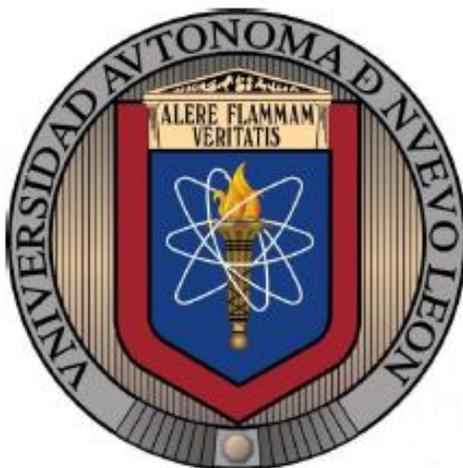


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**“Diseño de un sistema de fermentación extractiva para la recuperación de exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L”**

**Por**

**LBG CARLO FRANCO MEDINA RAMIREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en  
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**Octubre 2019**

**“Diseño de un sistema de fermentación extractiva para la recuperación de  
exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L”**

Revisión de la Tesis:

---

**Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo**

Directora de Tesis

---

**Dr. José Rubén Morones Ramírez**

Co-Director de Tesis

---

**Dra. María Teresa Garza González**

Comité Tutorial

---

**Dra. Alcione García González**

Comité Tutorial

---

**Dr. Ulrico Javier López Chuken**

Comité Tutorial

**“Diseño de un sistema de fermentación extractiva para la recuperación de  
exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L”**

Aprobación de la Tesis:

---

**Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo**

Directora de Tesis

---

**Dr. José Rubén Morones Ramírez**

Co-Director de Tesis

---

**Dra. María Teresa Garza González**

Comité Tutorial

---

**Dra. Alcione García González**

Comité Tutorial

---

**Dr. Ulrico Javier López Chuken**

Comité Tutorial

## DEDICATORIA

**A mi familia** por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de estos dos años.

**A mi padre Jorge Gerardo Medina Garza** por ser mi mayor ejemplo e inspiración de cómo debe ser un hombre de familia, por siempre apoyarme en mis sueños y no dejar que los abandone, así como los consejos que me dabas para mi formación y maduración a nivel personal.

**A mi madre Graciela Ramirez Medina**, por dame siempre el amor incondicional y consejos de una madre cariñosa, además de consejos y el apoyo que me han servido de pilar en mi vida.

**A mi novia Karen Garza Cuellar**, por tus interminables palabras de aliento, amor y comprensión que me has dado a lo largo de estos años te has convertido en una parte indispensable en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora: la Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo por guiarme y enseñarme el método científico, darme consejos tanto en nivel académico como a nivel personal para poder realmente encontrar mi camino en la ciencia y darme la confianza para formar mi criterio a lo largo del proyecto.

A mi co-asesor: el Dr. José Rubén Morones Ramírez por bríndame la oportunidad de entrar a su grupo de laboratorio, el uso de los equipos y el espacio brindado para la realización de mi investigación.

A mi comité de tesis: la Dra. María Teresa Garza González, la Dra. Alcione García González y el Dr. Ulrico Javier López Chuken por brindarme sus consejos para la realización del proyecto.

A mis amigos de la maestría en especial a Edwin y Habbi hicieron que estos dos años de maestría fueran realmente divertidos, a mis compañeros del laboratorio por los consejos y la ayuda técnica que me brindaron, así como también a los becarios que me brindaron su apoyo, su ayuda fue de gran importancia para la realización en tiempo y forma del proyecto.

## **FINANCIAMIENTO**

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (633454) para permitirme realizar mis estudios de Maestría, a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por aceptarme en el posgrado y permitirme seguir mi desarrollo tanto académico como personal.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica Tecnológica (PAICYT 2018) y el Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP 2018) por la asignación de los recursos para la compra de equipo de laboratorio, así como las compensaciones monetarias para los becarios que ayudaron en la realización del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Lista de tablas	I
Lista de figuras	II
Nomenclatura	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	4
2.1 Biopolímeros	4
2.1.1 EPS	5
2.1.2 Aplicaciones de los EPS de Levaduras	5
2.1.3 Factores en el medio de cultivo que afectan la producción del EPS de levaduras	6
2.1.4 EPS de <i>Rhodotorula</i> .	7
2.2 Purificación del EPS	8
2.2.1 Sistema de Dos Fases Acuosa (ATPS) y Fermentación Extractiva	9
2.2.2 Polímeros termosensibles	11
2.2.2.1 Relación óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO)	12
2.2.2.2 Peso molecular	12
2.2.2.3 Temperatura	13
2.2.2.4 Sales	14
2.2.2.5 Reciclado de los copolímeros	14
Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos	17
3.1 Hipótesis	17
3.2 Objetivos	17
Capítulo 4. Materiales y Metodología	19
4.1 Plan de trabajo del proyecto de investigación	19
4.2 Disposición de residuos	19
4.3 Materiales	19

4.4 Reactivos	20
4.5 Equipos	20
4.6 Realización del proyecto	20
4.7 Determinación el efecto del cambio de medio de cultivo en la generación del EPS	21
4.7.1 Recuperación de la biomasa y el EPS	22
4.7.2 Concentrado y pesaje de la biomasa y el EPS	23
4.7.3 Pruebas de viabilidad con el EOPO	24
4.7.4 Pruebas de generación de biomasa con el EOPO	26
4.8 Generación de dos fases con el EOPO.	28
4.8.2 Caracterización de la producción de biomasa y EPS en la fermentación extractiva con EOPO	29
4.9 Prueba de reciclado del EOPO.	30
4.10 Análisis estadístico.	32
4.11 Análisis de costos medios.	32
4.12 Análisis de costos para la fermentación extractiva.	32
Capitulo 5. Resultados	33
5.1 Determinación el efecto en la generación de la biomasa por el cambio de medio.	33
5.2 Determinación del efecto en la generación del EPS por el cambio de medio	34
5.3 Costos del medio de cultivo	37
5.4 Pruebas de viabilidad con el EOPO y generación de la biomasa.	38
5.5 Generación de dos fases con el EOPO.	42
5.6 Caracterización de la producción de biomasa y EPS en la fermentación extractiva con EOPO	46
5.7 Reciclado del EOPO y generación del EPS.	47
5.8 Costos del EOPO y el uso de la centrífuga.	48
Capitulo 6. Discusión	49
6.1 Efecto del cambio de medio en la generación de la biomasa.	49
6.2 Efecto del cambio de medio en la generación del EPS	50

6.3 Costo del medio.	52
6.4 Pruebas de viabilidad con el EOPO y generación de la biomasa.	52
6.5 Generación de dos fases con el EOPO.	55
6.6 Caracterización de las dos fases con EOPO	56
6.7 Reciclado del EOPO y generación del EPS	57
6.8 Costo del uso del EOPO y la centrífuga.	58
Capítulo 7. Conclusiones	59
Capítulo 8. Perspectivas	60
Capítulo 9. Material suplementario	61
Capítulo 10. Bibliografía	63
Capítulo 11. Resumen auto bibliográfico	73

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pagina</b>
Tabla.1 Composición Medio Mineral	21
Tabla 2. Composición de la solución de Azul de Metileno.	25
Tabla 3. Costos de cada componente del medio YM y mineral y el costo por 100ml.	37
Tabla 4. Tiempos de generación de las dos fases en concentración y temperatura.	42
Tabla 5. Porcentajes de recuperación de biomasa y EPS en la fase superior (FS) y la fase inferior (FI) de diferentes concentraciones de EOPO.	46
Tabla 7. Producción alcanzada en 168 h.	48
Tabla 8. Costos asociados al uso de la centrífuga y el EOPO.	48
Tabla 9. Análisis de Varianza para la Biomasa	61
Tabla 10. Análisis de Varianza para el EPS	61
Tabla 11. Análisis de Varianza para el EOPO 970	61
Tabla 12. Análisis de Varianza para el EOPO 12,000	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
Figura 1. Esquema general de proceso de recuperación con un sistema ATPS	9
Figura 2. Metodología seguida para la inoculación y muestra de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L en diferentes medios.	22
Figura 3. Protocolo empleado para la recuperación de la biomasa y el EPS de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001 L	23
Figura 4. Procesamiento de las muestras de biomasa y EPS con el concentrador y su posterior pesaje.	24
Figura 5. Metodología para la tinción de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L con Azul de Metileno y diferentes concentraciones de EOPO.	26
Figura 6. Pruebas de generación de biomasa con el EOPO a diferentes concentraciones.	27
Figura 7. Metodología seguida para medir la generación de las dos fases con el EOPO a diferentes temperaturas.	28
Figura 8. Pasos seguidos para realizar la caracterización de las dos fases con el EOPO.	30
Figura 9. Metodología empleada para la prueba comparativa de un cultivo batch vs un cultivo con el EOPO.	31
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L en medios YM y Mineral por 240 h.	33
Figura 11. Producción Máxima de biomasa de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L en medios YM y mineral por 240 h.	34
Figura 12. Peso seco de EPS de muestras de 5 ml.	35
Figura 13. Producción máxima de los cultivos cada 24 h.	36
Figura 14. Viabilidad de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L a lo largo de 168 h cultivado con el EOPO 12,000	38
Figura 15. Mediciones de viabilidad del medio de cultivo con el EOPO 970 a concentraciones de 10 a 50% (v/v) de EOPO por 168 h.	39
Figura 16. Generación de biomasa a diferentes concentraciones de EOPO (12,000) 20 y 30% (v/v) a lo largo de 168 h.	40
Figura 17. Generación de biomasa a diferentes concentraciones de EOPO (970) de un 20 a un 50% (v/v) a lo largo de 168 h.	41

Figura 18. No formación de las dos fases en una concentración de 10% de EOPO	43
Figura 19. Formación de las dos fases en una concentración de 20% de EOPO	44
Figura 20. Formación de las dos fases en una concentración de 30% de EOPO	44
Figura 21. Formación de las dos fases en una concentración de 40% de EOPO	45
Figura 22. Formación de las dos fases en una concentración de 50% de EOPO	45
Figura 23. Vista inferior del matraz con una concentración de EOPO al 40% (v/v) se logra ver la red micelar atrapando la biomasa	62
Figura 24. Caracterización de las fases de una concentración de EOPO al 40% (v/v)	62

## NOMENCLATURA

ATPS	Sistema de Dos Fases Acuosas
CP	Clouding Point
CsT	Centistokes
EOPO	Poly-oxido de etileno (EO) y Oxido de propileno (PO)
EPS	Exopolisacáridos
FI	Fase Inferior
FS	Fase Superior
g	Gramos
h	Horas
LCST	Temperatura de Solución Crítica más Baja
mg	Miligramo
°C	Grados Celsius
TSP	Polímeros termosensibles
v	Volumen

## RESUMEN

Nombre: Carlo Franco Medina Ramirez  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: Diseño de un sistema de fermentación extractiva para la recuperación de exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Uso de polímeros termosensibles para su aplicación en un sistema de fermentación extractiva.

Numero de Paginas: 88

**Propósito y Método de Estudio:** Los exopolisacaridos (EPS) son compuestos de gran interés industrial, por sus diversas aplicaciones. Estos EPS se obtienen generalmente por fermentación sumergida, sin embargo, debido a los bajos rendimientos del EPS producido por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L en esta investigación se propuso diseñar un sistema de fermentación extractiva que nos permitiría aumentar los rendimientos de obtención del EPS cuando se comparaban con una fermentación sumergida.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se midió si el cambio del medio YM por uno mineral afectaba la producción de biomasa y EPS, encontrándose que no hubo diferencias significativas en la producción de la biomasa y el EPS. Posteriormente, se midió el efecto del EOPO en la la viabilidad y la generación de biomasa en los cultivos, donde se estudió el efecto de dos EOPO con un peso molecular de 970 y 12,000. Se encontró que la viabilidad celular disminuía entre un 20 y 40% para el EOPO 970 y más del 35% para el EOPO 12,000. También, se midió la generación de biomasa, encontrándose que con respecto a los controles los dos EOPO's (970 y 12,000) tuvieron una diferencia significativa en producción de biomasa, sin embargo, se eligió el EOPO 970 por su menor tasa de perdida de viabilidad y generación de biomasa. Se midieron las concentraciones (10 al 50% (v/v)) y tiempos necesarios para la formación de las dos fases de la fermentación extractiva, eligiendo como mejor concentración la del 40% de EOPO 970, esto debido a que cuando se caracterizaron las fases para saber el contenido de biomasa y EPS en cada fase la que mejores resultados nos arrojó fue la del 40% a una temperatura de 35 grados centígrados por 11 minutos. Además, se realizó una prueba de concepto para saber si la fermentación extractiva podía producir mas EPS que la fermentación sumergida, obteniéndose 25% más de EPS con la fermentación extractiva, sin embargo, a la hora de comparar los costos operativos se encontró que el uso de EOPO vs la centrifuga era 61 veces mas caro.

Asesora: Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo\_\_\_\_\_

## ABSTRACT

**Purpose and Study Method:** EPS are compounds of great industrial interest, for their various applications, these EPS are usually obtained by a submerged fermentation, however, due to the low yields of the EPS produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L in this research was proposed to design an extractive fermentation system that would allow us to increase the EPS obtaining yields when compared with a submerged fermentation.

**Contributions and Conclusions:** It was measured if the change of the YM medium by a mineral one affected the production of biomass and EPS, it was found that there were no significant differences in the production of the biomass and the EPS, in addition, the viability and the generation of biomass were measured with two EOPO with a molecular weight of 970 and 12,000, finding that the viability was reduced between 20 and 40% for the EOPO 970 and more than 35% for the EOPO 12,000, the generation of the biomass was also measured. that with respect to the controls the two EOPO's (970 and 12,000) had a significant difference in biomass production, however the EOPO 970 was chosen because of its lower rate of loss of viability and generation of biomass, 10 to 50% (v/v) were measured concentrations and times necessary for the formation of the two phases choosing as the best concentration the 40% of EOPO 970 this because when the phases were characterized to know the content of biomass and EPS in each phase the one that gave us the best results was 40% at a temperature of 35 degrees Celsius for 11 minutes, a proof of concept was carried out to know if extractive fermentation could produce more EPS than submerged fermentation, 25% more EPS was obtained with extractive fermentation, however, when comparing operating costs it was found that the use of EOPO vs. the centrifuge was 61 times more expensive

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de alto peso molecular que son secretados por un microorganismo al entorno circundante (Hussain *et al.*, 2017). La formación de EPS es una característica bien estudiada entre las bacterias y algunos de estos EPS como por ejemplo el xantano, dextrano, e hialuronato se producen comercialmente (Andhare, Chauhan, *et al.*, 2014). Según estos autores algunos EPS fúngicos también se han examinado con respecto a sus interesantes propiedades y su potencial de aplicación, sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado especialmente en el campo médico (por ejemplo, esquizofilano y escleroglucano). Lamentablemente, los EPS producidos por levaduras u hongos han sido menos investigados, con la excepción de *Aureobasidium pullulans* y *Cryptococcus neoformans* (Satyanarayana & Kunze, 2009).

Se ha descrito que los EPS se producen en los siguientes géneros de levadura: *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Phomopsis*, *Exophiala*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Tremella* y *Trichosporon* (Satyanarayana & Kunze, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que muy pocos de estos tienen relevancia industrial y médica con un valor comercial significativo, especialmente en lo que respecta a su uso como biomateriales u otras aplicaciones. Por otra parte, dentro de los EPS documentados con aplicaciones de valor comercial se encuentra el producido por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001 L, levadura que se aisló del Río de Pesquería en Nuevo León, México. En dicha investigación, se encontró que la levadura en condiciones de estrés por metales pesados excretaba un exopolisacárido con propiedades bio-absorbentes, (Garza-Gonzales *et al.*, 2016).

Aún así, la principal limitación en la aplicación de algunos de estos EPS se ha debido en gran medida al costo de producción en relación con su valor comercial. Por lo tanto, el enfoque generalmente empleado para abordar este problema incluye utilizar sustratos más

baratos, mejorar el rendimiento del producto optimizando las condiciones de fermentación, desarrollar cepas de mayor rendimiento a través de mutagénesis, manipulaciones genéticas y optimizar el bioproceso para la recuperación y purificación del exopolisacárido (Nwodo, Green, *et al.*, 2012).

Dentro del proceso, la fase de recuperación y purificación representa en sí mismo más del 70% de los costos totales del bioproceso (Banik, Santhiagu, *et al.*, 2003). Los métodos convencionales como la centrifugación, sedimentación y el uso de solventes orgánicos de purificación de biomoléculas implican varias operaciones unitarias y, por lo tanto, suelen ser costosos. Además, es bien sabido que en cada paso se pierde cierta cantidad de producto de interés dependiendo del rendimiento en cada operación unitaria, lo cual representa pérdidas al final del proceso (Show *et al.*, 2012a).

Para poder superar los inconvenientes del poco rendimiento que se puede obtener, se ha propuesto utilizar un sistema de dos fases acuosas (ATPS), este es un método extracción líquido-líquido que utiliza dos fases acuosas inmiscibles para la separación de biomoléculas (Banik *et al.*, 2003). Este método ha probado reducir el número de operaciones unitarias y por lo tanto ayuda a reducir el costo general del bioproceso (Raja, Murty *et al.*, 2012). Estas fases líquidas se forman generalmente por la incompatibilidad mutua de dos polímeros o un polímero y una sal en solución acuosa. Sin embargo, una de los principales áreas de oportunidad de esta técnica es la difícil regeneración de los componentes de formación de las fases y su reciclaje (Iqbal *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha investigado la extracción *in situ*, también denominada fermentación extractiva, esta proporciona un entorno inocuo para la separación y purificación de diversos bioproductos. Esta metodología nos permite producir el producto de interés y recuperarlo al mismo tiempo, aumentando así la productividad del bioproceso (Zhu, Yan, *et al.*, 2007). Sin embargo, para poder generar las fases para la separación del producto casi siempre se debe de utilizar solventes que pueden llegar a ser tóxicos para los microorganismos. Para evitar este fenómeno, se ha investigado el empleo de polímeros de separación térmica para la formación de la fase extractiva. Estos polímeros tienen la

propiedad de cambiar drásticamente su solubilidad en agua debido a la temperatura, dividiéndose en dos fases inmiscibles cuando se incuban por encima de su temperatura de solución crítica más baja (LCST). Los co-polímeros oxido de etileno (EO) y Oxido de propileno (PO) (EOPO) son polímeros termosensibles, y se han aplicado exitosamente para la recuperación de biomoléculas (Rico, Castro, *et al.*, 2017).

La creciente demanda de los EPS hace necesario el desarrollo de una plataforma eficaz y barata para producir este tipo de compuestos a una mayor escala. Además, es importante que se aborde una estrategia con miras a mejorar las condiciones de producción y recuperación de estos productos.

En este proyecto se busca aumentar el rendimiento de un exopolisacárido sintetizado por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L mediante el diseño de una metodología de fermentación extractiva. Ya que si se quiere llevar este EPS hacia una posible comercialización es necesario rebajar los costos de producción, lo primero es saber si el cambio de un medio de cultivo mas simple afecta la producción de biomasa y EPS , después en la parte de diseño de la fermentación extractiva se necesita saber como se va a comportar el cultivo en cuanto a viabilidad, generación de biomasa y de EPS con el EOPO, así como saber las diferentes temperaturas y concentraciones necesarias con el EOPO y el cultivo para saber si esto puede ser una metodología viable para aumentar los rendimientos de producción de EPS

## **CAPITULO 2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Biopolímeros**

El término biopolímero, también llamados polímeros renovables, se utiliza para describir polímeros producidos por sistemas biológicos a partir de materiales biológicos tales como aminoácidos, azúcares y grasas naturales (Tang, Kumar, *et al.*, 2012). Por consiguiente, los biopolímeros se pueden clasificar como polímeros naturales. Los biopolímeros cuentan con ventajas sobre los polímeros derivados de la petroquímica en varios aspectos como la biocompatibilidad y la biodegradabilidad (Poli, Di Donato, *et al.*, 2011) convirtiéndolos en una alternativa para evitar efectos negativos posteriores como toxicidad, difícil degradación y la acumulación de residuos.

Estos biopolímeros generalmente pueden producirse mediante bacterias, estas usan los biopolímeros como materiales de almacenamiento en respuesta a tensiones ambientales particulares (Garcia, Lagaron, *et al.*, 2010). Los polisacáridos producidos por microorganismos pueden clasificarse en tres grupos principales según su ubicación en la célula (Donot, Fontana, *et al.*, 2012): polisacáridos citosólicos, que proporcionan una fuente de carbono y energía para la célula, polisacáridos que forman la pared celular, incluidos los peptidoglicanos, y los lipopolisacáridos, polisacáridos que se secretan al ambiente extracelular en forma de cápsulas o biofilm, conocidos como exopolisacáridos (EPS).

### **2.1.1 EPS**

En la naturaleza, los EPS tienen un papel importante para la protección de los microorganismos, como la adhesión de las bacterias a las superficies y la participación en las interacciones célula-célula, además sirven para protección en condiciones de estrés abiótico que puede incluir la temperatura, la intensidad de la luz o el pH (Donot, *et al.*, 2012; Nicolaus, Kambourova, *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha aumentado el interés hacia los EPS microbianos, por sus diversas propiedades estructurales y funcionales. Los EPS son recursos utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y química, debido a sus propiedades fisicoquímicas y reológicas. Los EPS microbianos se han empezado a aplicar como nuevos biomateriales y se les han encontrado una amplia gama de aplicaciones en muchos sectores industriales como, detergentes, adhesivos, tratamiento de aguas residuales, elaboración de la cerveza, cosmetología, farmacología y aditivos alimentarios (Rühmann, Schmid, *et al.*, 2015).

### **2.1.2 Aplicaciones de los EPS de Levaduras**

Aunque los EPS de levaduras no han sido tan estudiados como los de bacterias, estos también cuentan con propiedades muy interesantes en su aplicación en la industria, en particular su capacidad para formar soluciones densas en el medio acuático. Los EPS producidos por levaduras se pueden separar más fácilmente del medio de cultivo que los producidos por bacterias, por lo que son atractivos para la producción a gran escala (Pavlova, Koleva, *et al.*, 2004b).

El potencial de los EPS se manifiesta en la posibilidad de su uso como espesantes y estabilizantes tanto en alimentos como en cosméticos. Por lo tanto, parámetros físicos como propiedades reológicas, estabilidad en emulsiones y su capacidad de unirse al agua, son esenciales para su aplicación. El EPS producido por *Sporidiobolus salmonicolor* AL1 aumenta la eficacia de la formación de emulsiones y su estabilidad en las lociones

(Kuncheva, Pavlova, *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el uso del EPS de *Cryptococcus laurentii* como aditivo alimentario reduce la concentración de colesterol y triglicéridos en el suero sanguíneo, esta tecnología fue patentada en 2002 (Ananeva, 2002).

### **2.1.3 Factores en el medio de cultivo que afectan la producción del EPS de levaduras**

Los factores que afectan a la cantidad de EPS producido por las levaduras incluyen la composición del medio, en particular la fuente de carbono y nitrógeno, el pH, así como las condiciones de cultivo: temperatura, oxigenación, agitación, cantidad de inóculo y tiempo de cultivo (Sutherland, 2007).

El medio adecuado para la biosíntesis de los EPS debe contener fuentes biodisponibles de carbono y nitrógeno. Las fuentes de carbono son monosacáridos en forma de pentosas y hexosas, así como disacáridos. La cantidad que producen las levaduras de EPS varía en medios que contienen glucosa, sacarosa, xilosa, ribosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa y trehalosa (Rusinova, Pavlova *et al.*, 2011). Pero según estos autores la sacarosa se considera la fuente de carbono óptima para la producción de EPS. En un estudio previo se observó que un medio que contiene sacarosa a una concentración del 4%, *Sporidiobolus salmonicolor* AL1 y *Cryptococcus laurentii* AL36 producen más de 5 g/L de EPS (Pavlova, Koleva, *et al.*, 2004a). La glucosa, es la fuente asimilable más rápida de carbono, sólo que en concentraciones idénticas que la sacarosa, reduce la cantidad producida de EPS. De forma similar, las cepas del género *Cryptococcus* prefieren mucho más la sacarosa que la glucosa, como se evidencia por una eficiencia de la biosíntesis de EPS más de 3 veces superior (Gientka, Blazejak, *et al.*, 2015). Entre las fuentes de carbono residual que pueden ser un sustrato de carbono en los medios para la síntesis de EPS, se ensayaron melazas. Las levaduras demostraron un gran aumento de la biomasa, produciendo hasta 15 g/L con una concentración de 5% de melazas, sin embargo, la síntesis de EPS ocurrió a un nivel muy bajo solo de 2 g/L comparado con los demás medios (Grigorova, Pavlova, *et al.*, 1999).

Se ha estudiado el empleo de diversas fuentes de nitrógeno como peptona, extracto de levadura, así como fuentes inorgánicas en forma de sales de amonio o nitratos. Las mayores cantidades de EPS se obtuvieron en medios que contenían 0.2% a 0.25% de sulfato de amonio (Gientka, Blazejak, *et al.*, 2015). El uso de sales de amonio dio como resultado una mayor concentración de biomasa, pero una reducción en la eficiencia de la biosíntesis del EPS.

Otro factor que determina la eficiencia de la biosíntesis del EPS, además de la fuente de carbono y nitrógeno, es su relación molar. Se encontró en un estudio realizado en *Rhodotorula glutinis* que esta levadura es capaz de producir la mayor cantidad de EPS cuando la relación C: N es de 15: 1 (Cho, Chae, *et al.*, 2001). Una relación C: N más alta en el medio causó una activación del mecanismo de acumulación de otras sustancias de reserva, incluyendo grasas.

#### **2.1.4 EPS de *Rhodotorula*.**

Se ha documentado la producción del EPS en varias especies de *Rhodotorula*, a continuación, se muestran cuáles han sido las más relevantes y cuales han sido los estudios realizados en cada una de estas especies.

La investigación de Simova y colaboradores (2004) involucró el uso de *Rhodotorula rubra* y un cultivo de iniciador de yogur en un medio que contenía suero de queso. En dicha investigación se desarrolló un proceso de producción de bajo costo para la generación del EPS (Simova, Frengova, *et al.*, 2004b). *Rhodotorula rubra* es la única especie de *Rhodotorula* frecuentemente aislada de fuentes humanas. A diferencia de las propiedades beneficiosas de los polisacáridos extracelulares, es posiblemente una de las únicas especies de *Rhodotorula* que puede causar infección (Simova *et al.*, 2004a).

En otro estudio se investigaron los efectos de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en la síntesis de EPS por *Rhodotorula acheniorum* MC. Los valores más altos de producción de EPS (6.6 g/L) se obtuvieron en un medio suministrado con 5% de sacarosa (Grigorova *et al.*, 1999).

Las condiciones del medio para la producción del EPS en *Rhodotorula mucilaginosa* YR-2 ya han sido estudiada por Jun y colaboradores en 2004, encontrándose que la temperatura de cultivo fue de 30°C en medio con sacarosa y sulfato de amonio llegando a producir hasta 7.8 g/L de EPS (Jun, 2004).

## **2.2 Purificación del EPS**

El método específico utilizado para la recuperación del EPS del caldo de cultivo depende de las características de los organismos productores, del tipo de exopolisacárido y del grado de pureza requerido (Freitas, Torres, *et al.*, 2017). El caldo de cultivo puede ser simplemente deshidratado, produciendo de este modo un producto crudo que puede encontrar uso en algunas aplicaciones, pero no es adecuado para áreas de alto valor. Por lo tanto, el procesamiento “downstream” implicará varios pasos, comenzando con la eliminación de células por centrifugación o filtración, seguido por la recuperación del polímero del sobrenadante sin células. Un procedimiento frecuentemente utilizado para la etapa posterior es la precipitación del EPS mediante la adición de un disolvente no polar miscible en agua, tal como acetona, etanol o isopropanol (Trabelsi, Slima, *et al.*, 2015).

El precipitado puede separarse fácilmente de la mezcla de disolvente-agua y secarse. Se pueden utilizar varios procedimientos adicionales para eliminar los contaminantes como por ejemplo, la re-precipitación con soluciones acuosas diluidas, la desproteínización, mediante métodos químicos o enzimáticos y procesos de membrana (Guo & Chi, 2017). Sin embargo, los métodos tradicionales utilizan una gran cantidad de solventes además la forma de producción de los EPS es por lotes, lo que con lleva que la biomasa que se produjo se desperdicie, además de que el proceso con lleva mas tiempo si se compara con un cultivo semi-continuo o continuo.

### 2.2.1 Sistema de Dos Fases Acuosa (ATPS) y Fermentación Extractiva

Los sistemas de dos fases acuosa (ATPS por sus siglas en inglés) es un método de fraccionamiento líquido-líquido para la separación de biomoléculas que reduce el número de pasos y reduce el costo general del bioproceso. El método se basa en la diferencias de solubilidad de dos soluciones acuosa, presentando ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales tales como bajo costo, uso de solventes de bajo impacto ambiental, factibilidad para operación continua, fácil escalamiento y una atractiva eficiencia para la concentración y purificación de biomoléculas (Iqbal *et al.*, 2016). Se muestra un esquema general de un ATPS en la Figura 1, separando los productos deseados en una fase y los indeseados en otra fase. Los ATPS ofrecen un entorno biocompatible para el aislamiento de productos biotecnológicos debido a la presencia de un alto contenido de agua en ambas fases, lo cual es de importancia para su aplicación en varios campos de la biotecnología como la recuperación de proteínas, enzimas, productos biofarmacéuticos y la fermentación extractiva (Raja *et al.*, 2012).

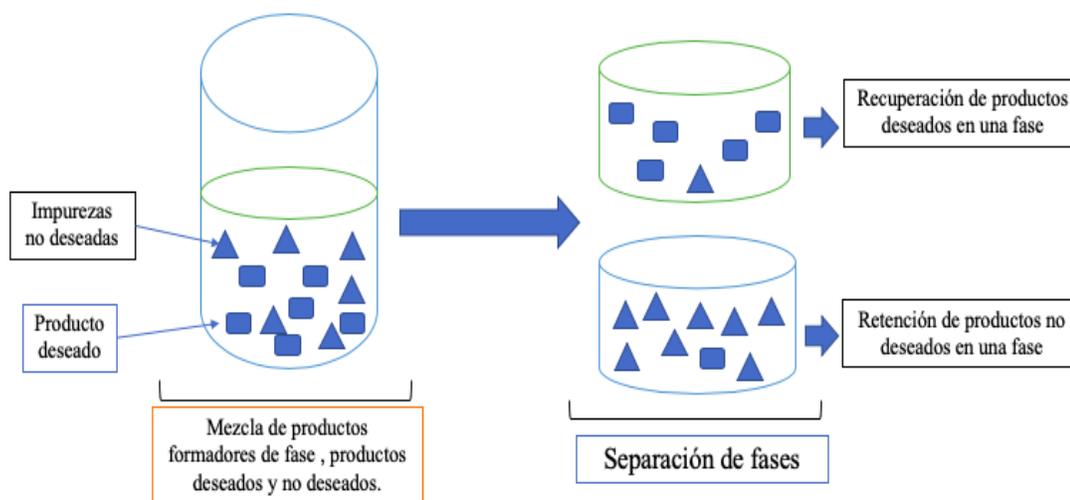


Figura 1. Esquema general de proceso de recuperación con un sistema ATPS.

Los sistemas mas utilizados para lograr las dos fases son (Yau *et al.*, 2015): polímero/sal, polímero/polímero, liquido iónico/sal, alcohol de bajo peso molecular/sal.

En los ATPS, el perfil de partición de los componentes depende de diferentes interacciones fisicoquímicas entre el material a separar y los productos químicos de formación de fase. Las interacciones como las fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, los efectos estéricos, la hidrofobicidad, así como los efectos conformacionales entre los componentes de la fase y las sustancias contribuyen a la partición de la sustancia particular (Raja *et al.*, 2012). Para lograr un proceso de separación efectivo, el comportamiento de partición de la biomolécula en ATPS puede verse afectado al cambiar los pesos moleculares y el tamaño de los polímeros, el tipo y la composición de los componente de fase, la temperatura del sistema y el pH del sistema (Phong, Show, *et al.*, 2018).

Se ha demostrado la posibilidad de sustituir procesos de precipitación de dos pasos que consumen mucho tiempo por una simple extracción mediante ATPS. En el trabajo de Nitsawang *et al* (2006) se comparo la purificación de papaína de *Carica papaya*, poniendo a prueba una precipitación de sal de dos etapas contra una recuperación con ATPS PEG / sulfato de amonio. Usando este último sistema, se obtuvo una mayor recuperación (88%) y pureza (100%), llegando a la conclusión que el ATPS era el mejor método.

Una de las aplicaciones de sistema ATPS es su uso combinado con la fermentación para la recuperación de productos *in situ*, generándose así la fermentación extractiva. Esta metodología consiste en integrar la separación con la producción extracelular del producto para aumentar el rendimiento global (Raja *et al.*, 2012). Esto es de importancia ya que los productos de fermentación pueden causar inhibición, toxicidad e inestabilidad del producto final. Por consecuencia si se quiere obtener una alta concentración del producto final, la metodología de la fermentación extractiva lo hace factible. Además, la fermentación extractiva implica la eliminación continua de producto de su sitio de producción (caldo de fermentación) a la fase acuosa opuesta, lo cual ocurre simultáneamente durante la producción del metabolito (Ooi, Hii, *et al.*, 2011). Por lo tanto, el producto de interés se puede extraer del sistema en un solo paso sin realizar la recuperación de la biomasa mediante otras operaciones unitarias o mediante la interrupción del bioproceso (Iqbal *et al.*, 2016). Debido a las limitaciones de los sistemas

ATPS convencionales, como por ejemplo la dificultad para reciclar los componentes por los cuales se forman las dos fases no se han logrado aplicar a una gran cantidad de bioprocesos.

### **2.2.2 Polímeros Termosensibles**

Para poder superar estos problemas se ha investigado el uso de los llamados polímeros termosensibles (TSP) para la formación de dos fases, que son polímeros que cambian sus propiedades físicas cuando se les someten a una cierta temperatura y concentración crítica, generando así las dos fases (Matanović, Kristl, *et al.*, 2014). Los polímeros termosensibles se discutieron por primera vez a principios de la década de 1990, donde se descubrió que podían formar las dos fases junto con dextrano (Berggren, Johansson, *et al.*, 1995). La ventaja de estos sistemas es que una de estas dos fases contiene un alto contenido de agua (70–90% v/v) que proporciona un ambiente ideal para la separación de bioproductos sensibles sin causar su desnaturalización (Yau *et al.*, 2015). Además, la transferencia de masa también se ve facilitada por la gran área de contacto interfacial debido a la baja tensión entre las dos fases. Con esta estrategia, el producto objetivo puede recuperarse exclusivamente en la fase acuosa y los polímeros pueden reciclarse y reutilizarse fácilmente ya que cuando se separan las dos fases podemos obtener directamente los polímeros termosensibles (Chen *et al.*, 2014). Por lo tanto, el uso de los polímeros termosensibles es una solución viable para la demanda industrial de tecnología de bioseparación a gran escala rentable y altamente eficiente con un tiempo de procesamiento corto (Ferreira, Azevedo, *et al.*, 2008).

En comparación con las técnicas convencionales de extracción de ATPS que consumen una gran cantidad de disolventes volátiles y tóxicos, los componentes termosensibles formadores de las dos fases son generalmente seguros, no inflamables, no tóxicos y relativamente inocuos para el medio ambiente (Li & Peeples, 2004). A parte de la fácil separación de fases, se ha observado que tiene buenos resultados para la separación de biomoléculas (Hasmann, Santos, *et al.*, 2008). Utilizando este sistema se han podido recuperar enzimas como lipasas y lacasas de *Burkholderia cepacia* y *Peniophora cinerea* además de PHA's de *Cupriavidus necator* (Dembczyński, Białas, *et al.*, 2013; Leong *et*

*al.*, 2017; Show *et al.*, 2012b). Los TSP mas comunes que se utilizan son copolímeros aleatorios, dibloque y tribloque de óxido de etileno hidrófilo (EO) y óxido de propileno (PO), denominados copolímeros EOPO. Otros ejemplos de TSP incluyen poli (N-isopropilacrilamida), poli (vinilcaprolactama), etil hidroxietilcelulosa y surfactantes no iónicos (Persson, Kaul, *et al.*, 2000).

Las propiedades que se deben de tomar en cuenta al diseñar la fermentación extractiva con el EOPO dependen de varios factores, como su relación de oxido de etileno (EO) y Oxido de propileno (PO), el peso molecular del EOPO, a que temperatura se va a llevar acabo la fermentación, si se van a agregar sales al medio y cuantas veces se tiene como objetivo reutilizar los polímeros sin que esto afecte al cultivo o la pureza de los productos a separar.

#### **2.2.2.1 Relación oxido de etileno (EO) y Oxido de propileno (PO)**

La relación entre los polímeros es uno de los factores por los cuales se ve afectado el comportamiento del EOPO en solución. Con el cambio de relación EO / PO, los copolímeros de EOPO que tienen un mayor contenido de PO se vuelven más hidrófobos, más viscosos y tienen un Clouding Point (CP) o punto de formación de las dos fases más bajo, ya que los monómeros de PO tienen una cadena de hidrocarburo más larga (Berggren *et al.*, 1995). Por ejemplo en un estudio llevado acabo por Show y colaboradores en el 2012 realizando un fermentación extractiva probando diferentes relaciones de EOPO pudieron obtener lipasa con una rendimiento de 9.8 – 48 ( U/mL) dependiendo del EOPO que se probó (Show *et al.*, 2012b).

#### **2.2.2.2 Peso Molecular**

La hidrofobicidad de los copolímeros aumenta conforme aumenta el peso molecular debido al aumento en la proporción de áreas de contacto hidrofóbicas respecto al grupo hidrofílico (Matanović *et al.*, 2014), Además, se requiere una concentración más baja para formar los ATPS para el copolímero de alto peso molecular. Los copolímeros de EOPO

aleatorios con alto peso molecular dan como resultado una generación de las dos fases con temperatura mucho mas baja (Rabelo, Tambourgi, *et al.*, 2004).

En un trabajo de (Zhu *et al.*, 2007) se vio que en un sistema para recuperar la L-asparaginasa en un sistema de PEO-PPO-PEO / fosfato se obtuvo un rendimiento mayor del 73.3%, con una actividad específica 94.8 U / (mg de proteína) comparado con una precipitación con solventes convencional. En otro estudio donde se comparó EOPO 970 y 3900 ( siendo 970 de cadena mas corta y 3900 de cadena mas larga) se observó que el primero necesitaba concentraciones más altas de EOPO para formar las dos fases , lo cual causaba precipitación de algunos componentes del sistema afectando el factor de purificación (Ng *et al.*, 2012).

### **2.2.2.3 Temperatura**

La temperatura es un factor critico para el sistema de separación térmica, ya que ésta afecta las concentraciones de los polímeros en cada fase, así como la recuperación de los materiales. Una baja temperatura es ventajosa ya que se minimiza el riesgo de desnaturalización de ciertas biomoléculas en la separación de fases (Ferreira *et al.*, 2008). Una alta temperatura puede inhibir o desnaturalizar biomoléculas termosensibles que se quieran separar (Rabelo *et al.*, 2004).

En la termoseparación, la concentración de polímeros en la fase rica en polímeros se vuelve más alta a medida que aumenta la temperatura, lo que conduce a una reducción en el espacio disponible por unidad de volumen, causando los productos de interés se repartan en la fase acuosa (Johansson, Persson, *et al.*, 1999).

Dependiendo de las propiedades hidrofóbicas del producto a separar es hacia donde tendrá mas afinidad por una de las dos fases. Dicha afinidad se puede controlar con la temperatura y concentración del EOPO. Por ejemplo se observó que la apolipoproteína A-1 se divide fuertemente en la fase rica en polímeros a 22–32°C durante la termoseparación de sistema con HM-EOPO / agua (Persson, Johansson, *et al.*, 1999).

#### 2.2.2.4 Sales

La adición de sal juega un papel importante en la separación de los productos de interés en la termoseparación. Debido a la diversa afinidad de los iones por las diferentes fases donde los efectos dados por los aniones son más fuertes en comparación con los cationes, la adición de co-solutos como las sales en el sistema sirve como "contraiones" que mejoran la partición de bioproductos a la fase preferida (Leong *et al.*, 2016). Con el aumento de la hidrofobicidad de los aniones mediante la adición de grandes iones monovalentes, como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{ClO}_4^-$ , el coeficiente de reparto aumenta para una biomolécula cargada positivamente, mientras que disminuye para una biomolécula cargada negativamente (Berggren *et al.*, 1995).

Además, la adición de sales promoverá la diferencia de hidrofobicidad entre las fases, causando una separación mas eficiente debido a que la hidrofobicidad aumenta en la fase superior rica en agua (Teresa, Cabral, *et al.*, 2000). La caída de la temperatura en la formación de las dos fases después del aumento en la concentración de sales puede explicarse por la reducción de la entropía del contraión debido a la disminución en la concentración de la diferencia entre las dos fases al aumentar la adición de sal al sistema (Jönsson & Johansson, 2003).

### 2.2.2.5 Reciclado de los Copolímeros

Como se mencionó anteriormente, los sistemas ATPS basados en la termoseparación tienen ventajas sobresalientes sobre los sistemas ATPS convencionales. Los polímeros pueden reciclarse y reutilizarse debido a su característica de separación térmica en una fase acuosa y una fase rica en polímeros, cuando la temperatura supera el CP. Por su naturaleza los TSP tienden agregarse y separarse de las demás fases, ya sea la fase rica en agua y si se aumenta más la temperatura los TSP se podrían concentrar de una forma que permita su recuperación de todos los demás productos de la fermentación.

Esta característica no solo es más ecológica, si no que además permite bajar el costo del procesamiento posterior si la separación de los productos objetivo se hace exclusivamente en la fase rica en agua, lo cual también hace que la recuperación sea más eficiente (Persson *et al.*, 2000).

Según el estudio de Persson y colaboradores (2000) el copolímero con mayor contenido de PO se puede separar del agua de manera más eficiente. Mientras que la recuperación del polímero es mejor con el copolímero de masa molecular más alta. El aumento de la recuperación del polímero puede ser de hasta el 90% con la temperatura de separación térmica y un tiempo de formación de las dos fases de 10 a 15 minutos. En el estudio se logró la recuperación de lisozima utilizando el sistema EO50PO50/Reppal PES 100, donde las proteínas mostraron un comportamiento de recuperación constante a lo largo de los tres ciclos, pudiendo recuperar entre un 77-80% del EOPO en cada ciclo.

En la mayoría de los estudios donde se someten a reciclaje los copolímeros, el rendimiento y la pureza disminuyen después de los ciclos de reciclaje debido al aumento de la cantidad de contaminantes en la fase inferior después de cada ciclo (Asenjo & Andrews, 2012). Por lo tanto, se recomienda que el copolímero EOPO solo pueda reciclarse y reutilizarse dos veces, siguiendo las observaciones a partir del procesamiento de ciclodextrina (Ng *et al.*, 2012), ciprofloxacina (Chen *et al.*, 2014) y de PHA's (Leong *et al.*, 2017).

Hay algunas excepciones tanto en los estudios de extracción de lisozima (Dembczyński, Białas, Regulski, *et al.*, 2010) como en un estudio de recuperación de lipasa por (*Show et al.*, 2012b). En dichos estudios se demostró que la pureza y el rendimiento son bastante constantes en cada ciclo, independientemente de la alta acumulación de proteínas que se acumulan en la fase inferior a lo largo de 4 ciclos consecutivos de recuperación del TSP. Además, también se ha demostrado que el reciclaje de ambas fases es posible cuando los sistemas de ATPS están formados por dos polímeros termosensibles diferentes y que es posible reciclar el TSP al menos tres veces sin una disminución significativa en el rendimiento y la pureza (Phong *et al.*, 2018).

## **CAPITULO 3**

### **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

La implementación de la fermentación extractiva con EOPO al proceso de recuperación de EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L permitirá aumentar la recuperación y purificación del EPS a un menor costo.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo General**

Diseñar una metodología que permita mejorar la recuperación y purificación del exopolisacárido del medio de cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L por fermentación extractiva.

##### **3.2.2 Objetivos Particulares**

1. Determinar el tiempo máximo de producción de biomasa y EPS en fermentación sumergida con medio YM y medio mineral
2. Medir la viabilidad de los cultivos obtenidos mediante fermentación extractiva con EOPO a diferentes concentraciones.
3. Determinar el tiempo y temperatura de formación de fases en la fermentación extractiva para la recuperación del EPS.
4. Determinar la recuperación de biomasa y EPS en cada fase de la fermentación extractiva.

5. Realizar un análisis comparativo en los costos de purificación para discernir si la fermentación sumergida resulta más atractiva que la fermentación extractiva.

### **3.3.3 Aportación Científica**

La aportación científica de este trabajo es el diseño de un protocolo para el cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L mediante la técnica de fermentación extractiva para la producción de un exopolisacárido y su recuperación *in situ*. El uso de esta metodología busca probar soluciones hacia los problemas de reducir los costos asociados al bioproceso en la parte del “downstream”, que es la parte más costosa de un bioproceso, mientras se busca aumentar los rendimientos de producción del exopolisacárido.

## CAPITULO 4

### MATERIALES Y METODOLOGIA

#### 4.1 Plan de Trabajo del Proyecto de Investigación



#### 4.2 Disposición de residuos

Los residuos generados durante el proceso de este proyecto de investigación se dispusieron y clasificaron de acuerdo con sus características y a los reglamentos establecidos por la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UANL. El Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas se asegurará de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos de acuerdo con los procedimientos para la clasificación de estos siguiendo el formato PR-CLB-SRR/000.

#### 4.3 Materiales

Micro pipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$  marca LabNet, puntillas para micropipeta marca Eppendorf, tubos para microcentrífuga de 1.5 mL marca Fisher Scientific, filtros de celulosa de diámetro de poro 0.45  $\mu\text{M}$  marca AHLSTROM, matraces Erlenmeyer 50, 125, 250 y 500 mL marca Pyrex, tubos para centrífuga 15 y 50

mL marca Corning, pipetas desechables de 10 y 5 mL marca Thermo Scientific, pipeteador marca BEL-ART, parafilm marca Bemis.

#### **4.4 Reactivos**

Medio de cultivo YM marca Sigma, solución de azul de metileno al 1%, etanol al 96 % marca Desarrollo de Especialidades Químicas, sales minerales: fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) marca Baker, sulfato de magnesio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) marca Baker, cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) marca Desarrollo de Especialidades Químicas, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}$ ) marca Baker, cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) marca Merck, sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) marca Baker, dextrosa marca Productos Químicos Monterrey, poly (ethylene glycol-ran-propylene glicol) MW 12,000 marca Sigma, poly (ethylene glycol-ran-propylene glicol) MW 970 marca Sigma.

#### **4.5 Equipos**

Cámara de flujo laminar marca Prendo, cámara de flujo laminar marca LABCONO, incubadora marca LabTech, centrifuga marca Thermo Scientific, concentrador marca Thermo Scientific, vortex marca Thermo Scientific, balanza analítica marca OHAUS, balanza analítica marca Thermo Scientific, cámara de Neubauer marca Supe Rio, microscopio marca ZEISS.

#### **4.6 Realización del Proyecto**

Este proyecto fue realizado dentro de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología 3 de la División de Posgrado, así como en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN), los dos laboratorios pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

#### 4.7 Determinar el efecto del cambio de medio de cultivo en la generación del EPS

La caracterización se llevó a cabo partiendo de una placa de cultivo puro de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. Como se muestra en la Figura 2 se tomó una asada del microorganismo en campana de flujo laminar y se inoculó en matraces de 100 mL con 50 mL de cultivo YM. El cultivo se mantuvo por 3 días a 30°C y 250 rpm, refiriéndose de ahora en adelante estas condiciones en el trabajo como las condiciones estándar. Después de los 3 días, se tomaron 10 mL de cultivo y se colocaron en 2 matraces con 100 mL de medio YM cada uno, incubándolas por tres días en las condiciones estándar para obtener el cultivo inicial.

Posteriormente, se prepararon 3 matraces con 100 mL de medio YM y 3 matraces con 100 mL de medio mineral, utilizando los componentes y concentraciones para el medio de la Tabla 1.

Tabla.1 Composición del medio mineral

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Cloruro de Amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	2 (g/L)
Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1 (g /L)
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	0.5(g /L)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0. 1 (g /L)
Cloruro de Calcio (CaCl)	0.1 (g /L)
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> )	0.005 (g /L)
Sacarosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	100 (g /L)

Como se muestra en la Figura 2, se inocularon 20 mL del cultivo inicial en los medios mineral y YM. Para el cultivo, se incubaron por 7 días en condiciones estándar. A partir de las 24 horas de la inoculación de los medios se tomaron muestras de 5 mL de suspensión celular cada 24 horas en tubos falcón de 50 mL para la caracterización de la biomasa y el EPS generado.

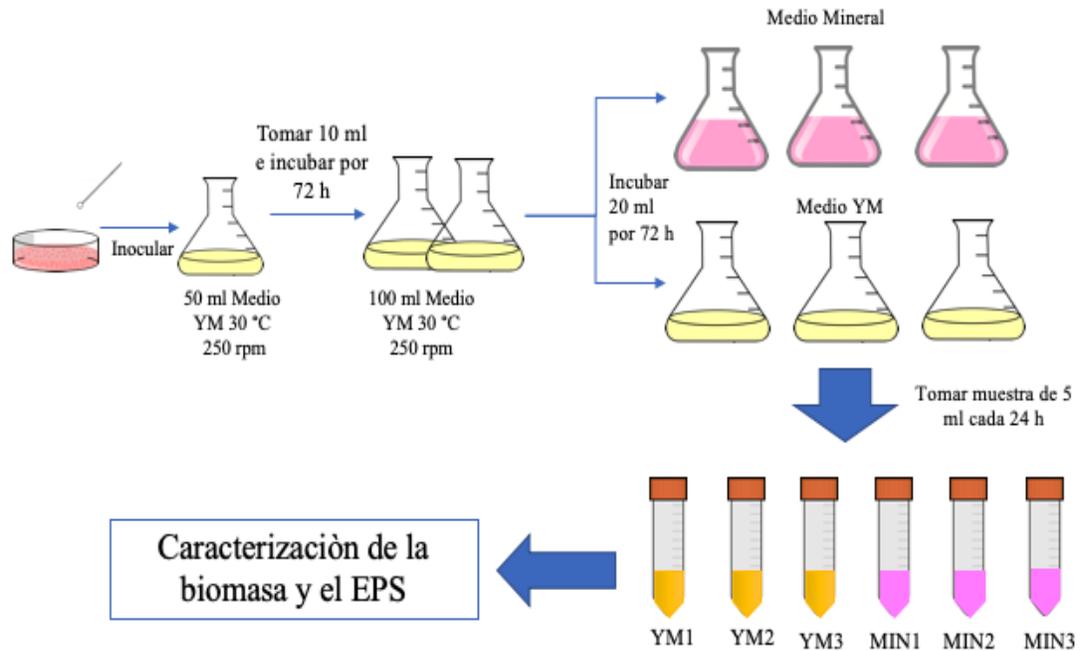


Figura 2. Metodología seguida para la inoculación y muestra de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en diferentes medios.

#### 4.7.1 Recuperación de la biomasa y el EPS

Como se muestra en la Figura 3, los 5 mL de suspensión celular contenida en los tubos falcón fueron centrifugados a 9,500 rpm por 20 min a 4°C. Después, el sobrenadante se transfirió a otro tubo falcón de 50 mL y la biomasa se conservó a una temperatura de -20°C para su posterior secado. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.2 µM. Posteriormente, se agregaron 2 volúmenes de etanol al 96% por cada volumen de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se guardó por 12 horas a -20°C para lograr la precipitación del EPS. Al término del tiempo de almacenamiento, se volvió a centrifugar la mezcla a 9,500 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet se lavó 2 veces con etanol al 70 % para purificar

el EPS. Entre cada lavado, se centrifugó a 9,500 rpm por 20 min a 4 °C, desechando en cada lavado el sobrenadante. Al finalizar el último lavado, se desechó el sobrenadante y el pellet se secó por evaporación del etanol restante a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos.

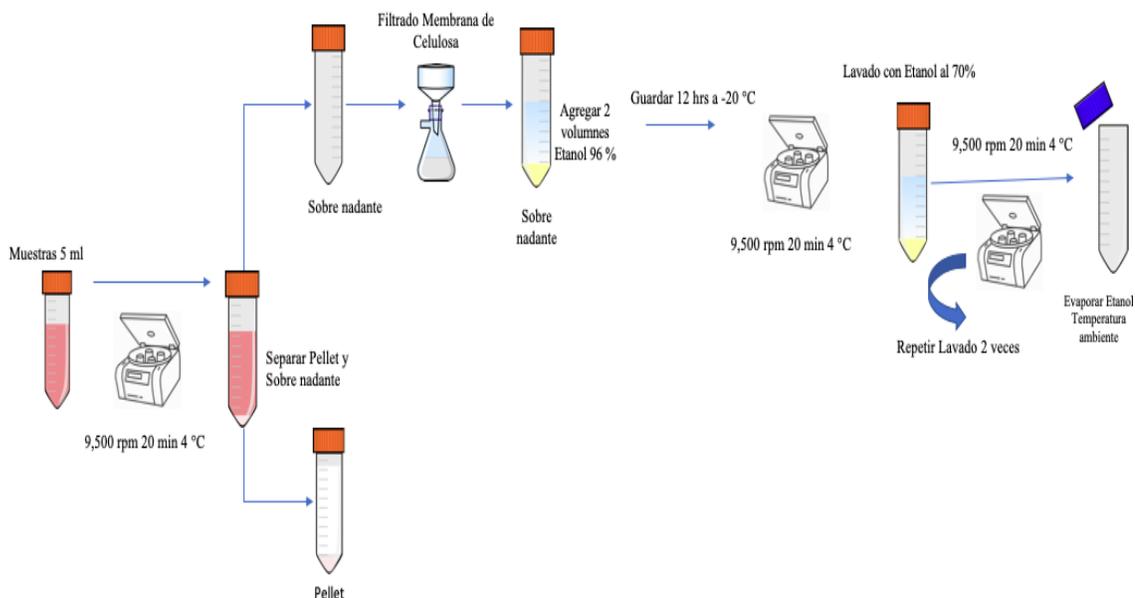


Figura 3. Protocolo empleado para la recuperación de la biomasa y el EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001 L

#### 4.7.2 Concentrado y pesaje de la biomasa y el EPS

Una vez obtenidos los pellets de la biomasa y el EPS, se evaporó el contenido de agua de los pellets para determinar el peso seco de la muestra, como se puede observar en la Figura 4. El secado se realizó mediante el concentrador modelo Integrated SpeedVac (ThermoFischer), a una temperatura de 45 °C y presión de 5 Thors con un tiempo de corrida de 6 horas. Transcurridas las 6 horas, los pellets se pesaron en una balanza analítica. Para realizar esto, primero se pesó cada vial sin el EPS en la balanza analítica y se ajustó ese peso en la balanza analítica para que fuera el peso inicial, después se pesó el vial con el EPS y la diferencia de peso dada por la balanza fue lo que se tomó como el peso del EPS.

Para determinar cual medio era el que permitía obtener una mayor producción de EPS, se tomó en cuenta los resultados de las muestras purificadas y se multiplicó lo que tenía en cada muestra por 200 para saber cual era todo el contenido del EPS en ese momento en el medio de cultivo.



Figura 4. Procesamiento de las muestras de biomasa y EPS con el concentrador y su posterior pesaje.

### 4.7.3 Pruebas de viabilidad con el EOPO

Se tiñeron las levaduras con azul de metileno para conocer la viabilidad de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L con el EOPO con un peso molecular de 12,000 y 970. Primero, se obtuvieron 2 cultivos iniciales de 100 mL en medio YM cultivado durante 3 días en condiciones estándar. Luego se inocularon 10 mL de este medio por duplicado en 100 mL de medio mineral y YM sin EOPO como medios control. Para el EOPO con un peso molecular de 12,000 se inocularon por duplicado 10 mL del cultivo inicial en 100 mL en medio mineral con 20 % y 30 %, de EOPO (v/v). Para el EOPO con un peso molecular de 970, se inocularon por duplicado en 100 mL de medio mineral cada una de las siguientes concentraciones: 10%, 20%, 30%, 40% y 50% (v/v) siguiendo la metodología descrita en la Figura 5.

Para teñir las levaduras se preparó una solución de Azul de Metileno con los componentes indicados en la Tabla 2. La solución preparada se agitó durante 6 h y después

se filtró mediante una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{M}$  y se cubrió con aluminio para su almacenamiento.

Tabla 2. Composición de la solución de Azul de Metileno.

Componente	Concentración
Azul de Metileno	0.025 (g /L)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.9 (g /L)
Cloruro de Potasio (KCl)	0.04 (g /L)
Cloruro de Calcio (CaCL <sub>2</sub> )	0.04 g /L

Para la determinación de viabilidad celular se siguió la metodología de la Figura 5. Se tomaron muestras de 1 mL de cada uno de los medios control y con EOPO y se mezclaron con el azul de metileno en una proporción de 1:1. La mezcla se incubó por 15 minutos a una temperatura de 25°C. Después, se tomó 300  $\mu\text{L}$  de las muestras teñidas en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de células viables en el microscopio con el objetivo 100x.

La metodología que se siguió para realizar el conteo fue dividir los cuadrantes en 5 zonas, y contar tanto las células teñidas con azul como las que no mostraron tinción para sacar la proporción de viabilidad. Utilizando la Ecuación 1.

$$[C] = \frac{CC}{Cc} \times TC \times FD \times 10,000 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

[C]: Concentración celular      TC: Total de cuadrantes  
 CC: Células contadas            FD: Factor de dilución  
 Cc: Cuadrantes contados

La viabilidad se obtuvo mediante la Ecuación 2.

$$V = \frac{([C] - CA)}{[C]} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

V: Viabilidad  
[C]: Concentración celular  
CA: Células Azules

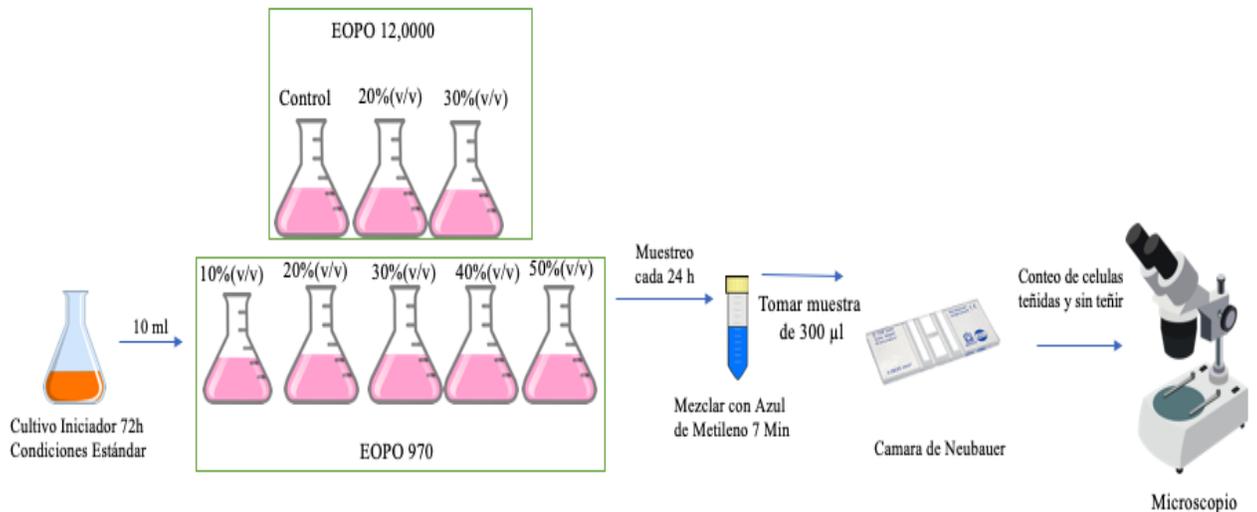


Figura 5. Metodología para la tinción de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L con Azul de Metileno y diferentes concentraciones de EOPO.

#### 4.7.4 Pruebas de generación de biomasa con el EOPO

Para las pruebas de cómo afectaba a los cultivos la adición de EOPO para realizar la fermentación extractiva, se prepararon por duplicado cultivos con 100 mL de medio mineral como se muestra en la Figura 6, con una concentración de EOPO 10, 20 y 30 % (v/v) de EOPO de un peso molecular de 12,000. Para el EOPO con un peso molecular de

970, se prepararon por duplicado cultivos con 100 mL de medio mineral con: 10, 20, 30, 40 y 50% (v/v) de EOPO.

Después, se inocularon 5 mL de un cultivo de medio YM de 50 mL incubado durante 3 días a condiciones estándar. Luego de 24 h de la inoculación de los medios se tomaron 10 mL de muestra de cada matraz cada 24 h durante una semana. Las muestras fueron después centrifugadas a 9,500 rpm durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se guardaron los pellets de biomasa a -20°C. Una vez que se obtuvieron todas las muestras éstas fueron concentradas a una temperatura de 45°C y presión de 5 Thors con un tiempo de corrida de 6 horas. Transcurridas las 6 horas los pellets se pesaron en una balanza analítica.

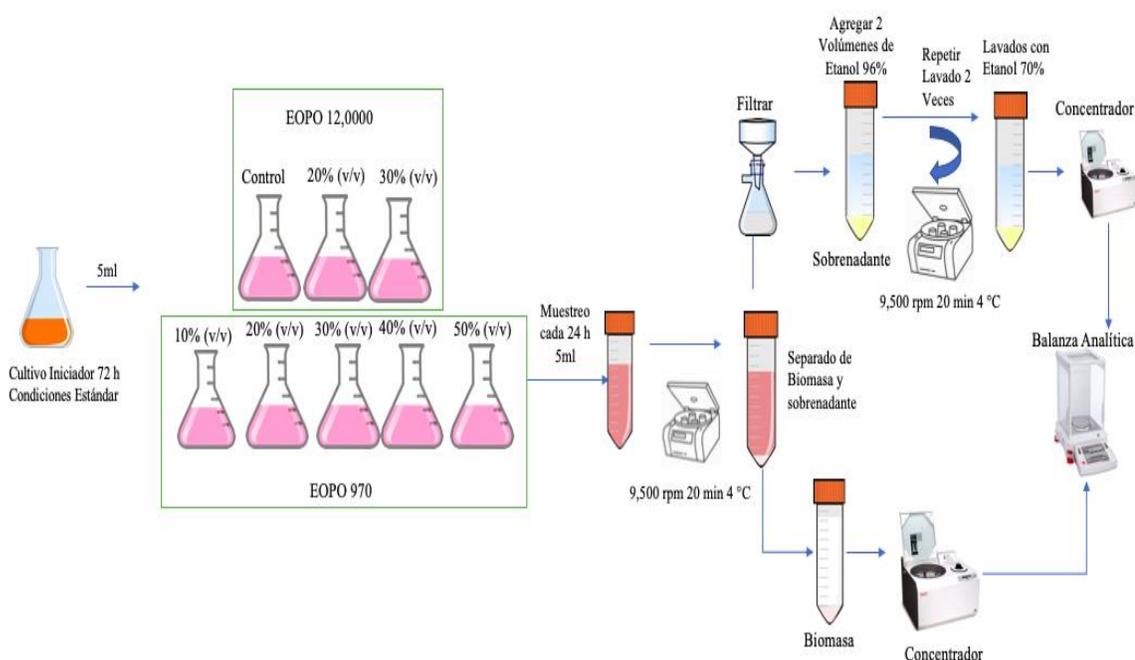


Figura 6. Pruebas de generación de biomasa con el EOPO a diferentes concentraciones.

## 4.8 Generación de dos fases con el EOPO.

Para conocer cual era la temperatura y concentración de EOPO necesaria para la generación de las dos fases, se midieron diferentes concentraciones y temperaturas. Primero se preparó un cultivo inicial de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001 L en 100 mL de medio mineral en condiciones estándar durante 3 días. Luego, se inocularon 12 matraces con 50 mL de medio mineral con 5 mL del cultivo iniciador y se dejaron durante 5 días en condiciones estándar como se puede observar en la Figura 7. Después de los 5 días se les añadió 5 diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50% (v/v)) del EOPO 970. Se inocularon 2 cultivos sin EOPO para usarlos como medios de control. Una vez que se tuvieron los cultivos con las concentraciones de EOPO, se cultivó cada sistema a diferentes temperaturas. El cambio de temperatura se realizó colocando en una plancha térmica un vaso de precipitado Pyrex de 1,000 mL con 700 mL de agua bidestilada, la cual se llevó a una temperatura inicial de 30°C. Después, se sumergió cada matraz hasta la mitad en el agua, monitoreando con el termómetro de laser la temperatura del medio de cultivo. La temperatura del agua exterior se modificó para mantener las siguientes temperaturas de cultivo: 30, 35, 40 y 45°C. Una vez que se alcanzó la temperatura deseada, se midió el tiempo que tomó para la formación de las dos fases. Esta metodología se repitió para cada de una de las concentraciones del EOPO con el medio de cultivo.

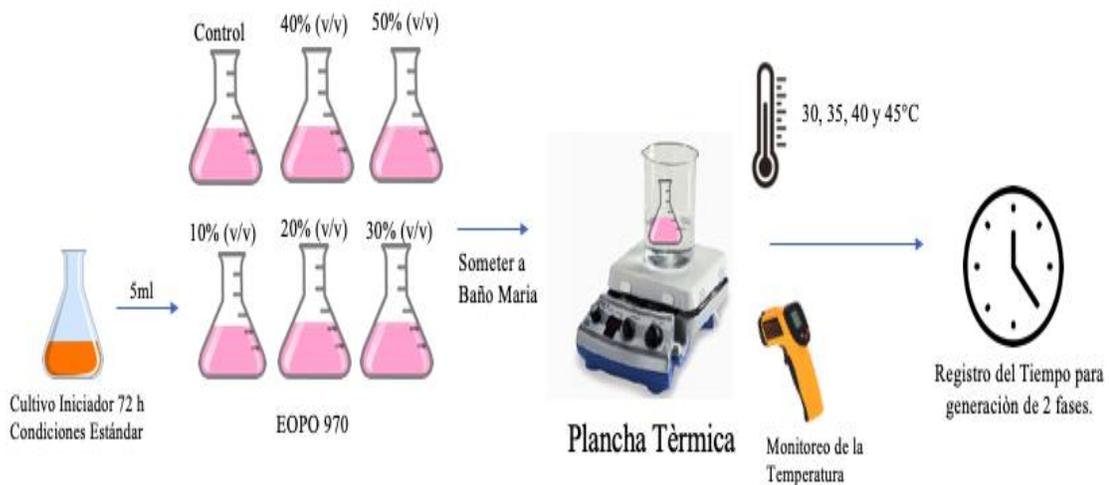


Figura 7. Metodología seguida para medir la generación de las dos fases con el EOPO a diferentes temperaturas.

## **4.8.2 Caracterización de la producción de biomasa y EPS en la fermentación extractiva con EOPO**

Conociendo la concentración de EOPO necesaria para formar las fases y para tener cultivos viables, así como la temperatura de formación de fases que no estuviera tan alejada de la temperatura de crecimiento del microorganismo, se caracterizaron la cantidad producida de biomasa y EPS, siguiendo la metodología de la Figura 8. Esto se realizó estudiando las fases obtenidas según lo descrito en la sección anterior. Brevemente, una vez que se generaron las dos fases en los cultivos, se tomó con una micro pipeta la fase superior del cultivo tratando de solo tomar esta parte. La fase superior recuperada fue vertida dentro de tubos falcón de 50 mL. La fase inferior también fue vertida dentro de tubos falcón de 50 mL. Los tubos tanto con la fase superior e inferior fueron centrifugados a 9,500 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los tubos con la fase inferior también fueron separados en 2 tubos falcón, uno con el pellet de biomasa recuperado y otro con el sobrenadante. Los tubos falcón con el sobrenadante tanto de la fase superior y la fase inferior fueron filtrados mediante una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{M}$ , a continuación, al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de etanol al 96% por cada volumen de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se guardó por 12 horas a - 20°C y al término de dicho tiempo, se centrifugó a 9,500 rpm por 20 min a 4°C. Después se paso a purificar el EPS del sobrenadante esto se realizo mediante la metodología descrita anteriormente en la sección 4.7.1.

Los tubos falcón con los pellets de biomasa y EPS de la fase inferior y superior fueron concentrados y procesados con el concentrador a una temperatura de 45 °C y presión de 5 Thors con un tiempo de corrida de 6 horas. Transcurridas las 6 horas los pellets se pesaron en una balanza analítica. Los medios utilizados como control fueron vertidos en tubos falcón de 50 mL y procesados en las condiciones anteriormente descritas en la sección 4.7.2 para separar la biomasa y el EPS.

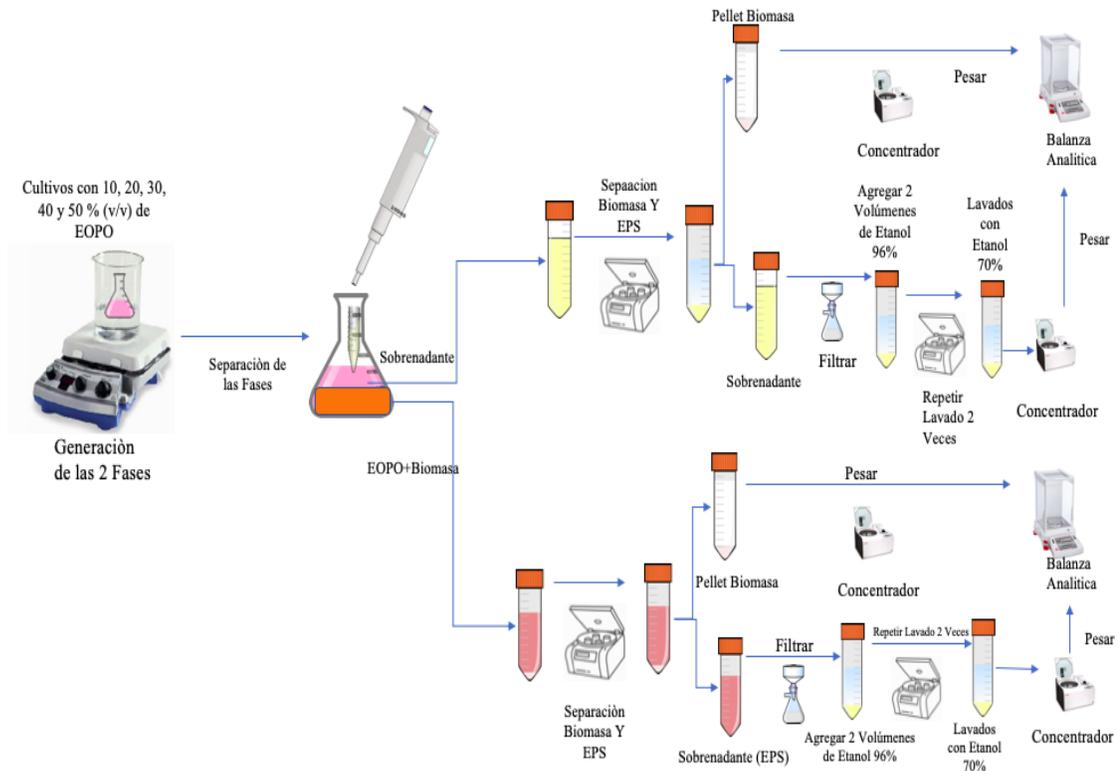


Figura 8. Pasos seguidos para realizar la caracterización de las dos fases con el EOPO.

#### 4.9 Prueba de Reciclado del EOPO.

Para poder discernir cual metodología era más eficiente a la hora de producir EPS, se realizó una prueba comparando el cultivo por lotes y el cultivo semi-continuo con el EOPO. Se partió de un cultivo inicial de medio mineral de 100 mL cultivado durante 3 días en condiciones estándar. Después, como se muestra en la Figura 9 se prepararon 6 medios minerales de 100 mL y fueron inoculados 20 mL del cultivo iniciador, 3 medios minerales fueron inoculados con una concentración de 40% de EOPO y 3 medios minerales fueron utilizados como control. Los cultivos con el 40% de EOPO fueron sometidos a una temperatura de 35°C cada 24 h durante 11 minutos aproximadamente. Una vez que se generaron las dos fases, se pasó a una campana de flujo laminar el cultivo y se retiró con una micropipeta la fase superior y se reemplazó el mismo volumen tomado por cultivo fresco. La fase superior fue transferida a un tubo falcón de 50 mL, para ser posteriormente filtrada con una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.2

$\mu\text{M}$ . Luego al filtrado se le agregaron 2 volúmenes de etanol al 96% por cada volumen de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se guardó por 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para los cultivos por lotes se espero a que los cultivos alcanzaran las 192 h, que fue el tiempo necesario para alcanzar la producción máxima de EPS en el cultivo mineral, después se separo la biomasa y el EPS del cultivo como se describe en las secciones 4.7.1 y 4.7.2

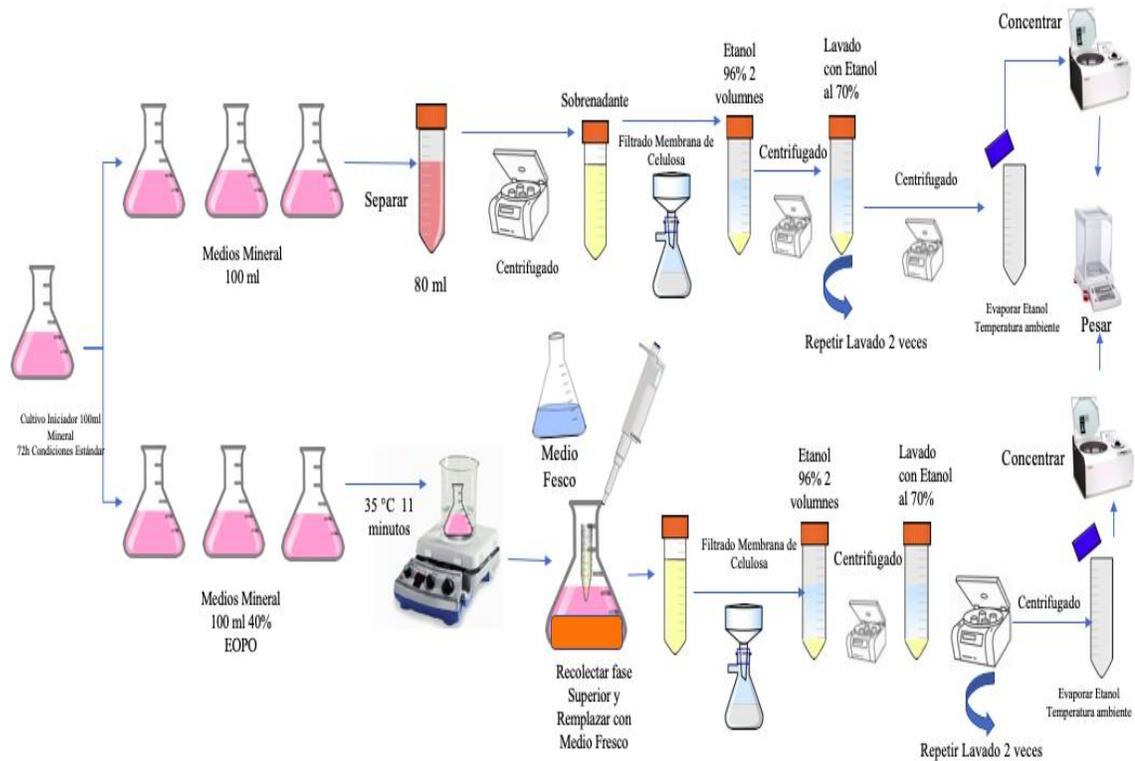


Figura 9. Metodología empleada para la prueba comparativa de un cultivo batch vs un cultivo con el EPO.

Los sobrenadantes obtenidos tanto de los medios con EPO fueron lavados, centrifugados y purificados con las condiciones descritas anteriormente en la sección 4.6.1. Una vez que se obtuvieron los pellets de EPS, se concentró y pesó el EPS con las condiciones descritas anteriormente en la sección 4.7.2.

#### **4.10 Análisis Estadístico.**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Excel, se realizó una prueba de anova de un solo factor con un alfa de 0.05 para poder discernir si había una diferencia significativa entre la producción del EPS y la biomasa con el medio mineral y el medio YM, así como la diferencia de generación de la biomasa con el EOPO 12,000 y el EOPO 970.

#### **4.11 Análisis de Costos Medios.**

Para poder determinar el costo por 100 mL de medio YM y medio mineral se cotizaron los componentes que constituyen los medios de cultivo, después se dividió el precio del material por la cantidad que se necesitaba por cada 100 mL de cada uno de los elementos del cultivo para sacar el respectivo costo de cada uno de los materiales y al final se sumaron los costos para sacar el costo por 100 mL de medio.

#### **4.12 Análisis de Costos para la Fermentación Extractiva.**

Después de realizar la fermentación extractiva y la fermentación sumergida se analizó si la fermentación extractiva fue un proceso mas económico, esto se calculó sacando los costos de utilizar la cantidad de 40% (v/v) de EOPO y el costo de utilizar la centrifuga por 25 minutos a 9,500 rpm en términos de costo de energía. Para el costo de recuperación de EPS utilizando la centrífuga después de la fermentación sumergida se investigó en el manual el consumo por hora en kW, después se sacó la relación para los 25 minutos y se multiplicó por la tarifa que la CFE maneja por minuto para saber cual es el costo resultante. Para el costo de recuperación de EPS mediante fermentación extractiva, se calculó el costo de generar 100 mL de medio de cultivo y se saco la relación por 1 mL de EOPO y se multiplicó por 40 para saber el costo por los 40 mL necesarios en el experimento.

## CAPITULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Determinación el efecto en la generación de la biomasa por el cambio de medio.

Para saber como cambió la producción de la biomasa y el EPS con el cambio de medio mineral contra un medio comercial se extrajo y purificó el EPS y la biomasa generada en los cultivos incubados en cada medio. En la Figura 10 se muestra la densidad celular obtenida en gramos de peso seco por litro de medio de cultivo para cada medio. Como se puede observar en la Figura 11, después de las 240 h de cultivo se encontró que la producción máxima de biomasa en los 2 cultivos fue de: YM: 7.22 g /L a las 168 h y del medio Mineral: 5.96 g /L a las 240 h. Según el análisis estadístico, se observó que no había una diferencia significativa (Material suplementario, Tabla 9) en la producción máxima de la biomasa alcanzada con el medio mineral y le medio YM.

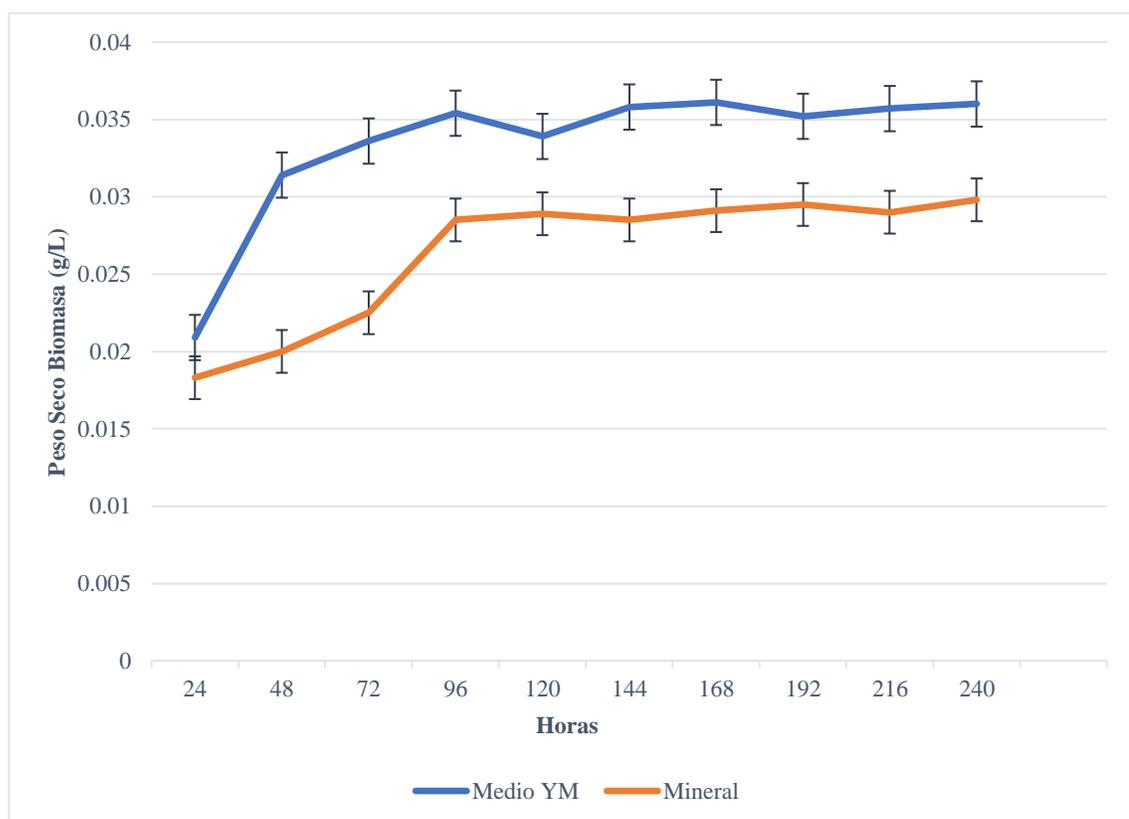


Figura 10. Curva de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en medios YM y Mineral por 240 h.

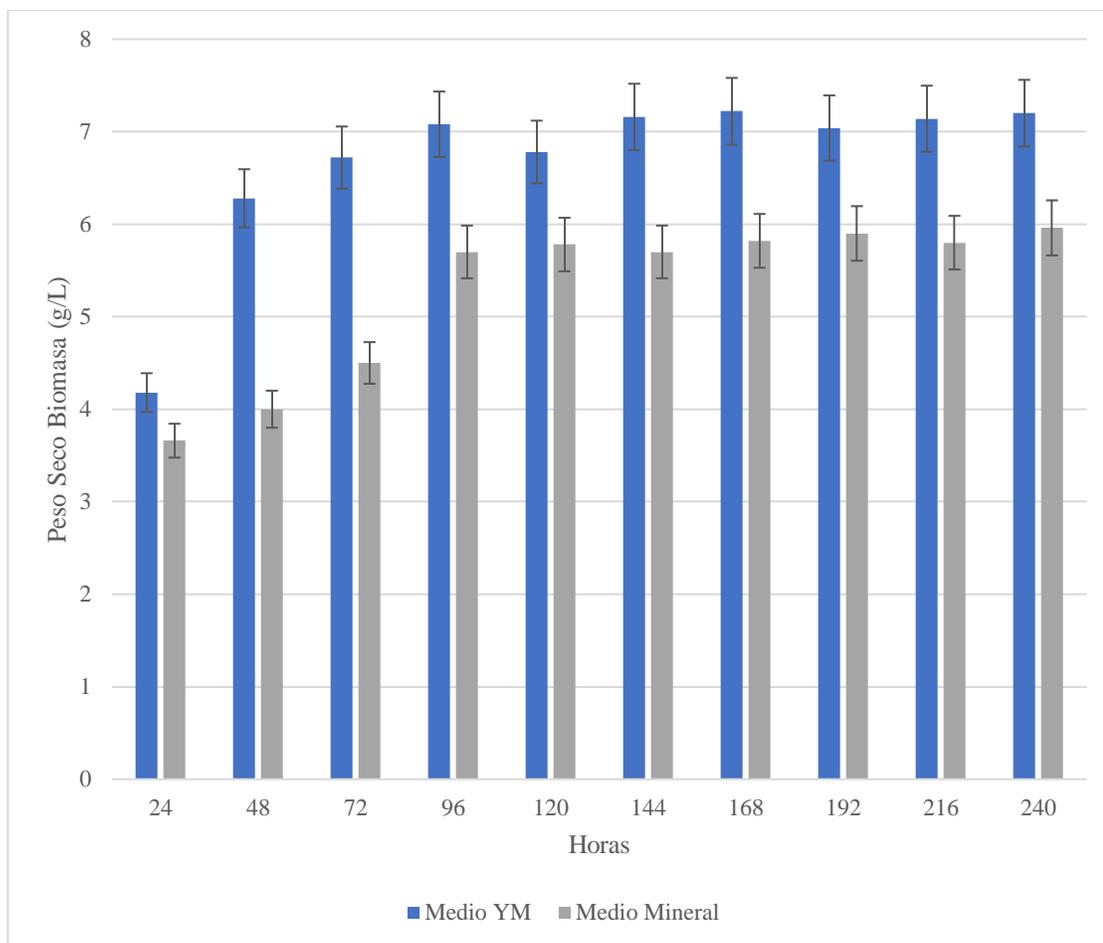


Figura 11. Producción máxima de biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en medios YM y mineral por 240 h.

## 5.2 Determinación del efecto en la generación del EPS por el cambio de medio

Se puede observar en la Figura 12 que la generación del EPS durante las primeras 96 h es muy baja, pero a las 120 h es cuando se observa una mayor producción de EPS. En ambos casos, la cantidad de EPS generado permanece constante después de las 120 h.

A partir de la metodología descrita en la sección 4.6.2 para determinar el rendimiento máximo, se observó que el rendimiento máximo obtenido de EPS fue de 1.06 g/L a las 120 h para el medio YM y 0.94 g/L a las 192 h para el medio mineral, el cual puede observarse en la Figura 13. También puede observarse que la producción del EPS

se mantuvo constante por un lapso mayor para el medio mineral comparado con el medio YM. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no existe una diferencia significativa en la producción del EPS comparando ambos medios. (Material suplementario Tabla 10).

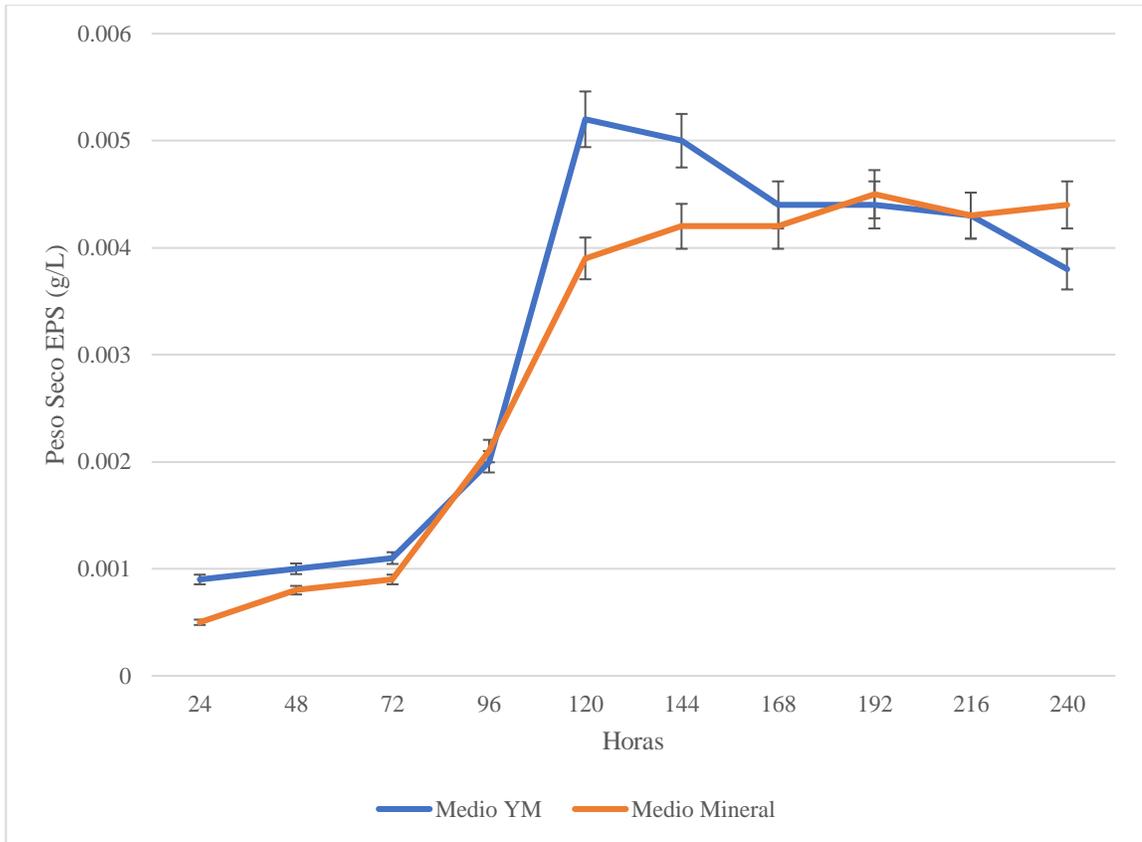


Figura 12. Peso seco de EPS de muestras de 5 mL.

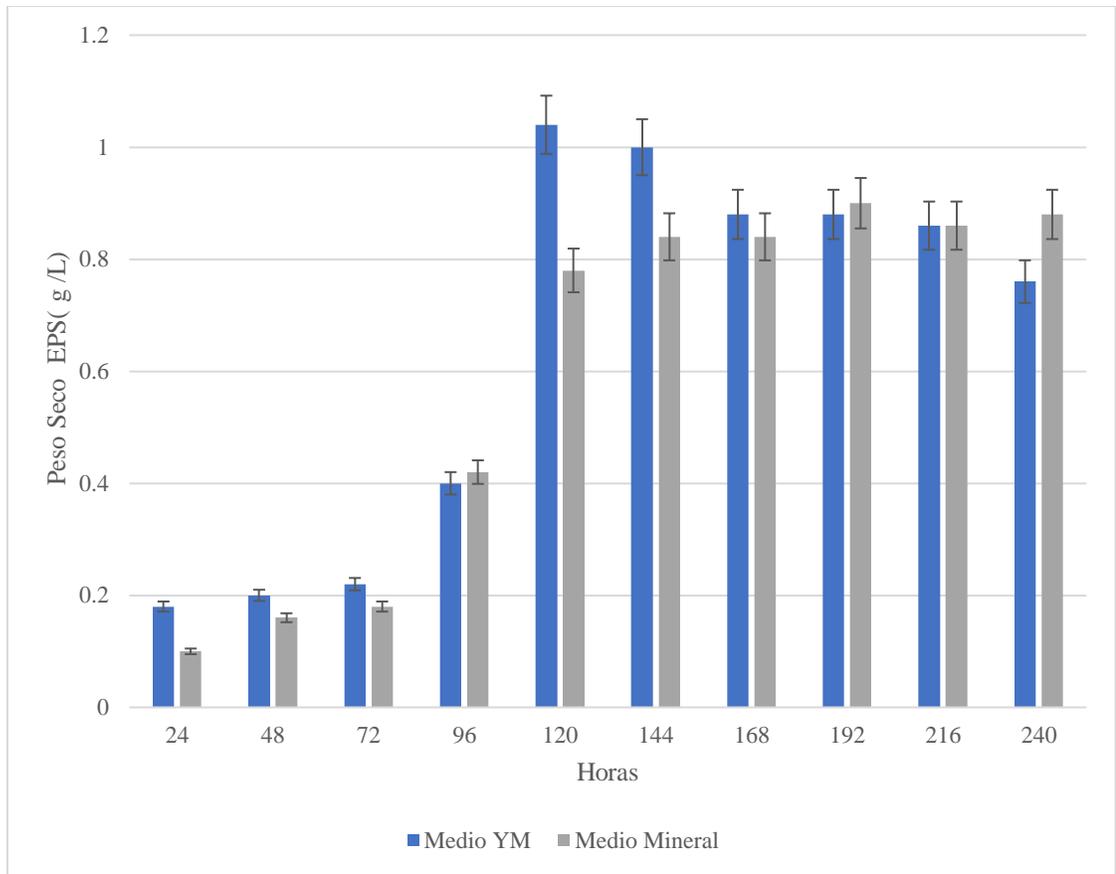


Figura 13. Producción máxima de los cultivos cada 24 h.

### 5.3 Costos del Medio de Cultivo

El costo por producción calculado fue de 26.51 pesos mexicanos por cada 100 mL para el medio YM y para el medio mineral se obtuvo un costo de 7.72 pesos mexicanos por cada 100 mL. Dicho costo se desglosa en la Tabla 3, en donde se puede observar que hay una diferencia de 18.79 pesos por costo de materiales en cada uno de los medios. Esto, es una diferencia de mas de 3 veces el costo del medio YM en comparación con el costo del medio mineral. Los costos de los componentes son del año 2019 y fueron sacados de cotizaciones de diferentes proveedores.

Tabla 3. Costos de cada componente del medio YM y mineral y el costo por 100mL.

<b>Producto</b>	<b>Precio (MXN)</b>	<b>Cantidad (mg) para 100 mL</b>	<b>Precio (MXN)</b>
<b>Medio YM</b>			
<b>Yeast malt broth for Microbiology 500 gr</b>	\$ 2,651.00	5000	\$ 26.51
		<b>Total</b>	<b>\$ 26.51</b>
<b>Medio Mineral</b>			
<b>Cloruro de Amonio 1kg</b>	\$ 1,948. 00	200	\$ 0.38
<b>Fosfato de Potasio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1kg</b>	\$ 1,500. 00	100	\$ 0.15
<b>Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 1kg</b>	\$ 2,500. 00	50	\$ 0.16
<b>Cloruro de Sodio (NaCl) 1kg</b>	\$ 1,309. 00	10	\$ 0.01
<b>Cloruro de Calcio (CaCl) 500 gr</b>	\$ 673. 00	10	\$ 0.01
<b>Sulfato de Zinc (ZnSO<sub>4</sub>) 100gr</b>	\$ 776. 00	5	\$ 0.04
<b>Sacarosa 5 kg</b>	\$ 3,500. 00	10 000	\$ 7.00
		<b>Total</b>	<b>\$ 7.72</b>

## 5.4 Pruebas de viabilidad con el EOPO y generación de la Biomasa.

La viabilidad de los cultivos se evaluó mediante el conteo de células en una cámara de Neubauer y tinción con Azul de Metileno. Para ello, se usaron 2 medios como controles, el medio YM y el medio mineral, para intentar conocer si había una diferencia en la viabilidad en los cultivos sometidos a fermentación extractiva con EOPO.

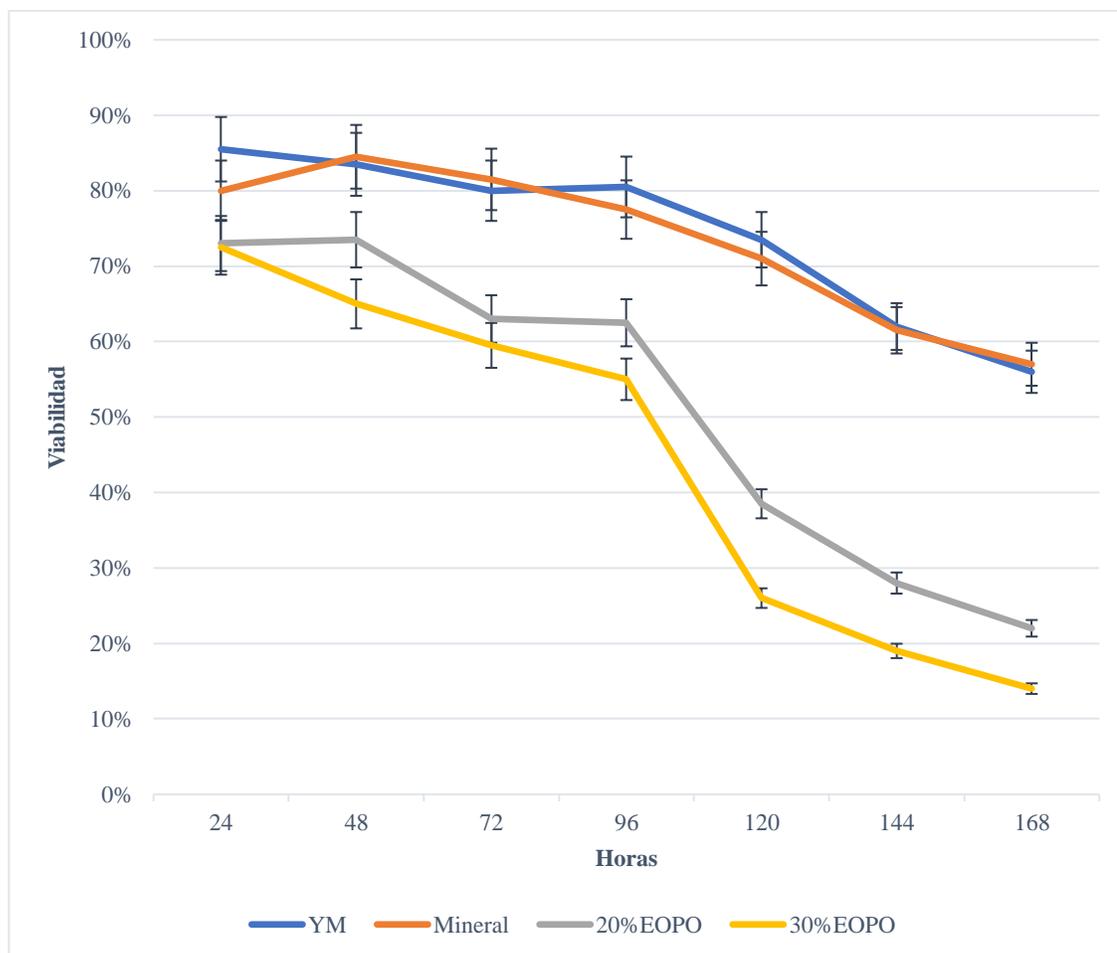


Figura 14. Viabilidad de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L a lo largo de 168 h cultivado con el EOPO 12,000

Como se puede observar en la Figura 14 a partir de las 96 h la viabilidad de los cultivos que contenían EOPO empezó a decrecer, observándose a las 168 h que había una diferencia de viabilidad entre los 2 controles y lo cultivos con el EOPO de mas de un 35%.

En cuanto a los cultivos que contenían EOPO 970, como se puede observar en la Figura 15, hubo poca pérdida de viabilidad cuando se compararon los cultivos control contra los cultivos de un 10 y 20% (v/v) de EOPO. Por otro lado, podemos observar en la misma Figura 15 que la viabilidad de los cultivos de 30 y 40% (v/v) de EOPO tiene una diferencia de viabilidad con respecto a los controles de entre un 20 a 25% menor a la de los cultivos sin EOPO. El cultivo con 50% de EOPO es el que mostró mayor diferencia en la viabilidad con respecto al control, teniendo este aproximadamente un 40% menos viabilidad.

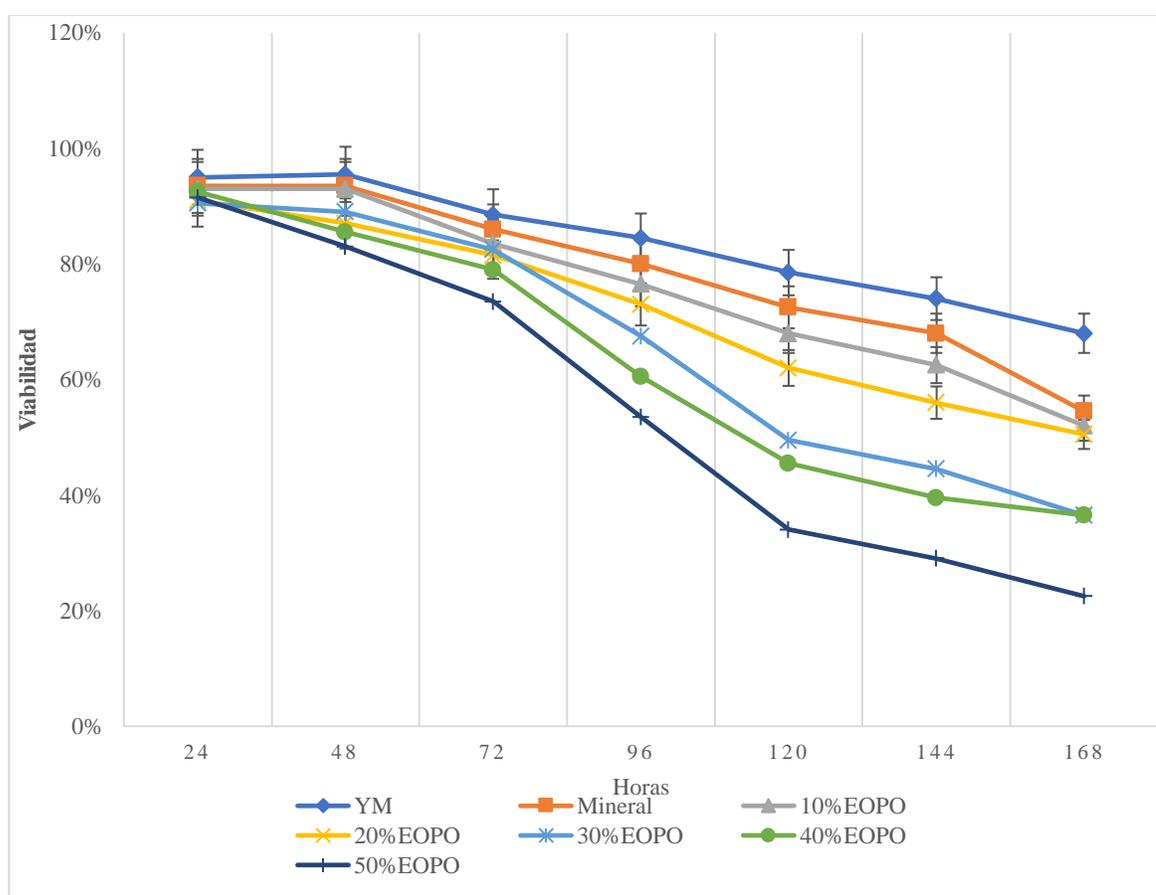


Figura 15. Mediciones de viabilidad del medio de cultivo con el EOPO 970 a concentraciones de 10 a 50% (v/v) de EOPO por 168 h.

Para determinar el efecto de la concentración de EOPO en la producción de biomasa en los cultivos, se trabajó con EOPO de dos pesos moleculares diferentes (12,000 y 970) a diferentes concentraciones. Para el EOPO 12,000 se cultivó a dos diferentes concentraciones 20 y 30% (v/v) y para el EOPO 970 se cultivó a 5 concentraciones

diferentes del 20 al 50% (v/v). Para el cultivo con el EOPO 12,00 se pudo observar en la Figura 16 que al principio los 2 cultivos tenían la misma concentración de biomasa, pero después de las 72 h hubo una diferencia de más del doble de obtención de biomasa, siendo de 0.005 g/L para el control y 0.002 g/L para los medios con el EOPO. Esta tendencia se mantuvo hasta el final del experimento, donde la media de biomasa obtenida a las 168 h para el cultivo control fue de 0.065 g/L y para los cultivos con el EOPO fue de 0.035 g/L y de 0.03 g/L para las concentraciones de 20 y 30% (v/v) respectivamente. Las variaciones del cultivo con el EOPO fueron significativas con respecto al control según en análisis de varianza realizado (Material Suplementario Tabla 12).

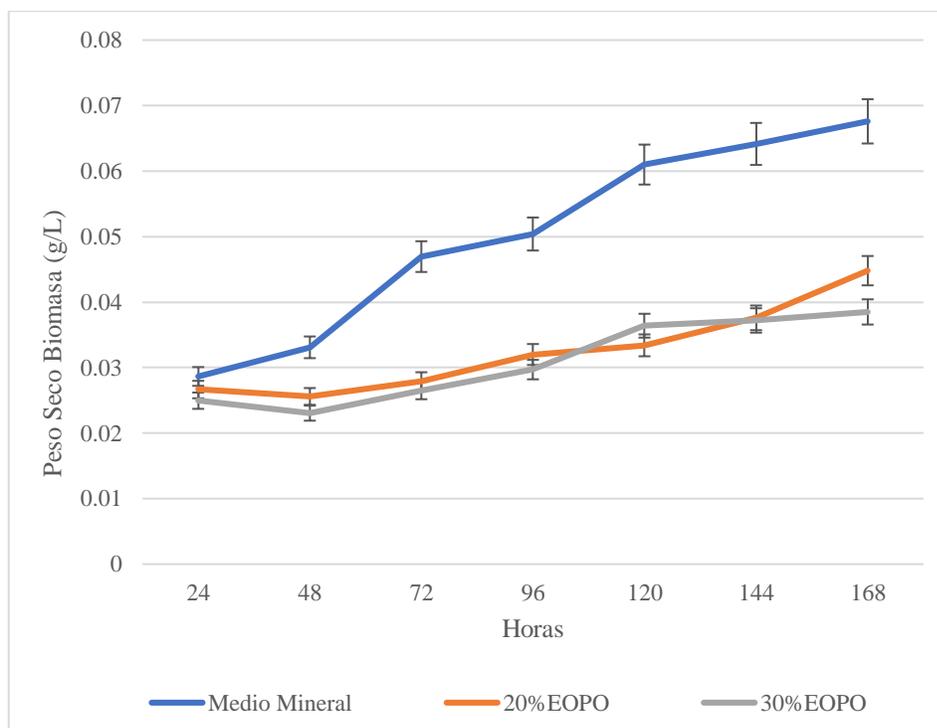


Figura 16. Generación de biomasa a diferentes concentraciones de EOPO (12,000) 20 y 30% (v/v) a lo largo de 168 h.

Para la generación de biomasa en el cultivo con EOPO 970 se midieron 5 concentraciones diferentes del 10 al 50% (v/v). Como se muestra en la Figura 17, a las 24 h se pudo observar que las concentraciones del 20 al 40% tuvieron valores muy parecidos a los del control. Sin embargo, la concentración del 50% de EOPO tuvo una menor generación de biomasa siendo esta de 0.012 g/L. Después a las 72 h hubo una diferencia entre las muestras tomadas siendo para el control de 0.005 g/L de biomasa, para la

concentración de 20% fue de 0.04 g/L, para el 30% de 0.037 g/L, para la del 40% de 0.033 g/L y para la del 50% de 0.026 g/L. A las 96 h se observó que la diferencia que se había presentado en las concentraciones del 20 al 40% (v/v) con respecto al control disminuyó, obteniendo rangos de producción de biomasa para el control y las concentraciones del 20 al 40% (v/v) de 0.049 a 0.052 g/L. Para la concentración del 50% la tendencia de obtener menor biomasa se mantuvo, siendo esta de 0.038 g/L de biomasa obtenida de la muestra. Para las horas 120 h en adelante los valores de la producción del 20 al 40 % (v/v) de EOPO con respecto al control fueron muy parecidos, y la concentración del 50% (v/v) de EOPO mantuvo la tendencia de obtener menor cantidad de biomasa por muestra hasta el final del experimento. Cuando se realizó el análisis estadístico se obtuvo que había una diferencia significativa en la producción de la biomasa de las concentraciones del 20 al 50% (v/v) con respecto al control (Material suplementario Tabla 11).

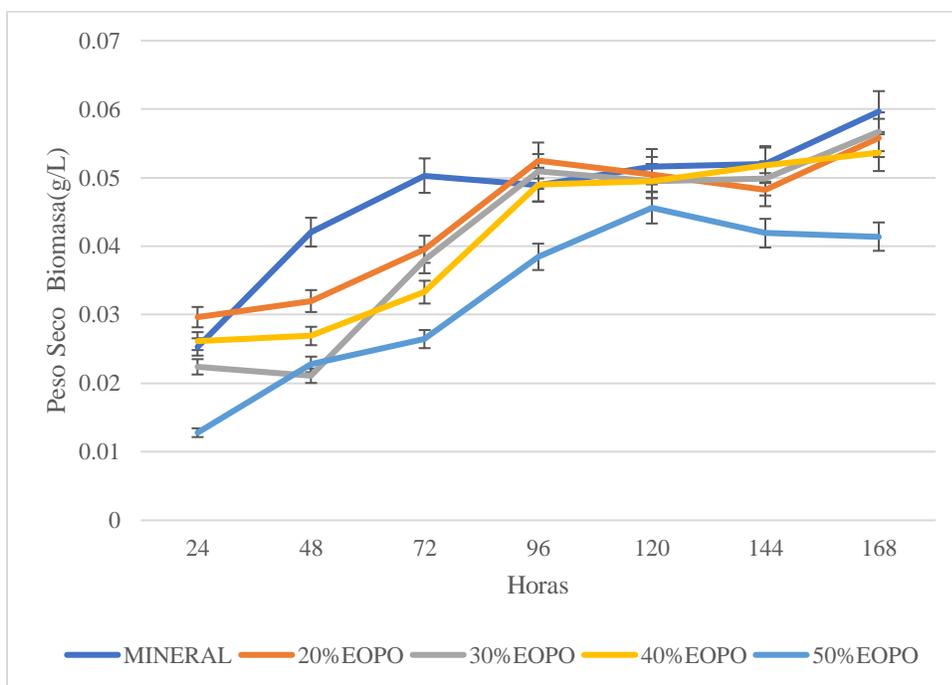


Figura 17. Generación de biomasa a diferentes concentraciones de EOPO (970) de un 20 a un 50% (v/v) a lo largo de 168 h.

## 5.5 Generación de dos fases con el EOPO.

La generación de las dos fases se realizó calentando los cultivos en baño maría y midiendo el tiempo que se requirió para que se formaran las dos fases acuosas. En la Tabla 4 se presenta un resumen de los tiempos de formación de fases para cada cultivo estudiado. Como se puede observar en la Tabla 4, los cultivos que tomaron un menor tiempo para formar las dos fases acuosas fueron las que contenían 50% de EOPO, siendo el tiempo de formación de fases entre 8 y 6 minutos en un rango de temperatura de 30 a 45 °C. Se observó que un aumento en la temperatura no implicaba un tiempo de formación de fases menor a 6 minutos. El cultivo con 40% de EOPO obtuvo un tiempo de generación de fases de entre 4 a 12 minutos en un rango de temperatura de 30 a 45 °C y se observó que cuando la temperatura alcanzaba los 40 °C el tiempo de generación de fases disminuía al doble.

Tabla 4. Tiempos de generación de las dos fases en concentración y temperatura.

<b>50% EOPO</b>	<b>Valor Promedio de Formación (min y seg)</b>	<b>Desviación Estandar (seg)</b>
<b>30 grados</b>	8 min y 40 seg	8 seg
<b>35 grados</b>	7 min y 20 seg	54 seg
<b>40 grados</b>	6 min y 10 seg	13 seg
<b>45 seg</b>	6 min y 10 seg	56 seg
<b>40% EOPO</b>		
<b>30 grados</b>	13 min	56 seg
<b>35 grados</b>	12 min y 10 seg	48 seg
<b>40 grados</b>	5 min y 20 seg	15 seg
<b>45 grados</b>	4 min y 30 seg	12 seg
<b>30 % EOPO</b>		
<b>30 grados</b>	19 min y 10 seg	47 seg
<b>35 grados</b>	13 min y 20 seg	8 seg
<b>40 grados</b>	11 min y 30 seg	42 seg
<b>45 grados</b>	10 min y 20 seg	48 seg
<b>20%EOPO</b>		
<b>30grados</b>	23 min y 30 seg	23 seg
<b>35 grados</b>	21 min y 20 seg	4 seg
<b>40 grados</b>	20 min y 50 seg	73 seg
<b>45 grados</b>	19 min y 13 seg	62 seg
<b>10% EOPO</b>		
<b>30 grados</b>	no hay formación	
<b>35 grados</b>	no hay formación	
<b>40 grados</b>	no hay formación	
<b>45 grados</b>	no hay formación	

Como se puede observar en la Tabla 4 el cultivo con 30% EOPO mostró un tiempo de generación de fases de entre 9 y 19 minutos, observándose un menor tiempo de generación de fases cuando la temperatura aumentaba de 30 a 35 °C. En la concentración del 20% de EOPO se observó el mayor tiempo de generación de fases (entre 18 a 23 minutos), además de que no presentaba cambios en el tiempo de formación de fases con respecto a los cambios de temperatura. Para el 10% de concentración probada del EOPO se observó que no se generaban las dos fases, aún dejando el cultivo a 45 °C un máximo de 30 minutos.

En las Figuras 18 a 22 se muestran ejemplos de la formación de las dos fases para cada concentración. Como se puede observar en la Figura 18, en la concentración del 10 % no se logró la formación de las dos fases a ninguna temperatura.



Figura 18. No formación de las dos fases en una concentración de 10% de EOPO

Como se puede observar en la Figura 19 en la concentración del 20 % de EOPO se nota que en la parte inferior hay una nata blanca, lo cual corresponde al EOPO con la biomasa, mientras que el resto del cultivo corresponde a la fase superior.

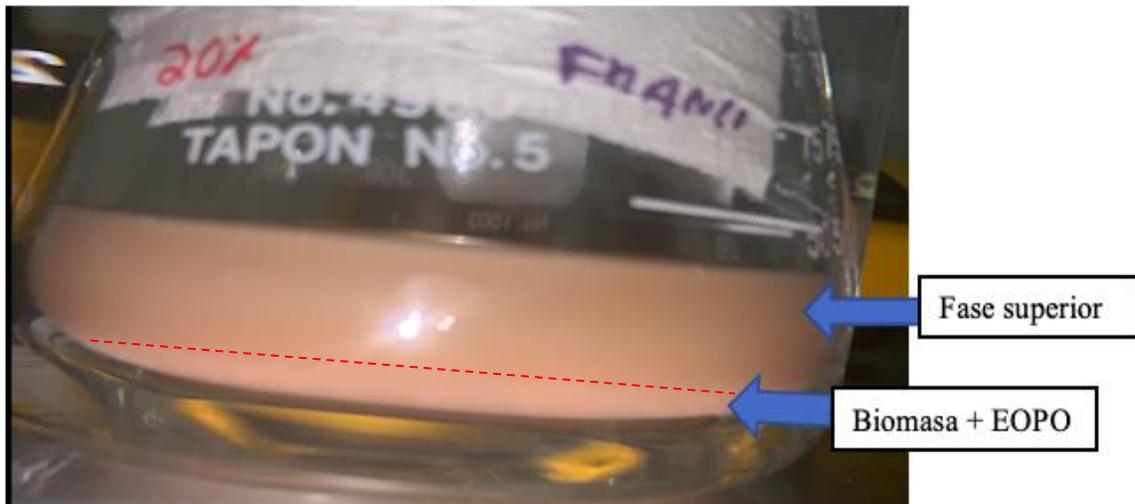


Figura 19. Formación de las dos fases en una concentración de 20% de EOPO

En la Figura 20, donde se muestra la concentración del 30% de EOPO se nota cómo al fondo del matraz hay una nata blanca, lo cual corresponde al EOPO con la biomasa y el resto a la fase superior.



Figura 20. Formación de las dos fases en una concentración de 30% de EOPO

Para la concentración del 40% mostrada en la Figura 21, se observa una nata blanca con grumos naranjas, esto es el EOPO y la biomasa, y la fase superior es el líquido amarillo que se encuentra en la parte superior del cultivo.

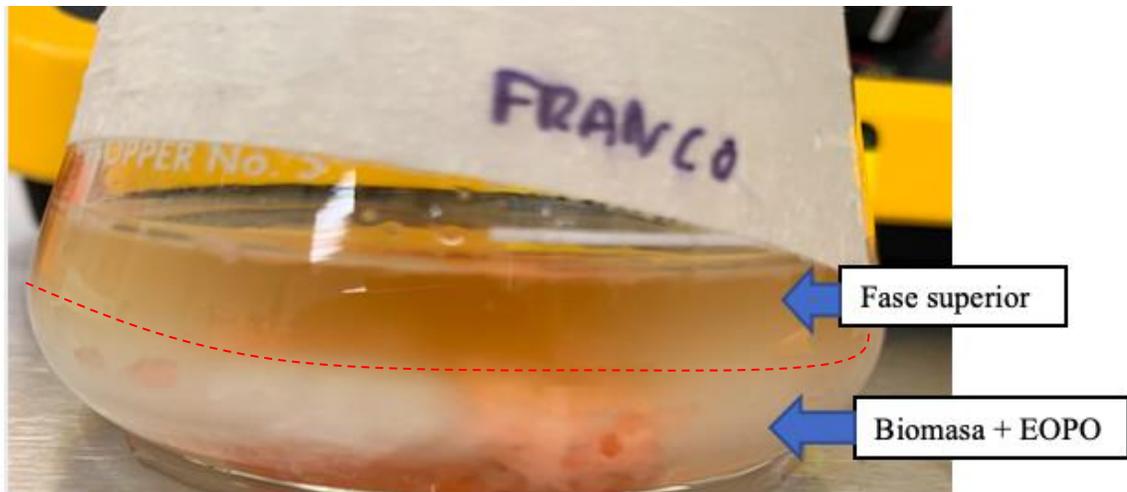


Figura 21. Formación de las dos fases en una concentración de 40% de EOPO

Para la última concentración de EOPO, que fue la del 50% (Figura 22) se puede observar una nata blanca en el fondo de un color distinto a las experimentaciones previas, siendo ésta la fase inferior (biomasa y EOPO) y el líquido restante, de color más traslúcido, la fase superior.

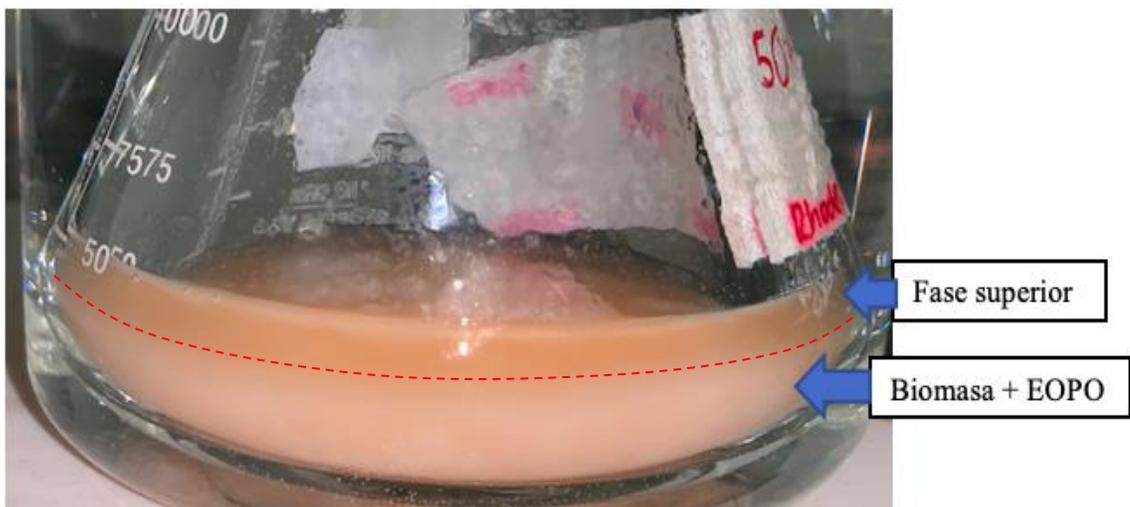


Figura 22. Formación de las dos fases en una concentración de 50% de EOPO

## 5.6 Caracterización de la producción de biomasa y EPS en la fermentación extractiva con EOPO

La formación de las dos fases se llevó con concentraciones de un 20 a un 50% (v/v) de EOPO en cultivos y después de la formación de fases, éstas se separaron para la obtención de rendimientos de biomasa y EPS en cada fase, esto mediante la purificación, secado y pesado de la biomasa y el EPS. En la Tabla 5 se presenta los resultados de la recuperación de biomasa y EPS en cada fase. La concentración con un 20% de EOPO nos dio como resultado que en la fase superior se recuperaba el 43% de la biomasa de todo el cultivo y que en la fase inferior se mantiene un 57% de la biomasa de todo el cultivo. En la concentración de un 30% de EOPO en la fase superior se obtuvo un 12% de biomasa en la fase superior y en la fase inferior se recuperó un 88% de la biomasa de todo el cultivo. En la penúltima concentración probada (40%) se pudo obtener del sobrenadante sólo un 7% de la biomasa y lo restante, que fue un 93% de la biomasa del cultivo se obtuvo en la fase inferior del cultivo. La concentración que menos biomasa logró recuperar en la fase superior fue la del 50%, siendo ésta de sólo un 5% en la fase superior y en la fase inferior se recuperó el 95% de la biomasa.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de biomasa y EPS en la fase superior (FS) y la fase inferior (FI) de diferentes concentraciones de EOPO.

Concentración	Fase	Porcentaje en Fase de Biomasa	Desviación Estándar Biomasa	Porcentaje en Fase de EPS	Desviación Estándar EPS
Sin EOPO	Control	100%	8.3%	100%	0.8%
20%	Fase Superior	43%	1.0%	36%	0.1%
	Fase Inferior	57%	3.3%	64%	0.2%
30%	Fase Superior	12%	0.5%	45%	0.1%
	Fase Inferior	88%	1.8%	55%	0.1%
40%	Fase Superior	7%	0.2%	42%	0.1%
	Fase Inferior	93%	0.6%	58%	0.0%
50%	Fase Superior	5%	0.4%	37%	0.9%
	Fase Inferior	95%	3.4%	63%	0.3%

Como se puede ver en la Tabla 5 para la columna del porcentaje del EPS, la concentración de un 20% de EOPO mostró que en la fase superior solo se pudo obtener un 36% del total de EPS y en la fase inferior se pudo obtener el restante 64% del EPS. Para la siguiente concentración que se probó, que fue la del 30% EOPO, en la fase superior se pudo recuperar un 45% del total de EPS y en la fase inferior se obtuvo un 55% del EPS total. En la penúltima concentración probada, que fue la del 40% EOPO, en la fase superior se recuperó un 42% del EPS total y el restante 58% se encontró en la fase inferior. La última concentración probada (50% EOPO) se encontró que en la fase superior se recuperó un 37% del total del EPS y la fase inferior un 63% del total del EPS.

### **5.7 Reciclado del EOPO y generación del EPS.**

Para saber que tipo de fermentación podía producir más EPS en 192 h, que es el tiempo determinado para obtener la producción máxima de EPS en el método de fermentación sumergida, se comparó la producción de EPS en la fermentación extractiva y en la fermentación sumergida, las condiciones de la fermentación extractiva fueron 100 mL de medio mineral con un 40% (v/v) de EOPO970. Para comparar las fermentaciones, se recuperó el EPS de las 2 fermentaciones (sumergida y extractiva), se purificó, secó y pesó. Se puede observar en la Tabla 7 que la cantidad que se podía recuperar de EPS cada 24 h fue bajando empezando con 0.00083 g recuperados de EPS y terminando con solo 0.00066 g de EPS recuperados al final del experimento. Dando un total de producción de 0.0451 g de EPS producidos con el cultivo con el EOPO. Para el cultivo batch solo se alcanzó a realizar un experimento de recuperación de EPS las 192 h donde el cultivo alcanzó el tiempo máximo de producción observado anteriormente en la sección 5.2, teniendo una producción de 0.0361 g de EPS. Por otro lado, la cantidad de EPS obtenida mediante la fermentación extractiva fue un 20% más con respecto al cultivo por fermentación sumergida. Además, en la fermentación extractiva se pudo saltar el paso de la centrifugación de la biomasa para separar el EPS de la biomasa, al obtener el EPS en la fase superior generada.

Tabla 7. Producción alcanzada en 168 h.

Tiempo	10 mL Sobrenadante EOPO	80 mL Batch
24 h	0 g	0 g
48 h	0 g	0 g
72 h	0.0083 g	0 g
96 h	0.0075 g	0 g
120 h	0.0077 g	0 g
144 h	0.0078 g	0 g
168 h	0.0072 g	0g
192 h	0.0066 g	0.0361
<b>Total producido en 192 h</b>	0.0451 g	0.0361 g

## 5.8 Costos del EOPO y el uso de la centrifuga.

Para saber si era más barato utilizar el EOPO para la fermentación extractiva o el uso de la centrifuga para recuperar la biomasa después de realizar la fermentación sumergida, se calculó el costo de utilizar cada componente. Como se puede ver en la Tabla 8, el costo por utilizar el cultivo en fermentación extractiva fue de 134 pesos mexicanos, mientras que el costo de realizar la fermentación sumergida fue de solo 2.27 pesos mexicanos siendo este un proceso 61 veces mas barato si se compara con la fermentación extractiva. Solo se calcularon estos costos ya que es en lo único en lo que se difiere la fermentación extractiva de la sumergida, por ende, los demás costos permanecen iguales para todo el bioproceso de obtención de EPS.

Tabla 8. Costos asociados al uso de la centrifuga y el EOPO.

Fermentación Sumergida				Fermentación Extractiva		
Consumo de Energía Centrifuga por hora (kW)	Consumo de Energía 25 minutos (kW)	Costo Kilowatt (MXN)	Costo por usar la centrifuga 25 minutos (MXN)	Costo EOPO 250 mL (MXN)	Costo por 1mL de EOPO (MXN)	Costo por 40 mL de EOPO (MXN)
1.95	0.8125	2.802	2.275	843	3.372	134.88

## CAPITULO 6

### DISCUSION

#### 6.1 Efecto del cambio de medio en la generación de la biomasa.

La producción de la biomasa para los 2 casos con el medio mineral y el medio YM, siguió una curva de crecimiento de fase lag de aproximadamente 72 h, y una fase exponencial de 72 h para los 2 casos, y al final se detuvo en una fase estacionaria hasta la última toma de muestras que fue a las 144 h. La producción máxima de la Biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, alcanzó una producción de biomasa máxima de 7.22 gr/ L a las 192 h con el medio YM, y para el medio mineral 5.96 g /L a las 240 h, lo cual es comparable a los resultados obtenidos por otros autores. Sin embargo, un factor importante a tomar en cuenta es que la cantidad del inóculo que se utilizó en la presente investigación (20% en volumen) fue mayor que la empleada por otros autores (1-5% de inóculo) (Ghada, Mahmoud, *et al.*, 2012; Sanchez, Ramírez, *et al.*, 2007; Pavlova & Grigorova, 1999), quienes alcanzaron producciones de 4.1 a 10.2 g/L de biomasa entre un tiempo de 96 a 168h. Esto es indicativo de que para obtener una producción de biomasa comparable a la previamente reportada es imperativo utilizar un mayor volumen de pre inóculo. Adicionalmente, en dichas investigaciones se empleó como inóculo un porcentaje de un cultivo iniciador, estrategia que fue seguida por el presente trabajo. Sin embargo, para una mayor certeza en cuanto al número de células que se utilizan para iniciar el cultivo, se debería de realizar un conteo de células en el cultivo iniciador para luego estandarizar la cantidad de pre inóculo necesaria para utilizar la misma densidad celular inicial que los autores reportados y determinar así el efecto del inóculo.

La cantidad de biomasa máxima alcanzada por las diferentes fuentes de carbono es mayor que la obtenida en el estudio de (Aksu & Tug, 2005) donde se demostró que la glucosa fue el sustrato que *R. mucilaginosa* prefirió usar para el crecimiento máximo, ya que el peso de biomasa seca fue de 5.1 g /L, utilizando una concentración de glucosa inicial de 20 g /L. Estas producciones se compararon con las de un medio que contenía 20

g/L de sacarosa, donde se obtuvieron 5.2 g /L de biomasa seca. Además, el cambio de fuente de carbono no demostró ser significativo para la producción de la biomasa según los resultados de las pruebas estadísticas (Anova).

El factor más significativo para la producción de la biomasa según varios autores es la fuente de nitrógeno (Ann, Ramirez, *et al.*, 2015; Chi & Zhao, 2003; Villay *et al.*, 2013), donde el utilizar el extracto de levadura o el nitrato de amonio puede llegar a ser lo más efectivo para la producción de la biomasa. Sin embargo, en este trabajo no se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno, solo se estudió el efecto en el cambio de la fuente de carbono (glucosa y sacarosa) en términos de producción de biomasa, EPS y costos de cultivo.

## **6.2 Efecto del cambio de medio en la generación del EPS**

Se observó que el EPS se empezó a producir hasta las 120 h de inicio del cultivo para los 2 medios probados, lo cual es comparable con el reporte de Jun (2004). En dicho estudio, se encontró que *Rhodotorula mucilaginosa* YR-2 iniciaba la producción de EPS a las 120 h de cultivo.

La concentración máxima de EPS producida fue de 1.06 g/ L a las 144 h en medio YM y de 0.94 g /L a las 192 h en medio Mineral. Estos resultados son mucho menores que los obtenidos por el estudio de Jun en el 2004, quien obtuvo una producción de 7.8 g /L, las condiciones que utilizó Jun (2004) son muy parecidas a las utilizadas en el presente estudio, por ende, las diferencias que se presentan pueden deber a la cepa que utilizó este autor, siendo ésta una cepa con una mayor capacidad productora de EPS si se compara con *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L.

Sin embargo, los resultados del presente estudio en cuanto a la producción de EPS son comparables con los reportados para *Rhodotorula acheniorum* MC en el estudio de Grigborova (1999), donde se obtuvieron rendimientos de 1.25 - 5 g /L utilizando como fuente de carbono la glucosa y de 2.11 - 2.86 g /L con la sacarosa como fuente de carbono.

Además, en el estudio de Ghada *et al.* (2012), se trabajó con diferentes fuentes de carbono en *Rhodotorula glutinins*, obteniendo rendimientos de 0.7 g /L de EPS cuando se utilizó la glucosa como fuente de carbono y de 1.6 g /L de EPS para la sacarosa como fuente de carbono.

Es importante destacar que los niveles de producción de EPS dentro del género de *Rhodotorula* varían mucho. Los niveles pueden llegar a variar de 0.7 g /L hasta 7.8 g /L (Ghada *et al.*, 2012; Grigorova *et al.*, 1999; Jun, 2004). Según estos autores la sacarosa es la mejor fuente de carbono, pero esto no se demostró en los resultados obtenidos en la presente investigación. Lo que se observó es que no hubo una diferencia significativa en el uso de la sacarosa y la glucosa como fuente de carbono en la producción de EPS, ya que se esperaba que con la sacarosa la producción del EPS fuera mayor. Esto se puede deber a otros factores que no se investigaron en el trabajo, tales como el pH y el nivel de agitación, los cuales han sido probados como factores importantes a la hora de la producción del EPS (Ates, 2015).

El tipo de fuente de carbono tiene una gran influencia en la productividad del EPS y también puede afectar la composición del EPS. En el estudio de Yuksekdog y Aslim (2008) se observó que el tipo de EPS producido por *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 se vio afectado cuando se cambiaba la fuente de carbono en el medio, cambiando la composición y relación de carbohidratos del EPS. Además en los estudios de Bont (1996 y 1997) se señaló que la regulación de la vía biosintética de EPS en *L. bulgaricus* NCFB 2772 podría depender de la fuente de carbohidratos y por ende podría cambiar la composición del EPS generado. Por esta razón, aunque no se tenga una diferencia significativa en la producción del EPS, el EPS obtenido en el medio con sacarosa puede ser diferente al producido con glucosa y se necesita caracterizar el EPS para averiguar su composición y su potencial aplicación en otras ramas industriales fuera de las ya reportadas.

### **6.3 Costo del medio.**

Para hacer que el proceso sea más rentable, es necesario realizar mejoras en el rendimiento del producto, lo que se obtiene mediante la optimización de las condiciones de cultivo, el desarrollo de cepas de alto rendimiento (manipulación genética) o la aplicación de sustratos de bajo costo (Iran *et al.*, 2016). Para producir EPS de una manera rentable a escala industrial mediante fermentación, se requieren fuentes de carbono y nitrógeno más económicas para reemplazar el medio convencional YM, ya que el rendimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L para la producción de EPS, no es el más rentable al momento de esta investigación. Por ende, se deben de buscar nuevas alternativas para poder bajar los costos del bioproceso (Saha, 2006).

En esta investigación, se logró bajar el costo más de 2 veces sin que el rendimiento del EPS tuviera diferencias significativas por el cambio de la fuente de carbono. Es decir, la producción del EPS fue similar usando medio mineral o YM, tal como se mostró en la Figura 12. Además, en la producción de la biomasa tampoco se observó un cambio significativo en el rendimiento según la prueba estadística. Por lo tanto, es factible la aplicación del este medio mineral en un bioproceso a mayor escala por su menor costo en comparación al medio convencional YM.

### **6.4 Pruebas de viabilidad con el EOPO y generación de la Biomasa.**

El primer polímero probado era el más viscoso, teniendo un peso molecular promedio de 12,000 y una viscosidad de 35,000 cSt (Centistokes) (Sigma, 2019). Por otro lado, la viscosidad del EOPO 970 es de 110 cSt. (Sigma, 2019). Tomando en cuenta la viscosidad de agua, la cual es de 1 cSt, la viscosidad de los medios de cultivo es muy alta, lo cual significa que la manipulación y agitación del medio puede ser más complicada por sus características reológicas. Dichas propiedades influyen fuertemente en el rendimiento del cultivo, especialmente si se emplean microorganismos aeróbicos (Schurgel *et al.*, 1981). El que se aumente la viscosidad del medio resulta en largos tiempos de

mezclado, que puede causar una falta de homogeneidad en la concentración de nutrientes y de oxígeno en el cultivo, lo cual es una condición indeseada (Schmidt, 2005).

El mezclado es crítico para los procesos de control del cultivo, ya que afecta otras condiciones dentro del medio de cultivo. Por ejemplo, el control del pH se ve altamente impactado por el mezclado, ya que dicho control se realiza mediante adición de ácidos o bases. Una mala mezcla puede causar inestabilidades considerables en el sistema de control debido a un retraso entre la adición de los buffers y la señal resultante del electrodo de pH, obteniendo un pH inadecuado para el crecimiento del microorganismo (Schmidt, 2005). Además, los microorganismos que se encuentren en un cultivo con mezclado ineficiente experimentarían una inanición de nutrientes y oxígeno dentro del cultivo, reduciendo así la eficiencia del cultivo. Esto puede resultar en un cambio o disminución en la velocidad del metabolismo de los microorganismos o incluso llevándolos a la muerte (Humbird & Fei, 2016). Cuando la viscosidad del medio aumenta, el medio se vuelve más coalescente, limitando la transferencia de oxígeno debido a la reducida área interfacial gas-líquido (Kold, 2010), afectando así la tasa de transferencia de oxígeno.

Otro problema es que cuando los medios son viscosos se tienden a formar aglomerados. Los nutrientes, dentro de los cuales el oxígeno suele estar presente en la concentración más baja debido a su solubilidad limitada en agua, deben difundirse en estos aglomerados. El agotamiento parcial de nutrientes en los aglomerados puede conducir a una pérdida de productividad (Seviour, McNeil, *et al.*, 2011). Un posible efecto adicional de una mala transferencia de oxígeno podría ser que la baja tensión de oxígeno resultante. Si este proceso continúa y no se aumenta la tensión, se conduce a una rápida caída de la tensión de oxígeno, que podría tener efectos desastrosos en el proceso microbiano (Metz, B., Kossen, *et al.*, 1979). Con el aumento de la viscosidad la transferencia de calor también decaerá haciendo que sea mucho más difícil controlar la temperatura de los cultivos haciendo que necesite aplicar una cantidad de energía mayor para poder controlar la temperatura. (Bhatia, 2017).

Por eso, en el cultivo con el EOPO 12,000 se pudo observar que la viabilidad del cultivo fue mas baja con referencia a los cultivos control, ya que se vieron afectados los procesos de transferencia de masa, mezclado y transferencia de calor, que son condiciones críticas que influyen en el crecimiento microbiano; además de la formación de productos secundarios. Lo último resulta de importancia ya que los EPS que pueda producir *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L se presentan después de alcanzar una fase específica del crecimiento del cultivo, y someter a la levadura a un mayor estrés de cultivo puede resultar en la disminución en la producción del metabolito de interés.

La generación de la biomasa también se vio afectada por los parámetros descritos anteriormente. Se obtuvo menor biomasa cuando se cultivo a *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L con EOPO, lo cual coincide con lo previamente reportado en el estudio de Show en el 2012, donde se comparó la generación de biomasa de *Burkholderia cepaci*. El estudio reveló que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa seca a partir de una fermentación batch en comparación con la fermentación extractiva en un matraz Erlenmeyer, demostrando que la fermentación extractiva puede reducir la tasa de crecimiento de los microorganismos, dependiendo de la concentración del EOPO con la cual se lleve acabo la fermentación extractiva. La cantidad Etilenglicol que tiene el EOPO 12,000 es del 75%, y del 10 % para el EOPO 970, (Sigma, 2019), lo cual puede afectar a la generación de la biomasa y a la viabilidad del cultivo dependiendo de la concentración con la que se trabaje en el medio de cultivo. El EOPO puede llegar a ser tóxico para los microorganismos dependiendo de la concentración, lo cual fue demostrado en un estudio de Oxes en 1966, donde se midió la viabilidad de cultivos con PEG de diferentes pesos moleculares. En dicho estudio se observo que los PEGS ligeros de 200 a 600 de peso molecular arriba de una concentración de un 30% (v/v) afectan la viabilidad de *Escherichia coli* disminuyendo su viabilidad aproximadamente un 20%, mientras que concentraciones mayores a un 50% disminuían la viabilidad un 50%. Por otro lado, el PEG con un peso molecular entre 9,000 y 15,000 disminuía la viabilidad de los cultivos un 70% si se utilizaba en concentraciones mayores a 20% (v/v).

Otro parámetro que también afectó la viabilidad de los cultivos, pero no es uno de los parámetros más críticos según Freitas *et al.* (2017) fue la misma producción de los EPS. Hay que recordar que estos son productos que se excretan al medio y en considerables cantidades, por lo que la presencia de estos productos puede afectar la viscosidad del medio de cultivo (Chen *et al.*, 2014). Aunque no de una manera significativa que realmente cambie los parámetros metabólicos de *Rhodotorula* que está acostumbrada al crecimiento con el EPS (Gientka, Błazejak, *et al.*, 2015).

## **6.5 Generación de dos fases con el EOPO.**

La caracterización de la formación de las dos fases con el EOPO en cuanto a tiempo y temperatura no está reportada en la literatura, ya que lo generalmente reportado es la concentración para la formación de las dos fases. En diversos trabajos consultados sólo se reporta que se utilizaba una temperatura para promover la formación de las dos fases y un tiempo de formación de fases de entre 20 a 30 minutos, dependiendo de la concentración (Chen *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2017; Show *et al.*, 2012b). Es importante destacar que la temperatura empleada por dichos estudios es muy alta (entre 30 y 50° C), lo cual puede resultar en un impacto negativo para el desarrollo de los microorganismos en el cultivo. En el estudio de Show en el 2012 se utilizó *Burkholderia cepaci* que crece a una temperatura óptima de 30 °C, pero la temperatura para generar las dos fases en la fermentación extractiva fue de 50°C, la cual se mantuvo por 15 minutos. Dichas condiciones pueden ser un factor crítico para la viabilidad del cultivo y de los rendimientos para la obtención de los productos (Jan *et al.*, 1982). Por ende, el obtener una temperatura que no diverja tanto de la temperatura de crecimiento óptimo es crucial si queremos que el proceso sea semi-continuo. La temperatura del cultivo afecta la tasa de crecimiento celular, la productividad de los productos deseados, la solubilidad del oxígeno y, en última instancia, el costo de producción (Humbird & Fei, 2016). Además, el tiempo al que sometemos a este estrés de temperatura debe ser lo más breve posible si se quiere mantener la viabilidad del microorganismo y la producción de los compuestos de interés de una manera estable (Prasad, 2008).

## 6.6 Caracterización de las dos fases con EOPO

Se pudo observar que tanto las fases superiores e inferiores tuvieron distinto volumen (Figuras 18 a 22) y por ende la cantidad de biomasa y EPS en cada una de estas fases varió. Esto se debe principalmente a la concentración crítica micelar, la cual afecta cuando se empiezan a formar las redes micelares dentro de una solución y por ende las dos fases (Alexandridis, *et al.*, 1994). Además, el tamaño de las micelas generalmente aumenta al aumentar la temperatura, variando la magnitud de la formación de la red micelar entre los diferentes copolímeros. Es por eso por lo que se le atribuye a la temperatura el aumento en la velocidad de formación de fases. Además, cuando se aumentaba la concentración del EOPO, el tiempo y la temperatura a la cual se someten los cultivos para que se formen las dos fases es menor. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la literatura, en donde se observa que a mayor concentración de EOPO o una mayor temperatura, la red micelar se formará más rápidamente (Lad, Bahadur, *et al.*, 1995; Patidar, Pillai, *et al.*, 2017; Planas, Radström, *et al.*, 1996).

Los resultados de obtención de productos difieren de la literatura, esto se puede deber a que la temperatura a la cual se sometieron los cultivos para la formación de las dos fases no fue tan alta como la empleada por otros autores, donde la mayoría utilizaban rangos de temperatura por arriba de los 50°C (Show *et al.*, 2012b; Xiong, Zhang, *et al.*, 2014) para la formación de las dos fases. Esto se traduce en que las fases estarán formadas de una manera mucho más marcada y la fase superior estará mucho más limpia y con una cantidad mínima de productos indeseados. Tomando como ejemplo el estudio de Show en el 2012 donde al someter a 50 °C los cultivos por un tiempo de 20 minutos, la pureza alcanzada de la obtención de la lipasa en la fase superior era superior al 90 %. Por otro lado, el estudio de Suan en el 2012, en donde se sometió a los cultivos a una temperatura de 65 °C durante 15 minutos, se obtuvo una pureza por arriba del 87% en la fase superior para la recuperación de ciclodextrina glicosiltransferasa de *Bacillus cereus*, sin bien estos resultados pueden servir como un marco de referencia no pueden utilizarse como guía para saber si el proceso propuesto en esta investigación es mejor o no, ya que los productos (biomasa y EPS) que se están separando difieren mucho de las enzimas que los autores

mencionados anteriormente estudiaron en los sistemas de fermentación extractiva. Al ser el EPS un producto con un mayor peso molecular y de compleja composición química, se espera que su comportamiento en las dos fases sea diferente.

Se encontró que las concentraciones de 20 y 30 % de EOPO permitieron obtener los mayores rendimientos del EPS, ya que las redes micelares que se formaban a esta concentración atrapan la biomasa y dejan la fase superior libre de otros contaminantes (Show 2012). Esto se puede observar en la Figura 21 donde la fase superior cambia su característico color rosa, indicativo de la presencia de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L por un tono amarillo, el cual denota la ausencia de la levadura en la fase superior. Además, esto se corrobora con baja cantidad de biomasa encontrada en dicha fase (Tabla 5). En cuanto a la última concentración del 50%, se cree que el tamaño de la red micelar fue mayor a la obtenida en otras concentraciones debido a la poca recuperación de fase superior, sin embargo, el tamaño de la red de EOPO con la biomasa eran muy grande, lo que hacía difícil manipulación y recuperación de la fase superior.

## **6.7 Reciclado del EOPO y Generación del EPS**

El reciclado de los polímeros es una de las mayores características de estos polímeros. Varios autores reportan que el rendimiento empieza a decaer después de 2 usos consecutivos, lo cual es atribuido al aumento de contaminantes en la fase superior (Chen *et al.*, 2014; Leong *et al.*, 2017). Sin embargo, en la presente investigación se pudo obtener resultados bastante consistentes en cuanto a la recuperación del EPS durante los primeros 4 reciclados del EOPO, lo cual va acorde a los resultados de Show 2012 y Phong 2018; donde ellos observaron que después de 4 reciclados del polímero la recuperación no era tan efectiva.

Dicha situación se reprodujo en el presente estudio, donde se observó que después del cuarto reciclado, la cantidad del EPS que se pudo recuperar fue menor y fue disminuyendo conforme aumentábamos el número de ciclos de reciclado obteniendo una

caída en el rendimiento de mas del 60% en la recuperación del EPS al término del experimento.

## **6.8 Costo del uso del EOPO y la centrifuga.**

Según los resultados que nos arrojó el análisis de costos mostrado en la Tabla 8, el uso del EOPO fue 61 veces mas caro si solo se comparaba con el gasto de energía por parte de la centrifuga para ser utilizada los 25 minutos, aunque hubo un aumento del rendimiento del 25% mas de producción de EPS cuando se comparo la fermentación extractiva vs la fermentación sumergida los costos que se llegan a ahorrar con este método no son justificables debido a que las aplicaciones de los EPS dentro de la industria casi siempre son dentro del ramo alimenticio y de cosméticos, por ende el precio que puede llegar a alcanzar en el mercado seria muy poco. A menos que se encontrara que el EPS producido por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, tuviera propiedades que puedan servir dentro de aplicaciones con un mayor rango de ganancias, como por ejemplo como expansor de volumen de plasma sanguíneo (Amspacher , Curreri, *et al.*, 1953), ya se podría discutir más sobre si el aumento de rendimiento podría llegar a ser justificable con el costo del EOPO. Sin embargo, para poder saber que aplicaciones tendrá el EPS producido en medio mineral con sacarosa, se necesitaría caracterizar el EPS producido en este medio de cultivo, objetivó que no fue abordado dentro de este proyecto.

## **CAPITULO 7**

### **CONCLUSIONES**

I. El cambio en el medio de cultivo no afectó de manera significativa la producción de biomasa ni del EPS en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en fermentación sumergida.

II. Se logro bajar el costo de producción del medio un 30%.

III. La viabilidad celular de los cultivos al final del experimento con el EOPO 12,000 disminuyo entre un 35 y 43% respecto a los controles y para el EOPO 970 disminuyo entre 16 y 45% respecto a los controles.

IV. La generación de biomasa para el EOPO 12,000 y 970 fue significativamente menor con respecto a los controles.

V. Se caracterizó la generación de las dos fases respecto al tiempo y concentración necesaria para la formación de las fases y se eligió la concentración de un 40% (v/v) de EOPO y una temperatura de 35°C por aproximadamente 11 minutos, ya que con esas condiciones se atrapo un 93% de biomasa en la fase inferior y 42% de EPS en la fase superior. Además, se utilizaron dichas condiciones para el estudio de la prueba de reciclado.

VI. Se realizó una prueba de concepto de reciclado del EOPO, encontrándose que el EOPO puede reciclarse al menos 4 veces sin que la cantidad de EPS recuperado se viera afectada.

VII. Los costos operativos de la recuperación del EPS utilizando la fermentación extractiva fueron 61 veces mas caros con respecto a la fermentación sumergida.

VIII. La hipótesis se rechazó, ya que la implementación de la fermentación extractiva al proceso se recuperación de EPS en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L no permitió aumentar la recuperación y purificación del EPS a un menor costo.

## **CAPITULO 8**

### **PERSPECTIVAS**

En este trabajo se investigó la parte microbiológica del comportamiento del cultivo junto con el EOPO. Sin embargo, un factor importante que hay que investigar son los parámetros reológicos del cultivo, ya que el poder conocer estos parámetros nos permitirá establecer una estrategia para la producción a una mayor escala o en un cultivo continuo.

Ya que este proceso se quiere llevar al mercado, se necesita realizar pruebas con reactores a una mayor escala para saber como se comportará el microorganismo en mayores volúmenes de cultivo. Esto, para poder generar una estrategia que nos permita seguir con los rendimientos a nivel matraz.

Por último, como se mencionó antes, se necesita volver a realizar una caracterización del EPS ya que muy probablemente éste haya cambiado su composición de carbohidratos por el cambio en la fuente de carbono y tal vez, por la presencia el EOPO. Por lo tanto, es necesario investigar cuáles son los carbohidratos que componen el EPS producido por las condiciones presentadas en esta investigación, así como la proporción de los mismos y sus posibles nuevas aplicaciones.

## CAPITULO 9

### MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 9. Análisis de Varianza para la Biomasa

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.7956	1	1.7956	14.938436	0.060891197	18.51282051
Dentro de los	0.2404	2	0.1202			
Total	2.036	3				

Tabla 10. Análisis de Varianza para el EPS

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0009	1	0.0009	1.8	0.3117528	18.51282051
Dentro de los grupos	0.001	2	0.0005			
Total	0.0019	3				

Tabla 11. Análisis de Varianza para el EOPO 970

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0003575	4	8.937E-05	19.453962	0.002999609	5.1921678
Dentro de los	2.297E-05	5	4.594E-06			
Total	0.0003805	9				

Tabla 12. Análisis de Varianza para el EOPO 12,000

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00093756	2	0.00046878	65.3503717	0.0033611	9.5520945
Dentro de los	0.00002152	3	7.1733E-06			
Total	0.00095908	5				

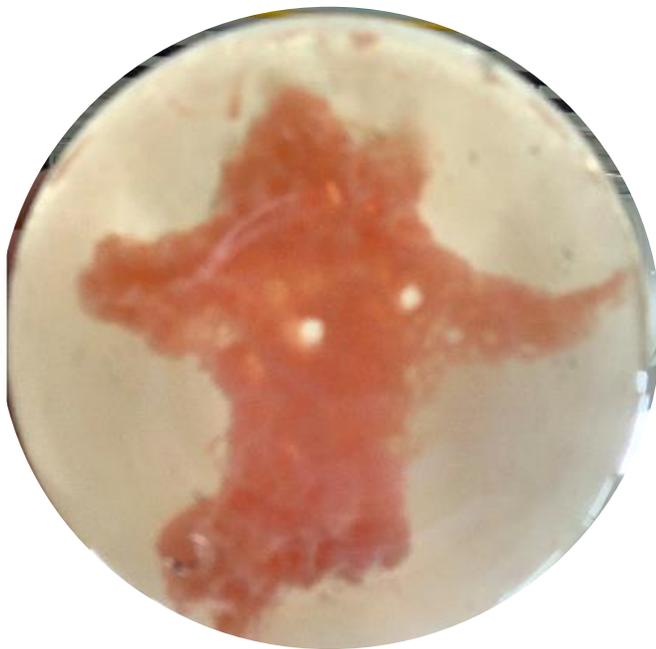


Figura 23. Vista inferior del matraz con una concentración de EOPO al 40%(v/v) se logra ver la red micelar atrapando la biomasa



Figura 24. Caracterización de las fases de una concentración de EOPO al 40%(v/v)

## **CAPITULO 10**

### **BIBLIOGRAFIA**

- Aksu, Z., & Tug, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source, *Process Biochemistry*, 40(9), 2985–2991. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., & Hatton, T. A. (1994). Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*, 27(9), 2414–2425. <http://doi.org/10.1021/ma00087a009>
- Ananeva. (2002). FOOD ADDITIVE “KRILASORB.” Russia, RU2177695C2
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., & Pathak, H. (2014). Microbial Exopolysaccharides: Advances in Applications and Future Prospects. *Biotechnology Vol. 3: Microbial Biotechnology*, 25. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.3518.4484>
- Ann, M., Ramirez, J. R., Dizon, E. I., & Mercado, S. M. (2015). Substrate Optimization for Exopolysaccharide Production by *Rhodotorula minuta* BIOTECH 2178 using Simplex-Lattice Design. *Journal of Society & Technology*, 5(1), 34–41. Extraído de <http://www.jst-online.org/index.php/JST/article/view/42>
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, 1238(2), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>
- Ates, O. (2015). Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(200), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Ampacher W. H., Curreri A. R. (1953). Use of dextran in control of shock resulting from war wounds. *AMA Arch Surg*.66(6):730–740. [doi:10.1001/archsurg.1953.01260030750004](https://doi.org/10.1001/archsurg.1953.01260030750004)
- Banik, R. M., Santhiagu, a., & Kanari, B. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(4):337-348 <http://doi.org/10.1023/A:1023940809095>
- Berggren, K., Johansson, H. O., & Yjerneld, F. (1995). Effects of salts and the surface hydrophobicity of proteins on partitioning in aqueous two-phase systems containing

thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *Journal of Chromatography A*, 718(1), 67-69 [http://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00657-5](http://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00657-5)

Bhatia, S. C. (2016). *Food biotechnology*. India Woodhead Publishing India PVT. Limited.

Bont, J. A. M. De. (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *bulgaricus* NCFB 2772, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(3), 279–284. <https://doi.org/10.1007/s002530050817>

Bont, J. A. M. De. (1997). Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 516–521. DOI <https://doi.org/10.1007/s002530051089>

Chen, B., Han, J., Wang, Y., Sheng, C., Liu, Y., Zhang, G., & Yan, Y. (2014). Separation, enrichment and determination of ciprofloxacin using thermoseparating polymer aqueous two-phase system combined with high performance liquid chromatography in milk, egg, and shrimp samples. *Food Chemistry*, 148(1), 105–111. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.011>

Cheng, Z., Song, H., Cao, X., Shen, Q., Han, D., Zhong, F., ... Yang, Y. (2017). Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system. *Industrial Crops and Products*, 102(4), 75–87. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.029>

Chi, Z., & Zhao, S. (2003). Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(3), 206–211. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00119-4](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00119-4)

Cho, D. H., Chae, H. J., & Kim, E. Y. (2001). Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(3), 183–193. <http://doi.org/10.1385/ABAB:95:3:183>

Dembczyński, R., Białas, W., & Jankowski, T. (2013). Partitioning of lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide copolymer and potassium phosphates. *Food and Bioproducts Processing*, 91(3), 292–302.

<http://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.11.001>

Dembczyński, R., Białas, W., Regulski, K., & Jankowski, T. (2010). Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide-propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate. *Process Biochemistry*, *45*(3), 369–374. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.10.011>

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 951–962. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>

Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., Rosa, P. A. J., & Aires-Barros, M. R. (2008). Purification of human immunoglobulin G by thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. *1195*(2), 94-100.<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.077>

Freitas, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*. *2445*(2) 1674-1763. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>

Garza, M. T. G., Perez, D. B., Rodriguez, A. V., Garcia-Gutierrez, D. I., Zarate, X., Cardenas, M. E. C., ... Morones-Ramirez, J. R. (2016). Metal-induced production of a novel bioadsorbent exopolysaccharide in a native rhodotorula mucilaginosa from the mexican northeastern region. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148430>

Ghada, S., Mahmoud, G., Asker, M. S., & Ghazy, A. (2012). Production and Biological Evaluation of Exopolysaccharide From Isolated Rhodotorula glutinins. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(3), 401–408.

Gientka, I., Blazejak, S., Stasiak-Różanska, L., & Chlebowska-Smigiela, A. (2015). Exopolysaccharides from yeast: Insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties - review. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, *14*(4), 283–292. <http://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.4.29>

Grigorova, D., Pavlova, K., & Panchev, I. (1999). Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast Rhodotorula acheniorum MC. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *81*(3), 181–91. <https://doi.org/10.1385/ABAB:81:3:181>

Guo, W., & Chi, Y. (2017). Purification and fermentation characteristics of exopolysaccharide from Fomitopsis castaneus Imaz. *International Journal of Biological*

- Macromolecules*, 105(1), 213-218. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.128>
- Hasmann, F. A., Santos, V. C., Gurpilhares, D. B., Pessoa, A., & Roberto, I. C. (2008). Aqueous two-phase extraction using thermoseparating copolymer: A new system for phenolic compounds removal from hemicelulosic hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83(2).167 - 173. <http://doi.org/10.1002/jctb.1779>
- Humbird, D., & Fei, Q. (2016). *Scale-Up Considerations for Biofuels. Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*. 513-517 <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00020-0>
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(1), 10–27. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., ... Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18(1), 1–18. <http://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>
- Johansson, H. O., Persson, J., & Tjerneld, F. (1999). Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two- phase system for protein purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(4), 247–257. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:4<247::AID-BIT6>3.0.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:4<247::AID-BIT6>3.0.CO;2-5)
- Jönsson, M., & Johansson, H.-O. (2003). Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. *Journal of Chromatography. A*, 983(1–2), 133–144. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01695-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01695-3)
- Jun & Itano, Ruriko & Morii, Naoya & Ebina, Futoshi & Matsuda, Kiichi & Katohda, Shigeyoshi. (2004). Production and Rheology of Exopolysaccharide by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* YR-2. *Journal of Applied Glycoscience*. 51(1). 255-257. [10.5458/jag.51.255](http://doi.org/10.5458/jag.51.255).
- Kold, David. (2010). *Study of Mass Transfer in Viscous Fermentations (Tesis de Doctorado)* -. Universidad Tecnica de Dinamarca. Dinamarca.
- Kuncheva, M., Pavlova, K., Panchev, I., & Dobрева, S. (2007). Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeasts. *International Journal of Cosmetic Science*,

29(5), 377–384. <http://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00393.x>

Lad, K., Bahadur, A., Pandyat, K., & Bahadur, P. (1995). Clouding and aggregation behaviour of ethylene oxide/propylene oxide/ethylene oxide block copolymers in aqueous media in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Indian Journal of Chemistry*, 34(2), 938–945. Recuperado de: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40363/1/IJCA\\_34A%2812%29\\_938-945.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40363/1/IJCA_34A%2812%29_938-945.pdf)

Leong, Y. K., Lan, J. C. W., Loh, H. S., Ling, T. C., Ooi, C. W., & Show, P. L. (2016). Thermoseparating aqueous two-phase systems: Recent trends and mechanisms. *Journal of Separation Science*, 39(4), 640–647. <http://doi.org/10.1002/jssc.201500667>

Leong, Y. K., Lan, J. C. W., Loh, H. S., Ling, T. C., Ooi, C. W., & Show, P. L. (2017). Cloud-point extraction of green-polymers from *Cupriavidus necator* lysate using thermoseparating-based aqueous two-phase extraction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 370–375. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.007>

Li, M., & Peebles, T. L. (2004). Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 807(1), 69–74. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.030>

Matanović, M. R., Kristl, J., & Grabnar, P. A. (2014). Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 262–275. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.029>

Metz, B., Kossen, N. W. F., & Suijdam, J. C. (1979). The Rheology of Mould Suspensions. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 11(-1)103–156. [http://doi.org/10.1007/3-540-08990-x\\_24](http://doi.org/10.1007/3-540-08990-x_24)

N. Sanchez, D. Ramírez, a. Z. (2007). Evaluación De Un Sistema De Fermentación Extractiva Para La Producción De Ácido Láctico Utilizando Suero De Leche Como Sustrato. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica Vitae*, 14(2), 27–34. <http://doi.org/10.1590/0104-1428.1986>

Ng, H. S., Tan, C. P., Mokhtar, M. N., Ibrahim, S., Ariff, A., Ooi, C. W., & Ling, T. C. (2012). Recovery of *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase and recycling of phase components in an aqueous two-phase system using thermo-separating polymer.

- Separation and Purification Technology*, 89(1), 9–15.  
<http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.028>
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145–1158. <http://doi.org/10.1080/09593330903552094>
- Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R., & Kanasawud, P. (2006). Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1103–1107. <http://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2006.02.013>
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002–14015. <http://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Ooi, C. W., Hii, S. L., Kamal, S. M. M., Ariff, A., & Ling, T. C. (2011). Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochemistry*, 46(1), 68–73. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.014>
- Patidar, P., Pillai, S. A., Bahadur, P., & Bahadur, A. (2017). Tuning the self-assembly of EO-PO block copolymers and quercetin solubilization in the presence of some common pharmaceutical excipients: A comparative study on a linear triblock and a starblock copolymer. *Journal of Molecular Liquids*, 241(1), 511–519. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.035>
- Pavlova, K., & Grigorova, D. (1999). Production and properties of exopolysaccharide by *Rhodotorula acheniorum* MC. *Food Research International*, 32(7), 473–477. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00110-6](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00110-6)
- Pavlova, K., Koleva, L., Kratchanova, M., & Panchev, I. (2004a). Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 435–439. <http://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000033068.45655.2a>
- Pavlova, K., Koleva, L., Kratchanova, M., & Panchev, I. (2004b). Production and Characterization of an Exopolysaccharide by Yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 435–439. <http://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000033068.45655.2a>
- Persson, J., Johansson, H. O., & Tjerneld, F. (1999). Purification of protein and recycling

of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. *Journal of Chromatography A*, 864(1), 31–48. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00991-7](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00991-7)

Persson, J., Kaul, A., & Tjerneld, F. (2000). Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 243(1), 115-126 . [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00213-9](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00213-9)

Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 273–281. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>

Planas, J., Ra<sup>o</sup>dström, P., Tjerneld, F., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Enhanced production of lactic acid through the use of a novel aqueous two-phase system as an extractive fermentation system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45(6), 737–743. <http://doi.org/10.1007/s002530050756>

Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., & Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea*, 201(1) 1-13 . <http://doi.org/10.1155/2011/693253>

Prasad. (2008). Sensitivity of Grain Sorghum to High Sensitivity of Grain Sorghum to High Temperature Stress during. *Crop Science*, 48(5), 1911-1917 <http://doi.org/10.2135/cropsci2008.01.0036>

Rabelo, A. P. B., Tambourgi, E. B., & Pessoa, A. (2004). Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 807(1), 61-68. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.029>

Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2012). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Science and Technology*, 1(1), 7–16. <http://doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02>

Rico-Castro, X., González-Amado, M., Soto, A., & Rodríguez, O. (2017). Aqueous two-phase systems with thermo-sensitive EOPO co-polymer (UCON) and sulfate salts: Effect of temperature and cation. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 108(1), 136–142. <http://doi.org/10.1016/j.jct.2017.01.009>

- Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2015). High throughput exopolysaccharide screening platform: From strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 212–220. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.021>
- Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., & Georgieva, K. (2011). Effect of Different Carbon Sources on Biosynthesis of Exopolysaccharide from Antarctic Strain *Cryptococcus Laurentii* AL62. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *25*(1), 80–84. <http://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0121>
- Saha, B. C. (2006). A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(4), 676–680. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0364-z>
- Sanchez-Garcia, M. D., Lagaron, J. M., & Hoa, S. V. (2010). Effect of addition of carbon nanofibers and carbon nanotubes on properties of thermoplastic biopolymers. *Composites Science and Technology*, *70*(7), 1095–1105. <http://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.02.015>
- Satyanarayana, T., & Kunze, G. (2009). *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4>
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(4), 425–435. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>
- Seviour, R. J., McNeil, B., Fazenda, M. L., & Harvey, L. M. (2011). Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*, *31*(12), 170–85. <http://doi.org/10.3109/07388551.2010.505909>
- Show, P. L., Tan, C. P., Shamsul Anuar, M., Ariff, A., Yusof, Y. A., Chen, S. K., & Ling, T. C. (2012b). Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, *116*, 226–233. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.131>
- Simova, E. D., Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2004a). Exopolysaccharides produced by mixed culture of yeast *Rhodotorula rubra* GED10 and yogurt bacteria (*Streptococcus*

- thermophilus 13a + *Lactobacillus bulgaricus* 2-11). *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 512–519. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02316.x>
- Simova, E. D., Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2004b). Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 115–121. <http://doi.org/10.1007/s10295-004-0122-0>
- Sutherland, I. W. (1972). 2.16 Bacterial Exopolysaccharides, *Adv Microb Physio*, 8(1),143-213, PMID: 4581483
- Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., & Sandeep, K. P. (2012). Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5), 426–442. <http://doi.org/10.1080/10408398.2010.500508>
- Teresa Cunha, M., Cabral, J. M. S., Tjerneld, F., & Raquel Aires-Barros, M. (2000). Effect of salts and surfactants on the partitioning of fusarium solani pisi cutinase in aqueous two-phase systems of thermoseparating ethylene oxide/propylene oxide random copolymer and hydroxypropyl starch. *Bioseparation*, 9(4), 203–209. <http://doi.org/10.1023/A:1008132108117>
- Trabelsi, I., Slima, S. Ben, Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74(1), 541–546. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045>
- Villay, A., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Delbac, F., & Michaud, P. (2013). Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresource Technology*, 146(3), 732–735. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.030>
- Xiong, X., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2014). Accumulation of yellow *Monascus* pigments by extractive fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1173–1180. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-6227-0>
- Yau, Y. K., Ooi, C. W., Ng, E. P., Chi, J., Lan, W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2015). Current applications of different type of aqueous two - phase systems. *Bioresources and*

*Bioprocessing*, 49(2), 1-13. <http://doi.org/10.1186/s40643-015-0078-0>

Yuksekdag, Z. N., & Aslim, B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22) *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(6), 581–585. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000300019>

Zhu, J. H., Yan, X. L., Chen, H. J., & Wang, Z. H. (2007). In situ extraction of intracellular l-asparaginase using thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1147(1), 127–134. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.035>

**CAPITULO 11**  
**RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

Carlo Franco Medina Ramirez

Candidato para el grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

**Tesis:** Diseño de un sistema de fermentación extractiva para la recuperación de  
exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L

**Edad:** 25 años

**Campo de Estudio:** Uso de polímeros termosensibles para su aplicación en un sistema  
de fermentación extractiva.

**Biografía:**

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 10 de Julio de 1993, hijo de  
Jorge Gerardo Medina Garza y Graciela Ramirez Medina

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de  
Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2016.

