3069

579.5
F516
2002

200-2508

Desarrollo de un Proceso para la Producción de un extracto de Micelio de Lentinula edodes a ser usado con fines medicinales

Informe final , Marzo 2002

Empresa : Finn-Vita S.A

579.5
F 516
2002

GERENCIA FONTEC
ENTRADA 01 ABR. 2002
TRAMITE S.B.M. 200-2508
SALIDA .....

PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por la incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas, toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compite con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

FONTEC - CORFO

Informe Final, Marzo 2002

Proyecto FONTEC 200-2508: "Desarrollo de un Proceso para la Producción de un Extracto de Micelio de *Lentinula edodes* a ser Usado con Fines Medicinales".

INDICE

A. RESUMEN EJECUTIVO 3

A.1. ANTECEDENTES DE LA EMPRESA 3
A.2. SÍNTESIS DEL PROYECTO DE INNOVACIÓN 3
A.3. PRINCIPALES RESULTADOS DEL PROYECTO Y CONCLUSIONES 4
A.4. CONCLUSIONES 4

B. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA 5

B.1. OBJETIVO GENERAL 5
B.1.1 Esquema del perfil 5
B.1.1.1 Descripción de la idea de Inversión 5
B.1.1.2. Definición del producto 5
B.1.1.3 Efectos sobre el sistema inmune 6
B.2. OBJETIVOS TÉCNICOS 7
B.2.1 Objetivo general 7
B.2.2 Objetivo específicos 7

C. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO 8

C.1. METODOLOGÍA 8
C.2. Materiales y métodos 9
C.2.1 Determinación de biomasa 9
C.2.2. Respirometría 9
C.2.3. Determinacio de glucosa 9
C.2.4. .. Cromatografía HPLC 10
C.3. Etapas 10
C.3.1. Etapa 1 10
C.3.1.1. Actividad 1 10
Tabla 1: Medios de cultivo para mantención y propagación de micelio 10
Figura 11: biomasa (g) v/s tiempo (días), para un reactor de un volumen de 1.440 litros con el medio de cultivo2 11
Tabla 2: Medio de crecimiento para cultivo en lotes 12
C.3.1.2. Actividad 2 12
FIGURA N°2: DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO MICELIAR Y EVALUACIÓN DEL PRINCIPIO FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVO 13
FIGURA N°3: MÉTODO DE EXTRACCIÓN PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DE UNO DE LOS PRINCIPIOS CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVA (LENTINAN) 14
C.3.2.ETAPA 2 15
C.3.2.1.ACTIVIDAD 1 15
C.3.2.2. ACTIVIDAD 2 15
FIGURA N°4: DIAGRAMA DE FLUJO QUE INDICA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO MICELIAR Y SU TRATAMIENTO PARA SU POSTERIOR COMERCIALIZACIÓN 16
C.3.3. REFERENCIAS 17
C.3.4. PLAN DE TRABAJO 19

D RESULTADOS OBTENIDOS.....20

D.1. Etapa 1.....20
D.1.1.Actividad 1.....20
D.1.1.2.Medio de cultivo N°1.....23
D.1.1.3. Medio de cultivo N°2.....23
D.1.1.4. Medio de cultivo N°3.....25
D.1.1.5. Medio de cultivo N°4.....26
D.1.2. Actividad 2.....28
D.2. Etapa 2.....29
D.2.1. Actividad 1.....29
D.2.1.1. Cromatografía por HPLC.....31
D.2.2.Actividad 2.....32
D.3. Análisis y Conclusiones.....32

E. IMPACTOS DEL PROYECTO.....34

E.1. Mecanismos de imlementación de los resultados del proyecto.....34

D ANEXOS.....35

D.1. Anexo 1.....35
D.1.2. Anexo 2. Resumen de gastos reales.....36
D.1.3. Anexo 3.Bases de diseño.....37

A. Resumen ejecutivo

A.1. Antecedentes de la empresa

FINN-VITA SA. Inició sus actividades comerciales en 1997.La empresa fue fundada por ex ejecutivos de la industria farmacéutica nacional con una vasta experiencia tanto en compañías extranjeras como nacionales.

FINN-VITA representa en Chile a cuatro importantes compañías internacionales. Estas son: Dermik y Neostrata ambas empresas americanas de gran prestigio en el campo de la Dermatología, QMED empresa sueca que cuenta con productos de gran desarrollo biotecnológico y Staten Serum Institut empresa danesa, que desarrolla productos del área diagnostica para laboratorios clínicos y vacunas.

El giro productivo de la empresa es de productos FARMACÉUTICOS con un marcado acento en sus opciones estratégicas en el área de DERMOCOSMÉTICO y reactivos de DIAGNÓSTICO clínico.

A.2. Sintesis del proyecto de innovación

El estudio del desarrollo de la producción de un producto con propiedades farmacológicas a partir del extracto del micelio del hongo *Lentinula edodes* para ser usado con fines medicinales se orientó a reactores biotecnológicos controlados. Dicho extracto presenta propiedades farmacológicas importantes como son: actividad anti-cancerígena y antiviral, efectos inmunomoduladores, adyuvante con fármacos contra el SIDA y cáncer, anti-colesterolémico, anticancerígeno y anti hepatitis B. El desarrollo de la producción se basó fundamentalmente en cultivos del micelio del hongo utilizando técnicas de fermentación en medio líquido y su posterior separación y purificación.

El tipo de innovación se centró en la producción, mediante un proceso controlado en reactores biológicos, de un producto con propiedades farmacológicas importantes a partir de biomasa miceliar en cantidades suficientes para abastecer el mercado nacional y eventualmente el mercado latinoamericano, para este producto natural.

Se desarrollaron diversas etapas de laboratorio que luego fueron escaladas a planta piloto, que permitió obtener los parámetros de diseño para su producción industrial, para cubrir el mercado nacional, y eventualmente el latinoamericano, de productos para el control y la reducción de niveles elevados de colesterol principalmente.

Los estudios fueron realizados por un equipo de especialistas del Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile encabezadas por el Dr. Leandro Herrera y en las mismas dependencias de dicha institución.

A.3. Principales resultados del proyecto y conclusiones

Se obtuvieron los parámetros tecnológicos necesarios para el posterior diseño de una unidad de producción industrial mediante el estudio tanto en laboratorio (cultivos de unos 0,1 litro) como en piloto (escala de reactores de 1 a 10 litros).

Se desarrollaron métodos para medir la concentración de biomasa y la productividad del hongo *Lentinula edodes* en diversos medios de cultivo a los efectos de establecer parámetros de diseño optimizado.

La extracción fue por filtración y secado a presión reducida, y se pudo establecer un parámetro de rendimiento que servirá para cálculos económicos futuros.

La producción del micelio en reactores de tamaño intermedio (reactor agitado, STR, bajo la modalidad de cultivo en batch), dio como resultado parámetros tecnológicos y se seleccionaron los más conveniente para proyectar la producción industrial.

El sistema de extracción óptimo para la producción del extracto del hongo *Lentinula edodes*, es por filtración, y secado a presión reducida.

A.4. Conclusiones

1. Los estudios iniciales permitieron concluir claramente la superioridad de la **cepa CS-41** en contraste con la cepa CS-24, que exhibió una cinética de crecimiento mucho menor.

Según las actividades desarrolladas y de los resultados obtenidos al cultivar la cepa CS-41, se extrajeron varias conclusiones:

2. El ensayo de medios de cultivo permitió seleccionar el medio de jarabe de fructosa (numerado 4) por presentar: mejor biodisponibilidad de sus componentes; mejor manejo en cuanto a condiciones de esterilidad; menor tiempo de esterilización; mejor manejo para el tratamiento del extracto; y menor costo.
3. El tiempo de cultivo será del orden de los 10 días para llegar a una fase estacionaria; momento en el cual se puede operar el reactor en modo de lotes secuenciales, disminuyendo los tiempos y costos de operación (ahorra esterilización).
4. La naturaleza miceliar del cultivo impuso problemas a los métodos clásicos de medición. Así, el micelio en el medio 1 pareció presentar inhibición, que se supuso debida a una fase lag prolongada o a inhibición por sustrato. El desarrollo de métodos y rangos de operación del reactor permitieron superar la inhibición aparente.
5. Los cultivos con salvado de trigo debieron ser descartados por su tiempo de esterilización (de 2 a 3 horas, versus 1 hora sin salvado de trigo), que lo hace encarecer costos, además de la complejidad en las etapas de separación para la obtención y cuantificación del principio farmacológicamente activo. Queda,

naturalmente, la posibilidad de comercializar un preparado que no requiera separación.

6. La productividad en términos del compuesto biológicamente activo (lentinan) fue de 0.014 g de extracto/L día; para el medio seleccionado, operando en reactores piloto.
7. En condiciones de escala piloto (reactor de 10 litros). La velocidad específica de crecimiento fue de 0.19 días^{-1}, (muy similar a la velocidad obtenida en el estudio de laboratorio), con un rendimiento de biomasa en función del consumo de glucosa de 0,32 gramos de células por gramo de glucosa.
8. La productividad en términos del compuesto biológicamente activo (eritadenina) fue de 0.13 mg por litro de reactor por día, para el cultivo en escala piloto, reactor de 10 litros.
9. Con una demanda de 1322 kg/año de biomasa miceliar, para un preparado farmacológico, el volumen de reactor necesario es de 2.9 m^3.

B. Exposición del problema

B.1. Objetivo General

Obtención de un nuevo producto natural de uso medicinal obtenido a partir de un extracto de micelio de *Lentinula edodes* que reemplaza a medicamentos usados como productos para tratamientos oncológicos, preparados para el control y la reducción de niveles elevados de colesterol y productos indicados en afecciones virales.

B.1.1 Esquema del perfil

B.1.1.1. Descripción de la idea de Inversión.

El proyecto consistió en estudiar la producción en reactores, bajo condiciones controladas, un producto extracto natural del micelio del hongo *Lentinula edodes* que presenta propiedades farmacológicas importantes como son: actividad anti-cancerígena y antiviral, efectos inmunomoduladores, adyuvante con fármacos contra el SIDA y cáncer, anti-colesterolémico, anticancerígeno y anti hepatitis B (Stamets, P. et.al.,1983; Prysybylowiscz, et.al., 1990; Stamets, P, et.al.,1993). El proceso de producción se basó fundamentalmente en cultivos del hongo *Lentinula edodes* principalmente en medio líquido.

B.1.1.2. Definición del producto

El producto desarrollado es: una presentación farmacológica a partir del extracto de micelio, concentrado y purificado del hongo *Lentinula edodes*.

El hongo en su forma comestible (cuerpo fructífero), se destaca por su alto contenido proteico con un 10% -29% del peso seco (bps), todos los aminoácidos esenciales, rico en lisina y leucina; con un 43-78% de carbohidratos (bps), considerado un alimento bajo en calorías. El contenido mineral es de 2.6-6.5%,

siendo calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio los más importantes. También es buena fuente de vitaminas, especialmente vitaminas del grupo B (B1, tiamina; B2, riboflavina; B12, niacina y ácido pantoteico) (Stamets, P. et.al.,1983; Prysybylowiscz, et.al., 1990; Stamets, P, et.al.,1993).

El extracto miceliar, en cambio y a diferencia del cuerpo fructífero, presenta una cantidad de compuestos biológicamente activos de importancia para la salud humana. Entre los más importantes figuran: el lentinan, un polisacárido con actividad antitumoral y anti-cancerigeno (Chihara, G., et.al., 1969; Chihara, G., et.al.. 1970); el KS-2, un polisacárido con actividad antitumoral por la inducción de producción de interferón (Fujii, T., et.al.,,1978); la eritadenina, de estructura similar a la adenina, acelera tanto el metabolismo como la eliminación del colesterol (Tensho, A., et. Al., 1974); la FBP, una proteína con acción antiviral en plantas; Cortinellin, antibiótico de amplio espectro; Ac2P, polisacárido inhibidor de la replicación viral (Stamets, P. et.al.,1983; Prysybylowiscz, et.al., 1990; Stamets, P, et.al.,1993) , además de, seguramente, otros efectos aún no estudiados.

B.1.1.3. Efectos sobre el sistema inmune

Antitumoral: Se ha encontrado que *Lentinula edodes*, inhibe diferentes tumores cancerosos transplantados en ratones. Inyectando extractos acuosos de *Lentinula edodes* o alimentando con el hongo deshidratado provoca una inhibición del 67% al 81% del crecimiento del tumor de sarcoma. Además, el extracto de *Lentinula edodes* presenta alta tolerancia y no efectos tóxicos a altas dosis. El primer antitumoral asilado desde *Lentinula edodes* fue el polisacárido llamado Lentinan (Chihara, G., et.al., 1969; Chihara, G., et.al., 1970) que tiene actividad inmunomduladora activando macrofagos. Su activación ocurre indirectamente vía estimulación de células T-helper (Prysybylowiscz, et.al., 1990). Otro polisacárido aislado (KS-2) (Fujii, T., et.al., 1978) posee actividad antitumoral inducida, además de estimular la producción de interferón tanto en ratones como en humanos. Partículas similares a virus asiladas desde *Lentinula edodes* tienen también propiedades antitumorales y estimulan la producción de interferón (Tekehara, M.,et.al., 1979; Mitamura, T., et.al., 2000).

Antiviral: Enfermedades virales, que son ampliamente distribuidas, no responden a tratamientos convencionales. Las propiedades antivirales del extracto de micelio de *Lentinula edodes* han sido ensayadas contra el virus de la influenza en ratones. Inyecciones de extractos acuosos de *Lentinula edodes*, inhiben el desarrollo de la enfermedad en ratones infectados con influenza (Prysybylowiscz, et.al., 1990; Suzuki, F., et.al.,1979). Dos tipos de actividad antiviral provenientes de extractos de *Lentinula edodes* han sido descritas: inhibición de la replicación viral y estimulación de la producción de interferón por el huésped Sarkar, S., et.al.,1993). Otro compuesto aislado es RNA de doble hebra, similar a RNA viral, que tiene la propiedad de estimular la producción de interferón (Takehara, M., et.al.,1984).

Anti-hepatitis: Muchos estudios en Japón durante los pasados 20 años, han probado el valor del micelio del hongo *Lentinula edodes* LEM en el tratamiento de la hepatitis B con tasas de conversión de un 25% a un 37% (Prysybylowiscz, et.al., 1990).

Influencia en los niveles de colesterol: Extractos acuosos de *Lentinula edodes* han mostrado bajar los niveles de colesterol en suero y se han aislado fracciones activas derivadas de adenina eritadenina (Tensho, A., et. Al., 1974), también conocida como lentisina, lentinacina y lentisine, que acelera el metabolismo y la excreción del colesterol.

Además de lo descrito anteriormente, se ha encontrado que los extractos de *Lentinula edodes* reducen la formación de coágulos sanguíneos (inhibiendo la agregación plaquetaria) y la presión sanguínea (Kabir, Y., et.al.,1987).

B.2. Objetivos técnicos

B.2.1 Objetivo general

Desarrollo de un producto a partir de un extracto del micelio del hongo Lentínula edodes producido mediante un proceso en reactores bajo condiciones controladas para ser usado con fines medicinales

B.2.2 Objetivo específicos

1. Caracterización de la cinética de crecimiento para la elección del sistema y tipo de cultivo a utilizar.
2. Diseño industrial básico (procesos, métodos, medios).
3. Estudio planta piloto. Y definición de parámetros y métodos para la validación GMP.
4. Definir y ensayar los post procesos necesarios para atrapar en fase sólida (gragea) y/o líquida (jarabe), la mayor masa posible de los principios activos.
5. Diseño y operación piloto del sistema completo.

En la etapa de caracterización, para establecer las bases de diseño, se utilizarán indicadores cuantitativos de éxito; en particular se medirá el rendimiento (Ys) y la productividad (P). El extracto será cuantificado en relación tanto a la masa de hongos como al volumen de reactor utilizado.

$$P = \frac{concentración\ de\ producto(g/L)}{tiempo\ de\ fermentación(días)} = productiviad$$

La innovación consistió en el desarrollo de técnicas de producción del extracto y obtención de un producto farmacológicamente activo, desde la biomasa miceliar, en cantidad suficiente para abastecer el mercado nacional de: Preparados para el control y la reducción de niveles elevados de colesterol, Productos indicados en afecciones virales, tratamientos oncológicos con medicamentos, especificando particularmente las rutas de post procesamiento, para este producto natural.

El Post procesamiento capaz de retener la mayor masa de los principios activos, se desarrolló cuidadosamente, aceptando como hipótesis básica que será posible su preparación y presentación como gragea.

C. Metodología y plan de trabajo

C.1. Metodología

Se estudió el proceso de producción tanto a nivel de laboratorio, como de planta piloto (escala de reactores de uno a dos litros) que permitieron obtener los parámetros tecnológicos necesarios para el posterior diseño de una unidad de producción industrial.

La metodología implicó la realización de las siguientes etapas y actividades:

Etapa 1: Estudio del crecimiento y caracterización del extracto miceliar de *Lentinula edodes* a nivel de laboratorio.

a) Actividad 1: Estudio del crecimiento del micelio en distintos medios y tipos (líquido y semi-sólido) de cultivo.

Esta actividad permitió establecer el rendimiento y productividad del hongo *Lentinula edodes* en diversos medios de cultivo a los efectos de establecer parámetros de diseño optimizado.

b) Actividad 2: Estudio de la extracción del micelio de *Lentinula edodes*.

Se estudió la extracción utilizando filtración y secado a presión reducida y se evaluó la calidad del producto obtenido en base a la determinación de los principios farmacologicamente activos: lentinan y eritadenina por técnicas cromatográficas.

c) Actividad 3: Informe etapa 1.

Etapa 2: Escalamiento de la producción del extracto de *Lentinula edodes*.

a) Actividad 1: Basado en lo anterior se montó un proceso de producción de micelio para obtener parámetros de escalamiento (propiedades de transferencia, consumo de potencia, etc).

Se estudió la producción del micelio en reactores de tamaño intermedio (reactor agitado, STR bajo la modalidad de cultivo en batch). Se determinaron los parámetros tecnológicos óptimos para su producción industrial.

b) Actividad 2:Determinación del sistema de extracción a nivel de planta piloto.

En base a la actividad anterior se estudió el sistema de extracción óptimo para la producción del extracto del hongo *Lentinula edodes*, para lo cual se utilizaron técnicas de filtración, cromatografia, y secado a presión reducida.

c) Actividad 3: Informe final del estudio.

Contendrá toda la información desarrollada, principalmente parámetros de diseño tecnológico esenciales para los estudios de prefactivilidad técnico económicos necesarios para la realización a nivel industrial.

C.2. Materiales y Métodos

C.2.1. Determinación de biomasa

Sólidos suspendidos totales.

Se filtra al vacío 10 ml de muestra con un filtro prepesado de 0,2 mm. El filtro con muestra se saca cuidadosamente y deja sobre una placa de petri. Se lleva a 104 °C durante una hora, se enfría en desecador y se pesa. Los sólidos suspendidos se calculan de acuerdo a la siguiente formula.

$$ss(ppm) = \frac{Peso\ Seco\ de\ la\ muestra\ (mg) * 1000(ml/L)}{Volumen\ de\ la\ muestra\ (ml).}$$

C.2.2.Respirometría

Los experimentos de respirometría consistieron en la medición de la concentración de oxígeno disuelto en dos etapas: primero al cortar la línea de aire y segundo al retornar a las condiciones iniciales (con aire). Las ecuaciones que se utilizaron para medir la biomasa por respirometría son las siguientes:

$$\frac{d(OD)}{dt} = kLa(ppO_2 K_h - OD) - rX$$ En presencia de aire.

Donde OD es el oxigeno disuelto, ppO_2 es la presión parcial de oxígeno, K_h es la constante de Henry, r es el consumo por unidad de biomasa (X) y X es densidad de biomasa.

$$\frac{d(OD)}{dt} = -rX$$ Sin aire.

Integrando tenemos que:

En presencia de aire :

$$OD = (OD)_{sat} - \frac{rX}{kLa} + ((DO) - DO_{sat} + \frac{rX}{kLa})\exp(-kLa\,t) \qquad (1)$$

En ausencia de aire:

$$OD = (OD)_{sat} - rX\,t \qquad (2)$$

C.2.3. Determinación de glucosa

Se utilizo un kit (Glucofix^R,B7640 de Menarini diagnostics) para la estimación de glucosa del medio de cultivo.

C.2.4.Cromatografía por HPLC

Las muestras (medio de cultivo) fueron diluidas apropiadamente y tratadas por filtración (0.2 μm). Se realizó una extracción al micelio seco con un tampón a pH=2. mediante congelamiento con nitrogeno líquido y posterior criofractura con mortero. Este procedimiento rompe las membranas celulares. Una vez obtenidas las muestras se procedió a su determinación de su composición por HPLC, usando una columna Inertsil ODS-2. La fase móvil fue ácido fosfórico 0.1 M y perclorato de sodio 0.2 M (pH=2). Se inyectaron 20 μl de muestra y se trabajo a 20 °C. Se detecto a 260 nm.

C.3.Etapas

C.3.1. Etapa 1.

C.3.1.1Actividad 1.

Se cultivó la cepa de *Lentinula edodes*, CS-41 (Stamets, P, 1993), en medio sólido (en placas de cultivo) y en medio líquido para su propagación y mantención según los medios correspondientes (tabla 1):

Tabla 1: Medios de cultivo para mantención y propagación de micelio.

Reactivo	**Medio 1a (sólido)**	**Medio 1b (líquido)**
Agar-Agar	20 g	0
Extracto de Malta	20 g	20 g
Extracto de levadura	2 g	2 g
$CaSO_4$	0	0.5 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

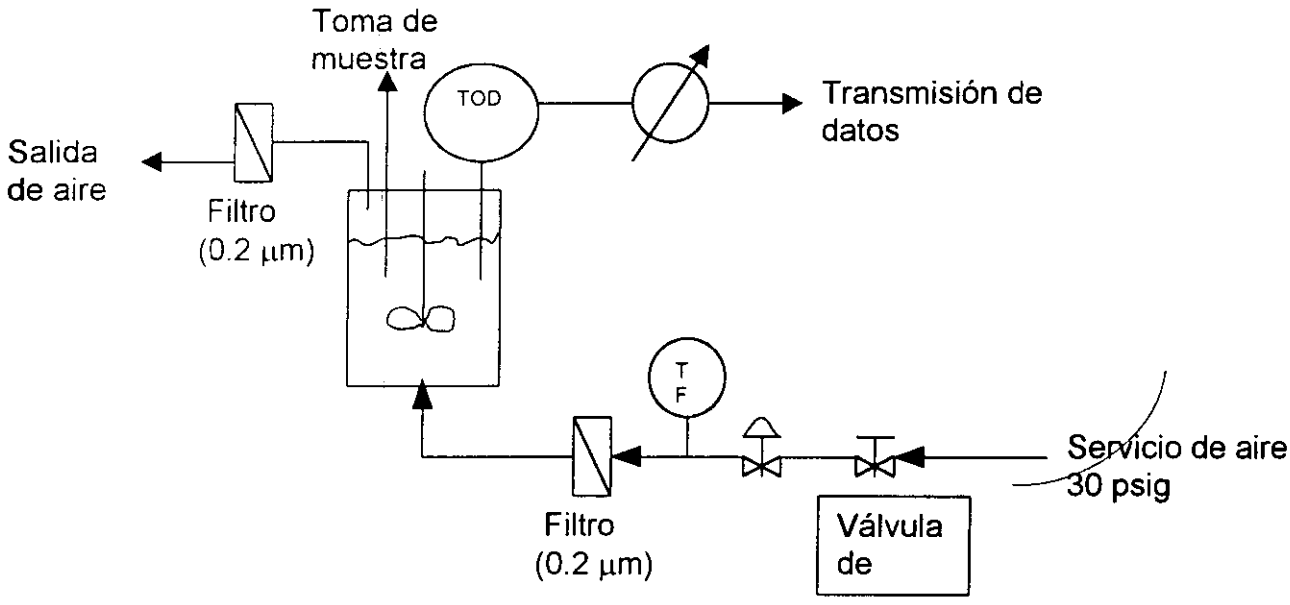
El cultivo en medio sólido de la tabla 1 (Medio 1a) se utilizó para la mantención y propagación de la cepa CS-41. Además se construyo una biblioteca de la cepa (cepario) en tubos con medio sólido, que se mantuvo a 4° C para su posterior utilización.

El cultivo en medio líquido (medio 1b de la tabla 1) se utilizó para las experiencias en matraces de 250 ml, a fin de disponer de inoculo para iniciar las experiencias en matraces de 500 ml y en reactores de 1 litro.

Para el estudio de crecimiento del micelio se escogieron dos métodos de estimación de biomasa; uno basado en la determinación de sólidos totales y el otro por respirometría del cultivo. Para la estimación por peso seco, debido a que estos organismos son filamentosos y tienden a agregarse, la estimación de la biomasa por peso (sólidos suspendidos totales) se dificulta pues la fracción de biomasa y líquido en una muestra dada podría ser poco representativa de la biomasa en el reactor. Para la estimación del sustrato consumido se midió la glucosa en el medio después de ser filtrado.

Se realizaron experiencias en una escala de 1 L para seleccionar el medio que presenta mejor crecimiento miceliar y productividad (evaluada como formación de producto en función del tiempo de fermentación, para un volumen determinado de reactor), y establecer parámetros como: biomasa, rendimiento, coeficiente de transferencia de masa gas-liquido (Kla) y velocidad específica de crecimiento. Para esto se monto un reactor (figura N°1) agitado STR (stirred tank reactor) con un sensor de oxígeno esterilizable y conectado a su amplificador para medir el oxigeno disuelto en el reactor, además se tomaron muestras cada día para medir los sólidos totales y concentración de glucosa.

Figura N°1



Reactor STR.

Figura 1: Esquema del reactor STR utilizado para la estimación de parámetros de diseño.

TF = Transductor de flujo.

TOD= Transductor de oxígeno disuelto.

Para la determinación de sólidos suspendidos totales, la muestra tomada del reactor STR, fue filtrada y secada, y se determinó la diferencia de peso del filtro (ver materiales y métodos).

La estimación de glucosa se realizó mediante un kit Glucofix [R].

La concentración de oxígeno se midió directamente tomando el tiempo para cada unidad de caída de la concentración de oxígeno.

Con esto se construyeron las curvas de respiración que nos indican, en forma indirecta, la biomasa miceliar, según las ecuaciones descritas en materiales y métodos.

Los medios utilizados para el crecimiento en lotes fueron los siguientes, (tabla 2):

Tabla 2: Medios de crecimiento para uso en lotes (batch)

Reactivo	**Medio 1**	**Medio 2**	**Medio 3**	**Medio 4**
Glucosa	20 g	0		0
Extracto de malta	0	20 g	20 g	0
Extracto de levadura	2 g	2 g	2 g	2 g
$CaSO_4$	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Salvado de trigo	0	0	50 g	0
Jarabe de Fructosa	0	0	0	20 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

El pH de los medios fue e 6.5

C.3.1.2.actividad 2

Se estudió el método de obtención del extracto miceliar, así como, la cuantificación del extracto con el principio farmacológicamente activo (figura N°3). Se utilizó filtración y filtración a presión reducida a escala de laboratorio para la estimación de los rendimientos asociados a cada etapa de purificación. El producto final fue secado en estufa a una T° de 40 °C, dado que el producto (Lentinan) posee estabilidad térmica hasta los 150 °C. Para tal efecto se siguió la técnica descrita por Chihara G, et.al., 1970. Esta actividad esta de acuerdo con los términos de referencia y los plazos fijados hasta la fecha.

El diagrama de flujo cualitativo que se muestra a continuación (figura N°2), indica, el método de obtención del extracto miceliar. En un primer paso el reactor se esteriliza mediante vapor, luego es cargado con medio de cultivo estéril más el inoculo de los cultivos en matraces de 250 ml, a razón de un 10 % del volumen del reactor. Este reactor fue aireado a un flujo de 1000 ml/min (1vvm) y agitado a 150 rmp. Tanto en la entrada como en la salida del reactor se instalaron filtros de 0.2 µm para evitar la entrada y la salida de microorganismos, si se llegase a contaminar. La temperatura de operación fue de 25 °C. Al terminar el ciclo de

crecimiento miceliar (aproximadamente 10 días), dado por las curvas de respirometría y sólidos totales, se detuvo el reactor y se elevó su temperatura hasta a 80 °C por 12 horas. Esto último permite la extracción remanente del principio activo a la fase líquida. Por último hay una etapa de separación por filtración obteniendo un producto sólido (línea S-108, figura N°2) con propiedades nutricionales importantes y el principio activo, y un filtrado (línea S-109) también con el principio farmacológicamente activo. Ambas líneas eventualmente no son separadas ya que el extracto y el micelio contendría el principio farmacologicamente activo más las propiedades nutricionales ya descritas en el proyecto, esto solo se realiza para poder estimar rendimientos.

Figura N°2: Diagrama de flujo para la obtención del extracto miceliar y evaluación del principio farmacológicamente activo.

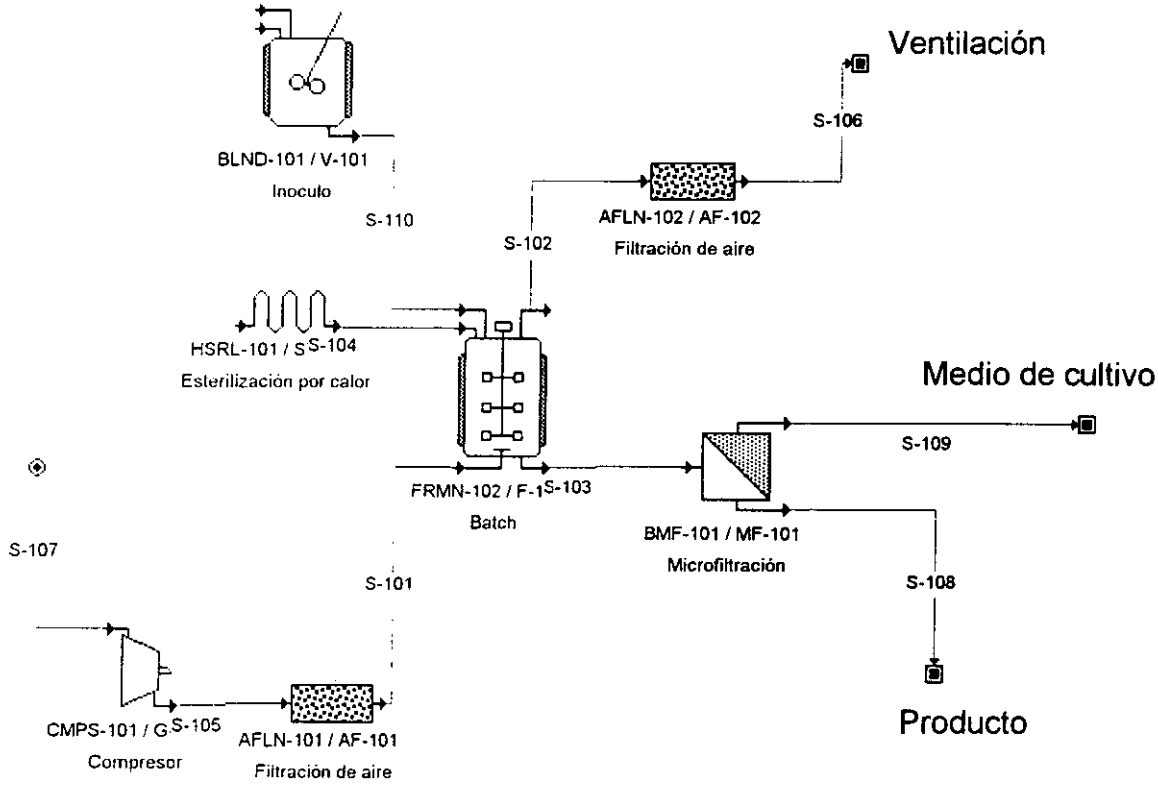
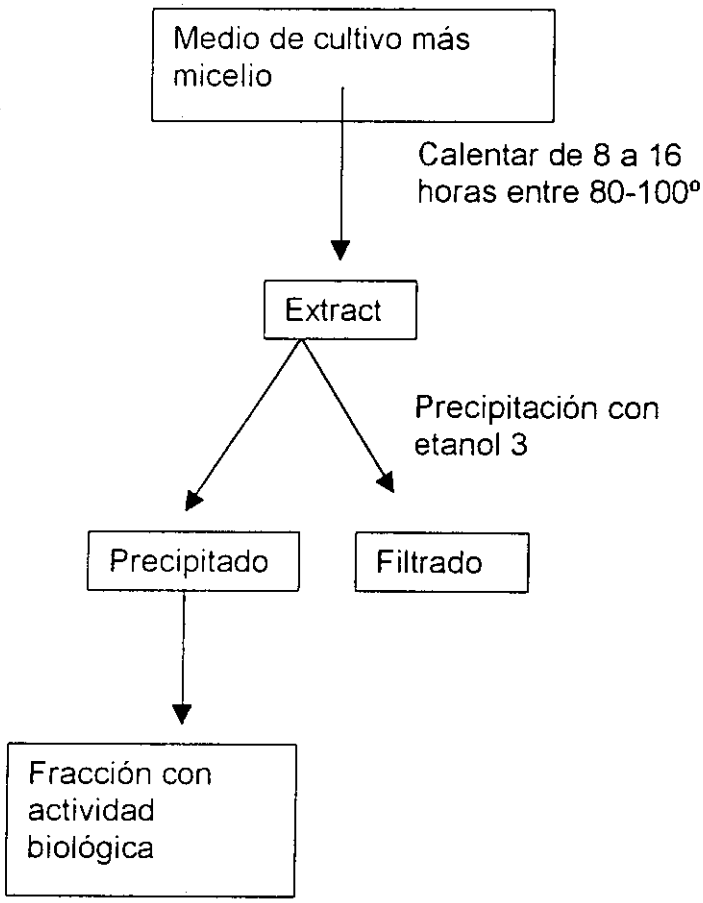


Figura Nº3: Método de extracción propuesto para la extracción de uno de los principios con actividad farmacológicamente activa (lentinan).



C.3.2. Etapa 2

C.3.2.1 Actividad 1

Basado en la actividad 1 se montó un proceso de producción de micelio para obtener parámetros de escalamiento (propiedades de transferencia, consumo de potencia, etc).

Se estudió la producción del micelio en reactores de tamaño intermedio (reactor agitado, STR bajo la modalidad de cultivo en batch). Se determinaron los parámetros tecnológicos óptimos para su producción industrial.

El diagrama de flujo cualitativo que se muestra a continuación (figura N°4), indica, el método de obtención del extracto miceliar. En un primer paso el reactor se esteriliza mediante vapor, luego es cargado con medio de cultivo estéril más el inoculo de los cultivos en matraces de 1L, a razón de un 10 % del volumen del reactor. Este reactor fue aireado a un flujo de 2000 ml/min (0.2 vvm) y agitado a 250 rmp. Tanto en la entrada como en la salida del reactor se instalaron filtros de 0.2 μm para evitar la entrada y la salida de microorganismos, si se llegase a contaminar. La temperatura de operación fue de 25 °C. Al terminar el ciclo de crecimiento miceliar (aproximadamente 21 días), dado por las curvas de respirometría y sólidos totales, se detuvo el reactor. Por último hay una etapa de separación por filtración obteniendo un producto sólido (línea S-108) con propiedades nutricionales y farmacológicas importantes y un filtrado (línea S-109). Ambas líneas son separadas y se utilizan para poder cuantificar el principio activo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

C.3.2.2. Actividad 2

Determinación del sistema de extracción a nivel de planta piloto.

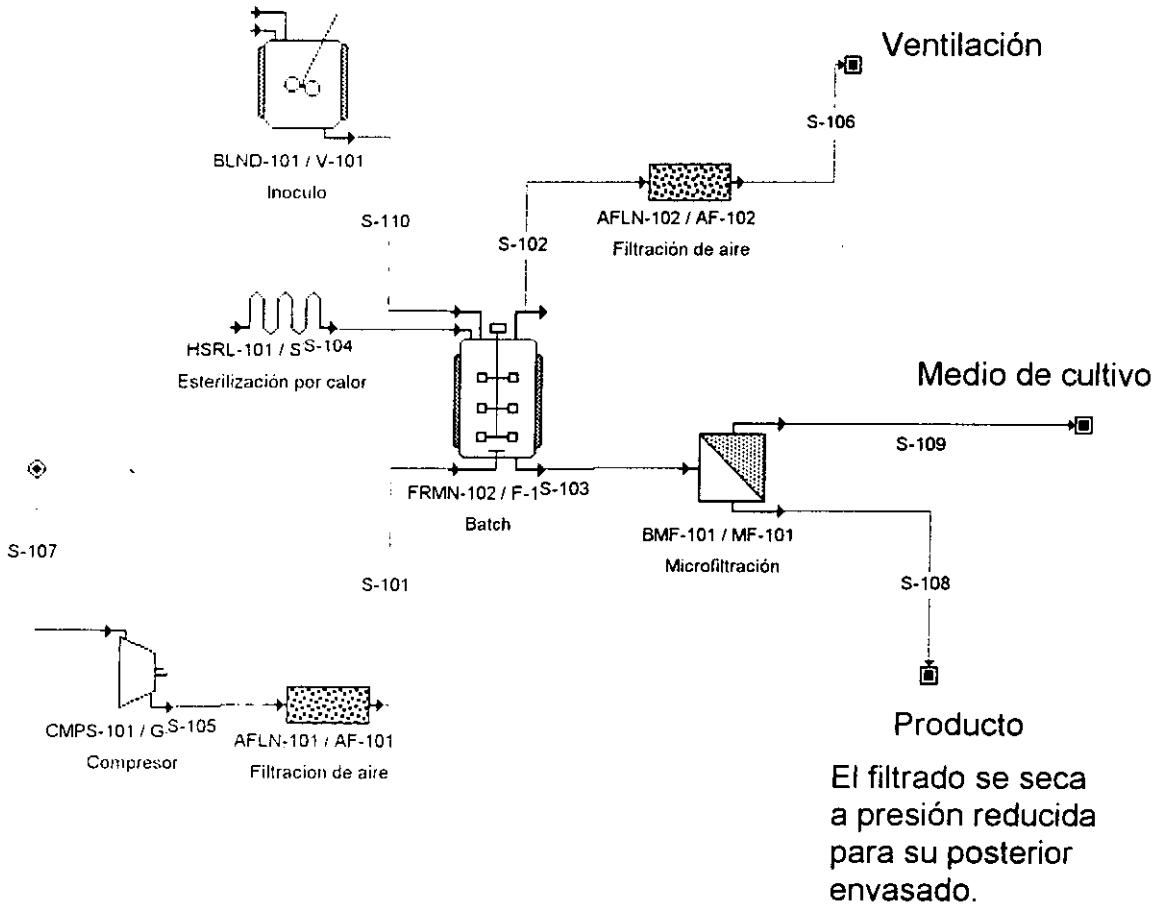
En base a la actividad anterior se estudió el sistema de extracción óptimo para la producción del extracto del hongo *Lentinula edodes*, para lo cual se utilizaron técnicas de filtración, y secado a presión reducida.

La figura N°4 contiene el diagrama de flujo que se desarrolló para la obtención del producto (extracto miceliar) ya seco para su utilización en envasado y posterior comercialización.

El diagrama nos muestra un reactor STR que opera de manera batch (lote).Comprende de tres líneas de entrada y dos líneas de salida. La línea de entrada S-101 es de aireación estéril, previo paso por un filtro de 0.2 μm, saliendo del reactor por la línea S-102 pasando por un filtro de 0.2 μm para su posterior salida al medio ambiente. La línea de entrada trae el inóculo cultivado en un reactor (BLND-101/V-101). La línea S-104 lleva el medio de cultivo que es esterilizado por calor mediante el equipo HSRL-101. La línea de salida de extracto miceliar más micelio, S-103, es pasada por un filtro para la retención de micelio el

que es separado del filtrado (línea S-109). El micelio es posteriormente secado. El reactor es operado a una temperatura de 25 °C durante 21 días, para el crecimiento del microorganismo.

Figura N°4: Diagrama de flujo que indica la obtención de extracto miceliar y su tratamiento para su posterior comercialización.



C.3.3.Referencias

Chihara G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., and Fukuoka, F., (1970), " Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from Lentinus edodes (Berk) Sing. (an Edible Mushroom), *Cancer Research*, (30), pp.2776-2781.

Chihara, G., Mauro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka, F., (1969), Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.) sing. Nature, 222(194), 687-8.

Chihara, G., Mauro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka, F., (1970), Fractionation and purification of the polysacacharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from Lentinus edodes (Berk.) Sing. (an edible mushroom)., Cancer. Res., 30 (10), 2776-81.

Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F., Ishida, N., (1978), Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinula edodes*, J. Antibiot. Tokyo, 31(11), 1079-1090.

Huang Y., Komoto J., Takata Y., Powell D., Gomi T.,Ogawa H., Fujioka M., and Fusao Takusagawa, (2001), Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase by "Acyclic Sugar" Adenosine Analogue D-Eritadenine: Crystal Structure of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Complexed with D-Eritadenine", JBC.

Jong, S.C., Birmingham, J.M., (1993), Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom, Adv. Appl. Microbiol., (39), 153-84.

Kabir, Y., Yamaguchi, M., Kimura, S., (1987), Effect of shiitake (Lentinus edodes) and maitake (Grifola frondosa) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats, J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo), 33(5), 341-6.

Lindersen, B.K., Delia N.A., Nelson, K.L., Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities, John Wiley & Sons, INC., New York, 1994.

Mitamura, T.,Sakamoto, S., Suzuki, S., Yoshimura, S., Maemura, M., Kudo, H., (2000), Effects of lentinan on colorectal carcinogenesis in mice with ulcerative colitis, Oncol. Rep. (3), 599-601.

Ooi, V. E., Liu, F., (2000), Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complex, Curr. Med. Chem., 7(7), 715-29.

Perfil técnico económico Cultivo industrial de Champiñones, Servicio de cooperación técnica (sercotec), filial CORFO.

Perry, R.H., Green, D.W., Maloney, J.O., Perry manual del Ingeniero Químico, Sexta Ed., McGraw-Hill, pp 25-1, 25-40, 1992.

Prysybylowiscz, P., Donoghue, J. Shiitake growers handbook, Northwest Mycological Consultants, Inc., Kendall/hunt Publishing company, 1990.

Przybylowicz, O., " Shiitake growers handbook", Kendall/hunt publishing company, 1988.

Sarkar, S., Koga. J., Whitley, R.J., Chatterjee, S.,(1993), Antiviral effect of the extract of culture medium of Lentinus edodes mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res*,20(4):293-303

Stamets, P. Growing gourmet & medicinal mushrooms, Ten Speed Press, Berekely, CA.. 1993.

Stamets, P. The Mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home, Agarikon Press, Olympia, Washington, 1983.

Stamets, P. The Mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home, Agarikon Press, Olympia, Washington, 1983.

Suzuki, F., Suzuki, C., Shimomura, E., Maeda, H., Fujii, T., Ishida, N., (1979), Antiviral and interferon inducing activities of a new peptidomanan, KS-2,extracted from culture mycelia od Lentinus edodes, J. Antibiot. Tokyo, 32(12), 1336-45.

Takehara, M., Toyomasu. T.. Mori, K., Nakata, M., (1984), Isolation and antiviral activities

of the double-stranded RNA from Lentinus edodes (shiitake), Kobe. J. Med. Sci., 30(3-4), 25-34.

Tekehara, M., Kuida, K., Mori, K., (1979), Antiviral activity of virus-like particles from Lentinus edodes (shiitake), Arch. Virol., 59(3), 269-74.

Tensho, A., Shimizu, I.. Takenawa, T., Kikuchi, H., Rokujo, T., (1974), Hypocolesterolemic activity of analogous compounds related to eritadenine, an active component of shiitake, Lentinus edodes Sing. Yakugaku Zasshi, 94(6), 708-16.

C.3.4. Plan de trabajo ejecutado

Informe Final (corresponde al período desde el 1 de Abril hasta la primera semana de Marzo)	
Identifique Hito(s) Verificable(s) Programado	X
Logro Hito (s) Verificable (s)	100 %

Detalle de actividades	Actividades programadas						Actividades realizadas					
	Mes						Mes					
Etapa 1	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Actividad 1												
Actividad 2												
Actividad 3												
Etapa 2	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12
Actividad 1												
Actividad 2												
Actividad 3												

D. Resultados obtenidos

D.1.Etapa 1

D.1.1.Actividad 1

En las primeras experiencias se cultivó la cepa CS-41 y se midieron sólidos suspendidos (figura 6 y 7) para estimar la biomasa del cultivo. El cultivo de la cepa CS-24 no arrojó resultados adecuados a la explotación comercial porque su crecimiento fue más lento que la cepa CS-41, seleccionada para este proceso.

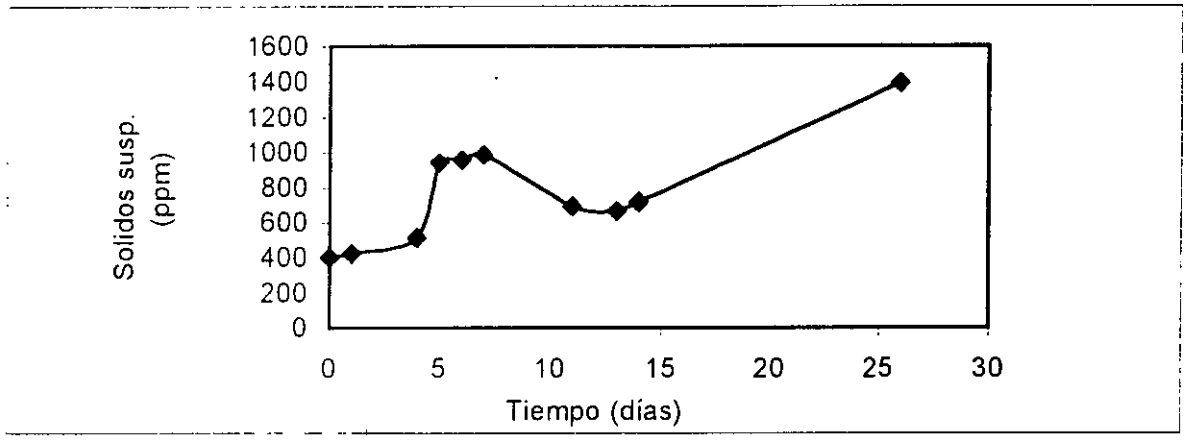


Figura 5: Estimación de sólidos suspendidos con cepa cultivada (CS-41) en matraces de 500 ml y medio de cultivo Nº2 (ver tabla 2).

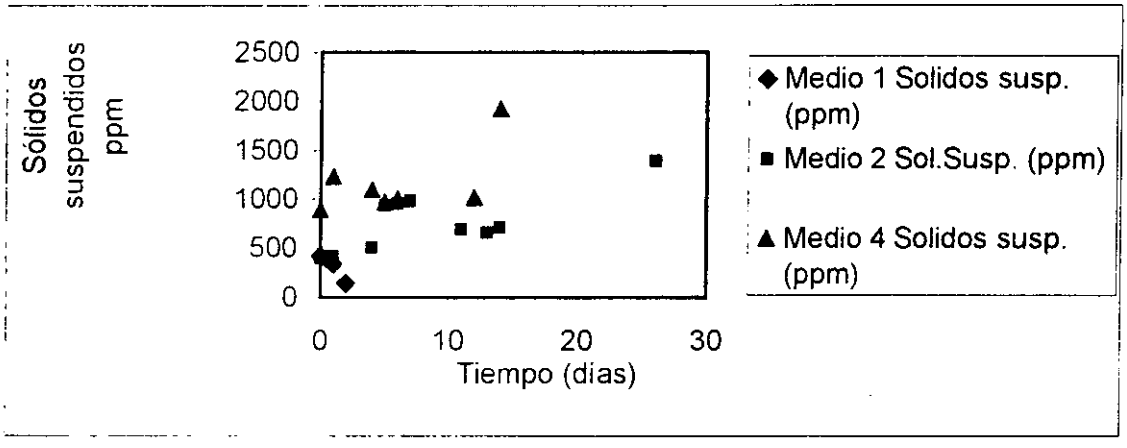


Figura 6: Relación entre sólidos suspendidos totales v/s tiempo para cada medio de cultivo comparable (medio 1 rombos, medio 2 cuadrados, y medio 4 triangulos; tabla 2).

Se puede observar en la figura 7 que para el medio 4 (que contiene jarabe de fructosa) los sólidos son mucho más altos que los obtenidos con los otros medios.

Además de considerar que este medio (medio 4) es de menor costo que los medios 1 y 2.

Por otro lado se realizaron experiencias para medir por respirometría la biomasa suspendida en matraces de 500 ml.

Los resultados obtenidos a partir de cultivo de CS-41 en matraz de 500 ml con medio de cultivo N°2, se pueden ver en la figura 8.

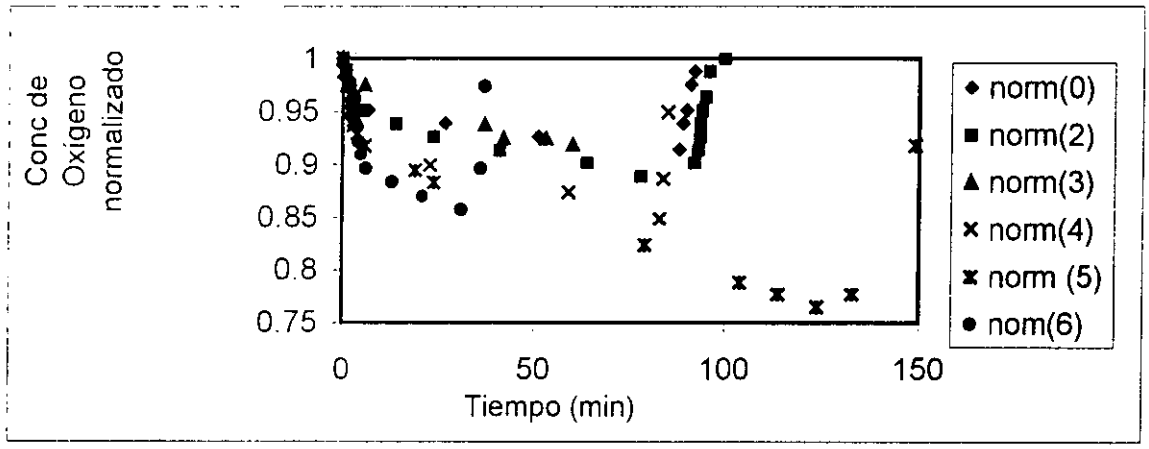


Figura 7: Concentración de oxígeno normalizado v/s tiempo de adquisición de datos, para distintos tiempos de cultivo.V=400 ml; medio inoculado con un 10% del volumen del matraz con cepa CS-41. El numero entre paréntesis representa el numero de días del experimento.

Se realizó un ajuste a la parte lineal de estos datos (figura 8) con la ecuación (2), dando una pendiente que representa la tasa de consumo de oxígeno por unidad de biomasa en función de la biomasa (rX) para cada día de la experiencia (tabla 3).

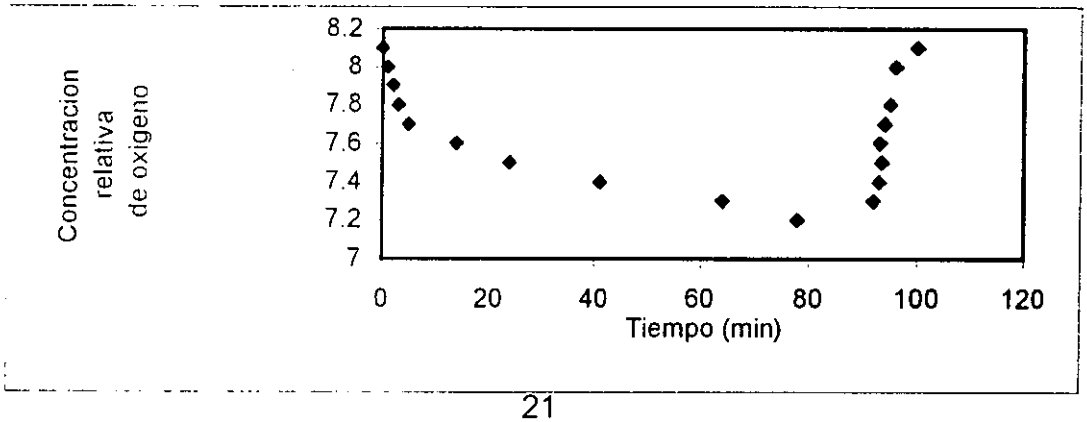


Figura 8: Concentración de oxígeno v/s tiempo. Se estimó la pendiente sobre la parte lineal de la curva y usando la ecuación (2), podemos obtener rX.

Tabla 3: Tasa de consumo de oxigeno en función de la biomasa por día de incubación.

Días	0	2	3	4	5	6
RX (ppm O_2/dia)	0.0037	0.0064	0.0082	0.0082	0.0106	0.0142

La biomasa al término del sexto día, expresada como el peso seco en gr /v de todo el reactor dio:

X=0.64 g /L

Con esto se pudo estimar r de la pendiente de la ecuación (2) y la biomasa para los distintos días de crecimiento miceliar.

rX=0.0142

r = 0.022 (ppm O_2/días g biomasa).

Tabla 4: biomasa para los distintos días de cultivo.

Días	0	2	3	4	5	6
Biomasa (g/L)	0.17	0.29	0.373	0.373	0.48	0.64

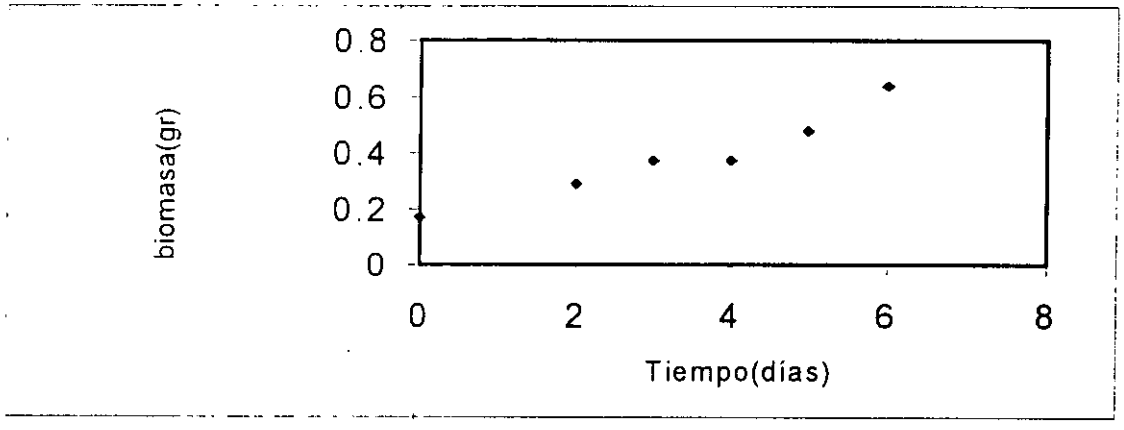


Figura 9: Biomasa v/s tiempo estimada por respirometria para un cultivo en matraz de un volumen de 500 ml con medio de cultivo 2.

Se pudo estimar una velocidad específica de crecimiento de 0.21 dias^{-1} usando la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

y obtener el tiempo de duplicación miceliar t_d, dado por:

$$t_d = \frac{Ln\,2}{\mu}$$

de t_d = 3.3 días.

Se trabajo con un reactor STR de capacidad de 1 litro para estimar parámetros de crecimiento a una mayor escala y poder probar los distintos medios de cultivo en cuanto a la velocidad de crecimiento miceliar.

D.1.1.2 Medio de cultivo N°1

Utilizando la técnica de respirometría, se realizó un ajuste a los datos con la ecuación (2). dando una pendiente correspondiente a rX, para cada día de la experiencia (datos no mostrados). A medida que el cultivo avanzaba nos encontramos que la pendiente bajaba. Esto podría deberse a la inhibición por sustrato, en este caso por glucosa.

D.1.1.3.Medio de cultivo N°2

Se realizó un ajuste a los datos (figura 11) con la ecuación (2), dando la tasa de consumo de oxígeno, rX, para cada día de la experiencia (tabla 5).

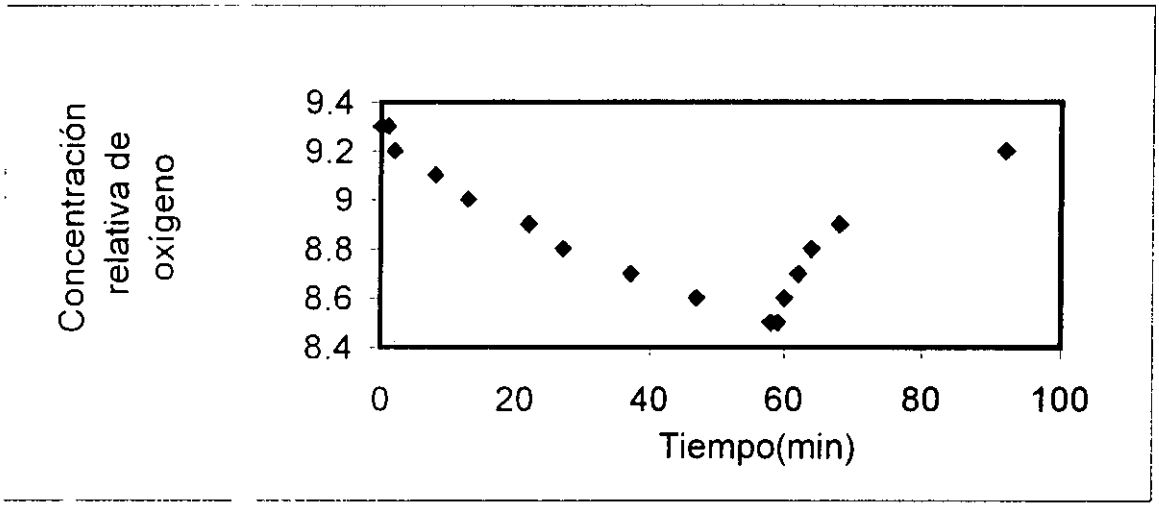


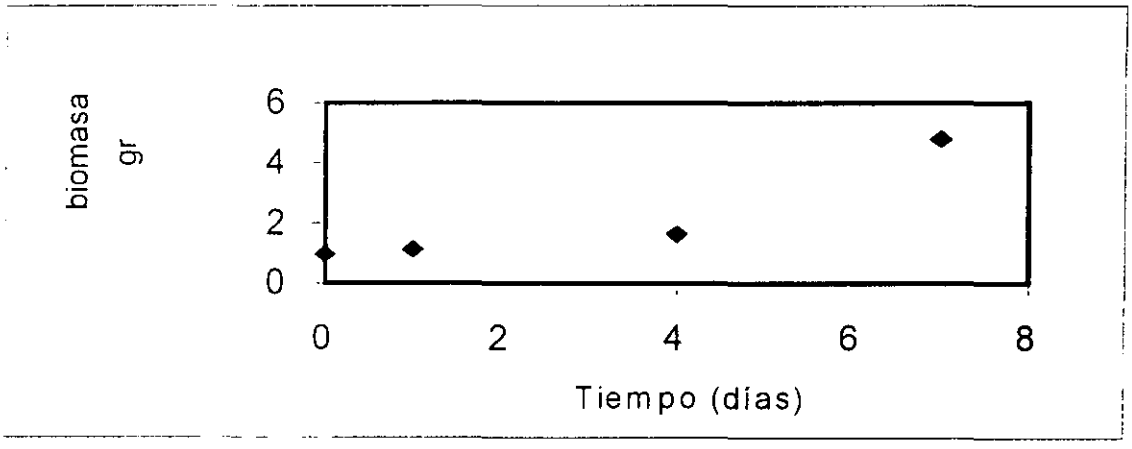
Figura 10: Concentración relativa de oxigeno v/s tiempo, para un reactor de capacidad de 1.440 litro y con medio de cultivo 2. Este gráfico nos permite estimar de la parte linear de la curva, la pendiente que corresponde a rX.

La siguiente tabla muestra las pendientes obtenidas de un cultivo de 6 días en un reactor STR.

Tabla 5: Tasa de consumo de oxigeno en función de la biomasa por día de incubación.

Días	0	1	3	6
RX (ppm O_2/día)	0.0073	0.0084	0.0124	0.0368

La biomasa al término de 6 días, expresada como el peso seco en gr /v de todo el reactor dio:



X=3.2 g/L

Con esto se pudo estimar r de la pendiente de la ecuación (2).

rX=0.0368; r = 0.0115 (ppm deO_2/día g de biomasa)

Figura 11: biomasa (g) v/s tiempo (días), para un reactor de un volumen de 1.440 litros con el medio de cultivo2.

Tabla 6:biomasa estimada para los tiempos de cultivo.

Días	0	1	3	6
Biomasa (g/L)	0.63	0.73	1.07	3.2

Se pudo estimar una velocidad específica de crecimiento de 0.23 $dias^{-1}$ y un tiempo de duplicación t_d = 3 días. Valores muy similares a los obtenidos para un cultivo en matraz con el mismo medio de cultivo (medio Nº2). Para este caso el cambio de escala no cambió la velocidad específica de crecimiento.

D.1.1.4.Medio de cultivo Nº3

Se realizó un ajuste a los datos (figura 12) con la ecuación (2), (parte lineal de la curva) y se obtuvo rX, para cada día de la experiencia (tabla 7).

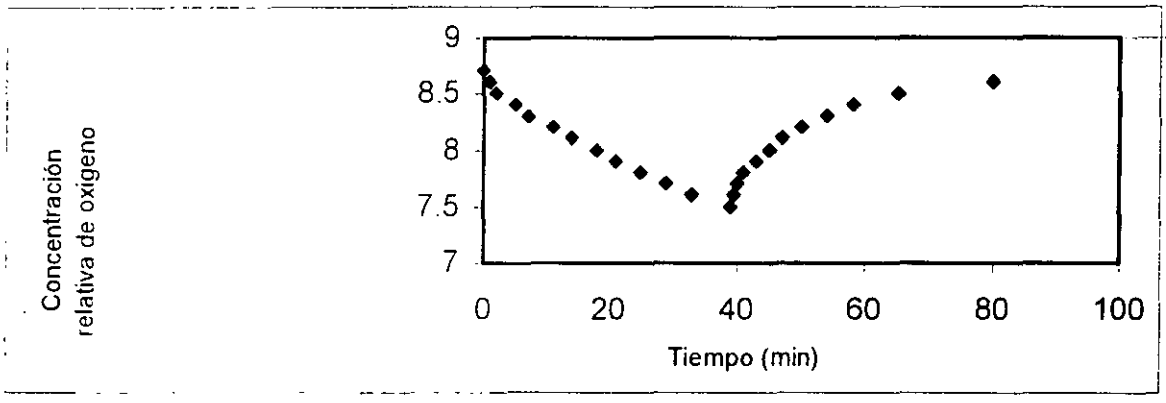


Figura 12 : Concentración relativa de Oxigeno v/s Tiempo. Estimado por respirometría para el medio 3.

La siguiente tabla muestra las pendientes obtenidas de un cultivo de 14 días en un reactor STR.

Tabla 7: Tasa de consumo de oxigeno en función de la biomasa por día de incubación.

Días	0	1	4	5	6	7	8	12	14
rX (ppm O_2/día	0.007	0.0056	0.027	0.045	0.065	0.094	0.118	0.12	0.114

La estimación de biomasa al término del cultivo por el método de sólidos suspendidos totales para este medio de cultivo, es la suma de los sólidos orgánicos más la biomasa miceliar, se asume que la tasa de consumo de oxígeno, r, es constante, por lo cual es posible estimar la biomasa a los distintos tiempos del cultivo. La biomasa al término del 14 días y utilizando un r de 0.0115 (ppm de O_2/día g de biomasa) expresada como el peso seco en gr en el reactor dio:

X= 9.9 g/1.4L = 7.07 g/L

Tabla 8: biomasa estimada para los tiempos de cultivo.

Días	0	1	4	5	6	7	8	12	14
Biomasa (g/L)	0.43	0.49	1.7	2.79	4.07	5.81	7.36	7.43	7.07

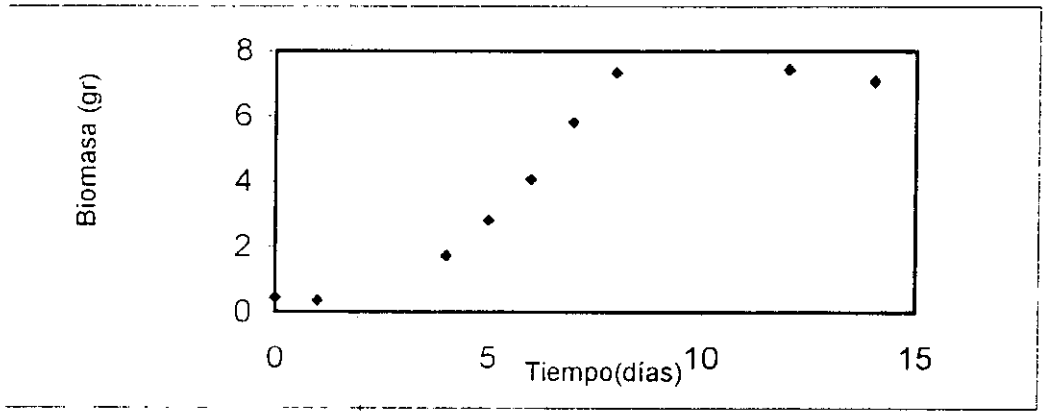


Figura 13: biomasa v/s tiempo. Para el medio de cultivo 3 y un reactor con un volumen de 1.4 litros.

Se pudo estimar una velocidad específica de crecimiento de 0.475 $dias^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 1.44 días.

D.1.1.5.Medio de cultivo N°4

Se realizó un ajuste a los datos (figura 14) con la ecuación (2), obteniendo rX, para cada día de la experiencia (tabla 9).

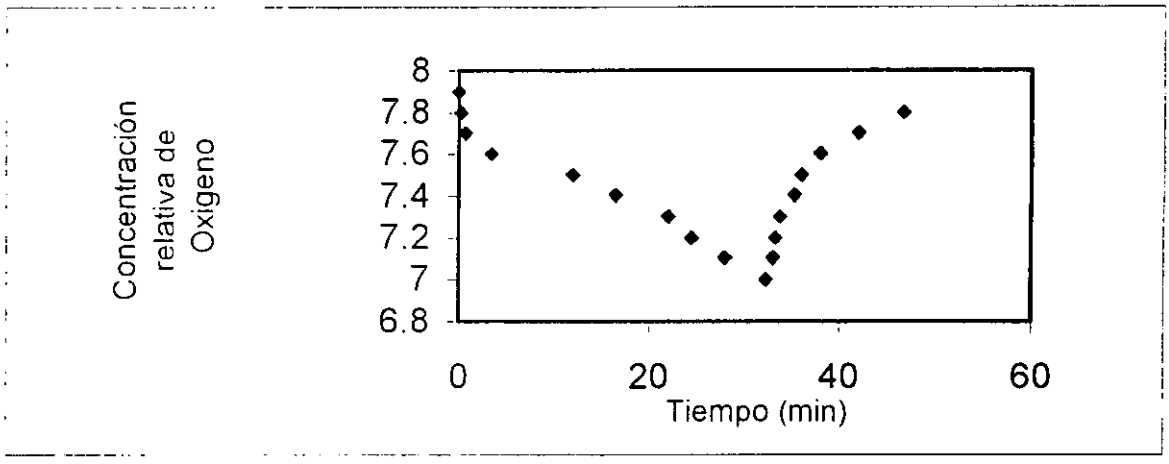


Figura 14: Concentración relativa de Oxigeno v/s Tiempo. Estimado por respirometría para el medio de cultivo 4.

La siguiente tabla muestra las pendientes obtenidas de un cultivo de 13 días en un reactor STR.

Tabla 9: Tasa de consumo de oxigeno en función de la biomasa por día de incubación.

Días	0	1	4	6	7	8	12	13
rX (ppm de O_2/día	0.01	0.014	0.023	0.0224	0.0338	0.0263	0.0131	0.0104

La biomasa al término del 13 días, expresada como el peso seco en gr /v de todo el reactor dio:

X= 0.8972 g/L.

Con esto podemos estimar r de la pendiente de la ecuación 2.

rX=0.0104

r = 0.0116

Tabla 10:biomasa estimada para los tiempos de cultivo.

Días	0	1	4	6	7	8	12	13
Biomasa (g/v reactor)	0.86	1.18	1.94	1.93	2.91	2.27	1.13	0.89

Se pudo estimar una velocidad especifica de crecimiento de 0.15 $dias^{-1}$. Tiempo de duplicación es de t = 4.6 días.

Con los resultados obtenidos (tabla 11) se pudo determinar el medio de cultivo óptimo y de menor costo, y estimar parámetros de crecimiento del micelio del hongo como la velocidad específica de crecimiento, kla y rendimiento en función del sustrato.

Tabla 11: Velocidades de crecimiento y Kla para los distintos medios de cultivo ensayados.

Medio	Velocidad esp. Crecimiento (μ) $días^{-1}$	Kla (min^{-1})
1	*	*
2	0.22	0.0007
3	0.48	0.001
4	0.15	0.00034

El coeficiente de transferencia de masa gas-líquido (Kla) fue estimado a partir de la respirometría en la parte de retorno de la aireación para cada experiencia y ocupando la ecuación (1).

* No se pudo estimar debido a una posible inhibición por sustrato ya que a medida que avanzaba el cultivo se observaba una disminución en el crecimiento, estimado por reapirometría.

Dado que el proyecto consiste en la obtención de un producto seco, la fracción de compuesto biológicamente activo por unidad total de masa será mucho más pequeña en le medio 3, porque la separación del salvado de trigo es impracticable.

D.1.2. Actividad 2

Siguiendo la figura N°2 previamente mencionada, se estimaron los rendimientos de producto asociados a cada etapa del presente esquema; se definió productividad como el cuociente entre la concentración de producto por litro v/s tiempo de fermentación.

$$P = \frac{concentración\ de\ producto(g/L)}{tiempo\ de\ fermentación(días)} = productiviad$$

Tabla 12: Calculo de rendimientos en la extracción según figura 4.

Medio	Volumen	Etapa 1 (peso seco)	Etapa 2 (peso seco)	Redimiento
Medio 1	1220	0.841 g	0.159 g	18.9 %
Medio 2	1400 ml	1.667 g	0.236 g	14.2 %
Medio 4	790 ml	0.897 g	0.139 g	15.5 %

El rendimiento esta expresado en base a la biomasa total obtenida al final del cultivo (etapa 1).

Tabla 13: Calculo de productividad del extracto biológicamente activo.

C.1. Medio	Tiempo de Fermentación (días)	Concentración producto (g/L)	Productividad (g/L día)
Medio 1	7	0.130	0.019
Medio 2	6	0.169	0.028
Medio 4	13	0.176	0.014

D.2.Etapa 2

D.2.1. Actividad 1

Se estudió la producción del micelio en reactores de tamaño intermedio (reactor agitado, STR bajo la modalidad de cultivo en batch). Se determinaron los parámetros tecnológicos óptimos para su producción industrial.

Para un reactor STR con un volumen de 10 L, una velocidad de agitación de 200 rpm, un flujo de aire de 2 L/min (equivalente a 0.2 VVM). Se determinó por respirometría la concentración de biomasa en el tiempo. Se ajustaron a los datos con la ecuación (2), y se obtuvo rX, para cada día de la experiencia (tabla 15). Además se estimó glucosa según el método descrito en materiales y métodos. Con estos datos se pudo estimar un "Yield" (rendimiento).

La siguiente tabla muestra las pendientes obtenidas de un cultivo de 14 días en un reactor STR.

Tabla 14: Tasa de consumo de oxigeno en función de la biomasa por día de incubación.

Días	0	6	8	12	15	18	19	21
rX (ppm O_2/día	0.0286	0.0468	0.0622	0.0493	0.0522	0.0948	0.1121	0.1004

La estimación de biomasa al término del cultivo por el método de sólidos suspendidos totales para este medio de cultivo, es la suma de los sólidos orgánicos más la biomasa miceliar, se asume que la tasa de consumo de oxígeno, r, es constante, por lo cual es posible estimar la biomasa a los distintos tiempos del cultivo. La biomasa al término del 21días y utilizando un r de 0.0071 (ppm de O_2/día g de biomasa) expresada como el peso seco en gr

X= 13.99 g

La concentración fue de 1.399 g/L

Tabla 15: biomasa estimada para los tiempos de cultivo.

Días	0	6	8	12	15	18	19	21
Biomasa (g/L)	0.39	0.65	0.867	0.687	0.727	1.321	1.562	1.399

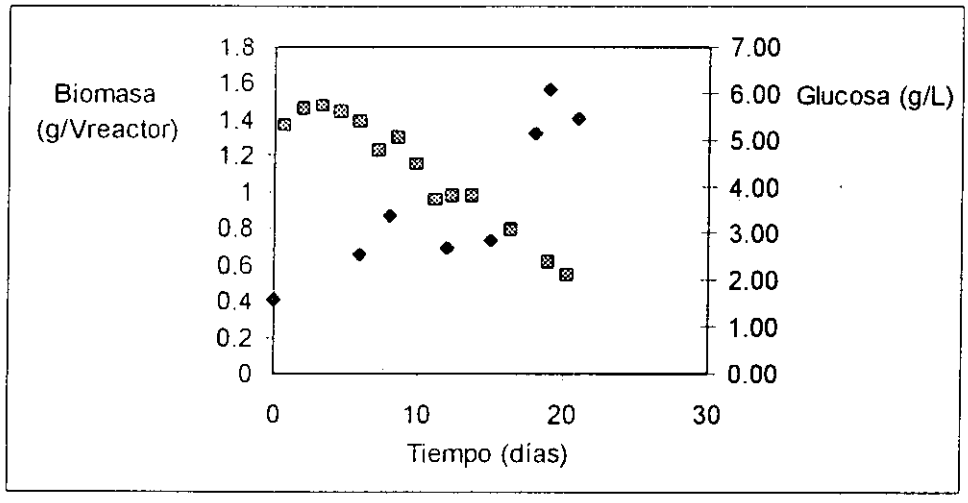


Figura 15: biomasa y glucosa v/s tiempo. Para un reactor con un volumen de 10 litros.

Se pudo estimar una velocidad específica de crecimiento de 0.193 $dias^{-1}$ (0.008 h^{-1})y un tiempo de duplicación de 3.59 días. El rendimiento fue de:

$Y^{X}_{glucosa} = 0.314$ Estimado de $Y^{X}_{glucosa} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$

Los datos obtenidos nos permitió obtener una base de diseño para una demanda determinada de producto.

D.2.2.Cromatografía por HPLC

Muestran un pico con un tiempo de retención de 4 minutos, que corresponde al principio farmacológico, tanto en el medio de cultivo como en el micelio (figura 16).

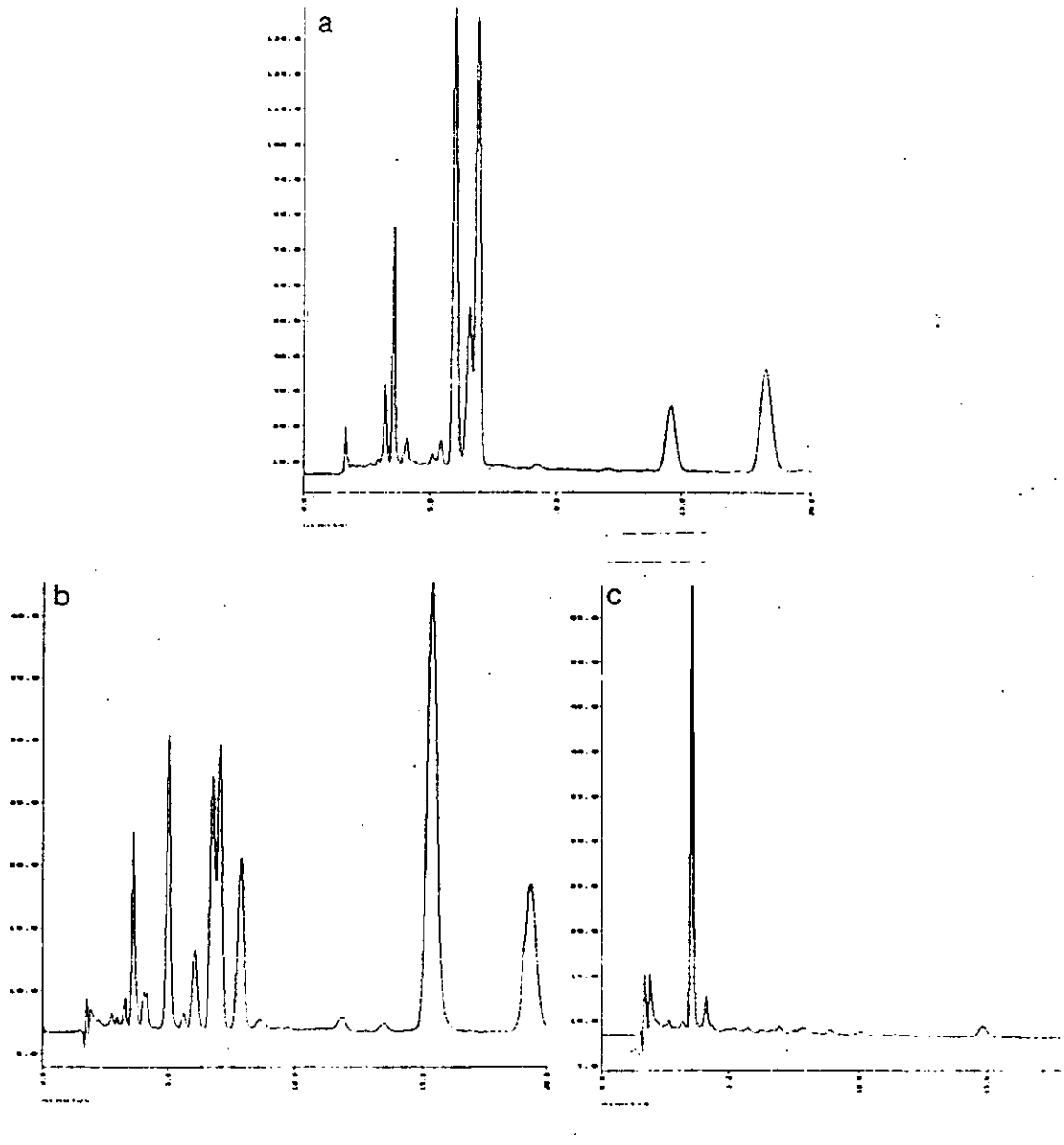


Figura 16: Cromatogramas obtenidos por HPLC. a) Extracción y ruptura de Micelio con N2 líquido. b) Medio de cultivo control. c)Medio de cultivo al tiempo final de la fermentación.

D.2.2. Actividad 2

Determinación del sistema de extracción a nivel de planta piloto.

Se estudió el sistema de extracción óptimo para la producción del extracto del hongo *Lentinula edodes*, para lo cual se utilizaron técnicas de filtración, cromatografía, y secado a presión reducida.

D.3. Análisis y conclusiones

Con los parámetros obtenidos se planteó una base de diseño para un rector de escala industrial. Esto nos permitió calcular los siguientes parámetros en base a una producción de 1330 Kg anuales de producto (ver anexo 3):

Volumen reactor =2.86 m^3.

Tasa de transferencia de oxígeno (OTR)=0.35 mmol/lh.

1. Los estudios iniciales permitieron concluir claramente la superioridad de la **cepa CS-41** en contraste con la cepa CS-24, que exhibió una cinética de crecimiento mucho menor.
2. Según las actividades desarrolladas y de los resultados obtenidos al cultivar la cepa CS-41, se extrajeron varias conclusiones:
3. El ensayo de medios de cultivo permitió seleccionar el medio de jarabe de fructosa (numerado 4) por presentar: mejor biodisponibilidad de sus componentes; mejor manejo en cuanto a condiciones de esterilidad; menor tiempo de esterilización; mejor manejo para el tratamiento del extracto; y menor costo.
4. El tiempo de cultivo será del orden de los 10 días para llegar a una fase estacionaria: momento en el cual se puede operar el reactor en modo de lotes secuenciales, disminuyendo los tiempos y costos de operación (ahorra esterilización).
5. La naturaleza miceliar del cultivo impuso problemas a los métodos clásicos de medición. Así, el micelio en el medio 1 pareció presentar inhibición, que se supuso debida a una fase lag prolongada o a inhibición por sustrato. El desarrollo de métodos y rangos de operación del reactor permitieron superar la inhibición aparente.
6. Los cultivos con salvado de trigo debieron ser descartados por su tiempo de esterilización (de 2 a 3 horas, versus 1 hora sin salvado de trigo), que lo hace encarecer costos, además de la complejidad en las etapas de separación para la obtención y cuantificación del principio farmacológicamente activo. Queda, naturalmente, la posibilidad de comercializar un preparado que no requiera separación.
7. La productividad en términos del compuesto biológicamente activo (lentinan) fue de 0.014 g de extracto/L día; para el medio seleccionado, operando en reactores piloto.

8. En condiciones de escala piloto (reactor de 10 litros). La velocidad específica de crecimiento fue de 0.19 días^{-1}, (muy similar a la velocidad obtenida en el estudio de laboratorio), con un rendimiento de biomasa en función del consumo de glucosa de 0.32 gramos de células por gramo de glucosa.
9. La productividad en términos del compuesto biológicamente activo (eritadenina) fue de 0.13 mg por litro de reactor por día, para el cultivo en escala piloto. reactor de 10 litros.
10. Con una demanda de 1322 kg/año de biomasa miceliar, para un preparado farmacológico. el volumen de reactor necesario es de 2.9 m^3.

E. Impactos del proyecto.

En base de las propiedades que los científicos atribuyen a los preparados que contienen extracto de *Lentínula edodes* podemos distinguir principalmente tres grupos de productos farmacéuticos cuyo impacto tiene relación con sus propiedades farmacológicas:

a) Preparados para el control y la reducción de niveles elevados de colesterol, cuyo volumen de ventas netas (precio salida a mayorista) anuales en Chile son de 700.000 unidades y US$ 12.870.000,-.

b) Productos indicados en afecciones virales. Como es sabido la mayoría de estos tratamientos son solo paliativos, no curativos. En cambio si se lograr difundir las propiedades curativas de *Lentínula edodes* se ampliará el potencial mercado como antiviral crecería substancialmente. La venta neta anual del mercado actual es de 551.700 unidades y US$ 3.184.000,-.

c) Los tratamientos oncológicos con medicamentos son difíciles de cuantificar puesto se realiza muchas importaciones directas y de los medicamentos utilizados en clínicas y hospitales existe poca información estadística. No obstante en el mercado de farmacias este asciende a 71.000 unidades y US$ 1.506.000.-.

Considerando las cifras anteriores podemos definir un mercado potencial básico de 1.322.000 unidades y US$ 17.470.000,- al año. Esta basado en una venta del mercado chileno en los segmentos directos donde se enfocarán nuestros esfuerzos de marketing iniciales.

E.1.Mecanismos de implementación de los resultados del proyecto.

Llegaremos a nuestro grupo objetivo de consumidores a través de prescripciones médicas y publireportajes en medios gráficos. En una segunda etapa incrementaremos la difusión con mayor presencia en diarios y revistas. Asimismo se elaborará una página web que permitirá optimizar nuestros esfuerzos de comercialización.

Una vez desarrollados los primeros productos, estos serán comercializados también a través de nuestros filiales en Perú, Ecuador y Colombia. También ofreceremos convenios con licencias a empresas conocidas en otros mercados como Argentina, Brasil y México.

D.Anexos

D.1. Anexo 1

Resumen de Actividades Desarrolladas

Informe Final (corresponde al período desde el 1 de Abril hasta la primera semana de Marzo)	
Identifique Hito(s) Verificable(s) Programado	X
Logro Hito (s) Verificable (s)	100 %

Detalle de actividades	Actividades programadas						Actividades realizadas					
	Mes						Mes					
Etapa 1	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Actividad 1	X	X	X				X	X	X			
Actividad 2				X	X				X	X		
Actividad 3					X	X					X	X
Etapa 2	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12
Actividad 1	X	X	X				X	X	X			
Actividad 2				X	X				X	X		
Actividad 3						X						X

GASTOS REALES DEL PROYECTO FONTEC

(anexo D.1.2.)

INFORME DE AVANCE

GASTOS PROGRAMADOS

PARTIDA DE COSTO	ITEM	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Total Neto	IVA	Subtot Progr
		abr-01	may-01	jun-01	jul-01	ago-01	sep-01			Informe 1
1.-PERSONAL DE DIRECCION	a)Director	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	10.462,50	0	10.463
E INVESTIGACIÓN	b)Desarrollo Procesos Bioquím.	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	1.549,80	0	1.550
	c)Desarrollo Sistemas extracción	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	1.549,80	0	1.550
	d)Bioquímico	678,08	678,08	678,08	678,08	678,08	678,08	4.068,48	0	4.068
SUBTOTAL		2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	17.630,58	0	17.631
2.- PERSONAL DE APOYO	a)Técnico Laboratorio	387,50	387,50	387,50	387,50	387,50	387,50	2.325,00	0	2.325,00
	b)Secretaria	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	310,02	0	310,02
SUBTOTAL		439,17	439,17	439,17	439,17	439,17	439,17	2.635,02	0	2.635,02
3.- SERVICIOS MATERIALES Y	a)Materiales y Reactivos	1.250,00						1.250,00	0	1.250,00
OTROS									0	0,00
SUBTOTAL		1.250,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.250,00	0	1.250,00
4.- USO DE BIENES DE CAPITAL DE	a)Uso laboratorios y equipos de	1.250,00						1.250,00	0	1.250,00
PROPIEDAD DE LA EMPRESA	proceso y de análisis								0	0,00
SUBTOTAL		1.250,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.250,00	0	1.250,00
5.- USO DE BIENES DE CAPITAL									0	
NUEVOS									0	
SUBTOTAL		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00
TOTAL		5.877,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	22.765,60	0	22.765,60

GASTOS REALIZADOS

PARTIDA DE COSTO	ITEM	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Total Neto	IVA	Subtot Real
		abr-01	may-01	jun-01	jul-01	ago-01	sep-01			Informe 1
1.-PERSONAL DE DIRECCION	a)Director *	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	10.462,50	0	10.462,50
E INVESTIGACIÓN	b)Desarrollo Procesos Bioquím.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.600,00	1.600,00	0	1.600,00
	c)Desarrollo Sistemas extracción	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2.000,00	2.000,00	0	2.000,00
	d)Bioquímico	0,00	0,00	2.034,25	678,08	666,97	666,97	4.046,27	0	4.046,27
SUBTOTAL		1.743,75	1.743,75	3.778,00	2.421,83	2.410,72	6.010,72	18.108,77	0	18.108,77
2.- PERSONAL DE APOYO	a)Técnico Laboratorio	388,88	0,00	777,77	388,88	388,88	388,88	2.333,29	0	2.333,29
	b)Secretaria *	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	310,02	0	310,02
SUBTOTAL		440,55	51,67	829,44	440,55	440,55	440,55	2.643,31	0	2.643,31
3.- SERVICIOS MATERIALES Y	a)Materiales y Reactivos **	1.250,00						1.250,00	0	1.250,00
OTROS									0	
SUBTOTAL		1.250,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.250,00	0	1.250,00
4.- USO DE BIENES DE CAPITAL DE	a)Uso laboratorios y equipos de	1.250,00						1.250,00	0	1.250,00
PROPIEDAD DE LA EMPRESA	proceso y de análisis**								0	
SUBTOTAL		1.250,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.250,00	0	1.250,00
5.- USO DE BIENES DE CAPITAL									0	
NUEVOS									0	
SUBTOTAL		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00
TOTAL		4.684,30	1.795,42	4.607,44	2.862,38	2.851,27	6.451,27	23.252,08	0	23.252,08

Notas: *) Salarios de la empresa
**) Los dos items estan incluídas en la misma factura: N°74900 de U. De Chile

GASTOS PROGRAMADOS

ITEM	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12	Total Neto	IVA	Subtot Progr	Total
	oct-01	nov-01	dic-01	ene-02	feb-02	mar-02			Informe 2	Acumulado
a)Director	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	10.462,50	0	10.463	
b)Desarrollo Procesos Bioquím.	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	1.549,80	0	1.550	
c)Desarrollo Sistemas extracción	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	258,30	1.549,80	0	1.550	
d)Bioquímico	678,08	678,08	678,08	678,08	678,08	678,08	4.068,48	0	4.068	
	2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	2.938,43	17.630,58	0	17.631	35.262
a)Técnico Laboratorio	387,50	387,50	387,50	387,50	387,50	387,50	2.325,00	0	2.325,00	
b)Secretaria	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	310,02	0	310,02	
	439,17	439,17	439,17	439,17	439,17	439,17	2.635,02	0	2.635,02	5.270,04
a)Materiales y Reactivos							0,00	0	0,00	
								0	0,00	
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	1.250,00
a)Uso laboratorios y equipos de							0,00	0	0,00	
proceso y de análisis								0	0,00	
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	1.250,00
								0		
								0		
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	
	3.377,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	3.377,60	20.265,60	0	20.265,60	43.032,04

GASTOS REALIZADOS

ITEM	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12	Total Neto	IVA	Subtot Real	Total
	oct-01	nov-01	dic-01	ene-02	feb-02	mar-02			Informe 2	Acumulado
a)Director *	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	1.743,75	10.462,50	0	10.462,50	
b)Desarrollo Procesos Bioquím.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.500,00	1.500,00	0	1.500,00	
c)Desarrollo Sistemas extracción	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.100,00	1.100,00	0	1.100,00	
d)Bioquímico	666,96	666,96	666,96	666,96	666,96	755,86	4.090,67	0	4.090,67	
	2.410,71	2.410,71	2.410,71	2.410,71	2.410,71	5.099,61	17.153,17	0	17.153,17	35.261,94
a)Técnico Laboratorio	388,88	388,88	388,88	388,88	388,88	372,23	2.316,63	0	2.316,63	
b)Secretaria *	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	51,67	310,02	0	310,02	
	440,55	440,55	440,55	440,55	440,55	423,90	2.626,65	0	2.626,65	5.269,96
a)Materiales y Reactivos **	0,00						0,00	0	0,00	
								0		
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	1.250,00
a)Uso laboratorios y equipos de	0,00				474,36		474,36	85,4	559,74	
proceso y de análisis**								0		
	0,00	0,00	0,00	0,00	474,36	0,00	474,36	85,4	559,74	1.809,74
								0		
								0		
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	
	2.851,26	2.851,26	2.851,26	2.851,26	3.325,62	5.523,51	20.254,18	0	20.339,56	43.591,64

D.1.3.Anexo 3. Bases de diseño

Bases del diseño		**Unidades**
a) Producto: Extracto natural de micelio de *Lentinula edodes*		
b)Producción anual (Py): requerida (producto seco)	Py	1322 Kg
c)Características de la fermentación:		
Volumen de trabajo máximo al día		10 litros
Masa celular máxima obtenida		1.4 g/l
Rendimiento celular basado en consumo de glucosa	Yx/s	0.314
Tasa de crecimiento específico sustentable (25 °C y pH=6.5)	μ	0.008 h^{-1}
Medio de fermentación: Medio de crecimiento con jarabe de fructosa.		
Modo de fermentación:		
Temperatura de fermentación	$T°_f$	25 °C
pH fermentación:	pH	6.5
Tiempo de fermentación en laboratorio:	t_f	504 h
d) Eficiencia de purificación		100.00%
e)Contenimiento: BL2		
f)Validación: Tiene que ser validada para GMP		
g)Dias de operación: 330 dias de operación por año, 24 horas por días, 7 días a la semana		

Solución

Balances totales y tamaño	**Unidades**
Producción anual requerida. Py	1322 Kg
Eficiencia de recuperación	100%
Producción del fermentador anual	1322 Kg
Producción de producto. g/g cell (dry)	1 g/g cell
Producción de cell anuales	1322 Kg
Concentración de masa celular deseada	1.4 g/L
Volumen de fermentación anual	944285 L
Tiempo de ciclo total	24 H
Tiempo de fermentación	504 h
Tiempo de turnaround	8 h
Dias de operación/año	330
Ciclos/fermetacionx año	330
Ciclos fermentador/dia = 1 x N° fermentadores	
Volumen de fermentación / dia	2861 L
Volumen de fermentación/día (m3)	2.86 m3
Se pueden usar dos fermentadores con un volumen de	1.43 m3

Si la fermentación corre a 25°C y con una tasa específica de crecimiento de 0,008 h-1

Tasa de transferencia de oxígeno, OTR	**0.35** mmol/Lh
Transferencia de calor metabólica Q	**0.24** BTU/h