide con la temperatura a la salida del lavado del biodiesel, punto del proceso de producción de biodiesel

para plantas Lurgi y Desmet lo que permitiría insertar el tratamiento enzimático en este punto sin el impacto en los costos que generaría tener que elevar la temperatura (Figura 33).



**Figura 33:** Ejemplo de Inserción del proceso enzimático Keclon en la unidad 11 de transesterificación de una planta Lurgi. La unidad enzimática es llamada U30.

El proceso se escaló exitosamente hasta 20 toneladas usando un reactor agitado, en el cual 7g de EGasa1 por tonelada de biodiesel eliminaron por completo las 75 ppm de EG presentes en la muestra en aproximadamente 2 h.

Si bien los EG no se miden directamente en biodiesel de forma rutinaria debido a dificultades técnicas, su presencia tiene un profundo impacto en las pruebas de calidad, incluyendo TC, CSFT, FBT y CSFBT [10]. Los resultados de estas pruebas de calidad obtenidos con el biodiesel tratado con EGasa1 son en todos los casos comparables a los del biodiesel destilado, indicando la eficiencia de el proceso enzimático desarrollado en la provisión de un biodiesel de calidad superior.

El proceso enzimático aquí presentado es el primer reporte de tratamiento biodiesel capaz de reducir los EG presentes en un biodiesel comercial estándar de soja a los niveles requeridos para pasar pruebas de calidad tan rigurosas como FBT y CSFBT, impuestas por los mercados de Australia y Canadá, respectivamente [16].

# Conclusiones

La eliminación de EG utilizando una tecnología enzimática propone un proceso amigable con el medio ambiente, coherente con el objetivo de fondo de la producción de energías renovables. Este trabajo de tesis propone producir la enzima EGasa1 utilizando un proceso de fermentación a un costo que haga viable su implementación industrial.

Para lograr este objetivo se diseñó una estrategia multifactorial que incluyó: ingeniería del organismo productor, uso de herramientas de biología sintética para maximizar expresión del gen codificante para EGasa1 (Capítulo 1), diseño y optimización del proceso de fermentación (Capítulo 2) y escalado de la producción, desarrollo de un proceso de downstream para la recuperación de EGasa1 y tratamiento enzimático el biodiesel (Capítulo 3).

En el Capítulo 1:

- ♥ Se seleccionó la versión del gen sintético de la enzima de interés con su uso de codones optimizado tanto para *E. coli* como para *S. cerevisiae*, para su expresión en el hospedador *E. coli*.
- ♥ Se aumentó un 40% la expresión inicial mediante la selección del promotor pBAD, dentro de una colección de promotores evaluados, utilizando un inductor económico como la L-arabinosa.
- ♥ Con la incorporación del sistema de chaperonas moleculares GroES-GroEL se consiguió incrementar tres veces la actividad de la enzima.
- ♥ Se optimizaron las condiciones del proceso: temperatura y punto de inducción, y concentración de inductor. Se encontró que los mejores niveles de actividad determinados a través del sustrato  $\beta$ -glucosidasa se obtuvieron cuando pGro7 y pKCN-BAD-EGasa1 se indujeron en la fase exponencial de crecimiento con 0,5 g/L de L-arabinosa, a 37°C.

## En el Capítulo 2

- ♥ Se seleccionaron dos genes que se encuentran expresados en bajos niveles en los cultivos a altas densidades celulares, *glpF* que codifica para un transportador de glicerol y *prsA* una enzima clave para la biosíntesis del precursor 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), involucrada en la ruta biosintética de nucleótidos y aminoácidos.
- ♥ Al sobre-expresarlos junto a la EGasa1 y las chaperonas GroES-GroEL las mayores actividades EGasa1 se obtuvieron con las construcciones pKCN207 (*egasa1-groES-groEL-glpF-prsA*) y pKCN196 (*egasa1-groES-groEL*), aunque ninguna mejoró el nivel de actividad obtenido por la expresión desde los plásmidos pKCN-BAD-EGasa1 y pGro7 por separado.
- ♥ Se incorporó a la cepa hospedadora BL21 Al los genes del catabolismo de la sacarosa *cscAKB*, obteniendo la cepa NK5 capaz de crecer en sacarosa como única fuente de carbono.
- ♥ Se evaluó la fuente de carbono a utilizar para optimizar el rendimiento de las fermentaciones en lote alimentado. Los sustratos seleccionados fueron: glucosa, sacarosa, glicerol en su forma refinada y cruda.
- ♥ Los mayores niveles de actividad EGasa1 se obtuvieron con glucosa.
- ♥ Debido a la ventaja económica que genera y a que es un subproducto de la industria del biodiesel, se selecciono al glicerol como fuente de carbono preferencial para las fermentaciones siguientes.
- ♥ Se rediseñó el medio salino HM, con la finalidad de obtener un medio más simple y reducir los costos de producción, así se obtuvo al medio

definido Fantasía:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaOH}$  (27,8 g/L y 1,32 g/L respectivamente).

- ♥ Se analizaron diferentes perfiles de post-inducción y se determinó que el flujo de alimentación más adecuado es el constante de 12 g/L/h.
- ♥ Se determinó que la C:N óptima en la solución de alimentación es 5. Con la misma se obtuvo el mayor valor de actividad EGasa1, 466 U/ml.

En el Capítulo 3:

- ♥ Se escalo el proceso de producción de la enzima exitosamente hasta 1000L.
- ♥ Se establecieron las condiciones de lisis: calentamiento a 80°C, durante 20 minutos con el agregado de 1% de alcohol láuricoetoxilado de 7 moles.
- ♥ Se optimizaron de las condiciones de hidrólisis enzimática en biodiesel: se redujo la cantidad de enzima necesaria para la eliminación completa de los EG a 7µg por gramo de biodiesel, y la cantidad de agua utilizada en la hidrólisis al 4,5% del volumen de biodiesel tratado, lo que disminuyó la cantidad de agua residual que se genera.
- ♥ La concentración de iones presentes en el buffer de hidrólisis se redujo disminuyendo la concentración del buffer fosfato a 10 mM y la del NaCl a 20 mM.
- ♥ En cuanto a la temperatura y pH óptimos de hidrólisis los resultados fueron 6,75 y 65°C respectivamente.
- ♥ El proceso de tratamiento se escaló exitosamente hasta 20 toneladas usando un reactor agitado, en el cual 7g de EGasa1 por tonelada de

biodiesel eliminaron por completo las 75 ppm de EG presentes en la muestra en aproximadamente 2 h.

- ♥ Los resultados de las pruebas de calidad TC, CSFT, FBT y CSFBT obtenidos con el biodiesel tratado con EGasa1 son en todos los casos comparables a los del biodiesel destilado.

## Referencias

1. <http://albardonbio.com/biodiesel-en-argentina>, 2016.
2. Janet L., S., *ENERGÍAS RENOVABLES REPORTE DE LA SITUACIÓN MUNDIAL*, 2016, REN21 Paris, France.
3. Molina, C., *Director Ejecutivo de la Asociación Argentina de Biocombustibles e Hidrógeno*. Telam, 2016.
4. Tang, H., S.O. Salley, and K.S. Ng, *Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends*. *Fuel*, 2008. **87**(13): p. 3006-3017.
5. Moreau, R.A., K.M. Scott, and M.J. Haas, *The identification and quantification of steryl glucosides in precipitates from commercial biodiesel*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008. **85**(8): p. 761-770.
6. Van Hoed, V., et al., *Identification and occurrence of steryl glucosides in palm and soy biodiesel*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008. **85**(8): p. 701.
7. Bondioli, P., *The Biodiesel Handbook*. By Gerhard Knothe, Jon Van Gerpen and Jürgen Krahl (Eds.). *Biotechnology Journal*, 2007. **2**(12): p. 1571-1572.
8. Bzdek, J. and J. Pellegrino, *Methods of purifying biodiesel fuels*, 2007, Google Patents.
9. Narasimharao, K., A. Lee, and K. Wilson, *Catalysts in production of biodiesel: a review*. *Journal of biobased materials and bioenergy*, 2007. **1**(1): p. 19-30.
10. Pfalzgraf, L., et al., *Effect of minor components in soy biodiesel on cloud point and filterability*. *Inform Supplement Biorenewable Resources*, 2007(4): p. 17-21.
11. Van Hoed, V., et al., *Identification and occurrence of steryl glucosides in palm and soy biodiesel*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008. **85**(8): p. 701-709.
12. Cabrera Rodolfo, P.P., Andrusko Natalia, Hourca de Mónica, Labadie Guillermo, *Identificación, cuantificación y determinación de variabilidad en el tiempo de componentes insolubles del biodiesel de soja que se comercializan en Argentina*. ASAGA, 2010. **3**.
13. Danzer, M.F., et al., *Biodiesel cold filtration process*, 2015, Google Patents.
14. Aguirre, A., et al., *A fluorometric enzymatic assay for quantification of steryl glucosides in biodiesel*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2015. **92**(1): p. 47-53.
15. Aguirre, A., et al., *Enzymatic hydrolysis of steryl glucosides, major contaminants of vegetable oil-derived biodiesel*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014. **98**(9): p. 4033-4040.
16. Peiru, S., et al., *An industrial scale process for the enzymatic removal of steryl glucosides from biodiesel*. *Biotechnology for biofuels*, 2015. **8**(1): p. 1.
17. Menzella, H., S. Peiru, and L. Vetcher, *Enzymatic removal of steryl glycosides*, 2013, Google Patents.
18. Tao, J. and J.-H. Xu, *Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes*. *Current opinion in chemical biology*, 2009. **13**(1): p. 43-50.
19. Chotani, G., et al., *The commercial production of chemicals using pathway engineering*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000. **1543**(2): p. 434-455.
20. Markert, Y., et al., *Production of synthetically created phospholipase A2 variants with industrial impact*. *Biotechnology and bioengineering*, 2007. **98**(1): p. 48-59.

21. Mustranta, A., P. Forssell, and K. Poutanen, *Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems*. Enzyme and Microbial Technology, 1993. **15**(2): p. 133-139.
22. Loeffler, F., et al., *Vegetable oil enzymatic degumming process by means of Aspergillus phospholipase*, 1999, Google Patents.
23. Matsui, I., et al., *Novel substrate specificity of a membrane-bound  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii*. FEBS letters, 2000. **467**(2-3): p. 195-200.
24. Akiba, T., et al., *X-ray structure of a membrane-bound  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004. **57**(2): p. 422-431.
25. Demain, A.L. and P. Vaishnav, *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. Biotechnology advances, 2009. **27**(3): p. 297-306.
26. Andersen, D.C. and L. Krummen, *Recombinant protein expression for therapeutic applications*. Current opinion in biotechnology, 2002. **13**(2): p. 117-123.
27. Lee, S.Y., *High cell-density culture of Escherichia coli*. Trends in biotechnology, 1996. **14**(3): p. 98-105.
28. Chen, R., *Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond*. Biotechnology advances, 2012. **30**(5): p. 1102-1107.
29. Baeshen, M.N., et al., *Production of biopharmaceuticals in E. coli: current scenario and future perspectives*. J Microbiol Biotechnol, 2015. **25**(7): p. 953-962.
30. Huang, C.-J., H. Lin, and X. Yang, *Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2012. **39**(3): p. 383-399.
31. Swartz, J.R., *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Current opinion in biotechnology, 2001. **12**(2): p. 195-201.
32. Ahmad Raus, R., et al., *Cell rupture of recombinant escherichia coli using high pressure homogenizer*. Journal of Applied Sciences, 2010. **10**(21): p. 2717-2720.
33. Chou, C.P., *Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **76**(3): p. 521-532.
34. Petsch, D. and F.B. Anspach, *Endotoxin removal from protein solutions*. Journal of biotechnology, 2000. **76**(2): p. 97-119.
35. Fischer, B., I. Sumner, and P. Goodenough, *Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies*. Biotechnology and bioengineering, 1993. **41**(1): p. 3-13.
36. Hockney, R.C., *Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli*. Trends in biotechnology, 1994. **12**(11): p. 456-463.
37. Hatfield, G.W. and D.A. Roth, *Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering*. Biotechnol Annu Rev, 2007. **13**: p. 27-42.
38. Langer, T. and H. Echols, *Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding*. Nature, 1992. **356**(6371): p. 683.
39. Gragerov, A., et al., *Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(21): p. 10341-10344.

40. Langer, T., et al., *Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity*. The EMBO journal, 1992. **11**(13): p. 4757.
41. Jones, H., et al., *The mechanism of GroEL/GroES folding/refolding of protein substrates revisited*. Organic & biomolecular chemistry, 2006. **4**(7): p. 1223-1235.
42. Weissman, J.S., et al., *Characterization of the active intermediate of a GroEL–GroES-mediated protein folding reaction*. Cell, 1996. **84**(3): p. 481-490.
43. Georgescauld, F., et al., *GroEL/ES chaperonin modulates the mechanism and accelerates the rate of TIM-barrel domain folding*. Cell, 2014. **157**(4): p. 922-934.
44. Hartl, F.U., *Chaperone-assisted protein folding: the path to discovery from a personal perspective*. Nature medicine, 2011. **17**(10): p. 1206-1210.
45. Hoffmann, A., et al., *Concerted action of the ribosome and the associated chaperone trigger factor confines nascent polypeptide folding*. Molecular cell, 2012. **48**(1): p. 63-74.
46. Oh, E., et al., *Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo*. Cell, 2011. **147**(6): p. 1295-1308.
47. Thomas, J.G., A. Ayling, and F. Baneyx, *Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from E. coli*. Applied biochemistry and biotechnology, 1997. **66**(3): p. 197-238.
48. Baltz, R.H., A.L. Demain, and J.E. Davies, *Manual of industrial microbiology and biotechnology* 2010: American Society for Microbiology Press.
49. Choi, J.H., K.C. Keum, and S.Y. Lee, *Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(3): p. 876-885.
50. Shiloach, J. and R. Fass, *Growing E. coli to high cell density—a historical perspective on method development*. Biotechnology advances, 2005. **23**(5): p. 345-357.
51. Riesenber, D., et al., *High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate*. Journal of biotechnology, 1991. **20**(1): p. 17-27.
52. Eiteman, M.A. and E. Altman, *Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations*. Trends in biotechnology, 2006. **24**(11): p. 530-536.
53. Xu, B., et al., *Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology, 1999. **51**(5): p. 564-571.
54. Babu, K., et al., *Production of interferon- $\alpha$  in high cell density cultures of recombinant Escherichia coli and its single step purification from refolded inclusion body proteins*. Applied microbiology and biotechnology, 2000. **53**(6): p. 655-660.
55. Sletta, H., et al., *Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 2004. **70**(12): p. 7033-7039.
56. Wong, H.H., et al., *Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in Escherichia coli*. Biotechnology and bioengineering, 1998. **60**(3): p. 271-276.

57. Chao, Y.-P., et al., *High production of heterologous proteins in Escherichia coli using the thermo-regulated T7 expression system*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **58**(4): p. 446-453.
58. Hu, S.-Y., J.-L. Wu, and J.-H. Huang, *Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant Escherichia coli*. Journal of biotechnology, 2004. **107**(2): p. 161-171.
59. Kleist, S., et al., *Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with Escherichia coli by using different fed-batch fermentation strategies*. Applied microbiology and biotechnology, 2003. **61**(5-6): p. 456-462.
60. Elvin, C.M., et al., *Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in Escherichia coli*. Gene, 1990. **87**(1): p. 123-126.
61. De Boer, H.A., L.J. Comstock, and M. Vasser, *The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983. **80**(1): p. 21-25.
62. Brosius, J., M. Erfle, and J. Storella, *Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity*. Journal of biological chemistry, 1985. **260**(6): p. 3539-3541.
63. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p. 103-119.
64. Tabor, S. and C.C. Richardson, *A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(4): p. 1074-1078.
65. Andrianantoandro, E., et al., *Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline*. Molecular systems biology, 2006. **2**(1).
66. Tian, J., et al., *Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1050-1054.
67. Cameron, D.E., C.J. Bashor, and J.J. Collins, *A brief history of synthetic biology*. Nature Reviews Microbiology, 2014. **12**(5): p. 381-390.
68. Church, G.M., et al., *Realizing the potential of synthetic biology*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(4): p. 289-294.
69. Sleight, S.C., et al., *In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering*. Nucleic acids research, 2010: p. gkq179.
70. Dormitzer, P.R., et al., *Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics*. Science translational medicine, 2013. **5**(185): p. 185ra68-185ra68.
71. Elena, C., et al., *Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives*. Recombinant protein expression in microbial systems, 2014: p. 59.
72. Zhou, Z., et al., *Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in Escherichia coli by codon optimization*. Protein expression and purification, 2004. **34**(1): p. 87-94.
73. Villalobos, A., et al., *Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments*. BMC bioinformatics, 2006. **7**(1): p. 1.
74. Ikemura, T., *Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system*. Journal of molecular biology, 1981. **151**(3): p. 389-409.
75. Gustafsson, C., S. Govindarajan, and J. Minshull, *Codon bias and heterologous protein expression*. Trends in biotechnology, 2004. **22**(7): p. 346-353.

76. Takakura, Y., S. Katayama, and Y. Nagata, *High-level expression of tamavidin 2 in human cells by codon-usage optimization*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2015. **79**(4): p. 610-616.
77. Burgess-Brown, N.A., et al., *Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study*. *Protein expression and purification*, 2008. **59**(1): p. 94-102.
78. Menzella, H.G., J.R. Carney, and D.V. Santi, *Rational design and assembly of synthetic trimodular polyketide synthases*. *Chemistry & biology*, 2007. **14**(2): p. 143-151.
79. Wang, X., et al., *Codon optimization enhances secretory expression of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in E. coli*. *Protein expression and purification*, 2010. **72**(1): p. 101-106.
80. Welch, M., et al., *Design parameters to control synthetic gene expression in Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e7002.
81. Menzella, H.G., *Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 2011. **10**(1): p. 1.
82. de Souza, M.Q., et al., *A recombinant multi-epitope protein for hepatitis B diagnosis*. *BioMed research international*, 2013. **2013**.
83. Becker, J. and C. Wittmann, *Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production—the heartbeat of industrial strain development*. *Current opinion in biotechnology*, 2012. **23**(5): p. 718-726.
84. Peralta-Yahya, P.P., et al., *Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel*. *Nature Communications*, 2011. **2**: p. 483.
85. Kocharin, K., V. Siewers, and J. Nielsen, *Improved polyhydroxybutyrate production by Saccharomyces cerevisiae through the use of the phosphoketolase pathway*. *Biotechnology and bioengineering*, 2013. **110**(8): p. 2216-2224.
86. Elleuche, S., et al., *Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms*. *Current opinion in biotechnology*, 2014. **29**: p. 116-123.
87. Egorova, K. and G. Antranikian, *Industrial relevance of thermophilic Archaea*. *Current opinion in microbiology*, 2005. **8**(6): p. 649-655.
88. Haki, G. and S. Rakshit, *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review*. *Bioresource technology*, 2003. **89**(1): p. 17-34.
89. Te'o, V.S., et al., *Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium Dictyoglomus thermophilum for expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000. **190**(1): p. 13-19.
90. Littlechild, J. *Thermophilic Enzymes and Applications as Industrial Biocatalysts in 2015 SIMB Annual Meeting and Exhibition*. 2015. Simb.
91. Balasundaram, B., S. Harrison, and D.G. Bracewell, *Advances in product release strategies and impact on bioprocess design*. *Trends in biotechnology*, 2009. **27**(8): p. 477-485.
92. Harrison, S.T., *Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products*. *Biotechnology advances*, 1991. **9**(2): p. 217-240.
93. Middelberg, A.P., *Process-scale disruption of microorganisms*. *Biotechnology advances*, 1995. **13**(3): p. 491-551.
94. Harrison, S., J. Dennis, and H. Chase, *Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria*. *Bioseparation*, 1990. **2**(2): p. 95-105.

95. Anand, H., et al., *The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from E. coli*. Biochemical engineering journal, 2007. **35**(2): p. 166-173.
96. Choi, J. and S. Lee, *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology, 2004. **64**(5): p. 625-635.
97. Robbens, J., et al., *Production of soluble and active recombinant murine interleukin-2 in Escherichia coli: high level expression, Kil-induced release, and purification*. Protein expression and purification, 1995. **6**(4): p. 481-486.
98. Steidler, L., W. Fiers, and E. Remaut, *Efficient specific release of periplasmic proteins from Escherichia coli using temperature induction of cloned kil gene of pMB9*. Biotechnology and bioengineering, 1994. **44**(9): p. 1074-1082.
99. Baldwin, C.V. and C.W. Robinson, *Enhanced disruption of Candida utilis using enzymatic pretreatment and high-pressure homogenization*. Biotechnology and bioengineering, 1994. **43**(1): p. 46-56.
100. Hopkins, T., *Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins*. Bioprocess Technol, 1991. **12**: p. 57-83.
101. Garcia, F., *Cell disruption and lysis*. Encyclopedia of Bioprocess Technology, 2002.
102. Vieille, C. and G.J. Zeikus, *Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability*. Microbiology and molecular biology reviews, 2001. **65**(1): p. 1-43.
103. Watson, J., et al., *Release of intracellular protein by thermolysis*, 1987, Ellis Horwood, London. p. 105-109.
104. Neijssel, O., R.R. Meer, and K. Luyben. *Proceedings 4th European Congress on Biotechnology, 1987, Amsterdam, June 14-19, 1987*. in *European Congress on Biotechnology 1987: Amsterdam, Netherlands*. 1987. Elsevier.
105. Ren, X., et al., *A new study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from Escherichia coli by thermolysis*. Journal of biotechnology, 2007. **129**(4): p. 668-673.
106. Ren, X., et al., *Thermolysis of recombinant Escherichia coli for recovering a thermostable enzyme*. Biochemical engineering journal, 2007. **33**(1): p. 94-98.
107. Jones, M., *Surfactant interactions with biomembranes and proteins*. Chemical Society Reviews, 1992. **21**(2): p. 127-136.
108. Griffin, W.C., *Classification of surface-active agents by "HLB"*. J Soc Cosmetic Chemists, 1946. **1**: p. 311-326.
109. Schnaitman, C.A., *Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100*. Journal of bacteriology, 1971. **108**(1): p. 545-552.
110. Sellek, G.A. and J.B. Chaudhuri, *Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **25**(6): p. 471-482.
111. Cantarella, L., F. Alfani, and M. Cantarella, *Stability in Organic Solvent Mixtures of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Fructofuranosidase as Dry Powder and Entrapped in Poly-HEMA*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **864**(1): p. 219-223.
112. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual* 1989: Cold spring harbor laboratory press.
113. Menzella, H.G., E.A. Ceccarelli, and H.C. Gramajo, *Novel Escherichia coli strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **82**(7): p. 809-817.

114. Jensen, P.R. and K. Hammer, *The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters*. Applied and environmental microbiology, 1998. **64**(1): p. 82-87.
115. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. Journal of molecular biology, 1986. **189**(1): p. 113-130.
116. Amann, E., B. Ochs, and K.-J. Abel, *Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli*. Gene, 1988. **69**(2): p. 301-315.
117. Gentz, R. and H. Bujard, *Promoters recognized by Escherichia coli RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5*. Journal of bacteriology, 1985. **164**(1): p. 70-77.
118. Ikeda, R.A., C.M. Ligman, and S. Warshamana, *T7 promoter contacts essential for promoter activity in vivo*. Nucleic acids research, 1992. **20**(10): p. 2517-2524.
119. Choi, J.H., et al., *Enhanced production of insulin-like growth factor I fusion protein in Escherichia coli by coexpression of the down-regulated genes identified by transcriptome profiling*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(8): p. 4737-4742.
120. Bruschi, M., et al., *A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing Escherichia coli strains*. Biotechnology advances, 2012. **30**(5): p. 1001-1010.
121. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(12): p. 6640-6645.
122. Lee, S., et al., *Architecture and characterization of sarcosine oxidase from Thermococcus kodakarensis KOD1*. Extremophiles, 2012. **16**(1): p. 87-93.
123. Wu, D., et al., *Complete genome sequence of the aerobic CO-oxidizing thermophile Thermomicrobium roseum*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4207.
124. Villaverde, A. and M.M. Carrió, *Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies*. Biotechnology letters, 2003. **25**(17): p. 1385-1395.
125. Sørensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli*. Microbial cell factories, 2005. **4**(1): p. 1.
126. Jhamb, K. and D.K. Sahoo, *Production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase*. Bioresource technology, 2012. **123**: p. 135-143.
127. Nishihara, K., et al., *Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 1998. **64**(5): p. 1694-1699.
128. Martínez-Alonso, M., et al., *Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production*. Microbial cell factories, 2010. **9**(1): p. 1.
129. Sonoda, H., et al., *Functional expression of single-chain Fv antibody in the cytoplasm of Escherichia coli by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones*. Protein expression and purification, 2010. **70**(2): p. 248-253.

130. Shuo-shuo, C., L. Xue-zheng, and S. Ji-hong, *Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948*. Protein expression and purification, 2011. **77**(2): p. 166-172.
131. Wang, S., et al., *Soluble expression of recombinant human CD137 ligand in Escherichia coli by co-expression of chaperones*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2012. **39**(3): p. 471-476.
132. Zelena, K., U. Krings, and R.G. Berger, *Functional expression of a valencene dioxygenase from Pleurotus sapidus in E. coli*. Bioresource technology, 2012. **108**: p. 231-239.
133. Puigbo, P., et al., *OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences*. Nucleic acids research, 2007. **35**(suppl 2): p. W126-W131.
134. Menzella, H.G., et al., *Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes*. Nature biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1171-1176.
135. Menzella, H.G. and C.D. Reeves, *Combinatorial biosynthesis for drug development*. Current opinion in microbiology, 2007. **10**(3): p. 238-245.
136. Villalobos, A., M. Welch, and J. Minshull, *In silico design of functional DNA constructs*. Gene Synthesis: Methods and Protocols, 2012: p. 197-213.
137. Balzer, S., et al., *A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in Escherichia coli*. Microbial cell factories, 2013. **12**(1): p. 1.
138. de Marco, A., *Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in Escherichia coli*. Nature protocols, 2007. **2**(10): p. 2632-2639.
139. Deuerling, E. and B. Bukau, *Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2004. **39**(5-6): p. 261-277.
140. Schlieker, C., B. Bukau, and A. Mogk, *Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the E. coli cytosol: implications for their applicability in biotechnology*. Journal of biotechnology, 2002. **96**(1): p. 13-21.
141. Kiefhaber, T., et al., *Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation*. Nature biotechnology, 1991. **9**(9): p. 825-829.
142. Koma, D., et al., *Overexpression of the genes from thermophiles in Escherichia coli by high-temperature cultivation*. Applied microbiology and biotechnology, 2006. **73**(1): p. 172-180.
143. Nishihara, K., et al., *Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(3): p. 884-889.
144. Schein, C.H. and M.H. Noteborn, *Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperature*. Nature biotechnology, 1988. **6**(3): p. 291-294.
145. Enfors, S.-O. and L. Häggström, *Bioprocess technology: fundamentals and applications*2000: Royal Institute of Technology.
146. Zhang, J. and R. Greasham, *Chemically defined media for commercial fermentations*. Applied microbiology and biotechnology, 1999. **51**(4): p. 407-421.

147. Puligundla, P., et al., *Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2011. **38**(9): p. 1133-1144.
148. Zhao, X.-Q., et al., *Bioethanol from lignocellulosic biomass*, in *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy* 2011, Springer. p. 25-51.
149. Verhoef, S., et al., *Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by Pseudomonas putida S12*. New biotechnology, 2014. **31**(1): p. 114-119.
150. Chatzifragkou, A. and S. Papanikolaou, *Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes*. Applied microbiology and biotechnology, 2012. **95**(1): p. 13-27.
151. Kenny, S.T., et al., *Development of a bioprocess to convert PET derived terephthalic acid and biodiesel derived glycerol to medium chain length polyhydroxyalkanoate*. Applied microbiology and biotechnology, 2012. **95**(3): p. 623-633.
152. Fu, J., et al., *Effects of impurities in biodiesel-derived glycerol on growth and expression of heavy metal ion homeostasis genes and gene products in Pseudomonas putida LS46*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(13): p. 5583-5592.
153. Vickers, C.E., D. Klein-Marcuschamer, and J.O. Krömer, *Examining the feasibility of bulk commodity production in Escherichia coli*. Biotechnology letters, 2012. **34**(4): p. 585-596.
154. Peters, D., *Carbohydrates for fermentation*. Biotechnology Journal, 2006. **1**(7-8): p. 806-814.
155. Renouf, M., M. Wegener, and L. Nielsen, *An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation*. Biomass and Bioenergy, 2008. **32**(12): p. 1144-1155.
156. Lim, H.K. and K.H. Jung, *Improvement of heterologous protein productivity by controlling postinduction specific growth rate in recombinant Escherichia coli under control of the PL promoter*. Biotechnology Progress, 1998. **14**(4): p. 548-553.
157. Guo, J., et al., *Medium optimization based on the metabolic-flux spectrum of recombinant Escherichia coli for high expression of human-like collagen II*. Biotechnology and applied biochemistry, 2010. **57**(2): p. 55-62.
158. Gill, R.T., et al., *Generating controlled reducing environments in aerobic recombinant Escherichia coli fermentations: effects on cell growth, oxygen uptake, heat shock protein expression, and in vivo CAT activity*. Biotechnology and bioengineering, 1998. **59**(2): p. 248-259.
159. Yoon, S.H., et al., *Combined transcriptome and proteome analysis of Escherichia coli during high cell density culture*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **81**(7): p. 753-767.
160. Lee, S.Y. and H.N. Chang, *High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source*. Biotechnology letters, 1993. **15**(9): p. 971-974.
161. Heldal, M., S. Norland, and O. Tুমyr, *X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria*. Applied and environmental microbiology, 1985. **50**(5): p. 1251-1257.
162. Holms, H., *Flux analysis and control of the central metabolic pathways in Escherichia coli*. FEMS Microbiology Reviews, 2006. **19**(2): p. 85-116.

163. O'Kennedy, R.D., C. Baldwin, and E. Keshavarz-Moore, *Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps*. Journal of biotechnology, 2000. **76**(2): p. 175-183.
164. Fu, Z., et al., *Cell death caused by hyper-expression of a secretory exoglucanase in Escherichia coli*. Protein expression and purification, 2005. **42**(1): p. 67-77.
165. Shiloach, J., et al., *Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by Escherichia coli BL21 ( $\lambda$ DE3) and Escherichia coli JM109*. Biotechnology and bioengineering, 1996. **49**(4): p. 421-428.
166. Kim, K.-A., et al., *Optimization of culture conditions for erythritol production by Torula sp.* Journal of microbiology and biotechnology, 2000. **10**(1): p. 69-74.
167. Schmidt, F., *Optimization and scale up of industrial fermentation processes*. Applied microbiology and biotechnology, 2005. **68**(4): p. 425-435.
168. Thiry, M. and D. Cingolani, *Optimizing scale-up fermentation processes*. Trends in biotechnology, 2002. **20**(3): p. 103-105.
169. Junker, B.H., *Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes*. Journal of bioscience and bioengineering, 2004. **97**(6): p. 347-364.
170. Okufi, S., et al., *Scale-up of liquid-liquid dispersions in stirred tanks*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 1990. **68**(3): p. 400-406.
171. Afshar Ghotli, R., et al., *Liquid-liquid mixing in stirred vessels: a review*. Chemical Engineering Communications, 2013. **200**(5): p. 595-627.
172. Na-Ranong, D. and P. Kitchaiya, *Precipitation above cloud point in palm oil based biodiesel during production and storage*. Fuel, 2014. **122**: p. 287-293.
173. Plata, V., P. Gauthier-Maradei, and V. Kafarov, *Influence of minor components on precipitate formation and filterability of palm oil biodiesel*. Fuel, 2015. **144**: p. 130-136.
174. Chupka, G., et al., *Effect of saturated monoglyceride polymorphism on low-temperature performance of biodiesel*. Energy & Fuels, 2010. **25**(1): p. 398-405.