



## Plan de Gestión de Datos

### INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

#### 1. – Datos del Proyecto

##### - Título del Proyecto (en castellano)

Desarrollo de bioprocesos para la valorización de subproductos industriales mediante la generación y la aplicación de técnicas quimiométricas y de modelado matemático de procesos

##### - Título del Proyecto (en inglés)

Development of bioprocesses for the valorization of industrial subproducts through the generation and application of chemometrical techniques and mathematical modelling of processes

##### - Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

En el presente proyecto se propone realizar mejoras globales en diferentes estrategias de cultivo involucradas en la producción de bioproductos de valor agregado a partir de desechos industriales, como la producción de lactasa por cepas fúngicas, y de lípidos intracelulares por parte de microorganismos oleaginosos. Para esto, se pretende emplear componentes de nulo o bajo valor agregado en la definición de la composición de los medios de cultivo, desarrollar metodologías de cuantificación de contenido lipídico que sean robustas, rápidas y económicas, optimizar la composición de los diferentes medios de cultivo que garanticen la maximización de los rendimientos, recurriendo en algunos casos a variaciones en las velocidades de alimentación de determinados componentes de dichos medios, y a diferentes alimentaciones. Para lograr esto, se recurrirá a la aplicación de diferentes herramientas quimiométricas que ayudan al investigador a tomar decisiones, además de reducir costos y tiempos, recursos que no siempre abundan.

El producto de esta investigación permitirá atender diferentes problemas que se suscitan en la actualidad como son la disposición de efluentes, la cuantificación rápida y sencilla del contenido lipídico de microorganismos plausibles de suplantar a los cultivos vegetales como materia prima para la producción de biodiesel, la producción de proteínas recombinantes y de enzimas, que se traducirá en una posible contribución a sectores industriales.

La metodología de trabajo propuesta considera como primera etapa la búsqueda y actualización permanente de información bibliográfica, consultando sistemáticamente bases





## DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

### -Describe la toma de muestras / datos a realizar

Los efluentes que se empleen en el presente proyecto, serán obtenidos contactando a personal que trabaje en las industrias que los generan, dando prioridad a industrias del medio local.

Las cepas de *P. fluorescens*, *A. platensis*, *H. pluvialis*, *A. niger* y *R. graminis* se encuentran disponibles en los ceparios del Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB, FCB-UNL), mientras que las cepas de *A. brasilense* y *L. plantarum* serán aisladas desde bioproductos de origen comercial. Para el aislamiento de *L. plantarum* se utilizará caldo MRS y una incubación durante 5 días a 37 °C, en condiciones de anaerobiosis. Por su parte, *A. brasilense* será aislada en medio Luria Bertani (LB) a 30 °C. Para ambas cepas, cultivos en fase de crecimiento exponencial tardía serán utilizados para la conservación en ultrafreezer a -80 °C.

-Cultivo de *P. fluorescens*: para la determinación de un modelo de crecimiento y la determinación de sus parámetros cinéticos se utilizarán frascos SCHOTT de 2 L agitados magnéticamente (con la opción de aireación mediante bomba de pecera). La biomasa será cuantificada mediante sólidos suspendidos totales (SST) y su correlación con la densidad óptica a 660 nm ( $DO_{660nm}$ ). Las células viables serán cuantificadas mediante técnica de dilución en placa agar. El glicerol será cuantificado mediante un kit comercial colorimétrico. El pH será determinado mediante un micro pHmetro.

-Cultivo de *A. brasilense*: para evaluar diferentes formulaciones nutricionales se realizarán cultivos en biorreactores automatizados Infors HT y Sartorius, operados en forma batch y en condiciones operativas adecuadas según información de literatura. La biomasa será cuantificada como SST y se correlacionará con la  $DO_{660nm}$ . Las células viables serán cuantificadas mediante técnica de dilución en placa agar. El contenido de azúcares totales y reductores será cuantificado mediante la técnica de fenol-ácido sulfúrico (Dubois) y DNS (Miller), respectivamente.

-Cultivo de *L. plantarum*: para evaluar diferentes formulaciones nutricionales y condiciones operativas de cultivo (pH, aerobiosis, anaerobiosis) se realizarán experiencias en biorreactores automatizados Infors HT y Sartorius. La biomasa será cuantificada como SST y se correlacionará con la  $DO_{660nm}$ . Las células viables serán cuantificadas mediante técnica de dilución en placa agar. La concentración de azúcares reductores se determinará utilizando la técnica de fenol-ácido sulfúrico (Dubois).

-Cultivo de *A. platensis* y *H. pluvialis*: los cultivos serán efectuados en fotobiorreactores (FBRs) automatizados (Infors HT y Sartorius) y otros de construcción *ad-hoc* (de 2 L de vidrio borosilicato, aireación con bombas de pecera, agitación magnética, etc.). Para el suministro de luz se utilizarán módulos de iluminación LED, los cuales fueron específicamente diseñados y construidos para cada biorreactor comercial automatizado, y que resultan ser compatibles con los biorreactores *ad-hoc*. Los inóculos serán efectuados a partir de repiques líquidos, en cámaras de iluminación de tipo estantería (focos LEDs), y con frascos tipo SCHOTT agitados y aireados. En cuanto a determinaciones experimentales, la biomasa será determinada por SST, el contenido de proteínas por Bradford y la astaxantina de *H. pluvialis* mediante una técnica espectrofotométrica derivativa de primer orden validada por HPLC.

-Cultivo de *A. niger*: se diseñarán experimentos utilizando diferentes componentes y concentraciones que permitan incrementar el rendimiento de producción de la lactasa.



Las combinaciones a ensayar se determinarán mediante el uso de herramientas quimiométricas. Concluidos los tiempos de cultivo, se separarán las células del sobrenadante de cada cultivo, utilizando cápsulas con papel Whatman N°1 previamente tarado, y se filtrará en vacío utilizando una bomba. Las biomásas filtradas serán secadas a 50 °C hasta pesada constante. Los valores de biomasa seca serán luego transformados en valores de concentración. En los sobrenadantes filtrados se determinarán las concentraciones de glucosa (kit enzimático Wiener Lab. (Argentina), azúcares reductores y actividad enzimática. La actividad enzimática se determinará combinando 100 µL de sobrenadante, 200 µL de solución de lactosa 100 mM y 1700 µL de solución buffer citrato 100 mM pH = 4. Dicha mezcla será incubada a 50 °C en baño María (37 °C) durante 10 min, y finalmente en agua hirviendo durante 2 min. Luego, se determinará la concentración de glucosa en cada mezcla.

-Cultivo de *R. graminis*: los diferentes medios de cultivo sugeridos por los diseños experimentales se materializarán combinando los volúmenes correspondientes de las soluciones completando el volumen final de 50 mL mediante la adición de agua destilada. Los cultivos tipo inóculos serán incubados durante 24 horas a 150 rpm y  $28 \pm 1$  °C. Cada inóculo será depositado sobre los medios de crecimiento hasta alcanzar una  $DO_{660nm}$  inicial de 0,1 unidades. Cumplido el tiempo de incubación correspondiente para cada uno de los cultivos desarrollados, se colectarán 500 µL de cada cultivo para determinar DO luego de un tratamiento previo de la muestra, que posteriormente se correlacionará con un valor de concentración expresado en  $g L^{-1}$  de biomasa, para lo cual se utilizará una curva de calibrado. El volumen restante de cada uno de los cultivos se empleará para realizar la cuantificación gravimétrica de lípidos saponificables contenidos en las células de levadura.

-Caracterización de los dispositivos de cultivo de laboratorio: los biorreactores tanque agitado se caracterizarán determinando mezclado y transferencia de materia gas-líquido. Se obtendrán a partir de ensayos de estímulo-respuesta con trazadores las distribuciones de tiempos de residencia, tal de verificar la idealidad del reactor. Mediante el uso de colorantes y modelos de transferencia, se cuantificará el coeficiente de transferencia de materia volumétrico ( $K_L a$ ) para diferentes gases de interés.

-Cuantificación alternativa de lípidos intracelulares: para cuantificar los lípidos intracelulares de manera alternativa a la extracción líquido-líquido, se buscará desarrollar técnicas basadas en una metodología espectrofluorimétrica. La determinación cuantitativa de lípidos neutros endocelulares se realizará empleando curvas de calibrado, las cuales se obtendrán empleando diferentes suspensiones de aceites provenientes de fuentes animales (pescado) como vegetales (maíz, soja, girasol, uva y oliva, entre otros). Dichas suspensiones se obtendrán emulsionando masas conocidas de tales aceites y sus mezclas, con diferentes proporciones de distintos solventes orgánicos y agua. Se acoplará la aplicación de herramientas de diseño experimental estableciendo funciones objetivo tales como la maximización del valor de la señal y la minimización de la desviación estándar, variando diferentes factores (concentración de colorante, tiempo de incubación y concentración de aceite).

-Determinación de actividad enzimática: en los sobrenadantes se determinará la actividad enzimática a través de la escisión de la lactosa que se adicione al sobrenadante junto con buffer; dicha escisión liberará glucosa que se cuantificará con un kit de glucosa oxidasa/peroxidasa comercial (Wiener Lab.), determinando la  $DO_{405nm}$  mediante un espectrofotómetro, para luego correlacionar el valor obtenido con la actividad enzimática expresada en unidades por mL.

-Aplicación de herramientas quimiométricas: se aplicarán técnicas de diseño experimental y optimización simultánea. Los procedimientos de optimización



sistemática se implementarán siguiendo la siguiente secuencia: 1) elección de una función objetivo, 2) selección de los factores más importantes y 3) optimización propiamente dicha. La metodología incluirá ensayos de *screening* aplicando diseños del tipo factoriales y técnicas basadas en algoritmos genéticos para conocer las variables más significativas que actúan sobre la respuesta, y posteriormente, la aplicación del método de superficie de respuesta para determinar las condiciones de operación óptima del sistema. Cuando se presenten situaciones de respuestas múltiples se aplicará la función deseabilidad. En todos los casos se buscará encontrar las condiciones experimentales que permitan un óptimo de la función objetivo, realizando el menor número posible de experimentos. Para determinar cuáles son los factores influyentes en los diferentes procesos en cuestión, se aplicarán diseños experimentales y se compararán técnicas basadas en cuadrados mínimos ordinarios y algoritmos genéticos determinando si hay coincidencias o diferencias en cuanto a las conclusiones obtenidas con cada una. Posteriormente, en las etapas de optimización, se aplicarán diseños experimentales y metodología de superficie de respuesta para modelar cada uno de los espacios experimentales y poder comprender como influencia cada uno de los factores evaluados a las respuestas de interés. Todos estos ensayos de optimización se realizarán aplicando programas informáticos como Design Expert, MATLAB, Mathematica y Octave. Una característica muy importante a destacar es que la utilización de estas herramientas de diseño y optimización, origina un considerable ahorro de tiempo y reactivos, y lleva a la obtención de las mejores condiciones de trabajo.

**– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)**

	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>SI. Elija una de las opciones:</b>
a)	Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes
b)	No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible
c)	Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación
d)	Otro. Justifique.

**– Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.**

**Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".**

	<b>1 (UN) año</b>
	<b>2 (DOS) años</b>
	<b>3 (TRES) años</b>
	<b>4 (CUATRO) año</b>
	<b>5 (CINCO) años</b>
	<b>Otro.</b>
	<b>Motivos:</b>



A photograph of a handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is written in a cursive style and reads "Pablo César Giordano".

Dr. Pablo César Giordano