

Análisis tecno-económico para la producción de feromonas mediante biocatálisis enzimática

Diego Ávalos ^{1,†}, Gabriel Díaz ^{1,†}, Diego Ocampo ^{1,†}, Nicole Olguín ^{1,†}, and Sebasthian Schnettler ^{1,†}

Abstract: The *Pseudococcidae* insect family is one of the major plagues for the grape industry in Chile. Because of that, control of this pest is important to address in the most unharmed way possible for both crops and the final consumers. Recent studies have shown that pheromone based methods are an effective and alternative to pesticides. In that line, this study focuses on the production of chrysanthemol and subsequent transformation to the sex pheromone of the *Pseudococcus calceolariae* species. At first, we engineered a *E. coli* to obtain the necessary enzymes to the treatment of the prenol to chrysanthemol pathway and the necessary carbon source to feed the cell. In this specific work, we elaborate about the process of obtaining the raw materials needed for a future production of the pheromone.

Keywords: cell free; mevalonate; pheromones; *Pseudococcidae*; tecno-economic analysis; process simulation; chrysanthemol; plague treatment; *Escherichia coli*

1. Introducción

Dentro de la industria agropecuaria, el manejo de plagas que afectan a cultivos es un foco de preocupación para las distintas empresas del rubro [1]. Es de principal importancia para la industria nacional el control de plagas en el sector frutícola de la uva. Como fruto, es la principal especie cultivada y exportada en Chile. Para su uso en vinos, la industria representa el producto de exportación nacional de mayor expansión en los últimos años, logrando retornos de más de 600 millones de dólares [2].

La plaga de mayor alcance que afecta a la uva es la de la familia de insectos *Pseudococcidae*, la cual es responsable del 70% de los rechazos de la exportación de uva por plagas cuarentenarias [3]. Para enfrentar este problema, se han desarrollado insecticidas y se ha trabajado con la introducción de especies depredadoras (aunque esto último de poco alcance para el cultivo de uva) [1].

Ante esto, la utilización de feromonas de insecto se ha instalado como una alternativa cada vez más atractiva para el control de distintas plagas [4]. Esta aproximación al problema posee la ventaja de no tener efectos adversos en humanos ni en la fauna local, al ser estas altamente selectivas para la especie que se busca controlar [4].

Uno de los principales problemas de este método de control es el alto costo de producción para la síntesis química de las feromonas [5]. Por esto, ha ido cobrando relevancia la producción por síntesis en factorías celulares [6], un método con menor costo de producción.

Este tipo de producción utiliza materias primas renovables baratas en lugar de químicos costosos derivados de fósiles. Además, este método, normalmente, implica una bioconversión de un solo paso con células vivas como único catalizador, en contraste con la síntesis química que implica varios pasos y diferentes catalizadores [6].

De esta última aproximación a la producción de feromonas, también existe la alternativa *cell free*, en donde la síntesis del compuesto de interés se realiza fuera de un sistema celular. Los sistemas *cell-free* permiten el acceso directo al funcionamiento de la célula; elimina las paredes celulares, la regulación genética indeseable, las barreras de transporte y el requisito de viabilidad celular [7]. De esta manera, se utiliza la maquinaria molecular enzimática proveniente de una célula lisada para realizar las reacciones que

Citation: Análisis tecno-económico para la producción de feromonas mediante biocatálisis enzimática. *Journal Not Specified* **2021**, *1*, 0.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Submitted to *Journal Not Specified* for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

lleven a tener los productos deseados [7]. Además, permite el alcance de rendimientos mayores para la producción de compuestos, al no estar limitados estos por su toxicidad en la factoría celular donde de estén produciendo [8].

Este tipo de proceso hereda las ventajas de producción no-química, pero debe enfrentar una dificultad adicional que la producción dentro de factorías celulares no sufre: el requerimiento energético en forma de ATP [7]. Esto último halla su solución en sistemas de reciclaje de ADP (originalmente ATP desde el lisado), para así evitar los altísimos costos de compra de ATP [7].

Estas ventajas y desventajas de este tipo de producción fueron descritas por Bowie et al. (2014) y son resumidas en la Tabla 1.

Table 1. Cuadro comparativo entre las ventajas y desventajas de la producción *cell free*.

Ventajas	Desventajas
No hay otras vías enzimáticas que compitan con la deseada.	Altos costos de producción de enzimas: hay costos adicionales por preparación de las enzimas (extracción y purificación).
Fácil optimización: se tiene control preciso de todos los componentes del sistema.	No todas las enzimas son estables extracelularmente.
Condiciones de reacción flexible: se puede trabajar fuera de los límites fisiológicos de un ser vivo.	Inhibición y desactivación de actividades catalíticas por no compartimentación: como no hay compartimentación de las reacciones, factores o intermediarios pueden detener las reacciones en curso.
No hay que considerar la toxicidad del compuesto al no tratar con células.	Se debe considerar el costo de los cofactores necesarios como ATP o poder reductor.
Modelación computacional simplificada: no hay que considerar reacciones indeseadas que complejicen los cálculos de reacción	—
Purificación del producto más simple.	—

A continuación, en este artículo se presentará un modelamiento en *Aspen Plus®* de la producción industrial de la feromona Crisantemol 2-acetoxy-3-metilbutanoato, la cual es sensada solamente por los organismos de la especie *Pseudococcus calceolariae*, con el fin de alejar de forma no invasiva la plaga del cultivo de uva. El tipo de factoría a utilizar será mediante la biocatálisis enzimática *cell free*.

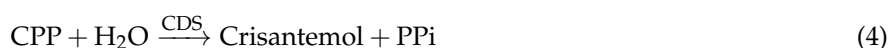
El procedimiento que se realiza en una factoría celular tiene su piedra angular en la formación de crisantemol en la llamada **vía del mevalonato (MVA)**. La vía del mevalonato implica siete reacciones para producir IPP, un precursor del crisantemol, a partir de acetyl-CoA. Una vez formado el IPP, ocurre su isomerización por la enzima isopentenil-pirofosfato delta isomerasa (IDI) para formar dimetilalil pirofosfato (DMAPP) [9]. Luego, la Crisantemol Fosfato Sintasa (CDS), una enzima involucrada en la biosíntesis de las piretrinas, realiza la ciclopropanación de dos moléculas de DMAPP para producir la molécula de Crisantemil difosfato (CPP) [10]. Esta misma enzima a bajas concentraciones de DMAPP desfosforila la CPP y permite obtener crisantemol.

66 Tal como se comprueba en aquel proceso, la complejidad de la ruta hace difícil su
 67 operación para una posible producción intracelular. Además, los compuestos interme-
 68 dios de la formación del crisantemol; IPP y DMAPP, reaccionan entre sí para participar
 69 de la formación de otros compuestos [11], a la vez que el mismo IPP puede no isomerarse
 70 y participar de otras vías [11].

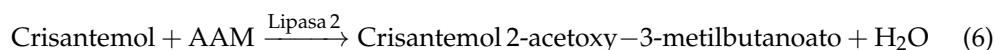
71 Para nuestro proceso *cell-free*, el propósito es producir a feromona de interés a partir
 72 de **prenol (DMA)**. Este compuesto se fosforila dos veces: la primera por una quinasa
 73 tipo 1 y la segunda por una quinasa tipo 2, para así formar DMAPP [12]. Este compuesto
 74 forma CPP por la acción de la enzima CDS, la cual vuelve a actuar sobre la molécula de
 75 CPP para formar el crisantemol [10].



Se ha demostrado que a bajas concentraciones de DMAPP, la enzima es capaz de catalizar la hidrólisis del difosfato, produciendo Crisantemol.



Una vez realizado esto, el crisantemol reacciona con ácido (R)-2-acetoxi-3-metilbutanoico para formar la feromona de interés: **crisantemol 2-acetoxi-3-metilbutanoato** [13].



76 Con todo esto, se logra la síntesis de la feromona de interés, cuyo costo de venta
 77 aproximado, en base a los cálculos de otras feromonas de especies con impacto agroin-
 78 dustrial parecido es de 216 USD/L. [14, 5, 15, 16].

79 La obtención de las células que catalizan las reacciones mencionadas se obtienen
 80 desde una *Escherichia Coli*. La célula se cultiva con un plásmido que le otorga la informa-
 81 ción genética para la síntesis proteica de las enzimas en cuestión.

82 Posterior a una lisis celular y centrifugación, las enzimas producidas son extraídas
 83 y purificadas. Las enzimas se habrán transcrito con una cola de histidinas para facilitar
 84 su purificación por cromatografía de afinidad. Finalmente serán guardadas para su uso
 85 posterior.

86 2. Revisión bibliográfica

87 2.1. Biotechnological production of the European corn borer sex pheromone in the yeast *Yarrowia lipolytica*

89 Petkevicius et al. (2021) [17] estudio una solución para tratar la plaga del barrenador
 90 de maíz europeo, a través de la producción de los precursores de las feromonas sexuales
 91 de esta misma. El proceso de producción de este precursor consistió en la construcción
 92 de una cepa de *Y. lipolytica* la cual pudiera producir este, para posteriormente cultivar
 93 esta cepa en un biorreactor *fed-batch*. El caldo de cultivo del biorreactor es centrifuga-
 94 do, tratado con etil acetato, incubado en un multi-vortex, decantado, tratado con etil
 95 acetato, incubado en un multi-vortex y decantado nuevamente, para luego ser secado
 96 con sulfato de sodio, retirando el solvente con un evaporador rotario para la extracción
 97 de alcoholes grasos crudos, los cuales posteriormente son pasados por una columna
 98 de gel y lavados con hexano para ser secados una última vez con un evaporador ro-
 99 tatorio. Los alcoholes grasos purificados fueron acetilados y puestos en un embudo

de decantación para diluirlos y lavarlos con una solución saturada, evaporada luego por un evaporador rotatorio que entrega el precursor final de la feromona. El estudio anterior arrojó resultados de $318.3 \pm 52.4 \text{ mg/L}^{-1}$ de producción de alcoholes grasos para obtener $21.5 \pm 2.2 \text{ mg L}^{-1}$ de producción del precursor Z11-14:OH, el cual tiene un precio comercial de 264 USD por gramo. Los autores logran concluir que se puede utilizar *Y. lipolytica* para la producción del precursor de la feromona sexual del barrenador de maíz y mostró que la feromona obtenida de este precursor efectivamente inducía conductas activas en los machos de este insecto.

2.2. A moth pheromone brewery: producción of (Z)-11-hexadecenol by heterologous co-expression of two biosynthetic genes from a noctuid moth in a yeast cell factory

En el estudio realizado por Hagström et al. (2013) [14] se utiliza un vector diseñado que coexpresa dos enzimas biosintéticas clave en una fábrica de células de levadura, con el objetivo de producir (Z)-11-hexadecenol, un componente de feromonas de polilla muy común. Para este ensayo se inocularon en 100 ml 3 réplicas de *S.cerevisiae* modificada. Esta levadura contenía los genes de dos enzimas importantes en la producción de la feromona en cuestión. La muestra se incubó durante 48 horas a 30°C y 300 rpm. El producto se extrajo agitando la mezcla con 100 ml de cloroformo/metanol (2:1). El extracto se transfirió a un matraz para evaporar el solvente utilizando un evaporador rotatorio y luego se volvió a disolver en 10 ml de diclorometano. El extracto que contenía aproximadamente 500 µg fue purificado mediante cromatografía en capa fina antes de la cuantificación por cromatografía de gases y su uso posterior. El cultivo produjo una media de 19,5 g de (Z)-11-hexadecenol, la cual tiene un precio de 536 USD/g. Este estudio prueba que es posible elaborar componentes de feromonas de polilla biológicamente activos a través de la coexpresión *in vitro* de enzimas biosintéticas de feromonas, sin tener que proporcionar precursores suplementarios. Los sustratos presentes en la levadura por sí solos parecen ser suficientes.

2.3. Production of moth sex pheromones for pest control by yeast fermentation

Holkenbrink et al. (2020) [5] investigan la producción de dos compuestos que son componentes esenciales o precursores directos de feromonas sexuales de distintas especies de plagas de polillas. En este estudio comienzan modificando y cultivando la levadura *Y. lipolytica* para disminuir la degradación de los alcoholes grasos que son necesarios para la generación del producto. Posterior a lo anterior, se lleva a cabo el proceso de fermentación en el biorreactor *fed-batch* de 10 L con una alimentación continua de glicerol que alcanzó una concentración final de 2.57 g L^{-1} de Z11-16OH, el cual es el precursor de la feromona Z11-16Ald. Para la extracción, se aplicó una extracción líquido-líquido con etil-acetato al caldo de fermentación, que luego fue centrifugado, liofolizado y pulverizado, para luego ser tratado con etil-acetato agitado en un multi-vortex y filtrado. Para finalizar la extracción la biomasa es re-extraída con un nuevo contenido de etil-acetato, se evaporan los solventes y el resultado es resuspendido en etil-acetato. En el caso de la purificación, el extracto fue pasado por un gel en un embudo de filtración, el cual fue lavado con un flujo de hexanos y etil-acetato para ser analizado por cromatografía de capa fina y de gas. Las fracciones mas puras fueron combinadas y se evaporo el solvente con un evaporador rotario y posteriormente, con bomba de alto vacío. Finalmente se llega a una concentración de 35. 33 mg mL⁻¹ de Z11-16Ald a través de múltiples suspensiones y evaporaciones, feromona que tiene un precio de 80 USD por gramo. Los autores concluyen, principalmente, que se demostró títulos importantes tanto como para la producción biológica, como para la comercialización de la feromona de polilla y sus precursores, a través de un medio barato con glicerol como única fuente de carbono.

2.4. Cell free biosynthesis of isoprenoids from isopentenol

En el estudio realizado por Ward et al. (2019) [18] utilizaron la reconstitución metabólica para caracterizar la vía de utilización de isopentenol *in vitro* y demostrar

su uso para la síntesis *cell free* de diferentes terpenos. Esta ruta simplificada utiliza un mínimo de cuatro enzimas para producir monoterpenos básicos y solo depende del ATP e isopentenol como sustratos. Los genes que expresan las enzimas utilizadas fueron ensambladas en diferentes plásmidos que codifican para una sola enzima cada uno, para luego ser transformadas en *E. coli*. Se inoculó una única colonia de cada cepa que contenía un plásmido diferente en 5 ml de medio de cultivo durante toda la noche a 37°C. A continuación se inoculó 1 ml en un matraz de 1 L que contenía 200 ml a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. La producción de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3750 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 30 ml de *buffer* NPI-10. Las células se lisaron pasándolas 2-3 veces a través de un homogeneizador de alta presión, luego se centrifugó para eliminar los restos celulares. Para obtener la enzima en cuestión se realizó una cromatografía por afinidad. Las reacciones del sistema multienzimático se llevaron a cabo en una solución que contenía: bicarbonato de amonio, MgCl, MnCl, ATP, isoprenol y las enzimas a 30°C. La solución fue cubierta de 1/10 de volumen de dodecano para atrapar los isoprenoides volátiles y se dejó por 9 horas. Se cuantificaron los terpenos diluyendo las superposiciones de dodecano y luego se pasó la muestra por una cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas para su análisis. Se produjeron 220 mg/L de taxadieno (terpeno), obteniendo una conversión del 65% de isoprenol y ATP. El precio de comercialización de este producto no se logró encontrar. El estudio demuestra que una ruta *cell free* es capaz de producir una tasa escalable del terpeno taxadieno, optimizando las concentraciones de enzima y sustrato.

2.5. Production of moth sex pheromone precursors in *Nicotiana* spp.: a worthwhile new approach to pest control

Otra aproximación para la producción de feromonas sexuales, es la de producirlas en plantas. El estudio llevado a cabo por Xia et al. (2020) [15] muestra como se puede utilizar especies de la planta del tabaco para la producción de feromonas sexuales de polillas. Primero, se introducen las enzimas necesarias a la planta del tabaco para la producción de las feromonas, extraídas de distintas plantas y algunas especies de polillas. Las plantas, ya modificadas, fueron cultivadas en un invernadero y luego tratadas con *Agrobacterium* genéticamente modificado para lograr la producción de los precursores de la feromona. Se realiza un análisis de los ácidos grasos en las hojas del cultivo, las cuales son tratadas con ácido sulfúrico y metanol, reposadas, mezcladas con agua y heptano, para luego ser agitado y centrifugado y finalmente analizadas a través de cromatografía. En el caso de los lípidos neutros, se las hojas del cultivo son sometidas a una extracción a través de un *glass tissue grinder*, para luego ser agitado y centrifugado para su separación. Posteriormente, el extracto es sometido a una cromatografía de capa fina, para luego ser extraído con una mezcla de metanol/cloroformo para finalmente añadir agua para dividir los lípidos y transferirlos para su secado y a través de evaporación y proseguir a la metanólisis ácida, paso final para la obtención de la feromona. Con esta aproximación, se llegó a una producción de 335 µg por gramo de hoja fresca de (Z)-11-hexadecenoic acid, el cual tiene un valor comercial de 688 USD por 5 gramos. La principal conclusión que llegaron los autores, es que la producción de este tipo de feromonas (aquellas con precursores C₁₆) puede ser llevada a cabo con buenos resultados con los datos obtenidos en el estudio, teniendo en cuenta que se puede escalar a condiciones de campo para un trabajo futuro.

2.6. A synthetic biochemistry system for the *in vitro* production of isoprene from glycolysis intermediates.

En un trabajo liderado por Korman et al. (2014), un grupo de investigadores llevaron a cabo la construcción de la **vía metabólica del mevalonato** para la producción en un sistema *cell free* de isopreno. La obtención del compuesto se realizó a partir de intermediarios de la glicólisis: fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato y Acetyl-CoA. Estos compuestos cual se transformaron en isopreno mediante un suministro externo de

ATP y reciclaje de NADP^+ y CoA, aunque sólo se cuantificó la producción en base a PEP. Para esto, primero se incubaron las cepas TOP10(DE3) y BL21Gold(DE3) de *E. coli* con plásmidos fabricados por ensamblaje Gibson que contenían todos los genes de las 12 enzimas necesarias para la experimentación. Las células fueron transformadas y la expresión de las proteínas fue inducida. Luego se procedió con el rompimiento celular por sonicación. Para la extracción de una parte de las enzimas, el *cell debris* fue removido por centrifugación a 30000 G por 20 minutos. El lisado fue purificado por su paso en una columna de cromatografía de afinidad de resina Ni-NTA. Para la extracción de la otra parte de las enzimas, el lisado fue purificado por calor y luego centrifugado a 100000 G por 60 minutos. Una fracción enzimática de esto luego pasó por ultracentrifugado por 4 horas a 95000 G. De esta manera, con las enzimas purificadas, se llevaron a cabo las reacciones para verificar la producción de isopreno, lo cual se cuantificó por microextracción de fase sólida y cromatografía de gases, obteniendo 14.6 mg por litro por hora de isopreno para el PEP, con conversión de aproximadamente el 100% del intermediario de la glicólisis. El precio de venta de este *commodity* ronda los 500 dólares por litro.

2.7. Yeast engineering to express sex pheromone gland genes of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*

En 2019, Vatanparast et al. [16] realiza un estudio sobre la expresión de los genes de la glándula sexual de la polilla oriental de la fruta en *Saccharomyces cerevisiae*. Para lo anterior, clonan e introducen los genes anteriormente mencionados a la levadura, para luego realizar un cultivo, realizado a través de distintos medios de cultivo, sin biorreactor, para luego dar paso a la extracción de los ácidos grasos de las levaduras transformadas. Para realizar la extracción, se somete a las células congeladas a una agitación con perlas de vidrio tratadas con ácido, para luego ser centrifugadas en solución para la separación de fases. Luego de lo anterior, los lípidos extraídos fueron secados con un flujo de nitrógeno y disueltos para la formación de ácido graso de metil éster, los cuales fueron nuevamente secados con nitrógeno para después ser centrifugados, diluidos y nuevamente secados. Para el caso de los alcoholes grasos, se realiza un proceso similar al anterior descrito, con perlas de vidrio, centrifugación y disolución, pero con los componentes pertinentes para la transformación de estos. El estudio muestra que se logra una composición de Ácido Z9-tetradecenoico (precursor de feromona) de un 2.3 %, el cual tiene un valor comercial de 778.84 USD por 100 mg.

2.8. Production of Long Chain Fatty Alcohols Found in Bumblebee Pheromones by *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica fue estudiada por Hambalko et al. (2021) [19] para producir alcoholes grasos necesarios para la formación de diferentes feromonas de abejorro. Se comenzó por transformar *Yarrowia lipolytica* con genes que expresan la acil coA reductasa grasa, la cual produce diferentes alcoholes grasos. El inóculo de levadura se preparó en 20 mL de medio en matraces de 100 mL. Posteriormente, se inoculó 50 mL de medio de producción en matraces deflectores de 250 mL. Las células se cultivaron a 28°C y 130 rpm dentro de un agitador orbital. Para confirmar la producción de alcoholes grasos, las cepas se cultivaron durante 3 días. Para aislar la biomasa, se centrifugaron las suspensiones celulares, se lavó dos veces con solución salina, luego una vez con agua desionizada y finalmente se liofilizó. Las células liofilizadas se agregaron a una mezcla de CH_2Cl_2 y HCl, y la suspensión se incubó a 50°C durante 3 h. Después de la incubación, se agregaron 1 mL de agua y 1 mL de hexano y toda la suspensión se agitó con vórtex. La capa orgánica que contiene alcoholes grasos se separó mediante centrifugación y se analizó mediante cromatografía de gases. Se logró producir 166 mg/L de alcoholes grasos totales, de ellos 50.5 mg/L corresponden a C18:0-OH, cuyo precio de comercialización es de 0.2 USD/g.

2.9. Cell-free biosynthesis of limonene using enzyme-enriched *Escherichia coli* lysates.

En el estudio y experimentación llevado a cabo por Quentin et al. (2019) [20], un grupo de investigadores llevó a cabo la producción biosintética del tipo *cell free* para obtener limoneno, un compuesto monoterpénico hidrocarbonado responsable del olor a limón. Este compuesto se sintetizó gracias a la comprensión de la **vía del mevalonato** ya descrita, de particular interés para la producción de nuestra feromona. Se compararon las producciones del aromatizante según la utilización de glucosa como sustrato con la utilización de mevalonato como sustrato. Para llevar a cabo el proceso, se trabajó con una *Escherichia coli* modificada con un plásmido pETBCS para sobreexpresar las enzimas clave de la vía enzimática mencionada: *mevalonate kinase* (MK), *phosphomevalonate kinase* (PMK), *pyrophosphomevalonate decarboxylase* (PMD), *isopentenyl pyrophosphate isomerase* (IDI), *geranyl diphosphate synthase* (GPPS) y *limonene synthase* (LS). Para el caso de los que partirían desde la glucosa, se agregaron los genes de *acetyl-CoA acetyltransferase* (ACAT), *hydroxymethylglutaryl-CoA synthase* (HMGs) y *hydroxymethylglutaryl-CoA reductase* (HMGR). Las células fueron cultivadas en 1-l Tunair shake flasks a 37°C y 250 rpm, para luego obtener un pellet celular por centrifugación de 15 minutos a 8000 G. Para extraer el material celular útil en esta experimentación, las células fueron homogenizadas por presión a 20000 psi y luego purificados sus componentes de interés catalítico por dos centrifugaciones de 30 minutos cada una a 30000 G, antes de ser congeladas a -80°C. La reacción de producción de limoneno se realiza en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 30°C, con 25 µl de lisado y 25 µl para capturar los compuestos volátiles como el limoneno. Ocurrido esto, se cuantificó la cantidad del aromatizante producido por cromatografía de gases, obteniendo concentraciones de 0.71 mM de limoneno para el camino desde el mevalonato y 0.45 mM de limoneno para el camino desde la glucosa. El precio de venta del compuesto se estima cerca de los 216 dólares por litro. Con este estudio, se comprobó que es posible realizar biosíntesis *cell free* de largos caminos enzimáticos como lo era con la glucosa, además de verificar que es posible la producción de este tipo para obtener monoterpénos como el limoneno.

2.10. A synthetic biochemistry platform for cell free production of monoterpenes from glucose

En un nuevo artículo escrito por Korman et al. (2017) [21] se diseñaron 27 enzimas con el objetivo de convertir glucosa en monoterpénos. Esto se logró utilizando un sistema *cell free* que puede operar cerca de 5 días. Se utilizó *E.coli* para la clonación y sobreexpresión de las proteínas utilizadas en la vía del mevalonato, la cual da origen a múltiples terpenos. Se incubó *E.coli* en 1 L de medio de caldo de Luria durante 16 horas, las células se lisaron para luego ser purificadas mediante cromatografía de afinidad, de esta forma se obtuvieron las enzimas necesarias para el sistema. La bioconversión *in vitro* se realizó en una muestra de volumen de 2 ml, la cual contenía: CoA, ATP, NADP, ADP, buffer, entre otros. Las reacciones se iniciaron al adherir glucosa. La muestra se cubrió cuidadosamente con miristrato de isopropilo. Se dejó que las reacciones prosiguieran durante 5 días, mientras se agitaban suavemente a 25°C. La muestra fue centrifugada durante 2 minutos a 16000 g para separar las capas acuosa y orgánica. Para el análisis y cuantificación de la producción de terpenos, se mezclaron 75 µl de la capa orgánica con 175 µl de hexanos y se analizaron mediante cromatografía de gases. Se produjo un total de 12 g l⁻¹ de limoneno con un precio de comercialización de 216 USD/L. Se concluyó que los sistemas *cell free* pueden tener altos rendimientos al optimizar bien el uso de las moléculas energéticas y las enzimas utilizadas en el proceso. Usando este método no se debe tener en cuenta los niveles de toxicidad aceptables en una célula viva (las cuales en este caso habrían matado a la bacteria), ni la competencia entre enzimas por los sustratos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Bases del diseño

El proceso de acondicionamiento de la materia prima fue simulado en el software *Aspen Plus*, una herramienta de simulación de procesos químicos desarrollada por *AspenTech*. El proceso propuesto se basa en la obtención de glucosa como materia prima para el cultivo celular de *E. coli* necesario para producir las enzimas recombinantes, que posteriormente se utilizarán en la catálisis *cell free*.

3.2. Acondicionamiento de la materia prima

El proceso propuesto consta de cinco operaciones unitarias distintas, en las que se utilizan subproductos de la producción de vino como materia prima. Sarmientos y tallos de vid, y el orujo de la uva son elementos que contienen altas concentraciones de celulosa y hemicelulosa, compuestos que se pueden utilizar para generar sacáridos. Para esto, primero se realiza una molienda de sarmientos y tallos, con tal de reducir el tamaño de partícula a aproximadamente un milímetro. Para asegurar esta variable, el flujo posteriormente entra a un proceso de tamizaje, tal que el material rechazado es recirculado hacia la molienda. El flujo que pasa el tamizaje, se mezcla con agua, un flujo de orujo de uva y con ácido sulfúrico dentro de un reactor de hidrólisis ácida, calentado utilizando un enchaquetado por el que fluye vapor sobrecalentado, hasta alcanzar una temperatura de operación de 125°C. Con esto se consigue hidrolizar parte de la celulosa y hemicelulosa a sacáridos más simples. Para maximizar esta reacción, el flujo es enfriado y luego llevado a un reactor de sacarificación enzimática, en el que se lleva a cabo la misma conversión anterior, pero esta vez catalizada por enzimas en vez de ácido.

3.2.1. Operaciones unitarias: Molino

El tamaño y estructura de la materia prima del proceso no son adecuados para ser procesados de manera química de forma inmediata. Por esto, se realizó una operación de molienda con tal de reducir el tamaño de partícula de los materiales a aproximadamente 0.5 mm. La distribución de tamaño de partículas generó valores entre los 0.1 y 0.84 mm, por lo que el flujo fue dirigido posteriormente a un proceso de tamizaje con recirculación, con tal de asegurar el tamaño de partícula requerido. Se tomó una eficiencia energética del 70% para el molino en la simulación. Además se especificó la distribución de tamaño de partícula de la Tabla 2 para la salida del molino.

Table 2. PSD especificado a la salida del molino (*mm*)

Intervalo	Límite Superior	Límite Inferior	Fracción de Masa
1	0.1	0.25	0.25
2	0.25	0.42	0.5
3	0.42	0.84	0.25

Las distribuciones de partículas resultantes en los distintos flujos se encuentran en los anexos.

Un molino disponible en el mercado para el proceso corresponde al triturador de mandíbula, modelo BB 500 del fabricante *Retsch*. Este permite obtener un *output* de salida con un 90% de partículas inferiores a 0.5 mm. También cumple con la especificación de flujo a triturar, ya que es capaz de procesar 240 kg/h de material, y tiene una potencia de 7.5 kW, lo cual es superior a los 0.17 kW requeridos por el proceso.

Table 3. Tabla resumen de la potencia total requerida para moler la materia prima al tamaño especificado

Configuración	1	2
Potencia (kW)	0.17	0.2 kW
PSD % < 0.42 mm	98.3	98.9

Se escogió finalmente la configuración 1, ya que la ganancia marginal en menor tamaño de partícula no compensa la potencia extra requerida, ni el costo de tener que comprar otro equipo de molienda. Además en esta última configuración se pierde material lignocelulósico como desechos que no logran el tamaño deseado.

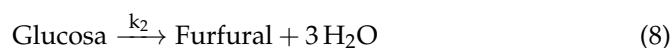
3.2.2. Operaciones unitarias: Reactor de Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida de la celulosa corresponde al proceso donde esta es hidrolizada a glucosa en un medio ácido, donde comunmente se utiliza ácido sulfúrico [22]. Para promover el proceso de hidrólisis, además se utilizan altas temperaturas (120°), obtenidas a través de un enchaquetado por el que fluye vapor sobrecalentado.

Como flujos de entrada, se consideran los sarmientos y tallos, disueltos en una corriente de agua, y los orujos. Esto da una corriente de reactivos disueltos de 40 kg por hora. Por otra parte, para llevar a cabo la hidrólisis, se utilizaron 20 kg por hora de ácido sulfúrico al 8% w/w. Después de un tiempo de residencia de 10 minutos, el flujo sale de manera homogénea, en dirección al enfriador. Este flujo contiene una mezcla de lignocelulósicos, polisacáridos y monosacáridos, ácido y furfural. Este último es un subproducto no deseado de la reacción.

Se realizaron los siguientes supuestos de operación:

- Reactor adiabático.
- Los únicos compuestos que reaccionan son la celulosa y la glucosa.



- La reacción sigue una cinética de Arrhenius.

La decisión de las condiciones de operación fue basada en los resultados obtenidos a partir de los análisis de sensibilidad mostrados en las figuras 4 y 5. En estos, se analizaron las cantidades de glucosa y furfural obtenidos en los flujos de salida del reactor, considerando distintos valores de temperatura y flujo de ácido. Dado esto, se prefirió utilizar el flujo de 20 kg/hr y operar a 120°C debido a que, con estas condiciones, se minimizó la producción de furfural, mientras que se mantuvo la producción de glucosa en niveles relevantes. Las especificaciones de los flujos respectivos se encuentran anexas a este documento.

Una opción de equipo disponible en el mercado es el modelo miniPilot de *Büchi-glasuster*. Este cumple con las especificaciones requeridas de temperatura (hasta 200°C), presión (1 bar) y volumen (hasta 15 L).

3.2.3. Operaciones unitarias: Reactor de Hidrólisis Enzimática

El reactor de hidrólisis enzimática corresponde a la segunda etapa de producción de glucosa. Esta ocurre a 40°C y se tomo como supuesto que en esta etapa se lograba una conversión a glucosa del 80% de la celulosa restante del proceso de hidrólisis anterior. Como este proceso posee un tiempo de residencia mayor (60 min), por lo tanto, el volumen de este tiene que ser mayor al utilizado en el reactor de hidrólisis ácida. Es por esto que se decidió utilizar un reactor de 200 L, del cual se pudo encontrar una opción de reactor de resina epoxi en *Weihai Global Chemical Machinery*, el cual cumple con las condiciones de operación anteriormente nombradas.

383 3.3. Diagrama de flujo del proceso

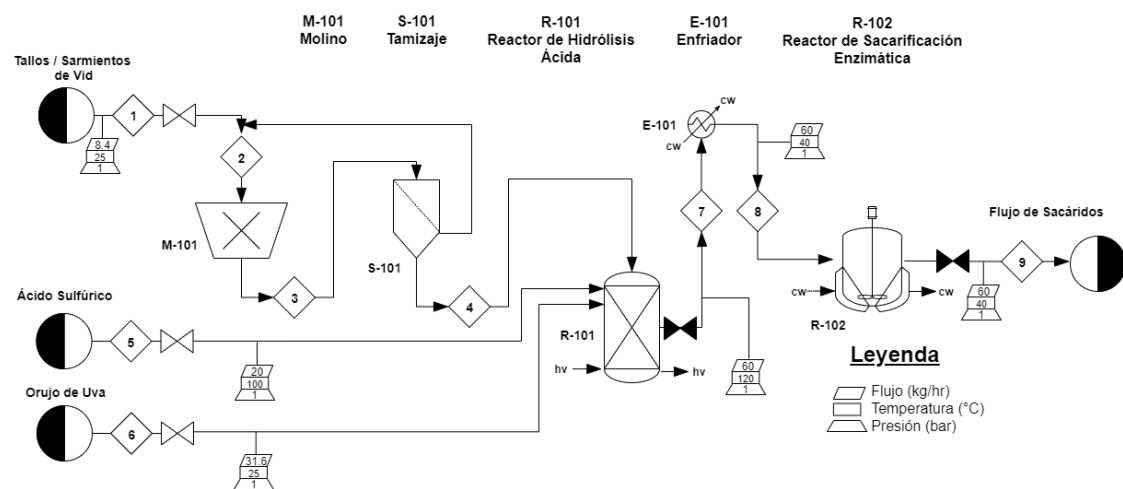


Figure 1. Diagrama de Flujos del Proceso

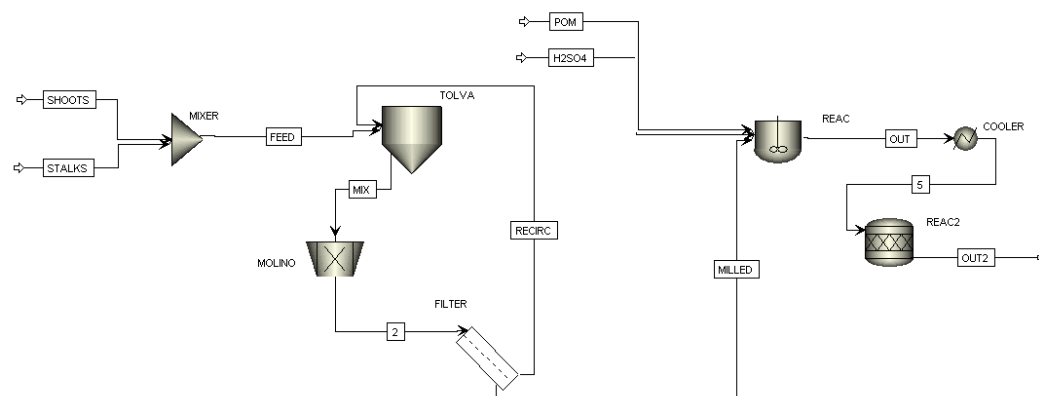


Figure 2. Flowsheet de la simulación para la configuración 1 del proceso en Aspen Plus

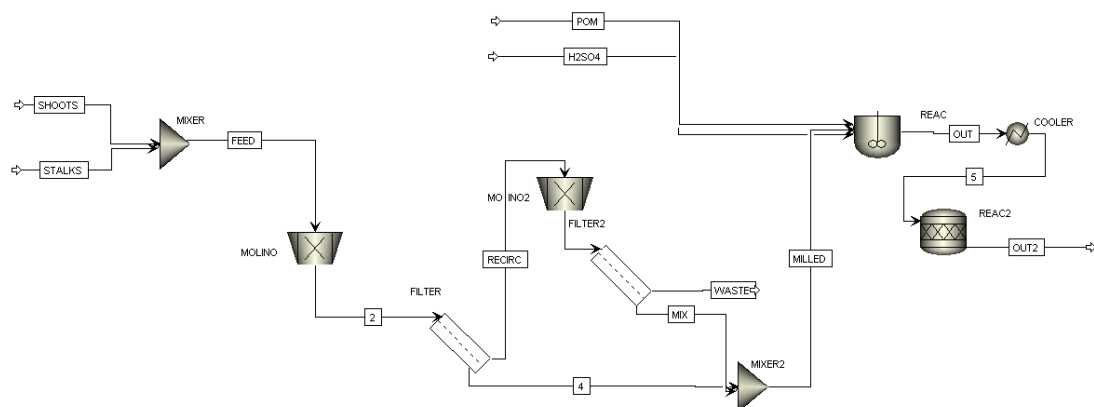


Figure 3. Flowsheet de la simulación para la configuración 2 del proceso en Aspen Plus

3.4. Análisis de sensibilidad

En la figura 4 (a), se puede ver el comportamiento de la glucosa y el furfural en función de la temperatura de hidrólisis. Se aprecia que la glucosa alcanza un máximo en aproximadamente 142°C. Sin embargo se decidió operar a una menor temperatura, con la finalidad de minimizar también el flujo de furfural a la salida, puesto que este es tóxico para los microorganismos. En (b) se ve el mismo análisis utilizando el flujo de ácido diluido como la variable independiente, en este se puede ver un comportamiento de tipo logarítmico, donde hay un aumento rápido a flujos de ácido bajos, el cual disminuye posteriormente. Debido a que la figura (b) está fijada a una temperatura de 120°C, la producción de furfural es mínima comparada con la de glucosa.

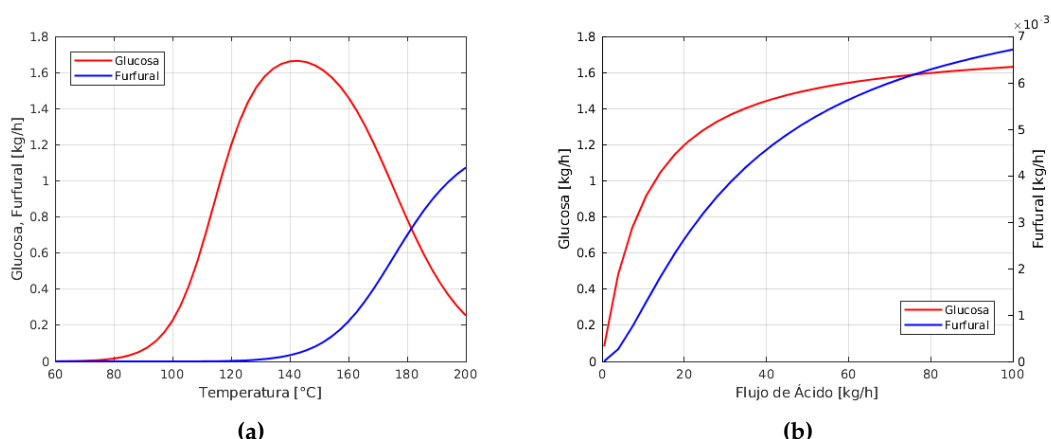


Figure 4. Análisis de sensibilidad para la glucosa y furfural en función de la temperatura de operación del reactor de hidrólisis ácida (a) y el flujo de alimentación de ácido.

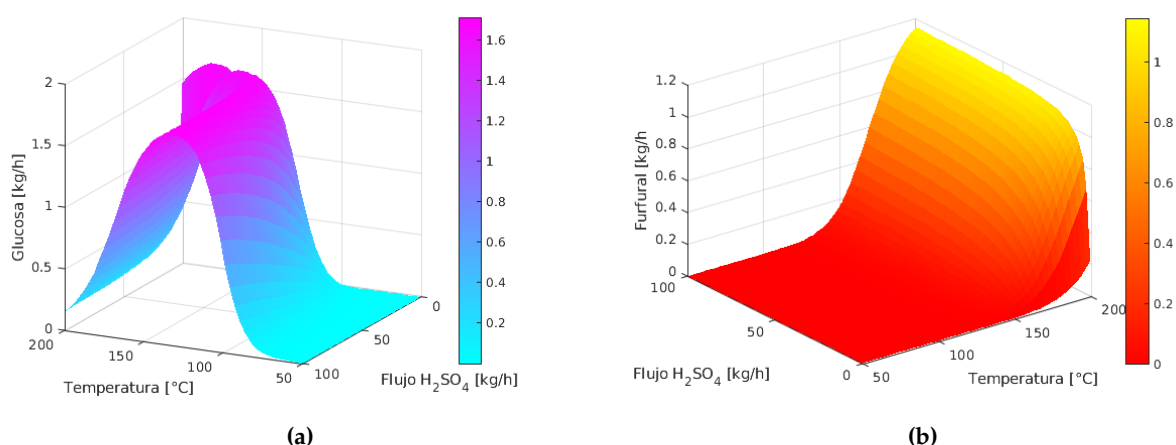


Figure 5. Análisis de sensibilidad en dos variables para el flujo de salida de glucosa (a) y furfural (b), en función de la temperatura del reactor y la alimentación de ácido sulfúrico.

En la figura 5 (a) se puede ver la respuesta multivariable del flujo de salida de glucosa. Se puede ver en el gráfico de superficie que la respuesta es mucho mas sensible a variaciones en la temperatura que en el flujo de ácido. Adicionalmente, se ve que para mantener una producción máxima de glucosa se debe disminuir el flujo de ácido al aumentar la temperatura. Por otro lado para la respuesta del furfural (b), la temperatura nuevamente es la variable más crítica, mientras que el flujo de ácido también aumenta su conversión en menor medida.

4. Anexos

4.1. Simulaciones

El repositorio con todos los archivos de las simulaciones y cálculos realizados en este trabajo se encuentra en este [enlace](#).

4.2. Tablas de flujos de operación

A continuación se presentan los flujos de operación, presión y temperatura de las corrientes más relevantes del sistema para ambas configuraciones.

Tabla configuración 1:

Parámetro	SHOOTS	STALKS	POM	FEED	H2SO4	OUT	OUT2
Temperatura (°C)	25	25	25	25	100	120	40
Presión (bar)	1.01325	1	1	1	1.01325	1.01325	1
Flujo Másico (kg/hr)	2.637	5.714	29.274	8.351	20	57.625	57.625
WATER	1.977	4.285	23.736	6.263	18.106	48.107	48.107
LIGNI-01	0.178	0.452	3.243	0.63	0	3.874	3.874
PROTEIN	0.032	0.104	0.791	0.137	0	0.928	0.928
XYLAN	0.21	0.348	0.474	0.559	0	1.03402	1.034
H2SO4	0	0	0	0	1.42E-06	2.37E-06	3.83E-09
GLUCO-01	0	0	0	0	0	1.198	1.667
CELULOSE	0.237	0.522	1.028	0.759	0	0.586	0.117
5-HYD-01	0	0	0	0	0	0.002	0.002
H+	2.00E-10	4.33E-10	2.40E-09	6.32E-10	0.019	0.019	0.019
OH-	3.37E-09	7.30E-09	4.04E-08	1.07E-08	1.68E-13	2.24E-12	5.90E-14
HSO4-	0	0	0	0	1.872	1.872	1.844
SO4-	0	0	0	0	0.001	0.002	0.029

Tabla configuración 2:

Parámetro	SHOOTS	STALKS	POM	FEED	H2SO4	OUT	OUT2	WASTE
Temperatura (°C)	25	25	25	25	100	120	40	25.412
Presión (bar)	1.013	1	1	1	1.013	1.013	1	1
Flujo Másico (kg/hr)	2.637	5.714	29.274	8.351	20	56.733	56.733	0.893
WATER	1.978	4.285	23.736	6.263	18.106	48.107	48.107	0
LIGNI-01	0.178	0.453	3.244	0.631	0	3.605	3.605	0.27
PROTEIN	0.033	0.104	0.791	0.137	0	0.87	0.87	0.059
XYLAN	0.211	0.348	0.474	0.559	0	0.795	0.795	0.239
H2SO4	0	0	0	0	1.419E-06	2.375E-06	3.837E-09	0
GLUCO-01	0	0	0	0	0	1.019	1.372	0
CELULOSE	0.237	0.522	1.028	0.76	0	0.441	0.088	0.325
5-HYD-01	0	0	0	0	0	0.002	0.002	0
H+	1.996E-10	4.325E-10	2.395E-09	6.322E-10	0.019	0.019	0.02	0
OH-	3.37E-09	7.303E-09	4.044E-08	1.067E-08	1.676E-13	2.239E-12	5.897E-14	0
HSO4-	0	0	0	0	1.872	1.872	1.845	0
SO4-	0	0	0	0	0.002	0.002	0.029	0

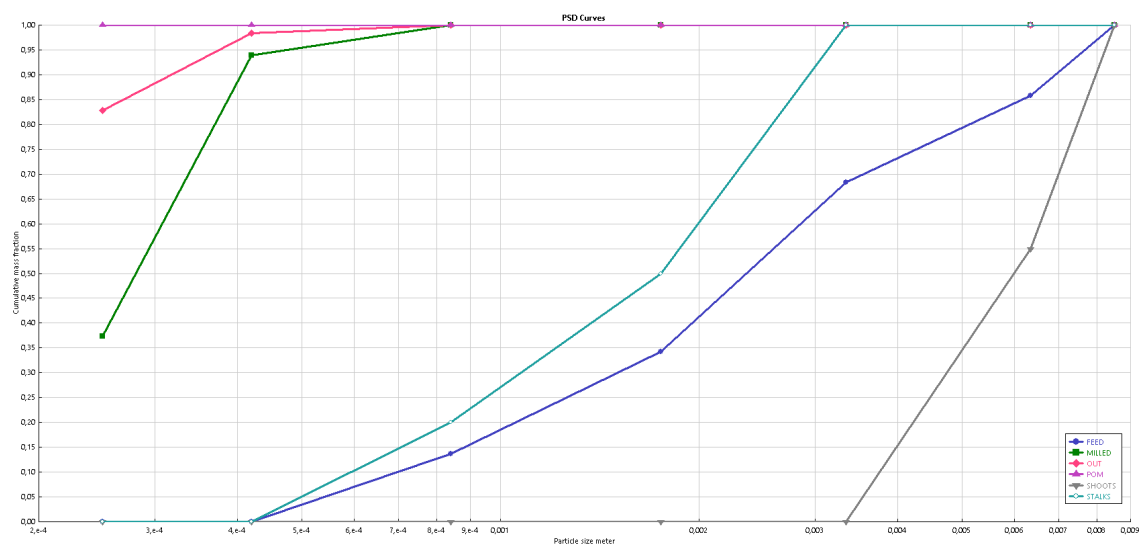


Figure 6. Distribución del tamaño de partícula para la configuración 1.

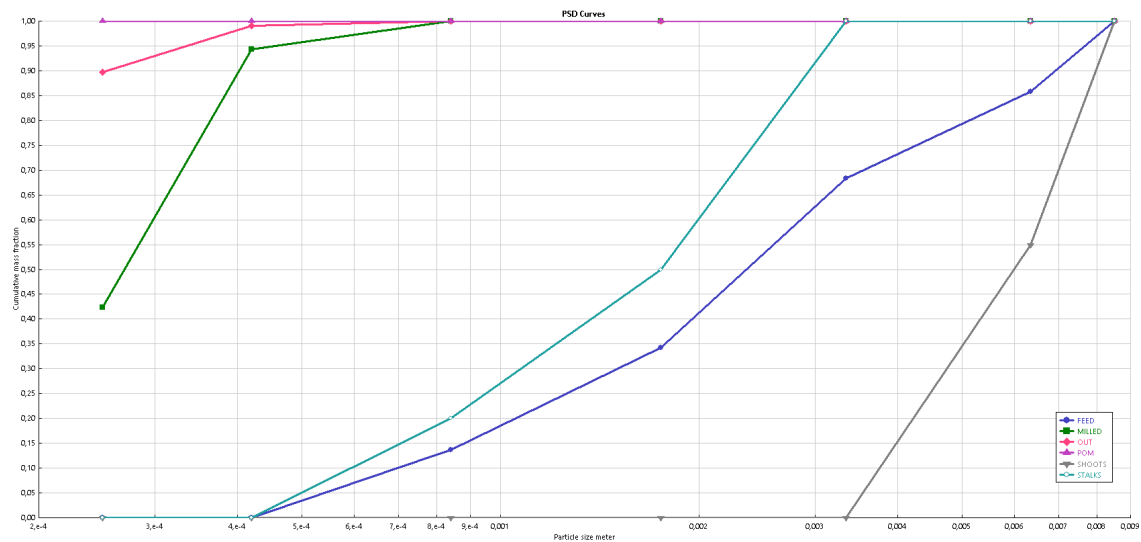


Figure 7. Distribución del tamaño de partícula para la configuración 2.

Referencias

- [1] Nilda Pérez and Luis L Vázquez. "Manejo ecológico de plagas". in: *CEDAR: La Habana. Cuba* 296 (2004).
- [2] Jorge Aladino Escobar-Fica. "Desarrollo De Formulaciones En Base A Extractos De Manzanilla Para El Control Fitosanitario En La Industria Vitivinicola". in: (2009).
- [3] Moore C. "Rechazos por *Pseudococcidae* y su estatus cuarentenario". in: *Servicio Agrícola y Ganadero de Chile* (2012). URL: http://www.fdf.cl/biblioteca/presentaciones/2012/04_jt_chanco_fosfina/Presentacion_FDF_Copiapo_SAG.pdf.
- [4] Gadi V.P. Reddy and Angel Guerrero. "Chapter Twenty - New Pheromones and Insect Control Strategies". in: *Pheromones*. by editor Gerald Litwack. volume 83. Vitamins Hormones. Academic Press, 2010, pages 493–519. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)83020-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)83020-1). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672910830201>.
- [5] Carina Holkenbrink and others. "Production of moth sex pheromones for pest control by yeast fermentation". in: *Metabolic Engineering* 62 (2020), pages 312–321. ISSN: 1096-7176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.10.001>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717620301567>.
- [6] Karolis Petkevicius, Christer Löfstedt and Irina Borodina. "Insect sex pheromone production in yeasts and plants". in: *Current Opinion in Biotechnology* 65 (2020). Chemical Biotechnology Pharmaceutical Biotechnology, pages 259–267. ISSN: 0958-1669. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.07.011>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166920301075>.
- [7] C. Eric Hodgman and Michael C. Jewett. "Cell-free synthetic biology: Thinking outside the cell". in: *Metabolic Engineering* 14.3 (2012). Synthetic Biology: New Methodologies and Applications for Metabolic Engineering, pages 261–269. ISSN: 1096-7176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.002>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717611000929>.
- [8] James U. Bowie and others. "Synthetic Biochemistry: The Bio-inspired Cell-Free Approach to Commodity Chemical Production". in: *Trends in Biotechnology* 38.7 (2020), pages 766–778. ISSN: 18793096. DOI: [10.1016/j.tibtech.2019.12.024](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.024). URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.024>.
- [9] Alkiviadis Orfefs Chatzivasileiou and others. "Two-step pathway for isoprenoid synthesis". in: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.2 (2019), pages 506–511. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1812935116](https://doi.org/10.1073/pnas.1812935116). eprint: <https://www.pnas.org/content/116/2/506.full.pdf>. URL: <https://www.pnas.org/content/116/2/506>.
- [10] Ting Yang and others. "Chrysanthemyl Diphosphate Synthase Operates in *Planta* as a Bifunctional Enzyme with Chrysanthemol Synthase Activity". in: *The Journal of biological chemistry* 289 (november 2014). DOI: [10.1074/jbc.M114.623348](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.623348).
- [11] Zerihun A Demissie and others. "The Biosynthetic Origin of Irregular Monoterpenes in *Lavandula*". in: *Journal of Biological Chemistry* 288.9 (march 2013), pages 6333–6341. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M112.431171](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431171). URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431171>.
- [12] Alkiviadis Orfefs Chatzivasileiou and others. "Two-step pathway for isoprenoid synthesis". in: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.2 (2019), pages 506–511. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1812935116](https://doi.org/10.1073/pnas.1812935116). eprint: <https://www.pnas.org/content/116/2/506.full.pdf>. URL: <https://www.pnas.org/content/116/2/506>.
- [13] Ashraf M. El-Sayed and others. "Chrysanthemyl 2-acetoxy-3-methylbutanoate: the sex pheromone of the citrophilous mealybug, *Pseudococcus calceolariae*". in: *Tetrahedron Letters* 51.7 (2010), pages 1075–1078. ISSN: 0040-4039. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.12.106>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403909024009>.
- [14] Asa Hagström and others. "A moth pheromone brewery: Production of (Z)-11-hexadecenol by heterologous co-expression of two biosynthetic genes from a noctuid moth in a yeast cell factory". in: *Microbial cell factories* 12 (december 2013), page 125. DOI: [10.1186/1475-2859-12-125](https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-125).
- [15] Y. -. Xia and others. "Production of moth sex pheromone precursors in *Nicotiana* spp.: a worthwhile new approach to pest control". English. in: *Journal of Pest Science* 93.4 (2020). Cited By :5, pages 1333–1346. DOI: [10.1007/s10340-020-01250-6](https://doi.org/10.1007/s10340-020-01250-6). URL: www.scopus.com.
- [16] M. Vatanparast and Y. Kim. "Yeast engineering to express sex pheromone gland genes of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*". English. in: *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22.3 (2019), pages 645–654. DOI: [10.1016/j.aspen.2019.04.009](https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.009). URL: www.scopus.com.

-
- [17] K. Petkevicius **and others**. “Biotechnological production of the European corn borer sex pheromone in the yeast *Yarrowia lipolytica*”. English. **in:** *Biotechnology Journal* 16.6 (2021). DOI: <https://doi-org.pucdechile.idm.oclc.org/10.1002/biot.202100004>. URL: www.scopus.com.
- [18] Valerie C.A. Ward, Alkiviadis Orfefs Chatzivasileiou **and** Gregory Stephanopoulos. “Cell free biosynthesis of isoprenoids from isopentenol”. **in:** *Biotechnology and Bioengineering* 116.12 (2019), **pages** 3269–3281. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.27146>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.27146>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.27146>.
- [19] Jaroslav Hambalko **and others**. “Production of Long Chain Fatty Alcohols Found in Bumblebee Pheromones by *Yarrowia lipolytica*”. **in:** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (2021), **page** 1498. ISSN: 2296-4185. DOI: [10.3389/fbioe.2020.593419](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.593419). URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.593419>.
- [20] Quentin M Dudley, Connor J Nash **and** Michael C Jewett. “Cell-free biosynthesis of limonene using enzyme-enriched *Escherichia coli* lysates”. **in:** *Synthetic Biology* 4.1 (january 2019). ISSN: 2397-7000. DOI: [10.1093/synbio/ysz003](https://doi.org/10.1093/synbio/ysz003). URL: <https://doi.org/10.1093/synbio/ysz003>.
- [21] Tyler P Korman, Paul H Opgenorth **and** James U Bowie. “A synthetic biochemistry platform for cell free production of monoterpenes from glucose”. **in:** *Nature Communications* 8.1 (2017), **page** 15526. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms15526](https://doi.org/10.1038/ncomms15526). URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms15526>.
- [22] G. SriBala **and** R. Vinu. “Unified Kinetic Model for Cellulose Deconstruction via Acid Hydrolysis”. **in:** *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53.21 (2014), **pages** 8714–8725. DOI: [10.1021/ie5007905](https://doi.org/10.1021/ie5007905). URL: <https://doi.org/10.1021/ie5007905>.