

Inspira Crea Transforma

Bioprocesos y Bioeconomía

Luz Deisy Marín Palacio
Departamento de Ingeniería de Procesos

Seminario: “Bioeconomía: a los 250 años de Humboldt”



Aplicaciones de la biotecnología

Biología ROJA

Aplicada a la salud humana y animal

- Obtención de vacunas y antibióticos
- Desarrollo de nuevos fármacos
- Prevención de enfermedades y tratamientos

Biología VERDE

Aplicada a la producción agrícola y pecuaria

- Biofertilizantes y biopesticidas
- Control biológico
- Mejoramiento de cultivos

Biología BLANCA

Aplicada a procesos industriales

- Biocombustibles
- Biomateriales
- Alimentos funcionales
- Cosméticos
- Enzimas
- Bioprocesos

Biología GRIS

Aplicada al Medio Ambiente

- Conservación y mantenimiento de la biodiversidad
- Biorremediación
- Aislamiento y eliminación de sustancias tóxicas
- Aprovechamiento de subproductos

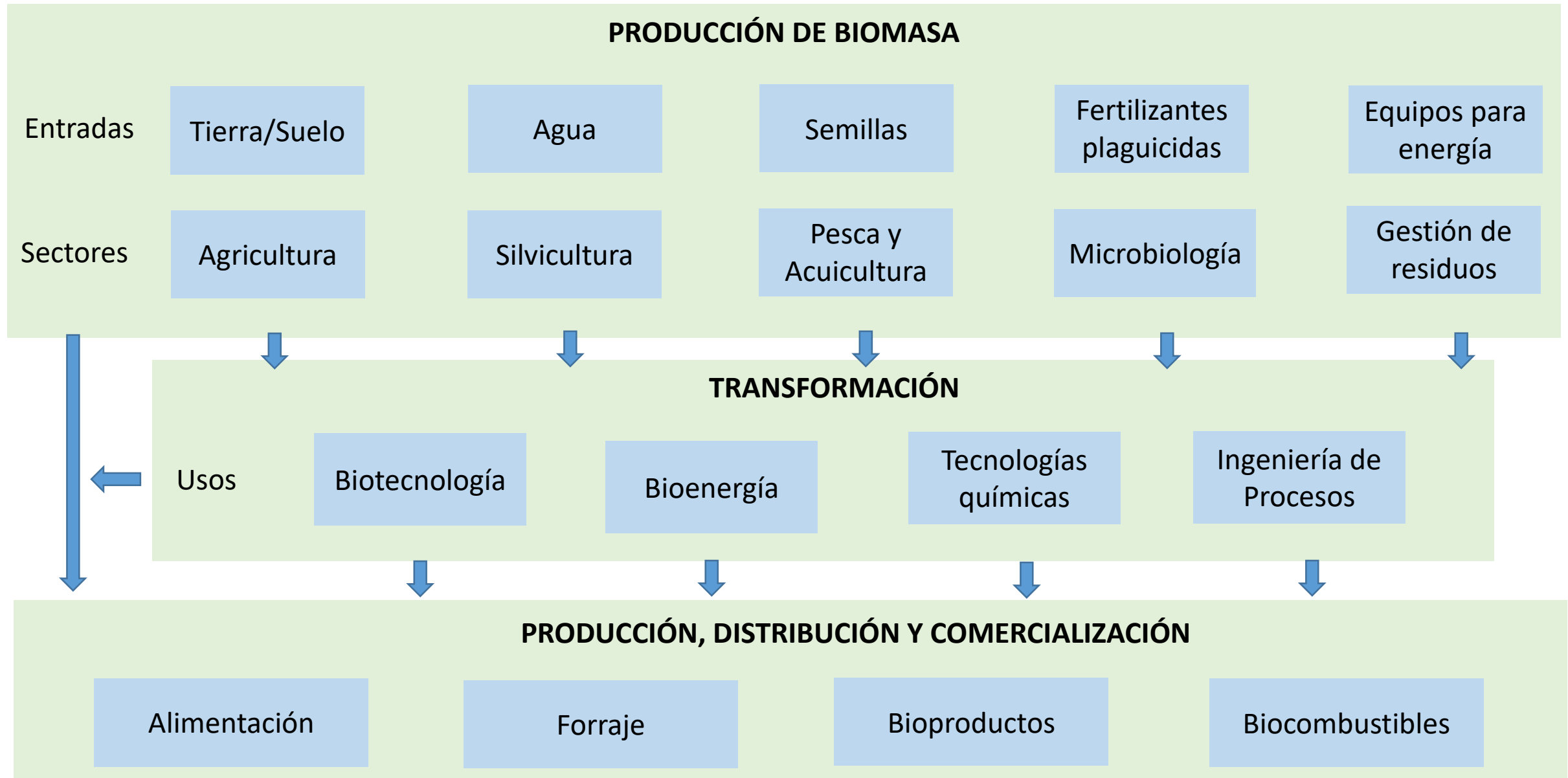
Biología AZUL

Aplicada a ambientes marinos y acuáticos

- Estudio de organismos marinos y de agua dulce
- Acuicultura
- Uso de algas

BIODIVERSIDAD

Sistema bioeconómico



Clasificación de bioproductos en la bioeconomía actual

Categoría	Materias primas	Grupo	Ejemplos	Aplicaciones
Biopolímeros	Biomasa lignocelulósica Cultivos alimentos, oleaginosas y algas	Bioplásticos Bioespumas Biocompuestos	Ácido poliláctico Polihidroxiclcanoato Espuma a base de almidón	Botellas de agua, eliminación artículos para el hogar
Bioquímicos	Biomasa lignocelulósica, cultivos de alimentos y algas	A base de: azúcar biogás Gas de síntesis	Furfural Acido succínico Ácido acrílico	Químicos industriales y productos de alto valor
Productos biofarmacéuticos	Plantas Microorganismos Biomasa general	Plantas medicinales Antibióticos Hormonas Anticuerpos Proteínas recombinantes	Ginseng, penicilina, progesterona, insulina recombinante	Anticancerígenos, antibacterianos, otros propósitos médicos
Bioadhesivos	Almidón Proteína Lignina Celulosa Caucho natural	Adhesivos naturales Adhesivos biológicos Adhesivos biocompatibles Adhesivos biomiméticos Adhesivos bioinspirados	Pasta de almidón pegamento de caseína	Encuadernación de papel, cinta médica, madera reconstituida paneles

Adaptado: Guo Mingxin, Song Weiping.. The growing U.S. bioeconomy: Drivers, development and constraints. New BIOTECHNOLOGY, 2019;.49: 48–57

Casos de estudio

Uso de biomasa para la producción de compuestos bioactivos

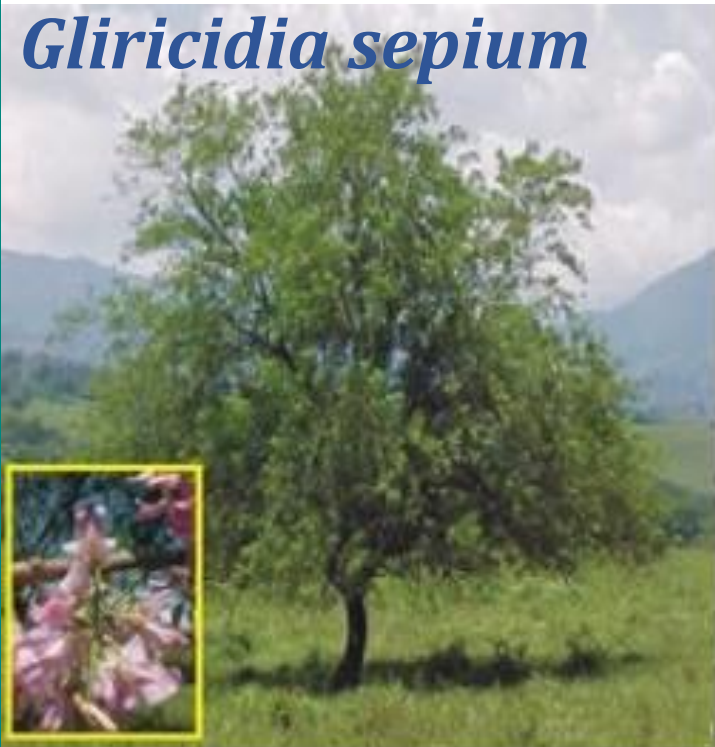
Prospección para la producción de enzimas

Producción de proteínas recombinantes

Uso de biomasa para la producción de compuestos bioactivos

Caracterización química y actividad biológica de extractos de *Gliricidia sepium*

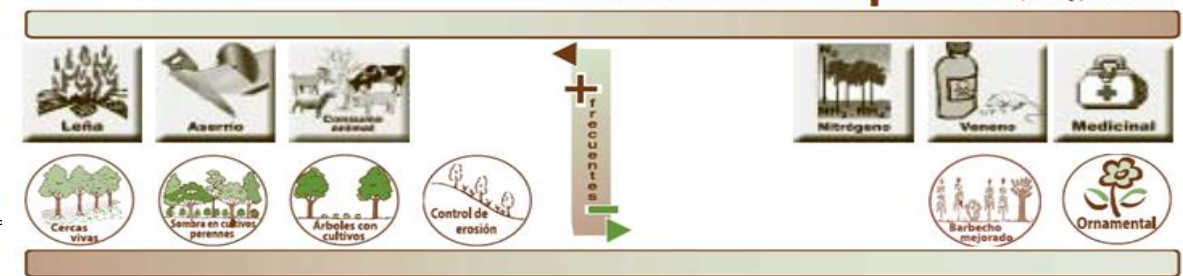
Gliricidia sepium



Fuente: <http://elsemillero.net/nuevo/semillas/matarraton.html>

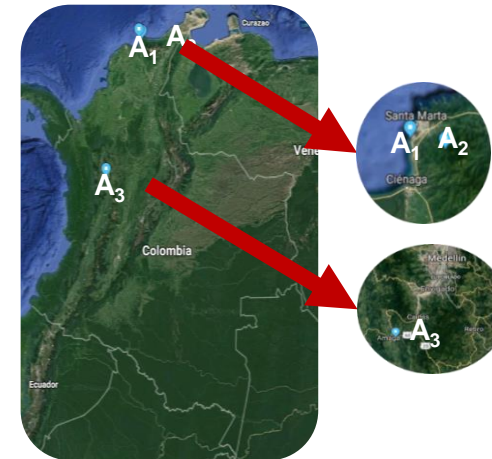
- ✓ Madera
- ✓ Cercas vivas
- ✓ Fertilizante
- ✓ Veneno (ratas)
- ✓ Medicinal
- ✓ Mejorador (suelos)

Leguminosae Papilionoideae



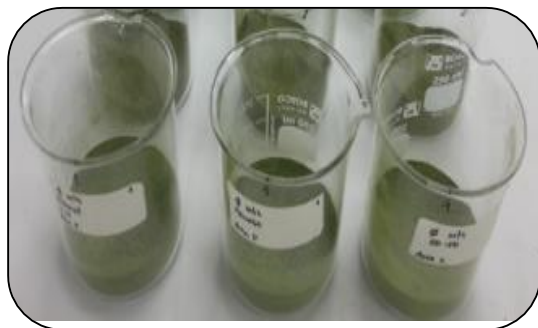
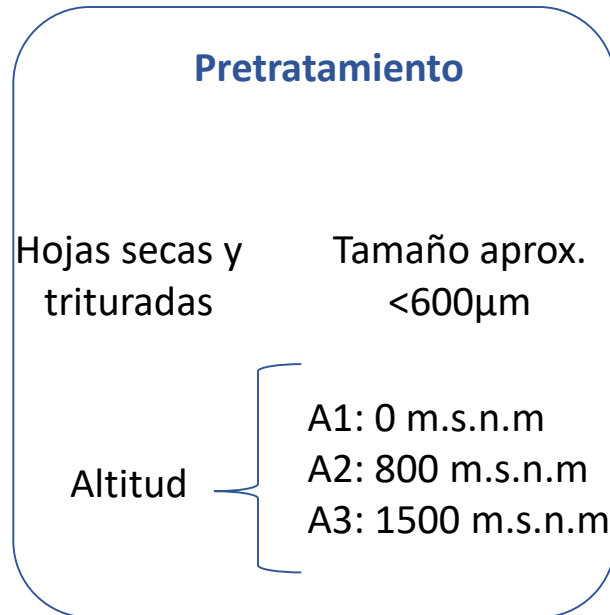
Fuente: CATIE/COHDEFOR (sin fecha), El Madreado (*Gliricidia sepium*). Uso y manejo en cercas vivas.

Cuervo-Jimenez, *et al.* Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend, FABACEAE, 2013; 17 (1: 33–45).

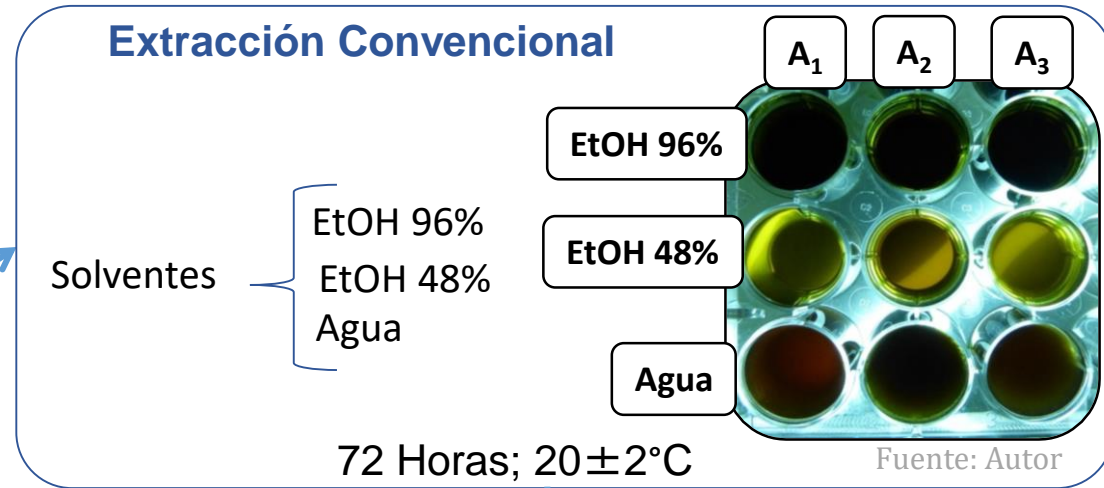


- A₁: Santa Marta, Magdalena (0 m.s.n.m)
- A₂: Minca, Magdalena (800 m.s.n.m)
- A₃: Amagá, Antioquia (1500 m.s.n.m)

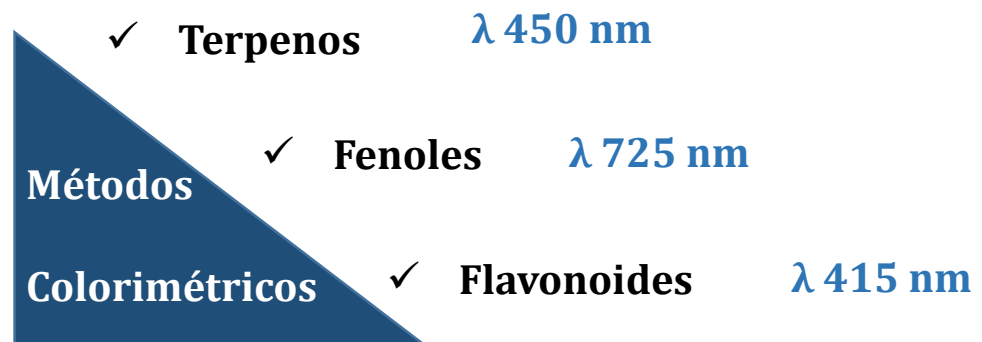
Metodología



Fuente: Autor

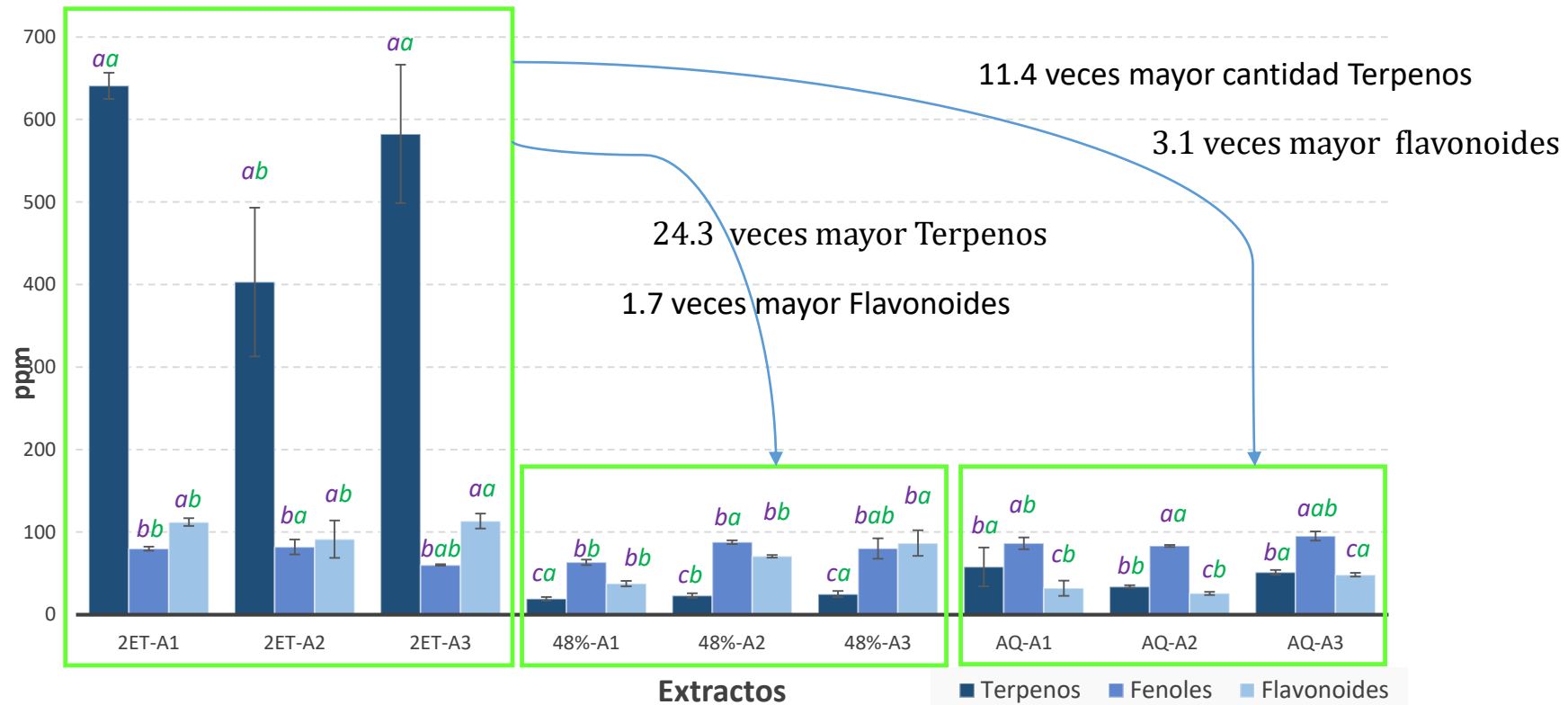


CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS



Resultados

Cuantificación de metabolitos obtenidos mediante extracción convencional con solventes



Para cada una de las variables de respuesta diseño factorial 3x3, nivel de confianza 95%, n=3.

Valores de concentración [ppm] ± desviación estándar.

Solvente ^{morado}: letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba LSD.

Altitud ^{verde}: letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba LSD.

Metodología

Actividad biológica

Actividad antimicrobiana Bacterias, levaduras y hongos

Dilución en
agar

Halo de inhibición
extracto-M.O

Crecimiento en
microplatos

[] M.O 5×10^5
72 a 96 horas aprox. 30°C.
Inhibición de crecimiento



Platos duales

Halo de inhibición
extracto-M.O

[] 250; 500; 1000 ppm de extractos.

Actividad antioxidante

ORAC

(Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Resultados

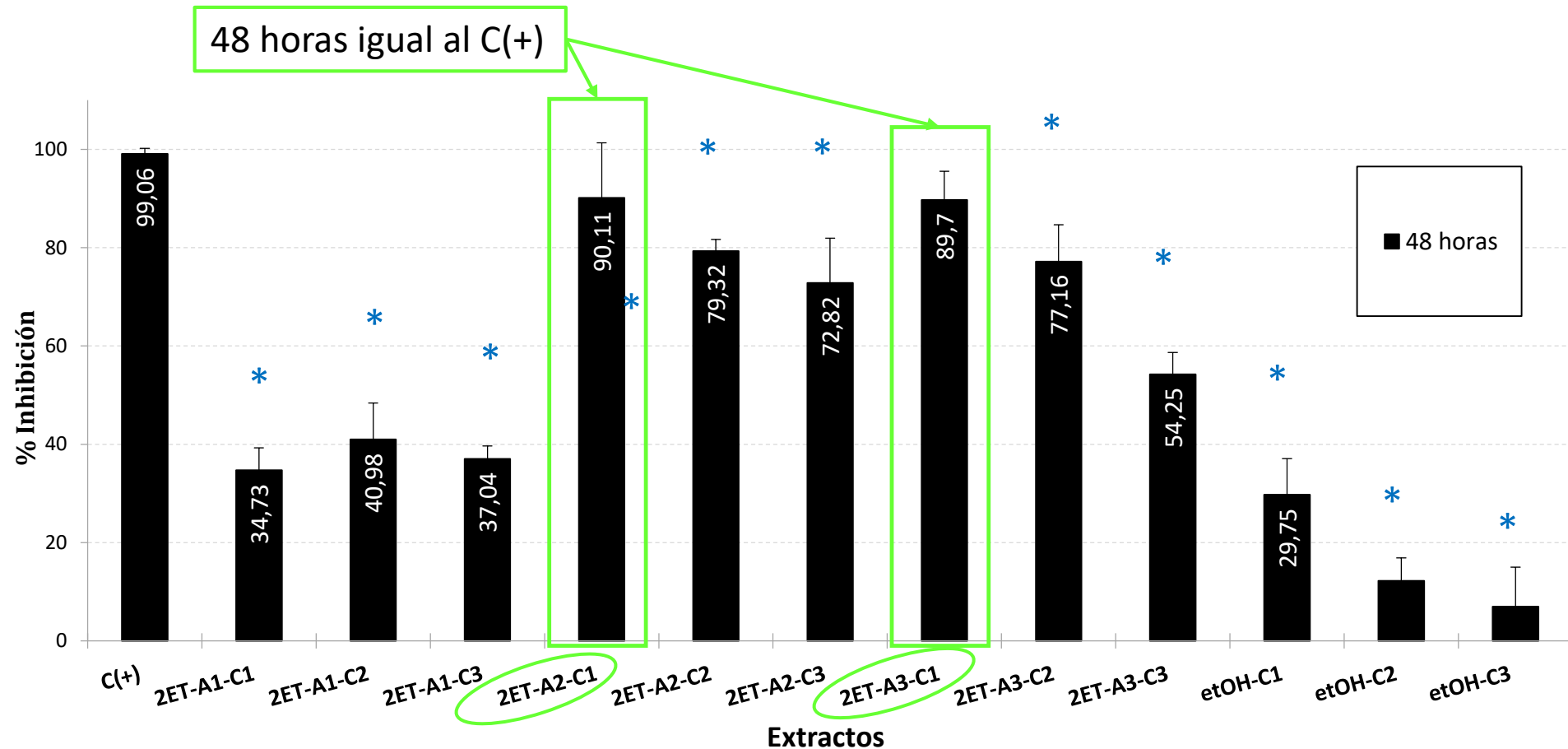
Actividad inhibitoria de los extractos de *G. sepium* en microorganismos

Microorganismo	Difusión en agar	Crecimiento en microplato	Platos duales
<i>Bacillus pumilus</i> EA-CB0177	-	-	n/a
<i>Aureobasidium pullulans</i> TM005	n/a	n/a	-
<i>Bacillus cereus</i> EA1047	-	-	n/a
<i>Bacillus megaterium</i> EA-CB0784	-	-	n/a
<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575	-	-	n/a
<i>Colletotrichum acutatum</i> EAP-0012	n/a	n/a	-
<i>Cryptococcus</i> TM017	n/a	n/a	-
<i>Escherichia coli</i> sp	-	-	n/a
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i> raza 1	n/a	n/a	-
<i>Phialemonium</i> CB023	n/a	n/a	-
<i>Phialemonium</i> TM004	n/a	n/a	-
<i>Phomopsis</i> FR008	n/a	n/a	-
<i>Pseudomona putida</i> UA4	-	-	n/a
<i>Ralstonia solanacearum</i> EAP09	+	+++	n/a
<i>Serratia. Marcescens</i> sp.	+	+	n/a
<i>Staphylococcus aureus</i> sp.	+	+	-

+++ : Mayor Inhibición; + : Inhibición; (-) : No inhibición; n/a : No aplica

Resultados

Porcentaje de inhibición para *R. solanacearum* EAP09 en presencia de extractos etanólicos de *G. sepium*

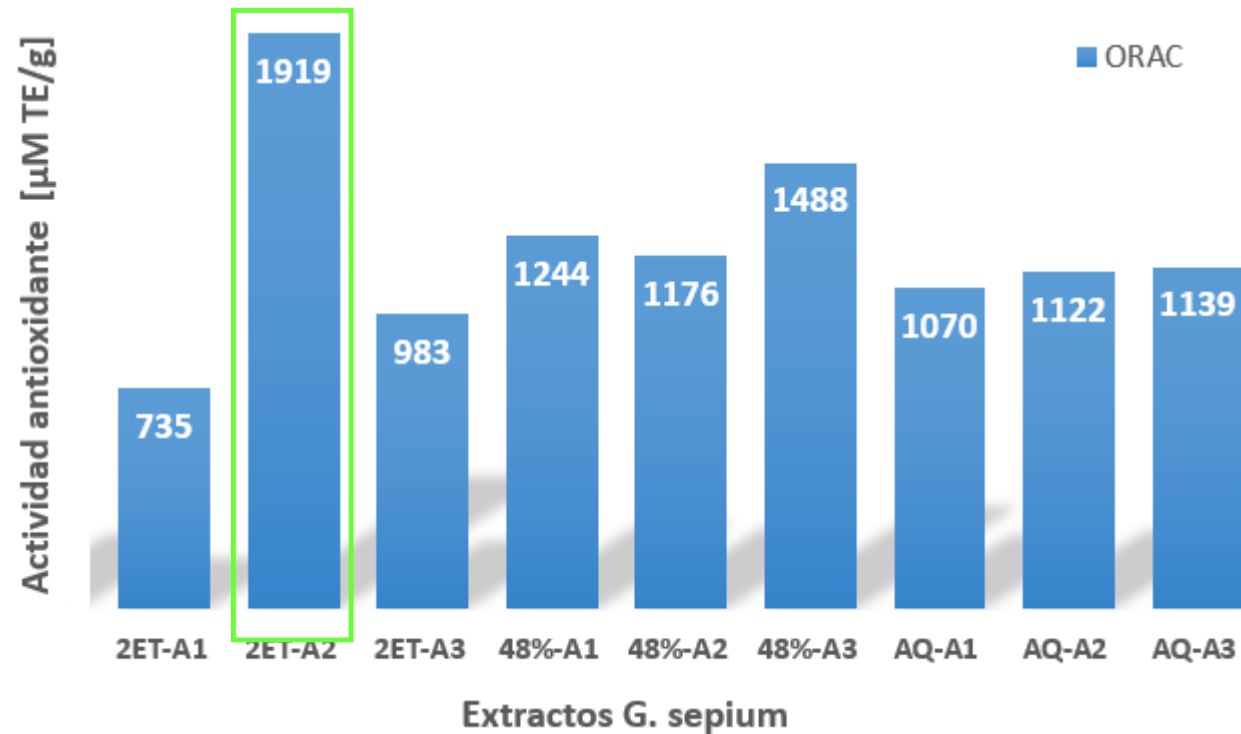


C(+): Control positivo (50ppm Cloranfenicol).
C1 (1000ppm), C2: (500ppm), C3: (250 ppm).
etOH: controles con etanol a iguales concentraciones que en el extracto.

*Diferencias significativas respecto al control negativo C(+) Prueba de Dunnett nivel de confianza 95%, n=3.

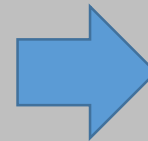
Resultados

Actividad antioxidante (ORAC) de los extractos de *G. sepium*



Conclusiones

90.11±11.20%
Inhibición
Actividad antimicrobiana
principalmente *R. solanaceaurum* EAP09



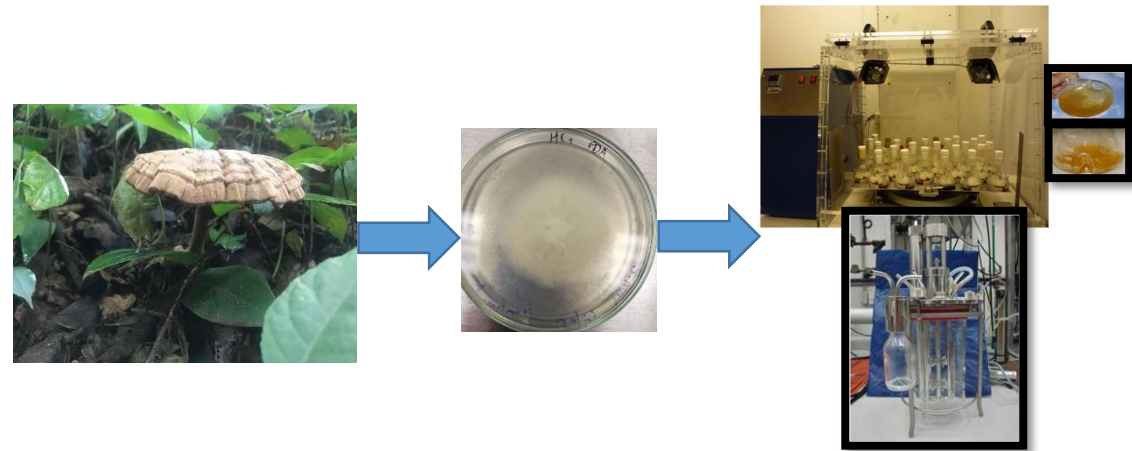
Extracto etanólico
(1:8) y altura 800
m.s.n.m a las
48 horas **(2ET-A2)**

 **ORAC**

1919.4 μM TE/g Extracción etanólica (1:8) y 800 m.s.n.m **(2ET-A2)**

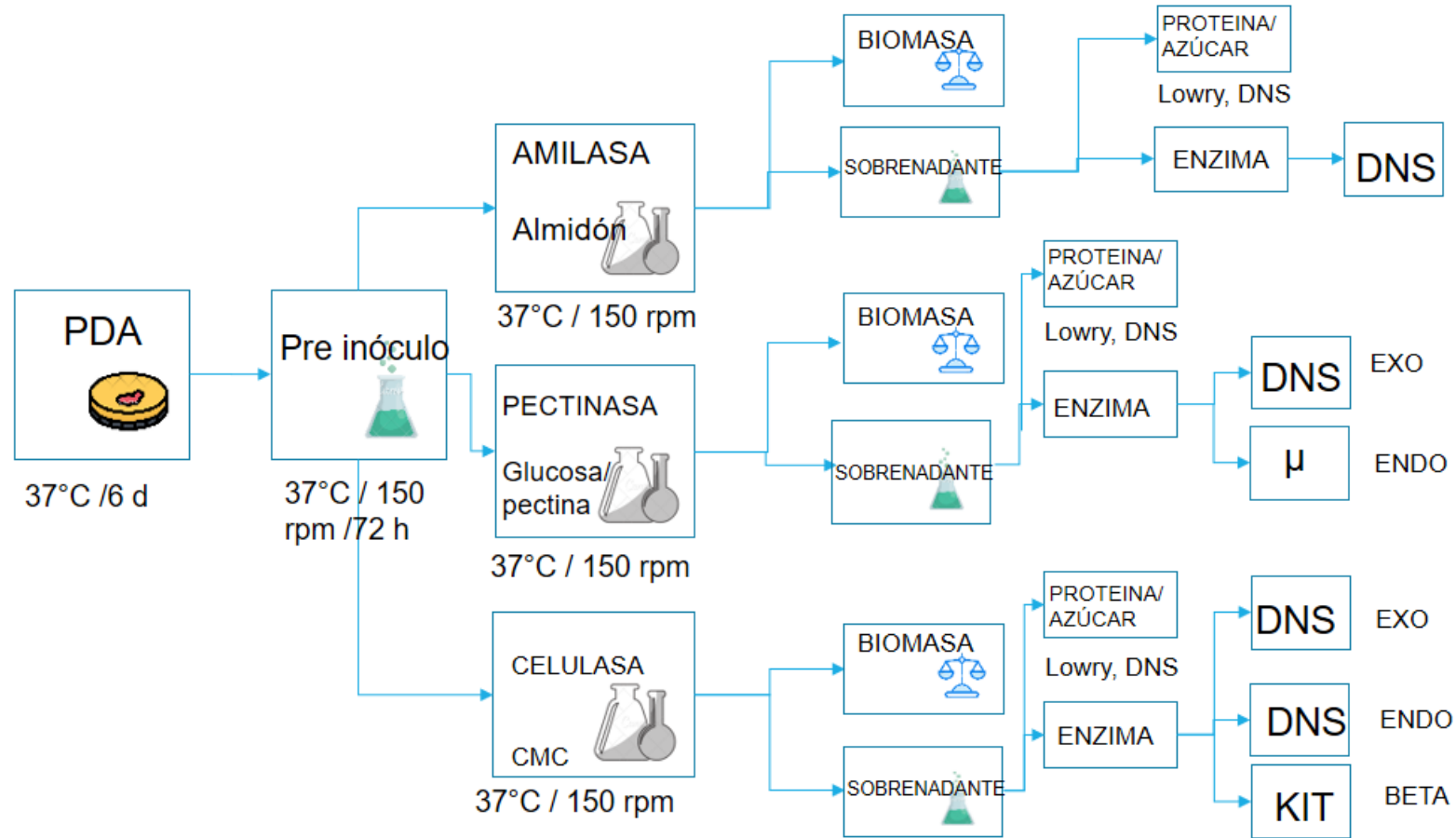
1488.0 μM TE/g Extracción Etanol-agua (1:8) y 1500 m.s.n.m **(48%-A3)**

Prospección para la producción de enzimas



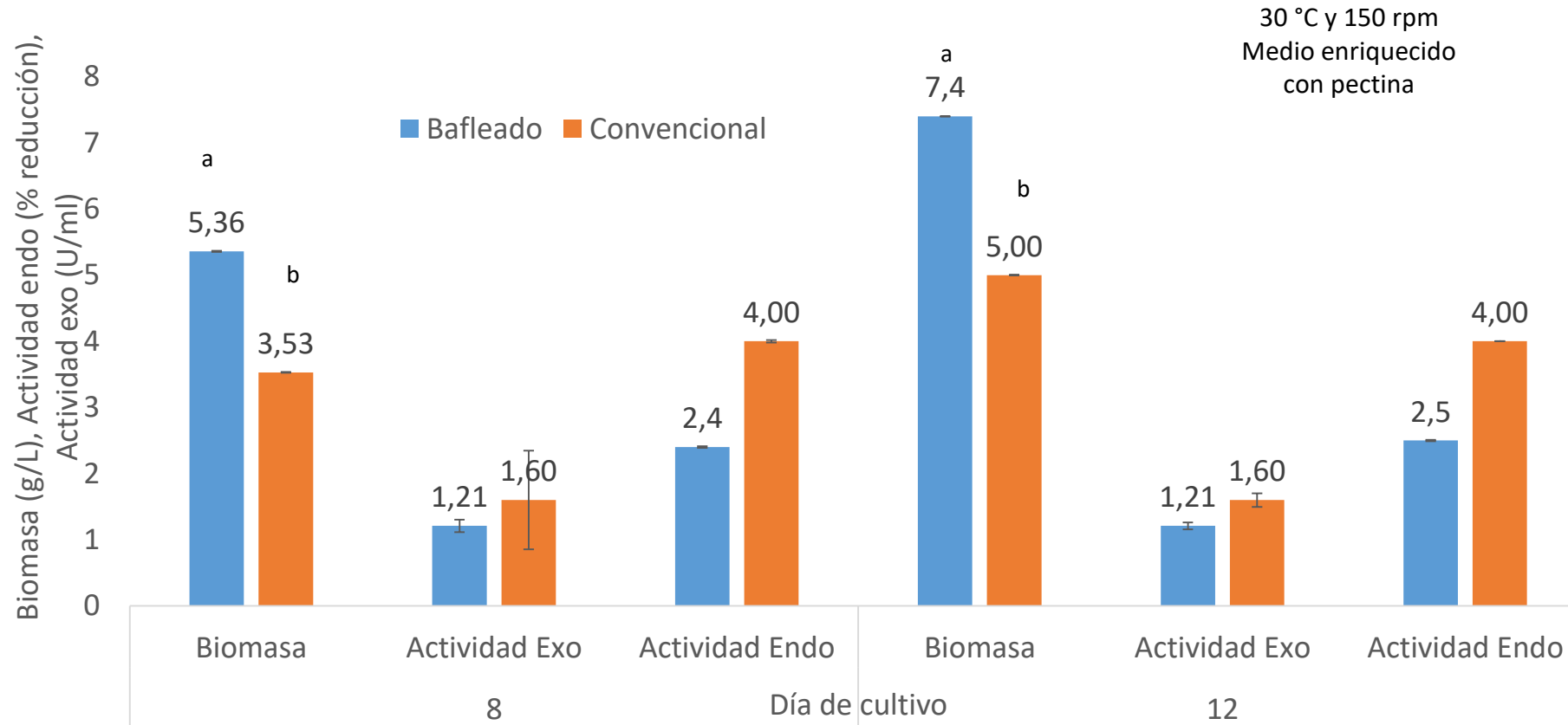
Carmona-Saldarriaga Laura (2019). Proyección de *Humphreya coffeata* en la producción de enzimas de interés industrial (Tesis de maestría)

Estrategia experimental



Resultados

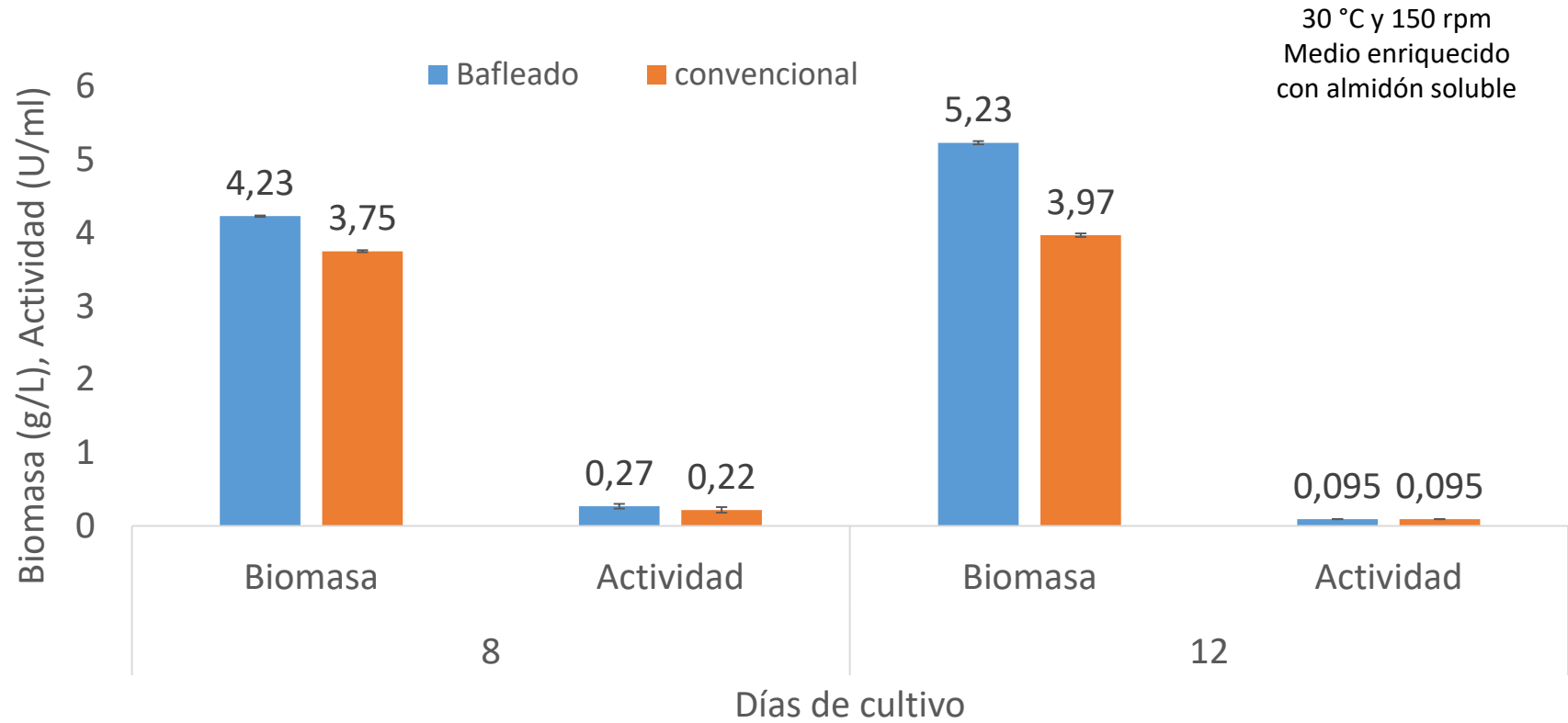
Pectinasa



Geometría	μ (dia ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	R^2
Baffles	0.45	7.38	0.89
Convencional	0.41	4.57	0.91

Resultados

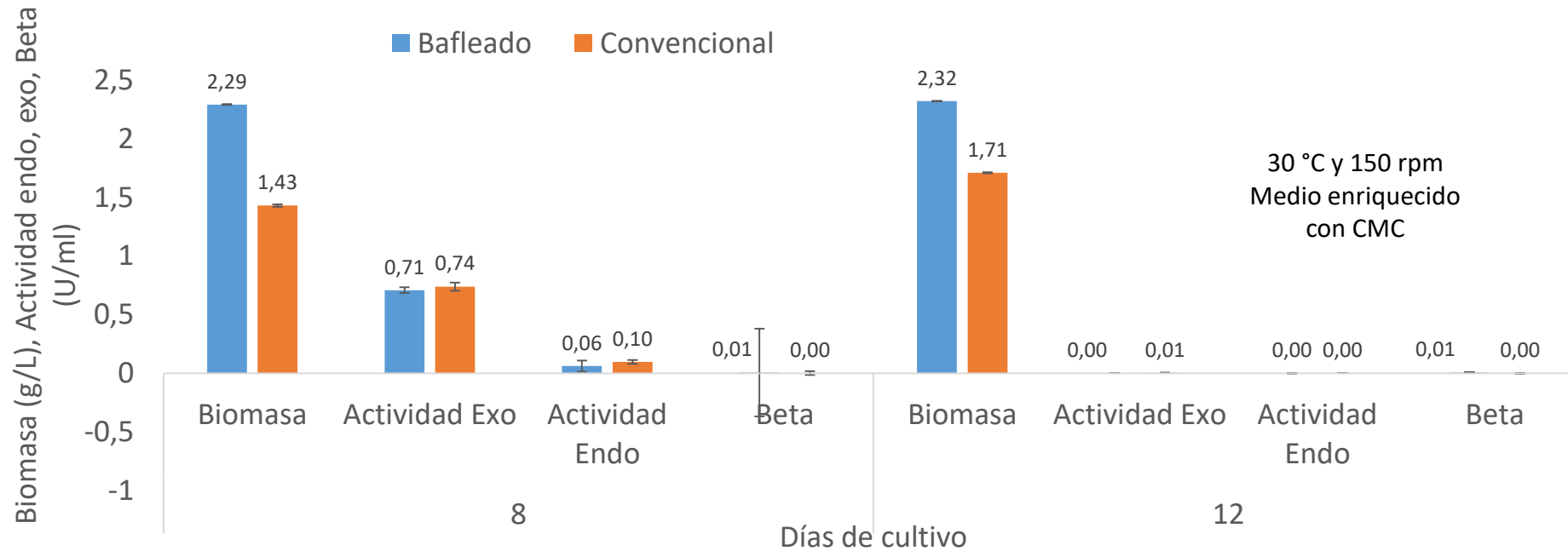
Amilasa



Geometría	μ (dia ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	R^2
Baffles	0.33	5.23	0.84
Convencional	0.25	3.98	0.83

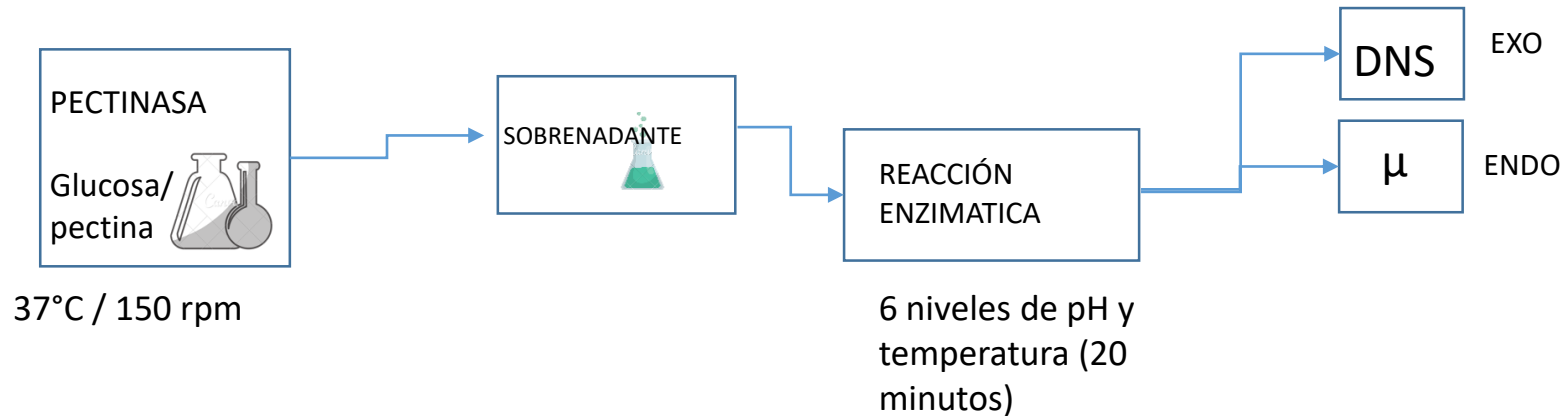
Resultados

Celulasa



Geometría	μ (dia ⁻¹)	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	R^2
Baffles	0.08	2.30	0.87
Convencional	0.13	2.26	0.78

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática del extracto pectinolítico



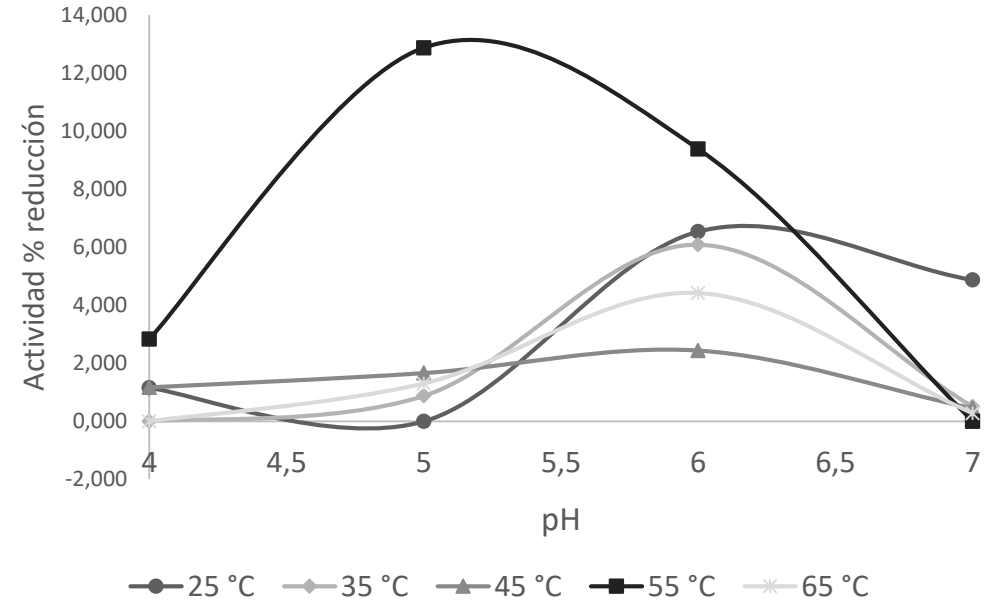
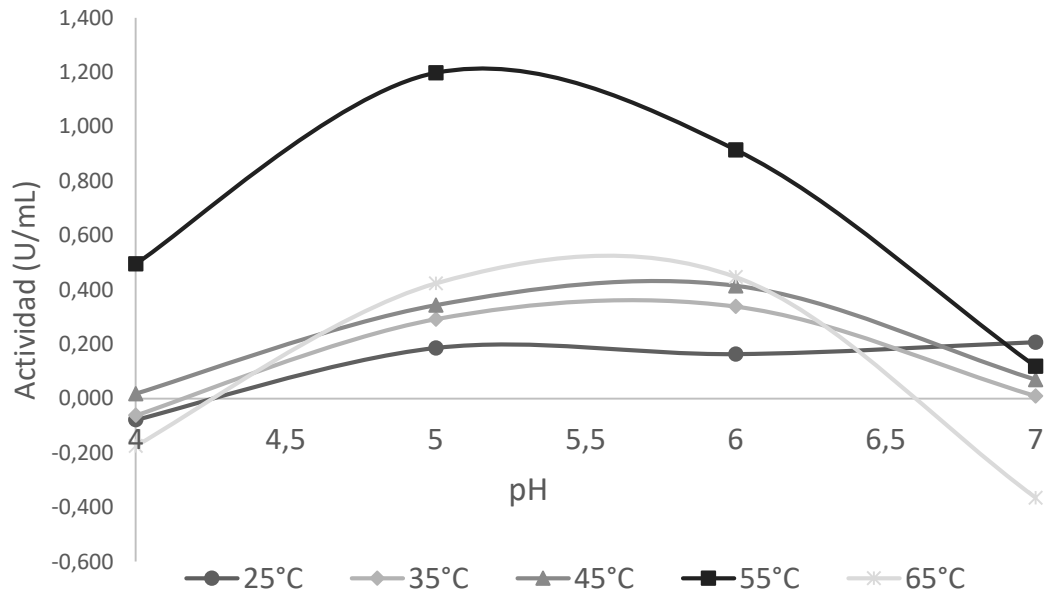
Diseño de experimentos para determinar condiciones favorables de pH y temperatura

Factores → pH y temperatura

Variable de respuesta → Actividad enzimática

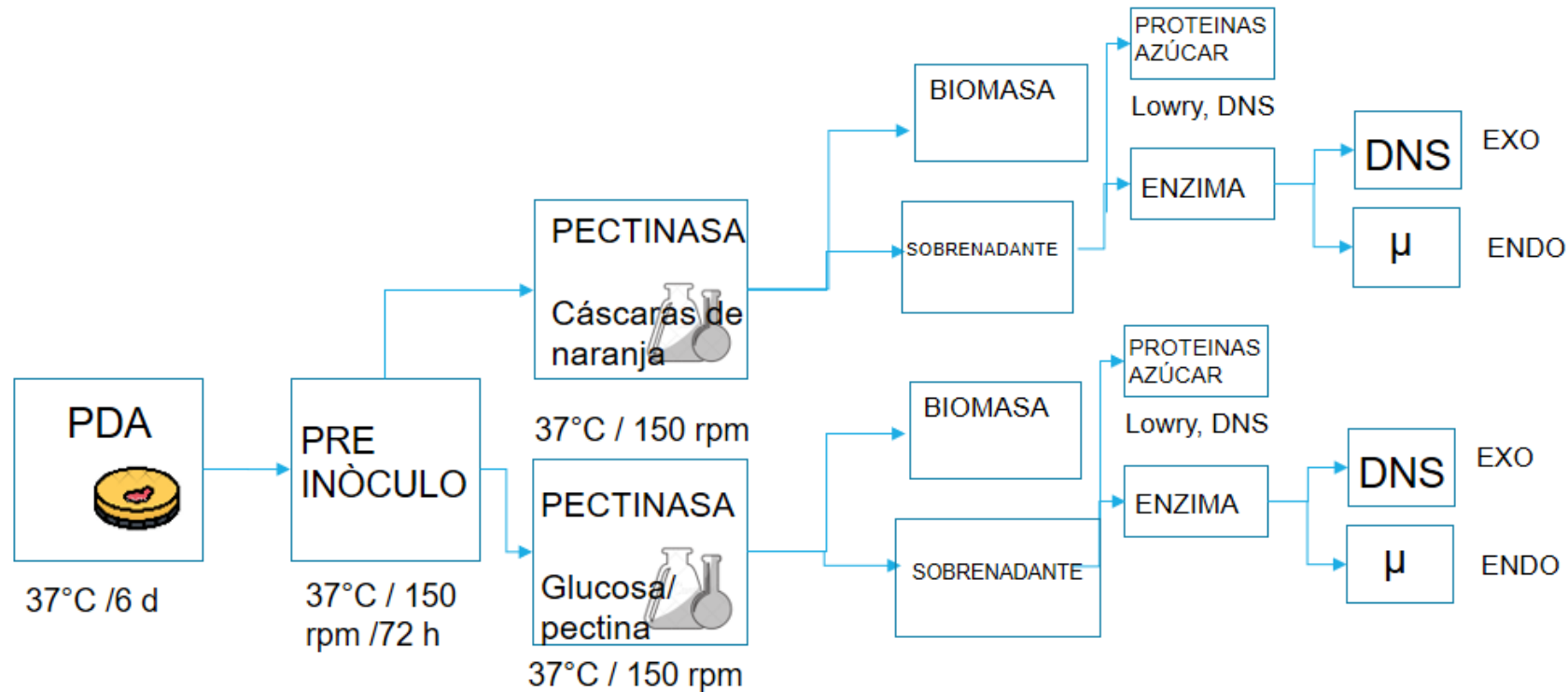
Resultados

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática



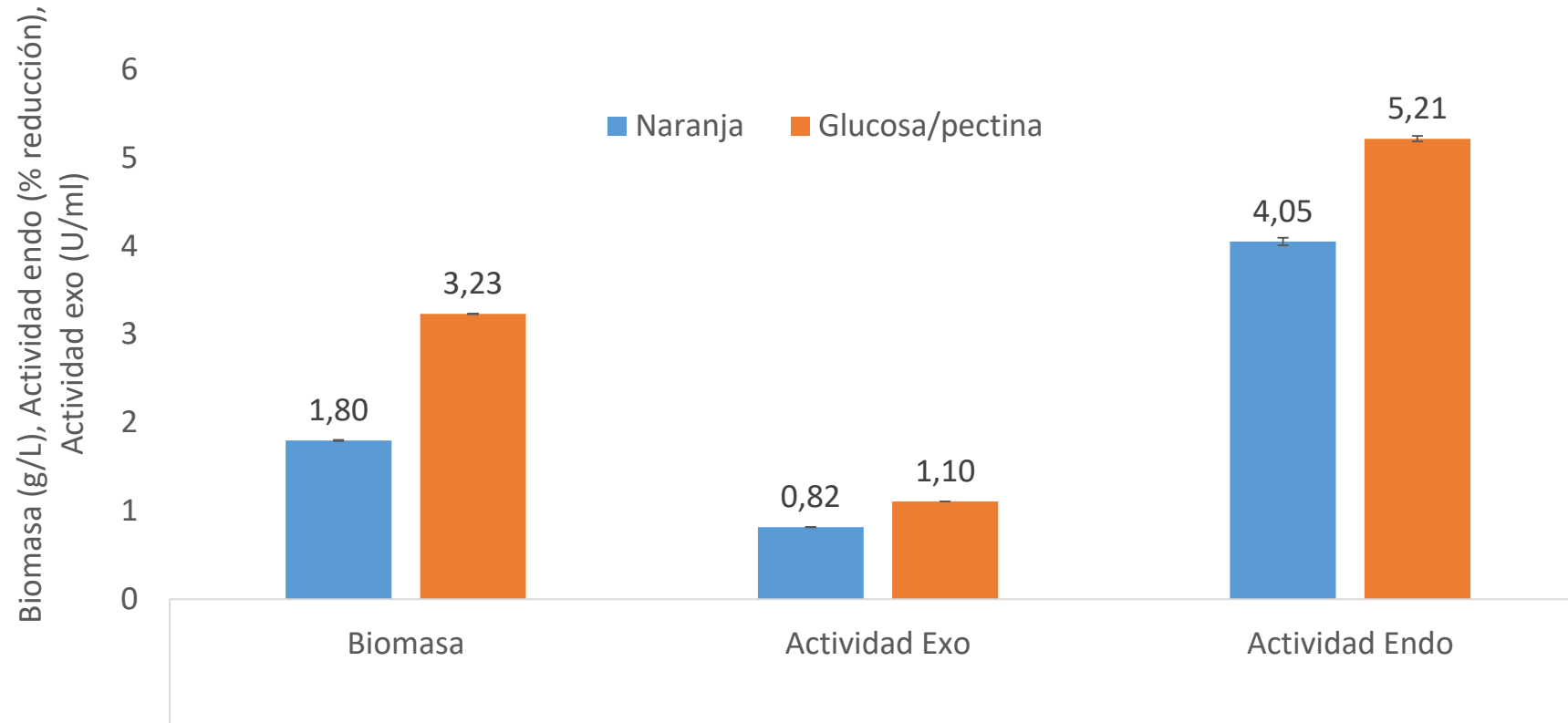
Actividad exo pectinolítica (A.) y Actividad endo pectinolítica (B.) usando ácido poligalacturónico 1 % p/V como sustrato a partir de *Humphreya Coffeata* a diferentes pH y diferentes temperaturas 25 °C (circulo relleno), 35°C (rombo relleno), 45°C (triangulo relleno), 55°C (cuadrado relleno), 65°C (asterisco)

Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento celular y producción de pectinasas



Resultados

Cáscaras de naranja como fuente de carbono para producción de pectinasas



Temperatura: 30 °C
Velocidad de agitación: 150 rpm
Tiempo de cultivo: 8 días

Conclusiones

Humphreya coffeata posee potencial para producir enzimas hidrolíticas: pectinasas

Los extractos pectinolíticos producidos son de tipo ácido, lo cual permite que sean implementadas en procesos industriales de clarificación de jugos, encontrando una temperatura favorable de reacción de 55 °C y un pH de 5,5.

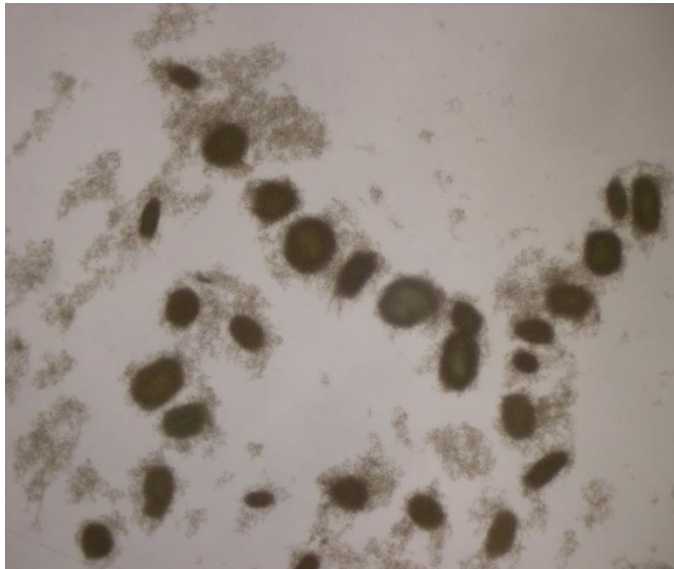
La cáscara de naranja puede ser considerado un buen inductor para la producción de enzimas pectinolíticas.



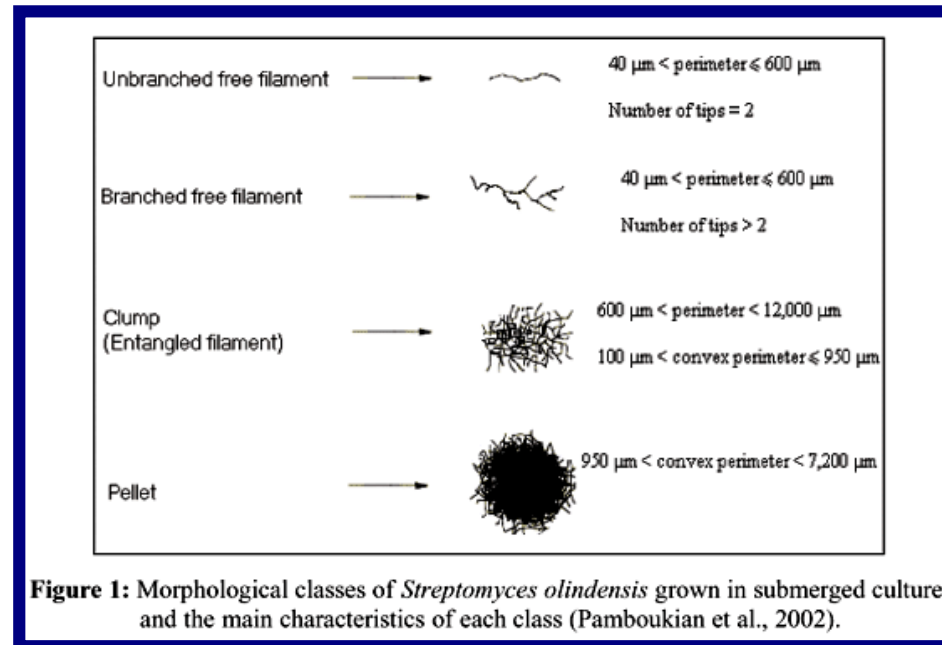
Producción de proteínas recombinantes

***S. lividans* ha sido reportado como un buen productor de proteínas recombinantes, con la capacidad de O-manosilar esta proteínas.**

Lara et al., Appl. Environ. Microbiol, 2004, 70(2):679-685; Espitia et al., Mol. BioSyst, 2010, 6:775–781; 3. Vallin et al., Tuberculosis, 2006, 86(4):198-202



Marín Palacio. Biochem Eng J. 2014;90:224–33



Pamboukian, Brazilian J Microbiology, 2002, 33:17-21

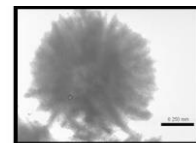
The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks

Ramsés A Gamboa-Suasnavart^{1,2}, Norma A Valdez-Cruz², Laura E Cordova-Dávalos², José A Martínez-Sotelo³, Luis Servín-González², Clara Espitia³ and Mauricio A Trujillo-Roldán^{1,2*}

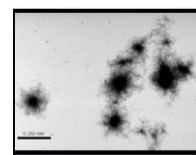
Configuración



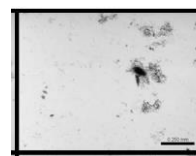
Morfología



$\varnothing: 1.57 \pm 0.41$ mm

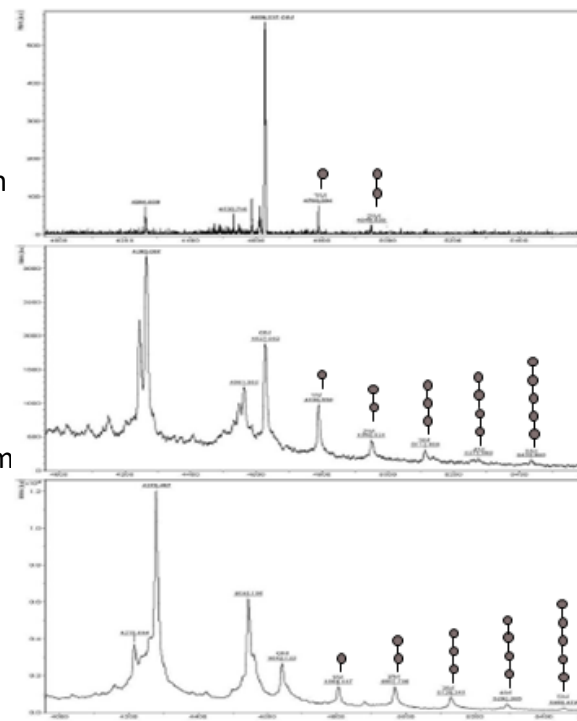


$\varnothing: 0.23 \pm 0.06$ mm



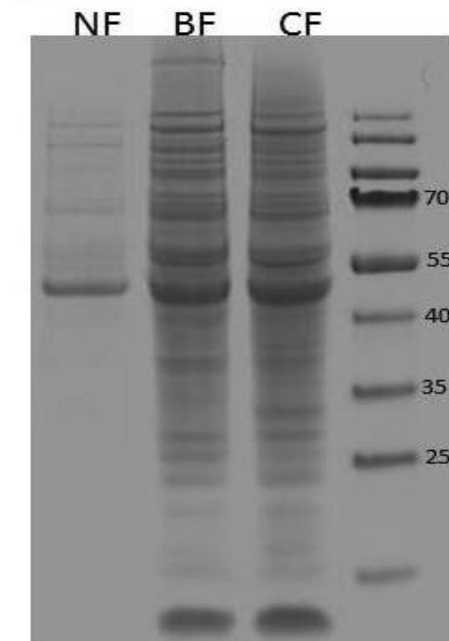
$\varnothing: 0.16 \pm 0.051$ mm

O-Manosilación APA

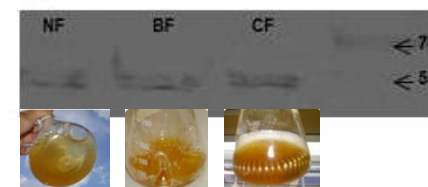


Gamboa-Suasnavart et al. *Microb Cell Fact*, 2011, 10:110-120.

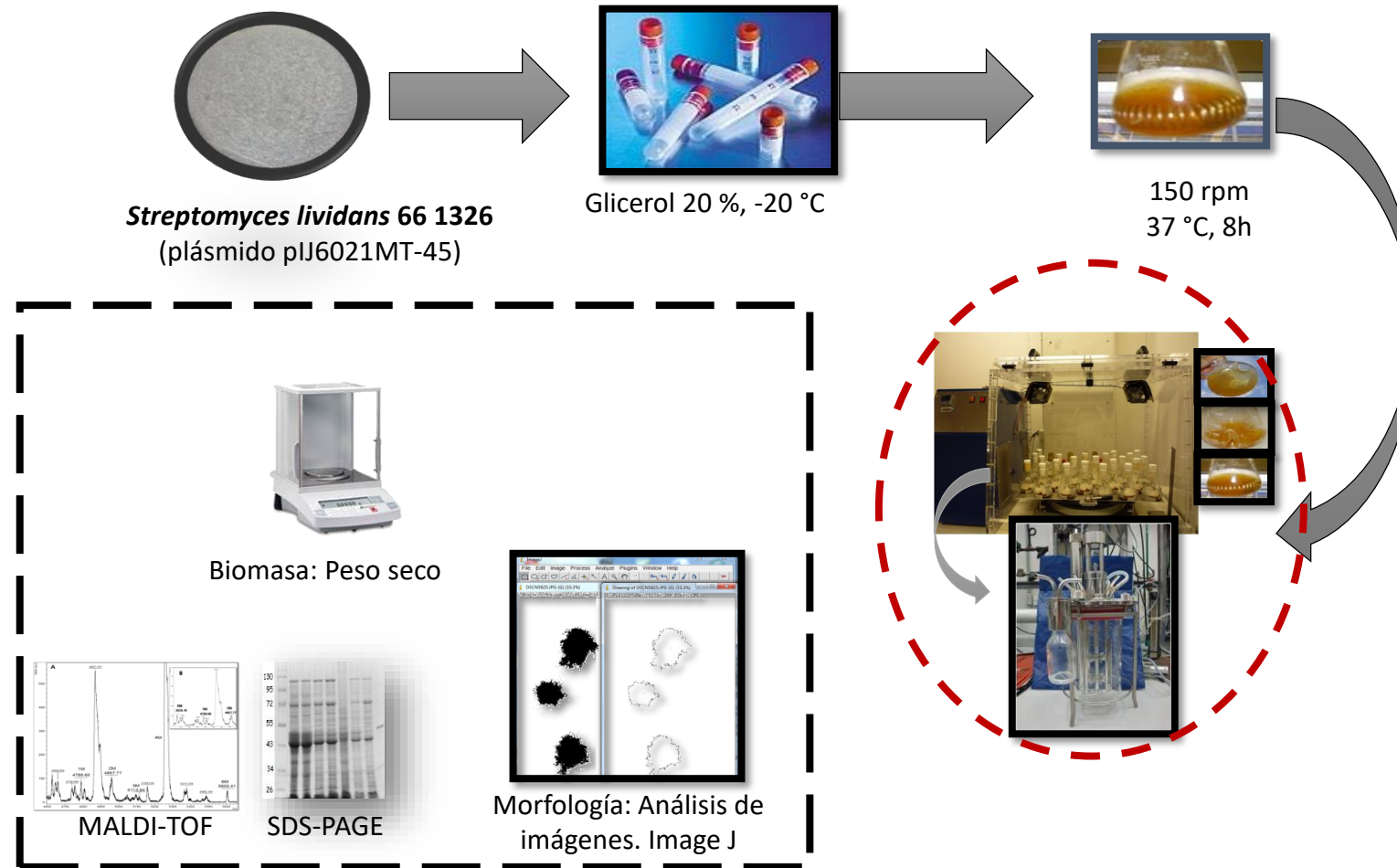
A



B

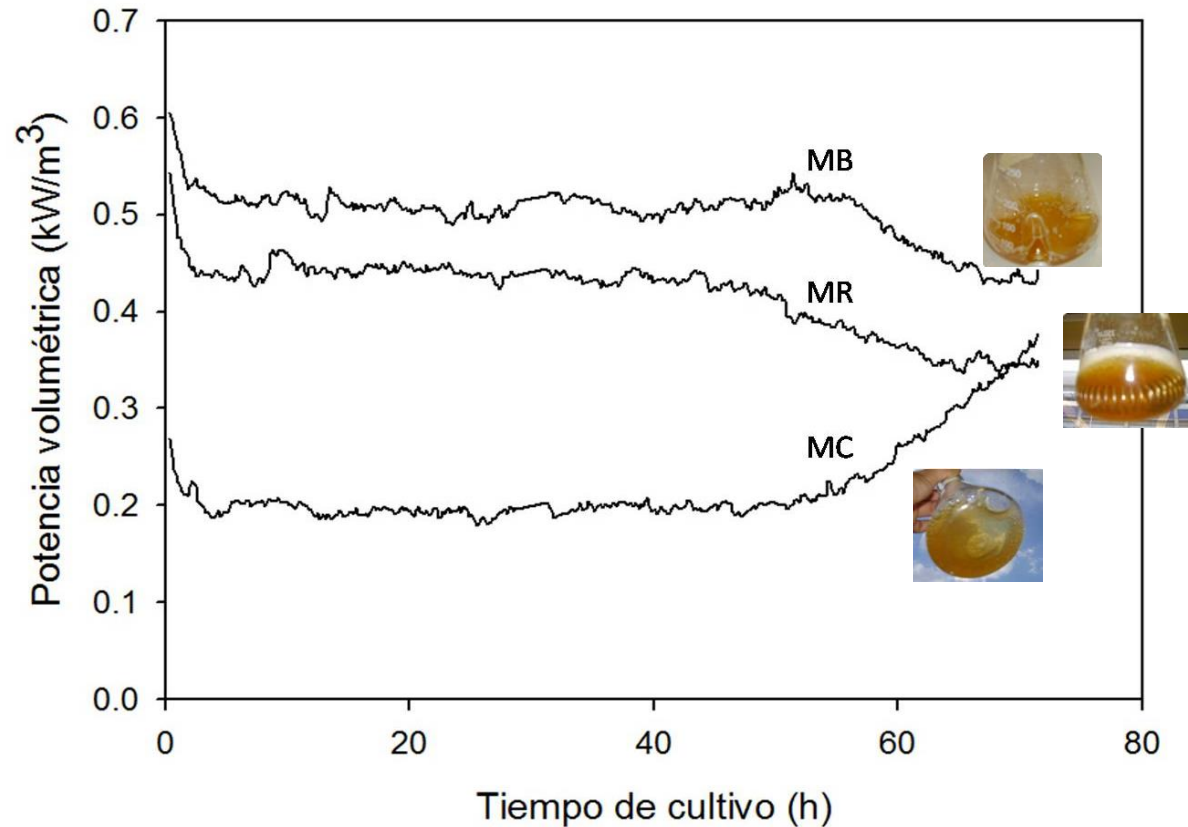


Estrategia experimental



Resultados

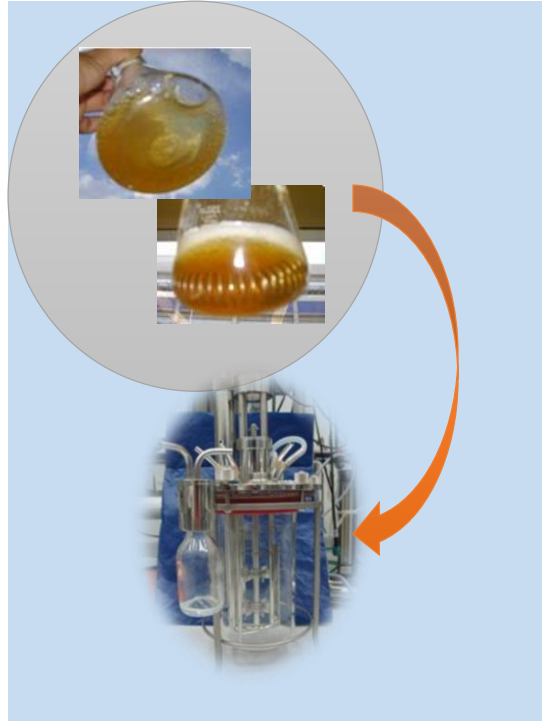
Determinación de la potencia volumétrica en matraces agitados



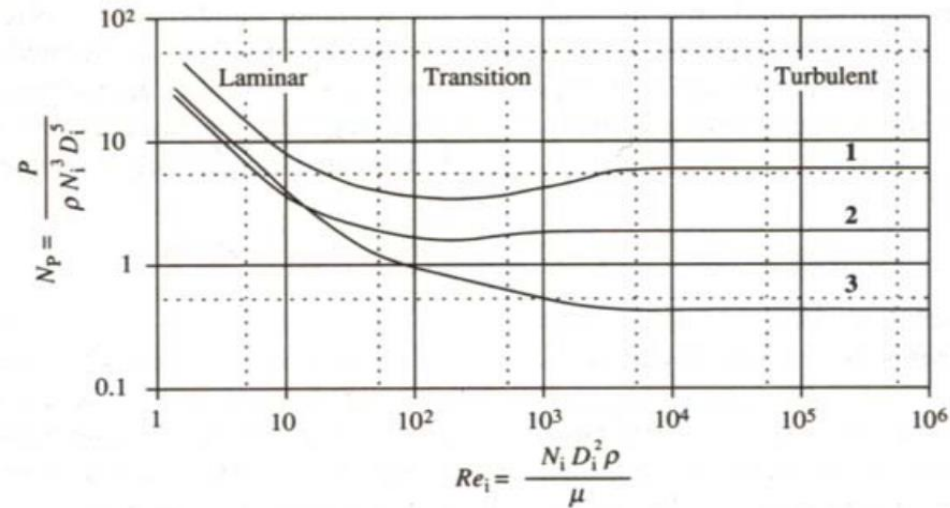
Evolución de la P/V durante el cultivo de *S. lividans* produciendo r-APA de *M. tuberculosis* en matraces convencionales (MC), bafleados (MB) y con resorte (MR) de 250 mL, con 50 mL de volumen de llenado, agitados a 150 rpm y con diámetro de agitación de 25 mm

Resultados

Reproducción de la potencia volumétrica de matraces en biorreactores de 1L, para la producción de la proteína recombinante en *S. lividans*.



Relación entre el número de potencia y el Reynolds.



1. Turbina Rushton. 2. Paletas. 3. Propela marina (Doran, 1995).

Parámetros de agitación en biorreactores a las P/V de matraces agitados

Geometría matraz	P/V _{experimental} (kW/m ³)	P _g /P	N del bioreactor (rpm) usando P	N del bioreactor (rpm) usando P _g
Convencional	0.22	0.97	260	259
Resorte	0.44	0.96	340	336

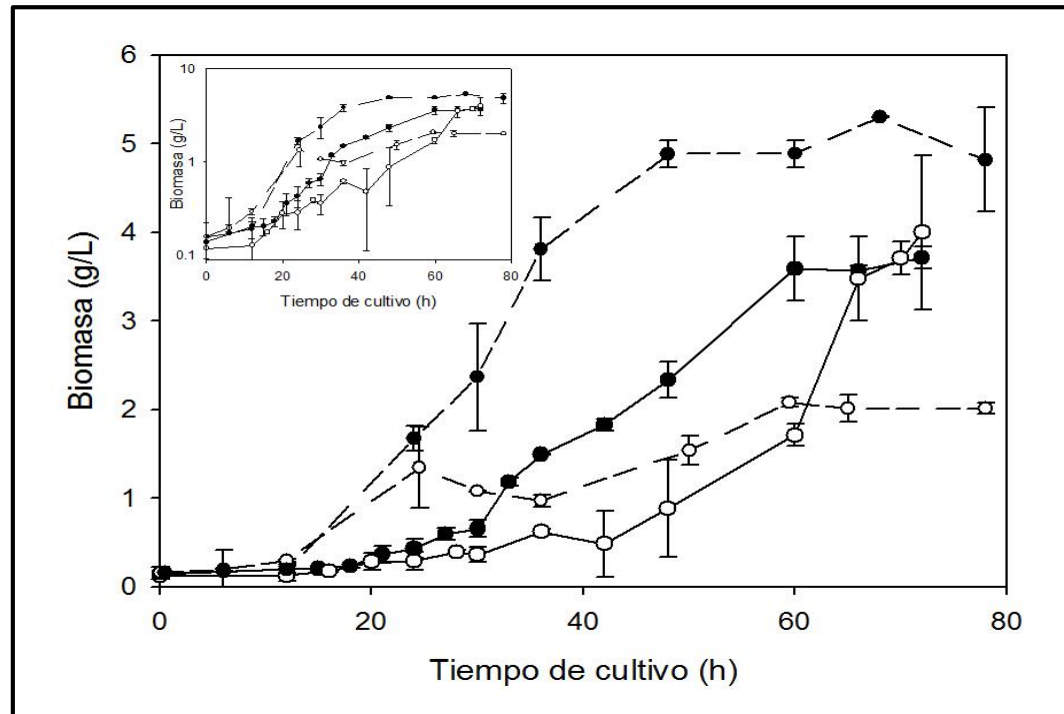
Asumiendo flujo turbulento
Operando con dos turbinas
Rushton
Np: 5.5

$$Np = \frac{P}{\rho N^3 D_i^5}$$

$$\log_{10} \frac{P_g}{P} = -192 * \left(\frac{D_i}{D_t}\right)^{4.38} * Re^{0.115} * Fr^{1.96} \frac{D_i}{D_t} * A_e$$

Resultados

Cinética de crecimiento bacteriano de *S. lividans* en biorreactores agitados.

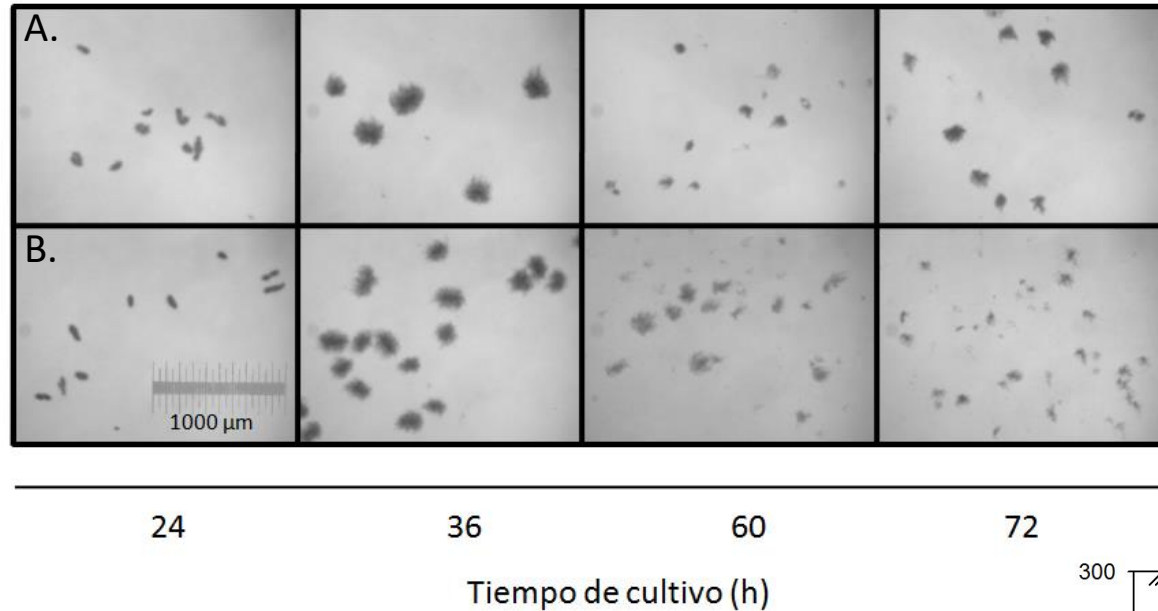


Cinética de crecimiento de *S. lividans* cultivado en biorreactores de 1L a 30 °C y TOD del 10%, agitados a 260 rpm (Línea continua, -O-), y 340 rpm (Línea continua, -●-) y su comparación con crecimiento de *S. lividans* 66 1326 cultivado en matraces convencionales (Línea discontinua -O-) y matraces con resorte (Línea discontinua, -●-)

Condiciones de agitación		Parámetros cinéticos	
Velocidad de agitación (rpm)	P/V (kW/m ³)	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	X _{máx} (g/L)
260	0,22	0.09 ± 0.01	5.1 ± 0.05
340	0,44	0.12 ± 0.01	5.2 ± 0.04
MC	0,22	0.08±0.01	2.1±1.2
MR	0,44	0.14±0.01	5.2±0.1

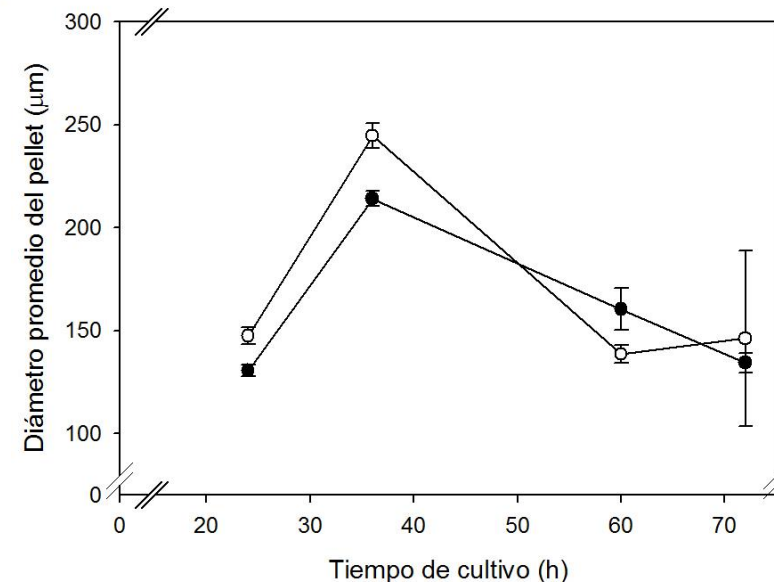
Resultados

Comportamiento morfológico de los cultivos de *S. lividans* en biorreactores agitados



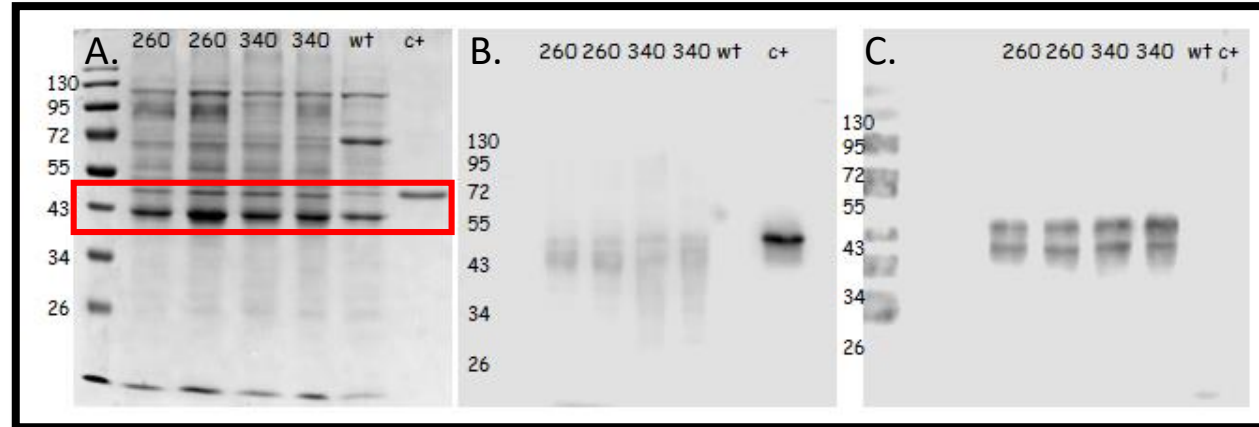
Cinética de morfología miceliar de *S. lividans* crecidas en biorreactores agitados. A) 260 rpm; B) 340 rpm.

Diámetro promedio de pellets de *S. lividas* crecida en biorreactores agitados a 260 rpm (O) y 340 rpm (●).

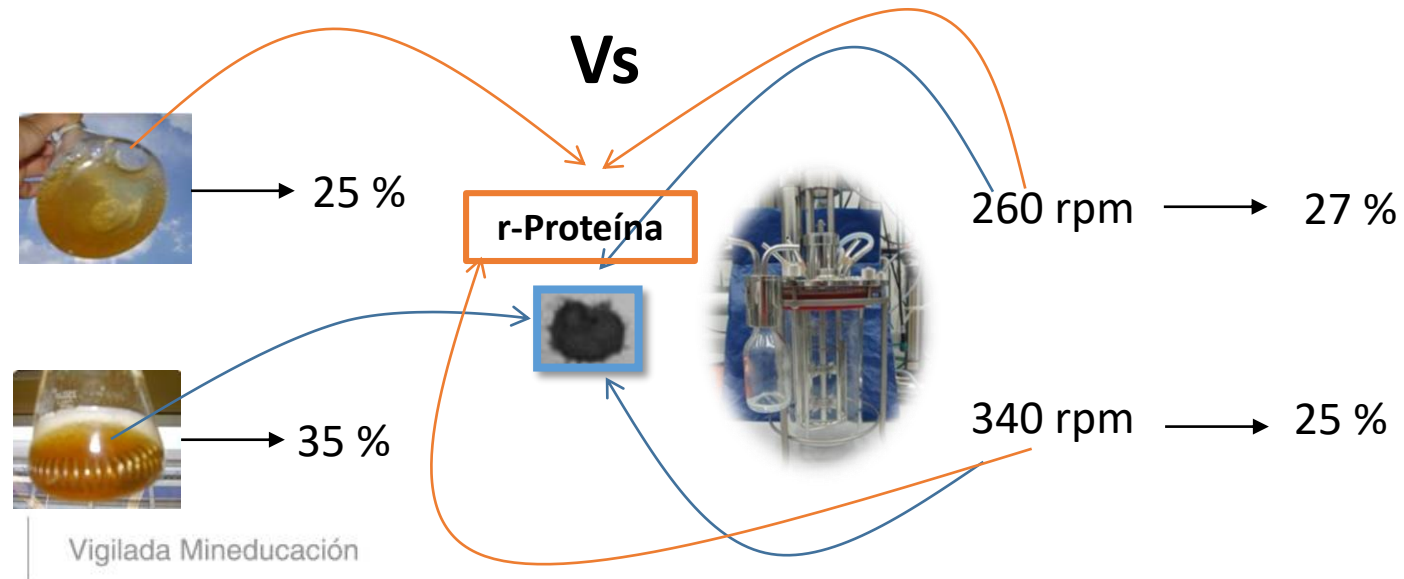


Resultados

Identificación de r-APA en biorreactores agitados reproduciendo la P/V de matraces convencionales y con resorte

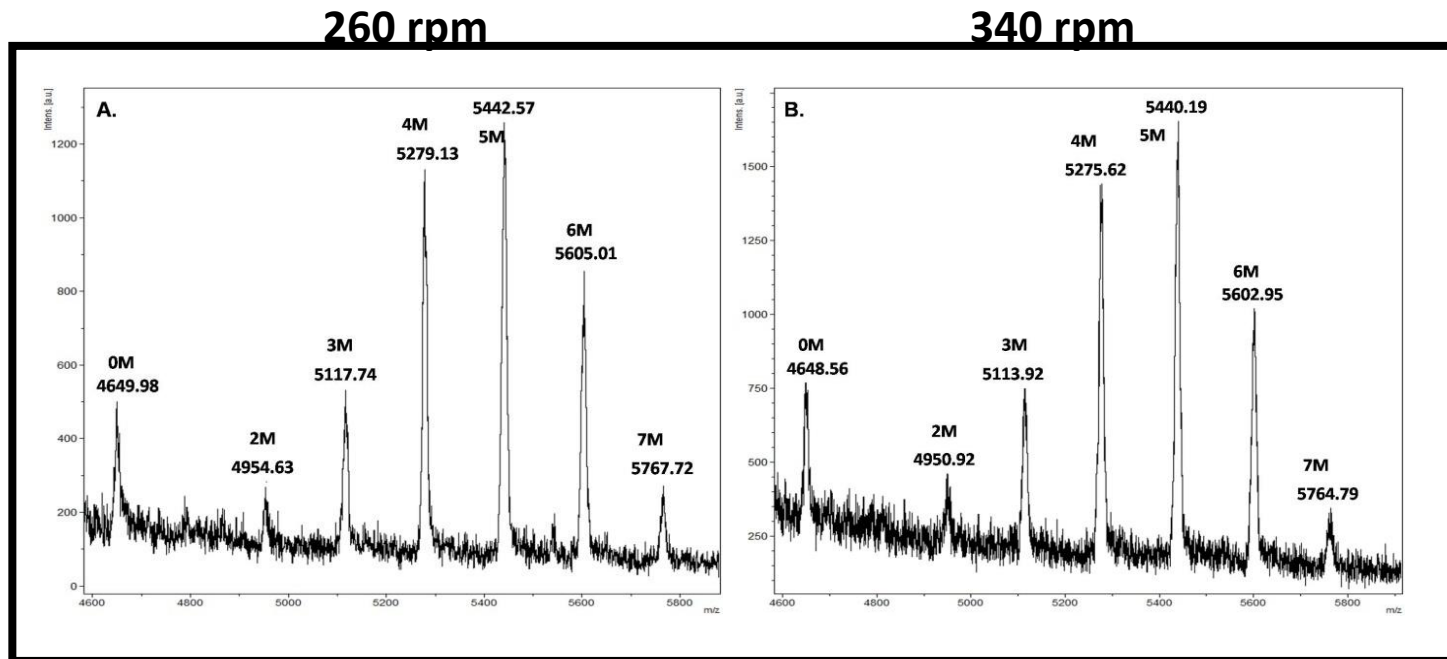


(A).SDS-PAGE de la proteína total secretada. Western blot de r-APA de *S. lividans* usando (B) AntiAPA Mab6A3, (C) ConA-peroxidasa.



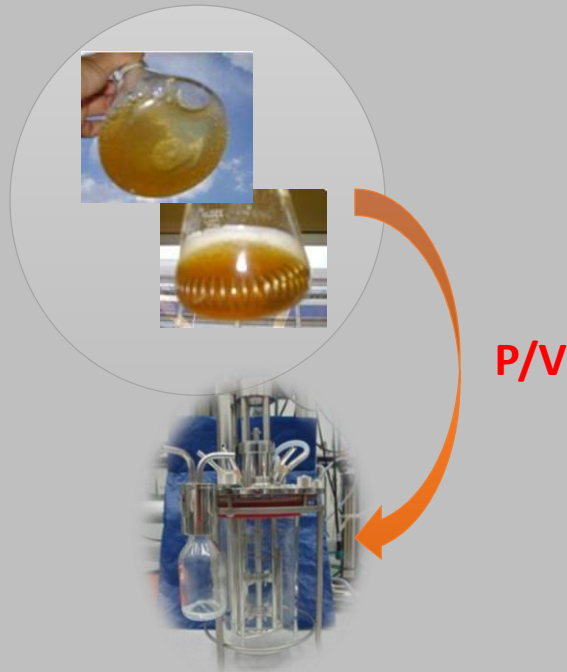
Resultados

Análisis de MALDI-TOF para el péptido correspondiente al extremo carboxilo terminal



Conclusiones

El crecimiento celular, la producción de la proteína recombinante y la *O*-glicosilación no se vieron afectados por la potencia volumétrica inicial de los cultivos agitados a 260 rpm y 340 rpm.



- ✓ Velocidad específica de crecimiento celular.
- ✓ Concentración de biomasa final en biorreactores y MR.
- ✓ Se produce la proteína recombinante.
- × No reproduce la morfología de MC.
- × Número de glicosilaciones.

Gracias

Inspira Crea Transforma