

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS**



**Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans*  
mediante fermentación extractiva con agentes termosensibles**

**Por**

**L.B.G. CARLOS IVAN AVILA VELASCO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**Abril, 2021**

V.O. Bo.  
*[Handwritten signature]*  
29-abril-2021

**Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* mediante  
fermentación extractiva con agentes termosensibles**

Revisión de tesis:

---

**Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo**

Director de Tesis

---

**Dra. Alcione García González**

Comité Tutorial

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**

Comité Tutorial

---

**Dr. Ulrico Javier López Chuken**

Comité Tutorial

---

**Dra. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Subdirectora de Estudios de Posgrado

**Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* mediante  
fermentación extractiva con agentes termosensibles**

Aprobación de tesis:

---

**Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo**

Director de Tesis

---

**Dra. Alcione García González**

Comité Tutorial

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**

Comité Tutorial

---

**Dr. Ulrico Javier López Chuken**

Comité Tutorial

---

**Dra. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Subdirectora de Estudios de Posgrado

## **DEDICATORIA**

**A mi familia** por toda la comprensión y apoyo brindado a lo largo de estos años.

**A mi Padre José Carlos Avila López** quien siempre me animo a superarme y apoyarme en todos los aspectos a lo largo del camino.

**A mi Madre Bacilia Velasco** Medellín que por todo su amor y cariño a lo largo de los años y por siempre sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles.

**A mis amigos y compañeros** de trabajo quienes siempre me mostraron su apoyo incondicional y estuvieron presentes tanto en los buenos momentos como en los no tan buenos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primordialmente quiero agradecer a mi directora de tesis: La Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo a quien le tengo una gran admiración y cariño al demostrar siempre una gran determinación para sacar las cosas adelante y mostrar una actitud muy positiva en todo momento. Además de brindarme su confianza y apoyo durante toda mi estancia, en un entorno de comunicación muy amigable.

A mi comité de tesis: La Doctora Alcione García González, el Doctor Edgar Allan Blanco Gámez y el Doctor Ulrico Javier López Chuken por todas sus aportaciones al proyecto y mostrar siempre una actitud de apoyo.

A mis amigos de la licenciatura, Axel, Alfred, Maury, Martín y Uriel por todo el apoyo brindado, ya que sin ustedes nada de esto sería posible. También a mi amiga, confidente Polilla que, aunque no lo crea estos años fuiste una persona muy especial para mí gracias por desvelarte conmigo hasta la madrugada haciendo trabajos y darme el apoyo que siempre requerí, sin duda te has vuelto una persona muy especial para mí, gracias por estar siempre ahí.

A mi compañero, hermano del alma con quien entable una gran amistad durante la Maestría Francisco Ricardo Recio alias pakin con quien durante estos dos años forje una gran hermandad y me ha inspirado a seguir adelante y superar mis límites.

## **FINANCIAMIENTO**

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca proporcionada (CVU 932082) y la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) los cuales permitieron la realización de este proyecto en sus instalaciones y continuar con mi desarrollo académico y profesional

## TABLA DE CONTENIDO

### Contenido

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN .....	10
CAPITULO 2 ANTECEDENTES .....	14
2.1 Polisacáridos.....	14
2.1.1 Exopolisacáridos.....	15
2.1.2 Exopolisacáridos Microalgales.....	15
2.1.2.1 Aplicaciones del EPS Microalgal .....	17
2.2 EPS de <i>N. oleoabundans</i> .....	18
2.3 Recuperación de EPS .....	18
2.4 Fermentación extractiva.....	20
2.4.1 Aplicaciones de la fermentación extractiva .....	21
2.5 Sistemas de dos Fases Acuosa (ATPS) .....	22
2.5.1 Sistemas ATPS aplicados a Microalgas .....	24
2.5.2 Polímeros termosensibles .....	26
2.6 Fermentación extractiva acoplada con sistema ATPS.....	27
CAPITULO 3 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	29
3.1 Hipótesis.....	29
3.2 Objetivos .....	29
3.2.1 Objetivo General .....	29
3.2.2 Objetivos Específicos .....	29
3.3 Aportación científica .....	29
CAPITULO 4 MATERIALES Y METODOS .....	30
4.1 Plan de trabajo del proyecto de investigación .....	30
4.2 Disposición de residuos.....	30
4.3 Materiales .....	30
4.4 Reactivos .....	31
4.5 Equipos.....	31
4.6 Realización del proyecto .....	31
4.7 Elaboración del medio cultivo .....	32

4.8 Prueba de viabilidad con el EOPO .....	33
4.9 Prueba de producción de EPS con el EOPO .....	36
4.9.1 Recolección de la Biomasa y el EPS .....	36
4.9.2 Concentrado y Pesado de la Biomasa y EPS .....	37
4.10 Generación de Fases con el EOPO .....	38
4.11 Caracterización de EPS en sistemas de fermentación extractiva .....	39
4.12 Prueba de producción de EPS bajo un sistema semicontinuo .....	41
4.13. Confirmación de EPS por el método de azúcares totales .....	42
4.14. Análisis estadístico .....	43
CAPITULO 5 RESULTADOS.....	44
5.1 Pruebas de viabilidad con el EOPO .....	44
5.2 Recuperación de Biomasa y EPS con el EOPO .....	50
5.3 Generación de fases con el EOPO.....	51
5.4 Producción de EPS en sistemas de fermentación extractiva .....	54
5.5 Generación de EPS en un sistema semicontinuo.....	56
5.6 Detección de azúcares por el método de ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales...58	
CAPITULO 6 DISCUSIÓN.....	60
6.1 Viabilidad del medio de cultivo con el EOPO 12,000 .....	60
6.2 Recuperación de EPS y Biomasa con el EOPO .....	62
6.3 Formación de fases con el EOPO .....	63
6.3 Caracterización del sistema de fermentación extractiva .....	65
6.4 Rendimiento de EPS por fermentación extractiva.....	67
6.5 Rendimiento de EPS en un sistema semicontinuo.....	68
6.6 Detección de EPS por el método de ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales.....70	
CAPITULO 7 CONCLUSIONES .....	72
CAPITULO 8 PERSPECTIVAS .....	73
CAPITULO 9 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	74
CAPITULO 10 BIBLIOGRAFIA .....	79
CAPÍTULO 11 RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	87



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplo de bioactividades de diferentes EPS producidos por microalgas.....	16
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio de cultivo descrito por Salim y colaboradores 2011 para preparar un litro .....	32
<b>Tabla 3.</b> Valores obtenidos a través del modelo matemático de Gompertz aplicado a las cinéticas de crecimiento de <i>N. oleoabundans</i> .....	47
<b>Tabla 4.</b> Valores obtenidos EPS para las pruebas de producción con diferentes concentraciones de EOPO después de 21 días .....	50
<b>Tabla 5.</b> Tiempos obtenidos para la generación de fases con las diferentes concentraciones de EOPO y temperaturas de formación. ....	52
<b>Tabla 6.</b> Porcentajes de EPS y biomasa recuperado de la fase inferior y fase superior de los sistemas de fermentación con un 20 y 25% de EOPO. ....	56
<b>Tabla 7.</b> Producción de EPS obtenida en 12 días en los sistemas semi continuo y por lotes. ....	57
<b>Tabla 8.</b> Análisis de Varianza para la concentración celular.....	74
<b>Tabla 9.</b> Análisis de medias por la prueba de Tukey para la concentración celular .....	74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Esquema general de un proceso de recuperación por ATPS.....</i>	23
<b>Figura 2.</b> Esquema general de la cámara de Neubauer representando en naranja los cuadrantes utilizados para el conteo celular. ....	34
<b>Figura 3.</b> Metodología general para las pruebas de viabilidad con el EOPO a diferentes concentraciones .....	35
<b>Figura 4.</b> Metodología general para las pruebas de Producción de EPS con el EOPO a diferentes concentraciones.....	36
<b>Figura 5.</b> Metodología utilizada para el proceso de recolección de biomasa y EPS de <i>N. oleoabundans</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> Procedimiento general para la obtención de los pesos de la biomasa y el pellet del EPS .....	38
<b>Figura 7.</b> Esquema general para las pruebas de formación de dos fases .....	39
<b>Figura 8.</b> Proceso general para el sistema de fermentación extractiva implementado para la recuperación de EPS .....	40
<b>Figura 9.</b> Metodología empleada para el sistema de fermentación extractiva implementado para la recuperación de EPS .....	42
<b>Figura 10.</b> Metodología general para la prueba de azúcares totales aplicada a las muestras obtenidas de la prueba de producción.....	43

<b>Figura 11.</b> Primer día de incubación de los matraces inoculados con diferentes concentraciones de EOPO: A) Control. B) Matraces con 10% de EOPO. C) Matraces con 20% de EOPO. D) Matraces con 30% de EOPO .....	44
<b>Figura 12.</b> A) Matraces control después de 8 días de incubación. B) Matraces con 10% de EOPO después de 8 días de incubación. C) Matraces con 20% de EOPO después de 13 días de incubación.....	45
<b>Figura 13.</b> Matraces correspondientes a la prueba de viabilidad al finalizar el tiempo de incubación de 24 días .....	45
<b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento de <i>N. oleoabundans</i> bajo diferentes concentraciones del EOPO 12,000 en un plazo de 24 días .....	46
<b>Figura 15.</b> Ajuste del modelo matemático de Gompertz para el crecimiento <i>N. oleoabundans</i> bajo diferentes concentraciones del EOPO 12,000 A) Matraz Control B) Matraz con 10% de EOPO C) Matraz con 20 % de EOPO .....	49
<b>Figura 16.</b> A) Matraces utilizados para la formación de fases B) Baño María .....	51
<b>Figura 17.</b> Formación de fases utilizando una temperatura de 70 °C con una concentración del 20% de EOPO A) Proceso inicial de formación de fases B) Obtención final de fases ..	52
<b>Figura 18.</b> Formación de fases utilizando una temperatura de 70 °C con una concentración del 25% de EOPO A) Proceso inicial de formación de fases B) Obtención final de fases ..	53
<b>Figura 19.</b> Formación de fases incompleta utilizando una temperatura de 60 °C con una concentración del 25% de EOPO .....	54
<b>Figura 20.</b> Proceso de fermentación extractiva con 25% de EOPO A) Separación de fases B) Recuperación de ambas fases en tubos Falcon.....	55

<b>Figura 21.</b> Proceso de fermentación extractiva con 20% de EOPO A) Separación de fases B) Recuperación de ambas fases en tubos Falcon.....	55
<b>Figura 22.</b> Cambio de coloración del Matraz 1 después de realizar la separación de fases con el EOPO 12, 000.....	58
<b>Figura 23.</b> Cambio de color de las muestras de las pastillas indicando la presencia positiva de azúcares en cada uno de los tubos .....	59
<b>Figura 24.</b> Concentraciones de glucosa utilizadas para la elaboración de la curva de calibración para carbohidratos totales .....	59
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica de las diferencias de las medias para la concentración celular obtenidas por la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% .....	75
<b>Figura 26.</b> Condiciones la incubadora para el crecimiento de <i>N. oleoabundans</i> .....	75
<b>Figura 27.</b> Crecimiento celular observado en las pruebas de viabilidad después de terminar el período de incubación A) Matraz control B) Matraz con 20% de EOPO .....	76
<b>Figura 28.</b> Formación de fases con una concentración del 25% de EOPO antes y después del tratamiento térmico.....	76
<b>Figura 29.</b> Precipitación del EPS obtenido de los matraces con un 20% de EOPO después del tiempo de incubación de 12 horas a -20°C .....	77
<b>Figura 30.</b> Curva de crecimiento correspondiente al sistema de producción semicontinuo utilizando una concentración del 25% de EOPO.....	77
<b>Figura 31.</b> Curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de carbohidratos totales.....	78

## NOMENCALTURA

ATPS	Sistema de Dos Fases Acuosas
cel	Células
EOPO	Poly-óxido de etileno (EO) y Oxido de propileno (PO)
EPS	Exopolisacáridos
g	Gramos
h	Horas
kDa	Kilodaltons
L	Litro
mg	Miligramo
min	minutos
μL	microlitro
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de Hidrogeno
PEG	Polietilenglicol
p	Peso
PHAs	Polihidroxiacanoatos
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
TAG	triglicéridos
LCST	Temperatura de Solución Crítica más Baja
v	Volumen

## RESUMEN

Nombre: Carlos Iván Avila Velasco  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Faculta de Ciencias Químicas

Título del estudio: Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* mediante fermentación extractiva con agentes termosensibles

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

Área de estudio: Biotecnología y Microbiología

Número de páginas: 77

**Propósito y Método de estudio:** En los últimos años las microalgas han abarcado un gran número de investigaciones debido al gran potencial que poseen como microorganismos productores de metabolitos de interés. Entre estos compuestos se encuentran los EPS (exopolisacáridos) los cuales son moléculas con propiedades espesantes e inmunomoduladoras con una gran aplicación en el sector industrial. Sin embargo, en la actualidad los métodos empleados para su obtención generan mayores pérdidas que ganancias, al no favorecer las condiciones para llevar a cabo un proceso que se efectúe de manera continua. En el presente proyecto se plantea utilizar la técnica de fermentación extractiva acoplada con agentes termosensibles (EOPO 12000) para la recuperación de EPS producido por la microalga *Neochloris oleoabundans*.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se probaron diferentes concentraciones del EOPO 12000 en el medio de cultivo de *Neochloris oleoabundans* para determinar la viabilidad de la microalga en presencia del polímero, en donde se encontró que a partir de una concentración del 30% de EOPO el crecimiento de la microalga fue inhibido por completo, por lo que se trabajó para las pruebas posteriores con concentraciones menores al 30%. Para llevar a cabo la formación de fases se estudiaron diferentes temperaturas con diferentes concentraciones del agente termosensible, en donde se encontró que los medios con concentraciones de un 20 y 25% del polímero resultaron positivas para la formación de dos fases a partir de una temperatura de 70 °C. Una vez que se obtuvieron los parámetros para la formación de fases se cuantificó la producción de EPS a partir del sistema de fermentación extractiva, utilizando una concentración del 20 y 25% de EOPO en el medio de cultivo. Los mejores rendimientos de EPS se obtuvieron utilizando una concentración del 25% de EOPO. Para evaluar la efectividad de la técnica se acopló a un sistema semicontinuo que se comparó con un sistema tradicional por lotes en donde se observó que debido a las condiciones empleadas para la separación de fases la microalga pierde su viabilidad; limitando al proceso de producción bajo un sistema batch.

Asesor: Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

## ABSTRACT

**Purpose and Study Method:** In recent years, a large number of investigations have been performed on microalgae due to its great potential as microorganisms that produce metabolites of interest. EPS (exopolysaccharides) are an example such compounds. EPS are molecules with thickening and immunomodulatory properties with great application in the industrial sector. However, the methods used to obtain them do not favor the conditions to carry out a recovery and purification process that is carried out continuously. In this project, the use of extractive fermentation technique coupled with heat-sensitive agents (EOPO 12000) for the recovery of EPS produced by the microalgae *Neochloris oleoabundans*.

**Contributions and Conclusions:** Different concentrations of EOPO 12000 were tested in the culture medium for *Neochloris oleoabundans* to determine the viability of the microalgae in the presence of the polymer. It was found that a 30% EOPO concentration hinders microalgae growth, so subsequent tests were performed using concentrations lower than 30%. To carry out the two-phase formation, different temperatures were studied with different EOPO concentrations, where the media with 20 and 25% EOPO were positive for the two-phase formation at 70 ° C. Once the parameters for the two phase formation were obtained, the production of EPS from the extractive fermentation system was quantified, using 20 and 25% EOPO in the culture medium. The best EPS yields were obtained using a 25% concentration of EOPO. To evaluate the effectiveness of the technique, it was coupled to a semi-continuous system that was compared with a traditional batch system where it was observed that due to the conditions used for the separation of phases, the microalgae lost its viability, limiting the production process to a batch system.

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

El uso de sistemas biológicos para la producción y extracción de moléculas de interés a través de procesos sustentables, representa una gran alternativa para suplir aquellas operaciones de alta demanda industrial que emplean una gran cantidad de energía e inversión económica, que al final repercute en el costo final o valor comercial del producto (Cisneros Ruiz & Rito Palomares, 2005). El uso de microorganismos unicelulares como pequeños reactores para la generación de compuestos de interés comercial, ha sido una estrategia adoptada últimamente en la producción de múltiples productos, debido a la gran variedad de compuestos que producen, además de presentar múltiples ventajas en su manipulación como un crecimiento acelerado y requerimientos muy básicos para su mantenimiento (Liu *et al.*, 2016).

En la actualidad existen diferentes sectores industriales que involucran el uso microorganismos dentro de sus procesos de producción, entre los más comunes se encuentra la industria alimentaria donde podemos encontrar la participación de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* en la elaboración de bebidas fermentadas (Gallone *et al.*, 2016) y en la industria farmacéutica, donde se trabaja en la producción de moléculas con potencial bactericida, como la estreptomicina derivada de la actinobacteria *Streptomyces griseus* (Meanwell & Shama, 2008). Aun así, a pesar del número amplio de microorganismos que podemos encontrar dentro de estos procesos, aún siguen existiendo una gran infinidad de los cuales falta aún por caracterizar. Dentro de este gran grupo de microorganismos por explorar podemos encontrar organismos unicelulares eucariotas que manejan una gran capacidad de producción de biomoléculas que aún no han sido completamente explotadas, como es el caso de las microalgas.

Las microalgas son organismos vivos ancestrales que constituyen la base de las cadenas alimentarias acuáticas. Son un grupo filogenéticamente diverso, que abarca una serie de diferentes filos y clases de organismos (Koyande *et al.*, 2019). En los últimos años se han realizado un gran número de estudios buscando aprovechar el alto



potencial de los diferentes compuestos que pueden generar para su aplicación industrial, entre los que se encuentra una amplia variedad de polisacáridos, lípidos, pigmentos, proteínas, antioxidantes, entre otros compuestos valiosos en cantidades significativas (Camacho *et al.*, 2019; Lian *et al.*, 2018).

Dentro de esta gran variedad de compuestos producidos por las microalgas, la producción de exopolisacáridos (EPS) representa una de las áreas de mayor interés para su aprovechamiento, debido al gran potencial que representa para su aplicación en diferentes sectores aunado a sus propiedades estructurales y funcionales (Angelis *et al.*, 2012). Estos exopolisacáridos de fuentes biológicas son capaces de explotarse comercialmente de diferentes formas, como para su uso como gomas, aditivos alimenticios, espesantes, estabilizadores de suelo, fitorremediación, entre otros (D. Kumar *et al.*, 2018). Entre algunas de las principales especies estudiadas por su producción de EPS podemos encontrar a *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Porphyridium cruentum* y *Nannochloropsis sp.* (Freitas *et al.*, 2017).

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que otras especies de microalgas son capaces de producir este tipo de compuestos al cultivarse bajo distintas condiciones, como es el caso de *Neochloris oleabundans*, que al someterse bajo condiciones mixotróficas se ha encontrado que es capaz de producir de manera considerable polímeros extracelulares utilizando como sustrato azúcares como sacarosa, glucosa y lactosa (Wu *et al.*, 2011).

Entre las propiedades que se le pueden atribuir al exopolisacárido producido por *N. oleabundans* además de alterar los comportamientos reológicos de los sistemas en soluciones acuosas actuando como agentes espesantes o emulsionantes, destaca su actividad inmunoreguladora recientemente descubierta por (Li *et al.*, 2020) en donde sugieren su aplicación en la elaboración de productos farmacéuticos. Sin embargo, las investigaciones relacionadas con las actividades médicas del EPS producido por *N. oleabundans* aún son muy limitadas por lo que faltaría investigar más al respecto.

Aun así, a pesar de las diferentes propiedades que se les han adjuntado a estas biomoléculas, las principales limitaciones para su comercialización están sujetas a

varios factores que engloban el proceso completo de producción, como el diseño del sistema de cultivo, las necesidades nutricionales, así como el proceso de recuperación y purificación, que en general representan un mayor costo en comparación con las ganancias generadas por el valor comercial del producto (Liu *et al.*, 2016).

Esta fase del procedimiento que corresponde al aislamiento del EPS representa la mayor demanda energética, junto con más del 70% de los costos totales del bioproceso, esto debido a el empleo de métodos de extracción convencionales (Ej., calor, solventes orgánicos, alcalinos) que emplean un gran número de operaciones unitarias (Banik *et al.*, 2003; Xiao & Zheng, 2016). Sin embargo, la problemática se empieza a presentar desde la etapa de fermentación, donde la mayoría de los procesos de producción de EPS está mal integrada con las etapas posteriores de recuperación (Freitas *et al.*, 2017). Por esto se ha desarrollado una búsqueda de procesos integrados de producción/recuperación, en los que se pueda predecir el rendimiento final y mejore la calidad de los productos, teniendo un impacto sustancial en la economía de la producción del EPS.

Como una alternativa potencial para sustituir el uso de estos métodos convencionales en el proceso de producción/recuperación, se encuentra la técnica de fermentación extractiva. Esta técnica representa una opción al permitir reducir el número de operaciones unitarias para la obtención de EPS además de ayudar a superar los bajos rendimientos del producto en un proceso de fermentación convencional, esto gracias a su capacidad de trabajar bajo un mismo sistema la producción y recuperación de nuestro producto de interés (Othman *et al.*, 2017).

Otra de las ventajas de utilizar la fermentación extractiva es que maneja un gran potencial para la integración de procesos de recuperación como los sistemas de dos fases acuosas (ATPS), los cuales consisten en un fraccionamiento líquido-líquido para la separación de biomoléculas, reduciendo de esta manera el número de pasos y el coste general del bioproceso (Banik *et al.*, 2003). Este método se fundamenta en las diferencias de solubilidad de dos soluciones acuosas a través del uso de algunos tipos de polímeros (polietilenglicol, dextrano, etc.) y sales (sulfatos, citratos, fosfatos, etc.). Dentro de los polímeros más utilizados para la formación del sistema bifásico destaca

el empleo de agentes termosensibles (TSP), este tipo de polímeros modificados químicamente como los copolímeros aleatorios y en bloque de óxido de etileno-óxido de propileno (EOPO) tienen la propiedad de volverse menos solubles en solución acuosa a medida que aumenta la temperatura, así como separarse en dos fases (fase de polímero y agua) cuando su temperatura excede un umbral específico de temperatura (Iqbal *et al.*, 2016). De este modo, el producto puede recuperarse exclusivamente en fase acuosa, mientras que los TSP pueden reciclarse y reutilizarse nuevamente.

Tomando en cuenta las ventajas mencionadas anteriormente, en el presente proyecto se plantea el desarrollo de una metodología para la producción y recuperación de EPS producido por la microalga *Neochloris oleoabundans* a partir de la técnica de fermentación extractiva, la cual permitirá en un mismo medio la obtención y producción del EPS buscando obtener rendimientos similares o mayores en comparación con los métodos tradicionales, para esto se buscara la compatibilidad entre el agente termosensible y la microalga utilizando diferentes concentraciones del EOPO en el medio de cultivo, junto con el cambio de temperaturas, para poder llevar a cabo un proceso de fermentación extractiva viable que permita la producción y recuperación del EPS microalgal.

## CAPITULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Polisacáridos

Los polisacáridos son los carbohidratos más abundantes en la naturaleza presentes en todos los organismos, son considerados biopolímeros de alto peso molecular (10 a 1000 kDa) con estructuras complejas y diversas propiedades fisicoquímicas (Pierre *et al.*, 2019). Su composición radica en una gran variedad de combinaciones de monosacáridos diferentes (hexosas y pentosas) abarcando un gran número de azúcares complejos ligados por enlaces glicosídicos que conducen a homo y heteropolímeros lineales o ramificados (Delattre *et al.*, 2016).

A pesar de poderse encontrar en diversos organismos superiores como, hongos, plantas y macroalgas, los polisacáridos microbianos procariotas y eucariotas tienen probablemente la mayor diversidad estructural. El papel fisiológico que desempeñan estos compuestos microbianos es extremadamente diverso y depende en gran parte de su estructura y composición, por esto mismo juegan un papel importante dentro de la comunidad microbiana en la formación de biopelículas y flóculos (Filomena *et al.*, 2015). Además, proporcionan reservas de carbono y energía para muchos tipos de células y a menudo se excretan como parte de procesos fisiológicos normales como en condiciones de estrés fisiológico (Delattre *et al.*, 2016).

Dentro del sector industrial han sido explotados principalmente por sus propiedades reológicas como agentes espesantes o gelificantes. Sin embargo, recientemente se han encontrado una amplia gama de actividades biológicas ligadas a estos compuestos como, anticoagulantes, bactericidas, antioxidantes, antiinflamatorias, etc (Liu *et al.*, 2016). Estos polisacáridos microbianos pueden clasificarse en tres grandes grupos que son: intracelulares (polisacáridos de reserva energética que se pueden encontrar en el citosol), estructurales (componentes de la membrana celular como  $\beta$ -glucanos o peptidoglicanos) y extracelulares (exopolisacáridos) (Pierre *et al.*, 2019).

### **2.1.1 Exopolisacáridos**

Los polisacáridos microbianos extracelulares también llamados exopolisacáridos (EPS) abarcan un grupo importante de biopolímeros de alto peso molecular que son secretados por diversos microorganismos, en contraste con los glucanos intracelulares los EPS manejan varios sustituyentes como grupos metilo, acetilo o sulfato, además de otras diferencias estructurales más complejas como la flexibilidad de la cadena macromolecular y la naturaleza de su estructura carbonada (Pierre *et al.*, 2019).

Dada estas diferencias a las que se les atribuye muchas de sus actividades biológicas, han sido objeto de investigación en múltiples áreas con especial énfasis en lo que es la identificación de las rutas biológicas involucradas en su síntesis, la optimización de sus procesos de producción y el desarrollo de aplicaciones basadas en las distintas propiedades que presentan (Freitas *et al.*, 2017).

A pesar del gran número de estructuras que han arrojado varias de las investigaciones relacionadas con estas moléculas, solo se ha examinado el potencial para el desarrollo industrial de aquellos polisacáridos que ya son reconocidos en el mercado como la goma de xantana, dextrano y el pululano (Moscovici, 2015). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente estos polisacáridos presentan una mayor variedad de estructuras y propiedades fisicoquímicas, lo que los hace aplicables en una gran variedad de áreas que van desde su uso como biomateriales o como modificadores reológicos de sistemas acuosos, hasta agentes terapéuticos (Donot *et al.*, 2012; Rehm, 2010).

### **2.1.2 Exopolisacáridos Microalgales**

En la actualidad se conoce que existe una gran variedad de microalgas capaces de sintetizar EPS con una gran diversidad estructural, esto con la finalidad de cumplir con diferentes roles durante el ciclo de vida de estos organismos fotosintéticos. Entre las diversas funciones en las que se les ha involucrado destacan la formación de biopelículas, adhesión, procesos de interacción celular, simbiosis y protección tanto

para condiciones de estrés ambientales, así como para predadores (D. Kumar *et al.*, 2018).

Estos EPS producidos por las microalgas se caracterizan por estructuras químicas complejas que van desde homopolímeros de glucosa o galactosa, hasta heteropolisacáridos compuestos por varios monómeros de azúcar (Angelis *et al.*, 2012). En comparación con otros microorganismos productores como las bacterias y levaduras, las microalgas emplean una mayor diversidad de monómeros de azúcar en la misma macromolécula, además de la presencia de grupos químicos como ácidos urónicos y sulfatos que contribuyen a las propiedades distintivas de sus EPS (Soanen *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Ejemplo de bioactividades de diferentes EPS producidos por microalgas

Especie	Función	Referencia
<i>Porphyridium cruentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad antiviral</li> <li>• Propiedades antioxidantes</li> </ul>	(Patel <i>et al.</i> , 2013) (Talyshinsky <i>et al.</i> , 2002)
<i>Porphyridium aerugineum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propiedades antiinflamatorias</li> <li>• Actividad antiviral</li> </ul>	(Najdenski <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rhodella reticulata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propiedades antioxidantes</li> <li>• Incremento de viscosidad</li> </ul>	(Chen <i>et al.</i> , 2010) (Filomena <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad antiviral</li> <li>• Anti adhesivo</li> </ul>	(Bermúdez <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antiinflamatorias</li> </ul>	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fungicida</li> </ul>	(Bafana, 2013)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad inmunoreuladora</li> <li>• Propiedades espesantes</li> </ul>	(Wu <i>et al.</i> , 2011) (Li <i>et al.</i> , 2020)

Aun así, sabiendo que existen varias especies de microalgas productoras de EPS como se muestra en la Tabla 1, en comparación de otros microorganismos como las

bacterias, el número de especies identificadas capaces de producir EPS aún son muy limitadas. Por lo tanto, los EPS de microalgas todavía están en gran parte sin explotar y solo recientemente se comenzó a considerar su relevancia como productores de polisacáridos valiosos, sobre todo por las propiedades mostradas como antioxidantes, antivirales y anticancerígenas, que conducen al desarrollo de candidatos farmacéuticos prometedores.

### **2.1.2.1 Aplicaciones del EPS Microalgal**

Dentro de las aplicaciones más comunes en los que podemos encontrar estos EPS producidos por microalgas se encuentra su uso como agente espesante dentro de la industria alimentaria, esto gracias a su capacidad de alterar comportamientos reológicos en soluciones acuosas. Un ejemplo de esto es el EPS producido por *Chlorella sp.* el cual ha mostrado ser un agente espesante prometedor tanto para la industria alimentaria, así como para la cosmética (Yalcin *et al.*, 1994).

Otras de las microalgas que destaca por su EPS producido es *P. aeruginosum*, el cual se ha sugerido su aplicación como agente espesante para fluidos impulsores acuosos para mejorar la recuperación del petróleo atrapado en el espacio poroso de las rocas del yacimiento (De Philippis *et al.*, 2000).

Sin embargo, a pesar del potencial desarrollo que presentan estos EPS para su producción, su industrialización enfrenta muchos desafíos y avanza a un ritmo lento, aunque en la actualidad ya existe en el mercado empresas empeñadas en explotar estos compuestos como es el caso de la empresa conocida como “Frutarom” la cual se encarga de comercializar el EPS producido por la microalga *Porphyridium sp.* bajo el nombre comercial de Alguard™ para su uso en cosméticos (Pierre *et al.*, 2019). Dentro de esta industria son utilizados como ingredientes activos ya que representan una clase atractiva de polímero por su alta afinidad a sustratos aniónicos como la piel y el cabello, por lo que son muy eficaces como agentes cosméticos acondicionadores.

## 2.2 EPS de *N. oleoabundans*

*N. oleoabundans* es una microalga verde clorofita de agua dulce la cual ha sido de gran interés biotecnológico desde la década de 1980 cuando se demostró por primera vez de su gran potencial como especie productora de biocombustible, debido a que puede llegar acumular una gran cantidad de lípidos neutros, de los cuales los triglicéridos (TAG) representan alrededor de un 80% de los lípidos totales (Morales-Sánchez *et al.*, 2013). Además, también destaca su alta tasa de crecimiento en comparación con otras especies y su gran versatilidad para poder crecer en ambientes salinos.

Entre estas y otras cualidades, han despertado el interés de múltiples investigadores que han llegado a realizar grandes aportaciones sobre las distintas cualidades que presenta esta especie, entre las cuales destaca recientemente su habilidad de producir EPS. Esto gracias a la tarea de Wu y colaboradores (2011) quienes documentaron que al someter a *N. oleoabundans* bajo condiciones mixotróficas, utilizando glucosa o lactosa como fuente de carbono, obtuvieron como resultado la producción de hasta 5 g/L de biopolímeros de alta viscosidad.

En base a estos resultados se abrió una nueva ventana de investigación en la que recientemente Li y colaboradores (2020) abordaron para detallar con mayor claridad las condiciones propicias para la producción del biopolímero, así como también las propiedades químicas y bioactivas del EPS, en donde en encontraron que la glucosa, la galactosa y la maltosa, así como la presencia de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo permitieron la mayor producción de EPS. Además, pudieron demostrar la presencia de actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo*, fomentando a futuras investigaciones el uso del biopolímero producido por *N. oleoabundans* para la elaboración de productos farmacéuticos.

## 2.3 Recuperación de EPS

Dado que los EPS son liberados al medio de cultivo de forma natural, ofrecen una gran ventaja inicial para facilitar los procesos de recuperación del biopolímero.



Estos procesos de recuperación dependen en gran manera de tres elementos clave, los cuales consisten en: conocer las características del microorganismo productor, el tipo de EPS que se plantea extraer y el grado de pureza que se desea obtener (Oleksy-sobczak *et al.*, 2020).

El primer paso que se plantea para iniciar con la recuperación del EPS consiste en la inactivación y eliminación de células microbianas del caldo fermentado, generalmente para el proceso de inactivación se emplean altas temperaturas similares a las de un proceso de pasteurización (Angelini *et al.*, 2016). Con esto también se inactivan las enzimas que pueden degradar el polímero en etapas posteriores de recuperación.

Después de la etapa de inactivación la eliminación de las células del medio se lleva a cabo por medio de métodos físicos como centrifugación y filtración por membrana (Grima *et al.*, 2003; Palaniraj & Jayaraman, 2011). La centrifugación es el proceso mayormente utilizado para la separación de las células del medio. Posteriormente, una vez obtenida la fracción soluble, esta se precipita utilizando alcoholes absolutos como metanol y etanol. La polaridad de estos solventes junto con la temperatura de precipitación tiene un impacto importante en el rendimiento final del EPS (A. Kumar *et al.*, 2013).

En general estos pasos representan la metodología para un sistema de extracción de EPS. Aun así, se pueden utilizar varios procedimientos adicionales para eliminar contaminantes como la re-precipitación con soluciones acuosas diluidas o desproteínización por métodos químicos o enzimáticos (Soanen *et al.*, 2016), para esto se debe tener siempre en cuenta la demanda de la pureza que se requiere para la aplicación que se le quiere dar al biopolímero.

Aun así, a pesar de que se han desarrollado distintos métodos para el aislamiento y el análisis del EPS, no existe un método estandarizado por el cual se puedan obtener grandes rendimientos, ya que como se mencionó anteriormente estos procedimientos van adaptados en función del EPS que se está trabajando. Lamentablemente varias de estas tecnologías requieren de múltiples pasos que conllevan a grandes pérdidas económicas por los largos tiempos establecidos en el

proceso completo, así como la pérdida del producto por cada etapa de recuperación/purificación empleada, por lo que es necesario desarrollar tecnologías económicas, efectivas y favorables para el medio ambiente para producir y purificar EPS de alto rendimiento para aplicaciones industriales.

## **2.4 Fermentación extractiva**

En busca de soluciones para llevar a cabo un sistema eficiente de producción continuo, la fermentación extractiva ha representado un nuevo enfoque que permite integrar el proceso de fermentación y extracción en uno solo, eliminando de manera selectiva el metabolito de interés del medio de cultivo (Jatoi et al., 2021). Esto a partir de diferentes estrategias como el uso de agentes hidrofílicos como algunos tipos de polímeros (polietilenglicol, dextrano, polipropilenglicol, etc.) y sales (fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) que se combinan en ciertas concentraciones críticas, lo que resulta en la formación de dos fases hidrofílicas obteniendo como resultado la recuperación de productos de interés, como proteínas o nanopartículas en la fase más soluble, mientras que el material menos soluble como la biomasa se concentra en la fase menos soluble (Benavides et al., 2008). Con este tipo de métodos no solo se han superado limitaciones como la inhibición del producto y la baja productividad volumétrica ahorrando tiempo y costos, sino que también ha reducido el riesgo de pérdida del producto durante los procesos individuales de separación y purificación (Jatoi *et al.*, 2021).

Para llevar a cabo la eliminación del producto *in situ* se han propuesto diferentes técnicas de separación, las cuales han mostrado gran compatibilidad con el proceso de fermentación extractiva, entre las que destaca la extracción con solventes, electrodiálisis, sistemas de adsorción, líquidos iónicos, extracción de gas y los sistemas de extracción líquido-líquido (ATPS) (Othman *et al.*, 2017). Entre los más utilizados podemos encontrar el uso de resinas de adsorción de intercambio iónico que han sido probadas en diferentes estudios como el de Cho y colaboradores (2020) que a través del uso de estas resinas obtuvieron mayores rendimientos de la thailandepsina A

producida por *Burkholderia* E264, esto al reducir la inhibición de la proteasa en el medio de cultivo aumentando significativamente su producción.

#### **2.4.1 Aplicaciones de la fermentación extractiva**

Entre los productos más estudiados para su recuperación por medio de esta técnica destaca la producción de etanol y ácido láctico, en los que se han empleado diferentes diseños de fermentación extractiva para su recuperación. Entre los trabajos más recientes Lemos y colaboradores (2018) describieron el modelado y validación experimental de la producción de etanol en fermentación extractiva por lotes a partir de ácido oleico en un biorreactor de columna de caída no convencional equipado con un sistema de circulación de bucle operado a un caudal de 10 L h<sup>-1</sup> para asegurar una mezcla adecuada del caldo de fermentación y la separación de las fases acuosa y orgánica, en donde pudieron obtener una productividad 12.7 – 29.8% mayor en comparación con el sistema en el que no se empleó la fermentación extractiva .

Para la recuperación de ácido láctico se han desarrollado metodologías como la de (Kim & Moon, 2001) donde analizaron la recuperación directa del ácido láctico del caldo de fermentación utilizando un sistema de fermentación extractiva de una etapa con una división de tres compartimentos, informando que el sistema convertía el lactato de sodio disponible en el medio de fermentación en un 96% de ácido láctico y un 93% de hidróxido de sodio alcanzando una concentración final de 157 g/L.

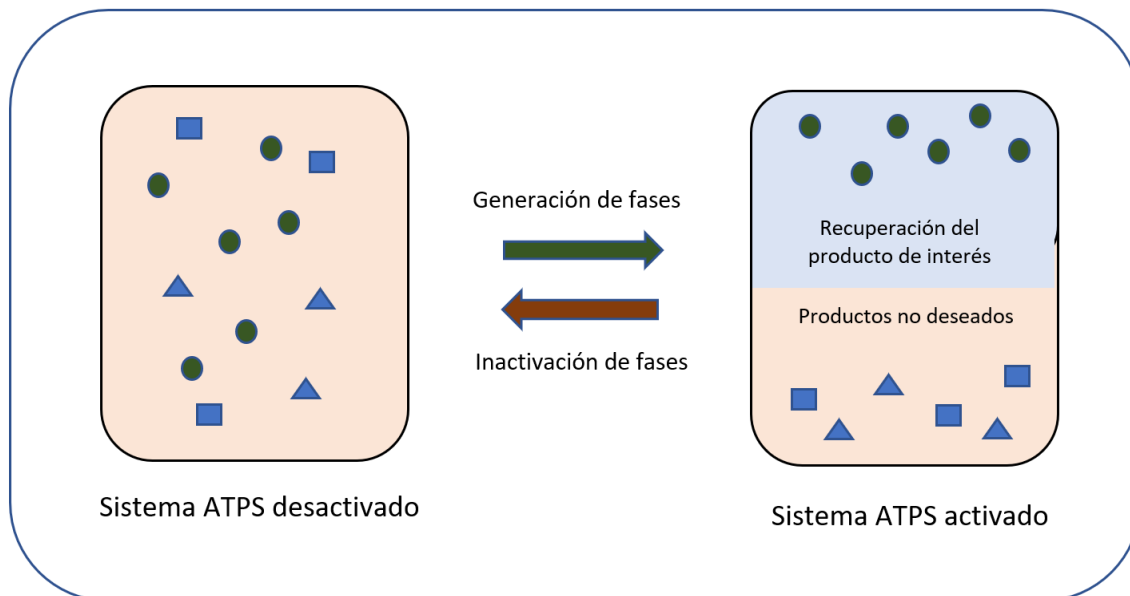
Otras de las cualidades que destaca esta tecnología es su aplicación en especies como los mohos en los cuales se han realizado investigaciones como la de Wang y colaboradores (2015) quienes utilizaron la fermentación extractiva para la recuperación de pigmentos de *Monascus anka* a través de una solución acuosa de micelas surfactantes no iónicas, donde encontraron que la fermentación extractiva en solución acuosa de micelas de surfactante no iónico exportó selectivamente los pigmentos intracelulares de *M. anka* en su caldo extracelular obteniendo una alta concentración de pigmento, es decir, aproximadamente 40 UA de pigmentos extracelulares de *M.*

*anka*, mediante fermentación extractiva a una concentración de tensioactivo no iónico relativamente alta de 10 g/L.

Sin embargo, a pesar de presentar diferentes metodologías compatibles con los sistemas de fermentación extractiva, los sistemas de extracción líquido-líquido en la actualidad representan una mayor eficiencia y selectividad para su aplicación en la recuperación y producción de compuestos de interés industrial, por lo que en la mayoría de los estudios realizados para llevar a cabo un proceso de fermentación extractiva optan por incorporar el sistema ATPS más adecuado para su diseño de producción.

## **2.5 Sistemas de dos Fases Acuosa (ATPS)**

Los sistemas acuosos de dos fases (ATPS) son una técnica de extracción líquido-líquido que se ha utilizado para establecer bioprocesos para la recuperación primaria y la purificación parcial de una variedad de productos biológicos, incluidas proteínas, material genético, nanopartículas, productos de bajo peso molecular, células y organelos (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2010). Las principales ventajas de esta técnica sobre otras técnicas de separación incluyen un aumento en la viabilidad, la capacidad de integración de procesos, biocompatibilidad, factibilidad para operaciones continuas, fácil escalamiento y una atractiva eficiencia para la concentración y purificación de biomoléculas. Estos sistemas se originan cuando los compuestos hidrofílicos como algunos tipos de polímeros (polietilenglicol, dextrano, polipropilenglicol, etc.) y sales (fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) se combinan en ciertas concentraciones críticas, lo que resulta en la formación de dos fases que tienden a separarse debido a su incompatibilidad (Sinha *et al.*, 2000), obteniendo de esta forma una fase con los productos deseados y en otra los no deseados como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Esquema general de un proceso de recuperación por ATPS

En la literatura se describen tres tipos principales de sistemas ATPS: (1) polímero-sal, (2) polímero-polímero y (3) ATPS construidos con compuestos alternativos, por ejemplo, óxido de etileno y copolímeros de óxido de propileno (EOPO), hidroxipropil almidón (HPS), ácido iminoadiacético (IAA), etc. Cabe mencionar que existen clases alternativas como los sistemas líquido iónico/sal y alcohol de bajo peso molecular/sal que han mostrado un gran potencial para su aplicación en la recuperación de compuestos biológicos (Benavides *et al.*, 2008). De los usos de los sistemas de sal polimérica, el fosfato de polietilenglicol (PEG) -potasio es particularmente preferido debido a importantes ventajas, que incluyen una caracterización extensa, bajo costo y una amplia gama de aplicaciones. Además, la integración y la intensificación de procesos pueden lograrse utilizando estrategias basadas en ATPS que resultan en procesos optimizados que son fáciles de ampliar (Teke & Pott, 2021).

El funcionamiento correcto para la partición de los componentes en un sistema ATPS depende principalmente de sus propiedades fisicoquímicas entre las cuales destaca el peso molecular del polímero, su hidrofobicidad y su carga neta electroquímica superficial. La presencia de sal también influye en el comportamiento de las fases que también provocan cambios según su tipo y su concentración (Iqbal *et al.*, 2016).

Para conocer como impactan este tipo de variables dentro de uno de estos sistemas de extracción, se llevan a cabo estudios como el de Chavez-Santoscoy y colaboradores (2010) en donde evaluaron parámetros como masa molecular de polietilenglicol (PEG), concentración de PEG y sal para determinar bajo cuales de estas condiciones era factible la recuperación de  $\beta$ -caroteno y luteína de la cianobacteria *Synechocystis sp*, encontrando que bajo un sistema ATPS PEG - dextrano (6.6% p / p de PEG 3350, 8.4% p / p de dextrano 66900, pH 7) y (4.22% p / p de PEG 8000, 9.77% con dextrano 66900, pH 7) se logra el crecimiento de *Synechocystis sp*. y la recuperación de luteína en fases opuestas.

Otro ejemplo similar se refleja en el trabajo de Othman y colaboradores (2017) en el cual se estudiaron las condiciones óptimas para la recuperación ácido láctico bajo un sistema bifásico de etanol /fosfato de hidrógeno dipotásico. A partir de este trabajo obtuvieron las mejores condiciones de extracción de ácido láctico utilizando una concentración del 30.23% p / p de etanol, 18.40% p / p de fosfato de hidrógeno dipotásico y 80 g / l de ácido láctico. El coeficiente de reparto máximo del ácido láctico y el rendimiento de extracción se determinó como 2.26 y 87%, respectivamente.

### **2.5.1 Sistemas ATPS aplicados a Microalgas**

A lo largo de los años la extracción de productos en sistemas de dos fases se ha aplicado a una amplia variedad de especies que van desde bacterias, levaduras, células vegetales y en menor medida las microalgas. Estos microorganismos fotosintéticos son utilizados actualmente para la producción de productos especializados y cada vez se consideran con mayor interés para la producción de productos a granel (Kleinegris *et al.*, 2011). Sin embargo, para que este proceso de producción sea económicamente viable, los costos de producción deben de reducirse considerablemente.

Por esto mismo se han considerado la aplicación de estos sistemas de dos fases los cuales han demostrado tener mejores rendimientos que los métodos convencionales además de reducir los costos de producción. Entre algunos de los trabajos que destaca la recuperación de metabolitos intracelulares de interés a partir de microalgas se

encuentra el estudio elaborado por Gómez-Loredo y colaboradores (2014) donde evaluaron diversos parámetros para la recuperación de fucoxantina producida por *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum* en un sistema de recuperación de dos fases compuesto por etanol y fosfato de potasio, en donde obtuvieron hasta un 95.36% de recuperación y 66.01% de pureza para los extractos metanólicos de *P. tricornutum* y un 89.18% de recuperación y 78.74% de pureza para los extractos metanólicos de *I. galbana*.

Otra de las microalgas que ha sido objeto de estudio de este tipo de tecnologías debido a la gran relevancia que presenta como productora de moléculas de interés es *N. oleoabundans*, la cual como se ha comentado anteriormente presenta una gran cantidad de facultades favorables para su explotación por medio de un sistema ATPS. Suarez Ruiz y colaboradores (2018) probaron varios sistemas acuosos de dos fases para separar selectivamente los pigmentos y proteínas de *N. oleoabundans*, encontrado que el sistema compuesto de polietilenglicol y dihidrogenofosfato de colinio mostró los mejores índices de recuperación al obtener en la fase rica en polímero  $97.3 \pm 1.0\%$  de luteína y  $51.6 \pm 2.3\%$  de clorofila, mostrando una gran compatibilidad entre estos sistemas y la recuperación de compuestos de *N. oleoabundans*.

Recientemente Suarez Ruiz y colaboradores (2020) elaboraron un sistema de recuperación de carbohidratos de *N. oleoabundans* para comprender mejor el fraccionamiento de estas moléculas dentro de un sistema de recuperación ATPS, donde encontraron que a partir del sistema compuesto Polietilenglicol 400 - Dihidrogenofosfato de colinio (PEG400-ChDHp), la glucosa libre de la microalga se fraccionó hasta alcanzar una recuperación del 99% en la fase inferior más hidratada, simultáneamente alcanzaron una recuperación del 70% para el almidón en la interfase después de dos extracciones líquido-líquido adicionales con PEG400-ChDHp.

Como se ha demostrado con los ejemplos anteriores, existen varios mecanismos de extracción que desempeñan un papel importante en la aplicación de los sistemas ATPS en las microalgas donde se ha demostrado que, en el caso de productos extracelulares, la aplicación de sistemas bifásicos para la extracción *in situ* puede ser muy valiosa. Sin embargo, en su mayoría parten de un proceso de extracción a través

de la permeabilización o la muerte celular, en donde la extracción *in situ* no es ideal, por lo que sería recomendable trabajar este tipo de procesos con microalgas capaces de excretar el producto de interés a su medio y de esta manera facilitar estos sistemas de producción/recuperación. De esta manera, los costos de procesamiento pueden reducirse mientras el producto se extrae de manera selectiva.

### **2.5.2 Polímeros termosensibles**

Los sistemas ATPS utilizan predominantemente PEG y dextrano de alto peso molecular o un sistema de polímero-sal. Sin embargo, una de las restricciones de estos sistemas es que la mayoría de los componentes formadores de fase no se pueden reciclar de forma eficaz (Rico-Castro *et al.*, 2017). Esta falta de reciclabilidad resulta en un proceso costoso y de contaminación ambiental, que se ha convertido en un obstáculo para las aplicaciones de ATPS en la industria biotecnológica, además de que se ha descubierto que el empleo de altas concentraciones de sales es tóxico para las células microbianas.

Como una solución a estas problemáticas se ha investigado el uso de polímeros termo-separadores, los cuales cambian drásticamente su solubilidad en agua con la temperatura, dividiéndose en dos fases inmiscibles cuando se incuban por encima de su temperatura de solución crítica más baja (LCST) (Rico-Castro *et al.*, 2017), donde la fase inferior está enriquecida en polímero (entre 40% y 80% en peso de polímero) y la fase superior contiene mayoritariamente agua. A partir de esta estrategia puede llevarse a cabo la recuperación del compuesto de interés en la fase acuosa y los polímeros a su vez pueden reciclarse para su reutilización en la fase inferior.

Los copolímeros aleatorios de etilenglicol y propilenglicol (a menudo denominados EOPO) son un ejemplo típico de polímero de termo-separación que se ha aplicado con éxito para la recuperación de biomoléculas con el reciclaje de polímero (Huang & Forciniti, 2002). Al introducir estos copolímeros EOPO en el ATPS polímero / polímero y polímero / sal convencional, se puede generar una gran cantidad



de ATPS híbridos con un gran potencial para la recuperación de biomoléculas de alto valor.

## **2.6 Fermentación extractiva acoplada con sistema ATPS**

En comparación con otras técnicas los sistemas ATPS formados con polímeros termosensibles muestran una gran compatibilidad y capacidad de integración de procesos entre los que destaca la fermentación extractiva, en el cual el sistema de expresión crece en una de las fases del sistema mientras que el producto de interés se excreta y se reparte hacia la fase opuesta (Show *et al.*, 2012). Por lo tanto, el producto se puede eliminar del sistema sin necesidad de recuperación de biomasa o rotura celular.

Este enfoque integrador no solo ahorra tiempo y costos, sino que también reduce el riesgo de pérdida de producto durante los procesos individuales de separación y purificación. Además, las ventajas de la fermentación extractiva también incluyen la disminución de los efectos tóxicos del producto sobre el crecimiento microbiano, minimiza los efectos de degradación provocados por la temperatura y el pH y supera la baja productividad volumétrica que a menudo ocurre en el proceso de fermentación convencional (Cruz Filho *et al.*, 2020).

El uso de esta tecnología en conjunto ha sido utilizada en modelos bacterianos como *Bacillus cereus* en la producción de ciclodextrina glicosiltransferasa propuesto por Suan y colaboradores, (2012) donde implementaron la construcción de un sistema con copolímero de separación térmica y sales de fosfato de potasio para la extracción de la enzima. A partir de esto obtuvieron un rendimiento máximo del 87% en la recuperación de la enzima en donde este mismo copolímero pudo recuperarse en las siguientes fases de extracción en un 80% obteniendo un modelo funcional para la producción, y el reciclado del EOPO para la extracción de la enzima.

De igual forma esta metodología ha sido aplicada para diversos microorganismos aparte de bacterias como hongos y células vegetales en los que destaca el estudio elaborado por Badhwar y colaboradores, (2019) que establecieron

un sistema de producción y recuperación de pululano a través de un sistema de fermentación extractiva con PEG 4000-Dextrano 500. En cuanto a su aplicación en células vegetales Suan y colaboradores, (2017) a través de un sistema acuoso de dos fases llevaron a cabo la obtención de polifenoles producidos por *Camellia sinensis* a través de agentes termosensibles de óxido de etileno-óxido de propileno (EOPO), obteniendo un total del 96.54% de polifenoles en la fase rica del EOPO 2500 con una recuperación del 95.2% del polímero tras la inducción por calor.

A partir de los resultados positivos obtenidos en cada una de las pruebas para la aplicación de estos sistemas se ha evaluado su extensión a diversos microorganismos que sean capaces de excretar estos metabolitos de interés, con el objetivo de generar una producción a mayor escala que permita generar mayores ganancias en comparación con los sistemas de fermentación tradicionales.

## CAPITULO 3

### HIPOTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

La fermentación extractiva acoplada con agentes termosensibles permite la producción y recuperación de exopolisacáridos obteniendo rendimientos similares o mejores comparados con los métodos convencionales de recuperación.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 Objetivo General

Producir y recuperar exopolisacáridos de *N. oleoabundans* a partir de la técnica de fermentación extractiva mediante agentes termosensibles (EOPO)

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la viabilidad del cultivo con los agentes termosensibles.
2. Determinar los parámetros (tiempo y temperatura de proceso, concentración del agente termosensible) para la producción y recuperación del exopolisacárido producido por *N. oleoabundans* mediante fermentación extractiva.
3. Determinar la recuperación de biomasa y EPS durante el proceso de extracción fermentativa
4. Comparar sistemas de producción y recuperación con los parámetros ya establecidos con la formación de fases por lotes y por un proceso semicontinuo.

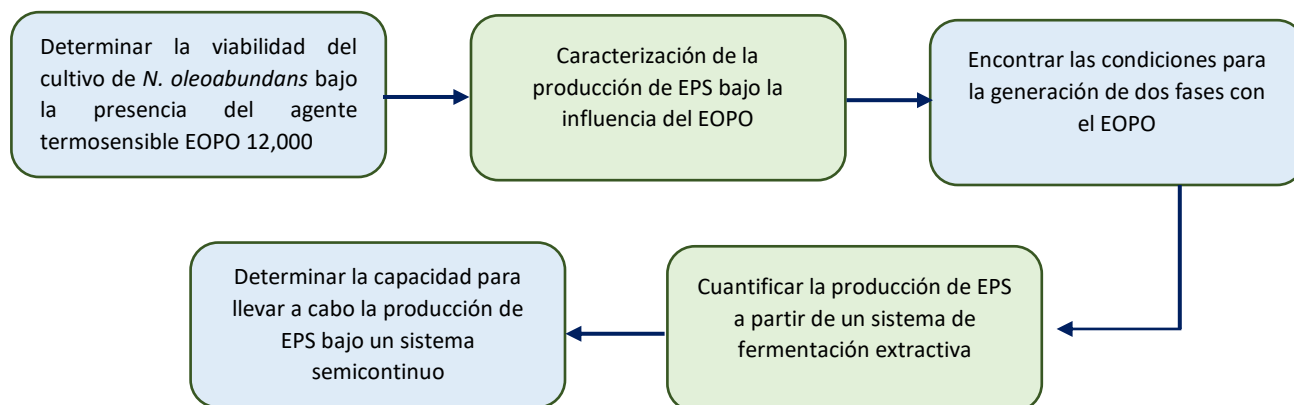
#### 3.3 Aportación científica

La aportación científica del presente trabajo consiste en el desarrollo de una técnica de fermentación extractiva para la producción y recuperación de exopolisacáridos de *N. oleoabundans* a partir de agentes termosensibles (EOPO).

## CAPITULO 4

### MATERIALES Y METODOS

#### 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

Micropipetas de 0.5-10, 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$  marca LabNet, puntillas para micropipeta marca Eppendorf, tubos para microcentrifuga 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 centrifuga 15 y

50 mL marca Corning, pipetas desechables de 10 y 5 mL marca Thermo Scientific, filtros Whatman grado 1, pipeta serológica de 50 mL y jeringas desechables de 10 mL

#### **4.4 Reactivos**

KNO<sub>3</sub> marca DEQ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O marca PQM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> marca JT Baker, HEPES marca Sigma-Aldrich, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> marca DEQ, EDTA-Fe (III)-Na marca Sigma Aldrich, EDTA-Na<sub>2</sub> marca Sigma-Aldrich, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O marca JT Baker, MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O marca Sigma-Aldrich, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O marca JT Baker, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O marca DEQ, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O marca DEQ, Vitamina B12 marca Sigma-Aldrich, D-Biotina marca Sigma Aldrich, Tiamina-HCl marca Sigma-Aldrich, NaCl marca JT Baker, α-D-glucosa marca Sigma Aldrich, agar bacteriológico marca BD Bixon, HCl marca JT Baker, NaOH marca DEQ, etanol absoluto 96% marca DEQ, poly (ethylene glicol-ran-propylene glicol) MW 12,000 marca Sigma.

#### **4.5 Equipos**

Cámara de flujo laminar marca Prendo, medidor de luz quantum meter MQ200 marca Apogee, vórtex marca VWR, incubadora marca LabTech, centrifuga Legend XF marca Thermo Scientific, concentrador modelo Integrated SpeedVac marca Thermo Scientific, vortex marca Thermo Scientific, Potenciómetro marca HANNA, autoclave marca ALL AMERICA-USA, Microscopio óptico marca Carl Zeiss, balanza analítica marca OHAUS, balanza analítica marca Thermo Scientific, cámara de Neubauer marca Supe Rio.

#### **4.6 Realización del proyecto**

Este proyecto fue realizado dentro de las instalaciones del Laboratorio de Innovación y desarrollo Biotecnológico en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, ubicado en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológico (PIIT) en Apodaca, Nuevo León.

## 4.7 Elaboración del medio cultivo

Para el crecimiento de *N. oleoabundans* durante el desarrollo de todos los experimentos se utilizó un medio base de agua dulce descrito por Salim y colaboradores (2011) utilizando los reactivos y cantidades que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo descrito por Salim y colaboradores 2011 para preparar un litro

	Reactivos	Cantidad		Reactivos	Cantidad
	<b>Primera Fase</b>	KNO <sub>3</sub>		3 g/L	<b>Segunda Fase</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		0.26 g/L	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	13 mg/L	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.74 g/L	Vitamina B12	1 µg/L	
HEPES		2.38 g/L	D-Biotina	1 µg/L	
H <sub>3</sub> BO		61.8 µg/L	Tiamina-HCl	200 µg/L	
EDTA-FE		0.11 g/L	Glucosa	20 g/L	
EDTA-Na <sub>2</sub>		37 mg/L			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		3.2 mg/L			
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		13 mg/L			
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		1.83 mg/L			

Para la realización del medio se pesó cada reactivo de la primera fase de acuerdo con la cantidad establecida en la Tabla 2., Posteriormente, se colocaron los reactivos en un matraz erlenmeyer para diluirlos con agua bidestilada hasta obtener el volumen deseado. A continuación, se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1M o NaOH 1M y se pasó a esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min. Finalizado el proceso de esterilización se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos para añadir los componentes de la segunda fase.

Previamente antes de añadir los componentes de la fase dos, estos de igual manera se pesaron y se ajustaron a un volumen conocido con agua bidestilada. Al terminar el tiempo de enfriamiento se procedió agregar por filtro de jeringa los componentes de la segunda fase en la campana de flujo laminar.

## 4.8 Prueba de viabilidad con el EOPO

Para las pruebas realizadas en este trabajo se empleó la microalga *Neochloris oleoabundans* la cual fue adquirida del centro de colección de cultivos de microalgas de la Universidad de Texas, EUA y el EOPO con un peso molecular de 12,000. Para el comienzo del experimento se obtuvo un cultivo inicial de 100 mL en medio de cultivo descrito por Salim y colaboradores (2011) que se dejó incubando por 12 días a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, 150 rpm, con ciclos completos de luz, que se manejaran como condiciones estándar a lo largo del trabajo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó un conteo celular del medio de cultivo a través de la cámara de Neubauer, el cual se llevó a cabo bajo un microscopio óptico utilizando el objetivo de 40x.

El método por el cual se procedió al conteo consistió en contar las células de la microalga presentes en los cuatro cuadrantes situados en los extremos de la cámara como se muestra en la Figura 2. El cálculo de la concentración total de células se desarrolló utilizando la Ecuación 1

$$[C] = \tilde{x} \times FD \times V$$

**Ecuación 1**

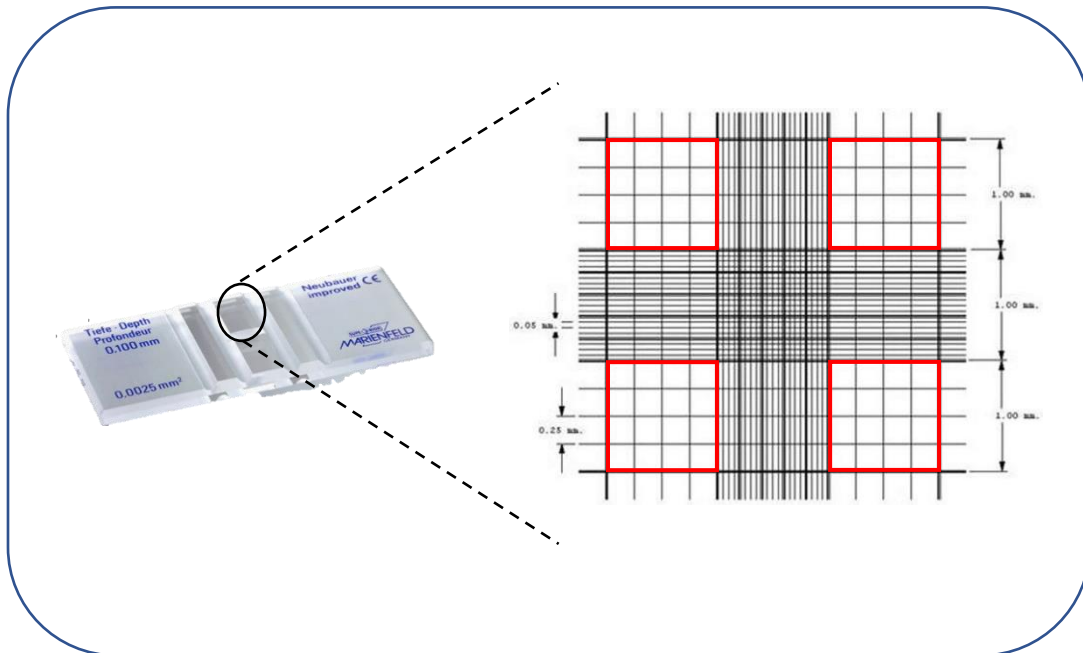
Donde:

**[C]:** Concentración celular (células/mL)

**FD:** Factor de dilución

**$\tilde{x}$ :** Promedio de células contadas por cuadrante

**V:** volumen de la cámara (10,000 mm<sup>3</sup>) equivalente a 1mL



**Figura 2.** Esquema general de la cámara de Neubauer representando en naranja los cuadrantes utilizados para el conteo celular.

Una vez obtenida la concentración celular del cultivo inicial se procedió a inocular cada uno de los matraces de 125 mL con 50 mL de medio para la prueba de viabilidad con una concentración inicial conocida de 10, 000 cel/mL. Se inocularon dos matraces control y para las pruebas con el EOPO 12,000 se inocularon por duplicado 50 mL de medio con 10 %, 20 % y 30% de EOPO (v/v). Estos se dejaron incubando bajo condiciones estándar por 24 días siguiendo la metodología de la Figura 3. Para determinar la viabilidad del cultivo se realizó el conteo por cámara de Neubauer cada 2 días por el lapso de incubación de 24 días.

Para el análisis de las cinéticas de crecimiento se utilizó el modelo matemático corregido de Gompertz, con el cual se obtuvieron parámetros como, la tasa de crecimiento (B), el crecimiento máximo (a) y la fase adaptación. Para el desarrollo del modelo se empleó la Ecuación 2 (Gil et al., 2011).



$$\log N = A + D \times \exp[-\exp(-B \times (\text{tiempo} - M))] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

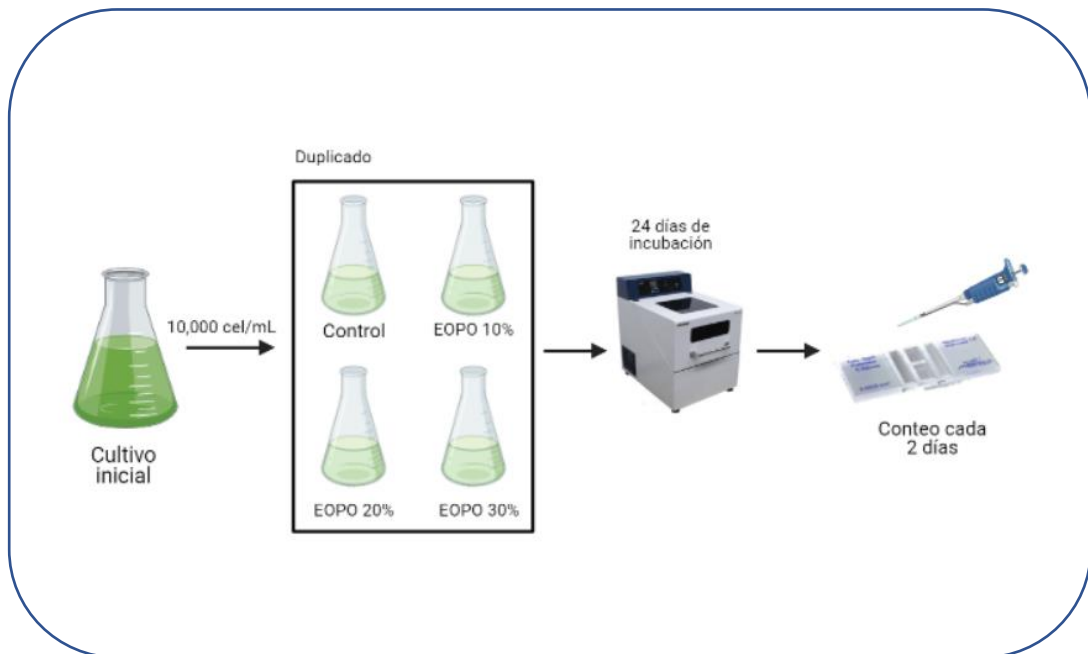
**Log N:** Logaritmo común de poblaciones

**D:** Conc. Máxima de microorganismos

**A:** Logaritmo común de la población inicial

**M:** Crecimiento máximo (tiempo)

**B:** Tasa de crecimiento

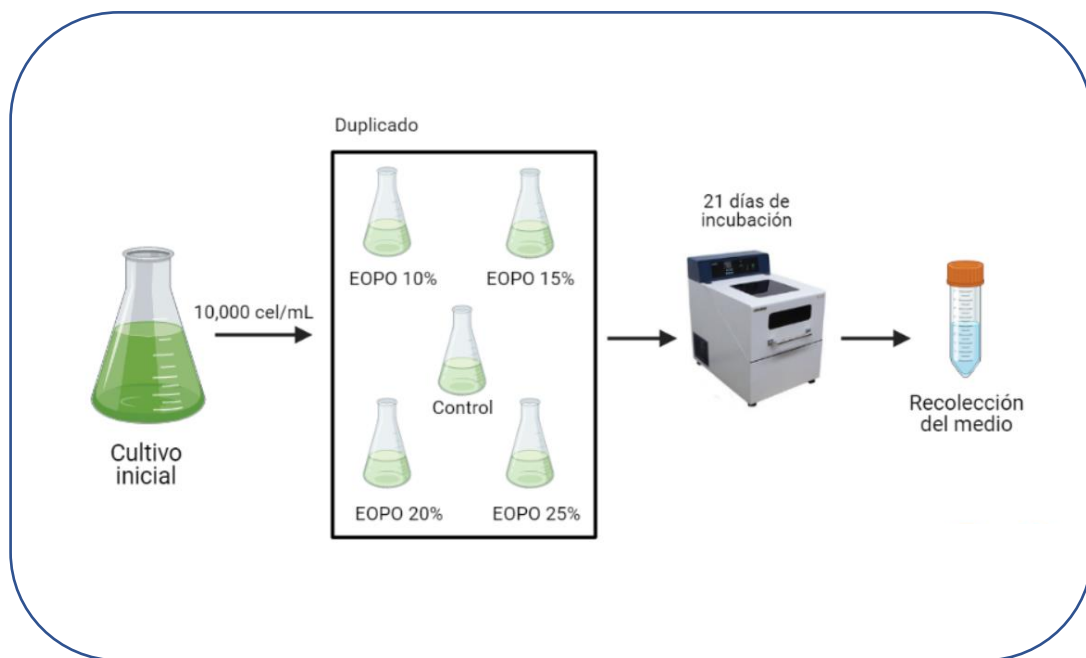


**Figura 3.** Metodología general para las pruebas de viabilidad con el EOPO a diferentes concentraciones

## 4.9 Prueba de producción de EPS con el EOPO

La metodología que se siguió para determinar si la presencia del EOPO afectaba la producción del EPS consistió en preparar por duplicado cultivos con 50 mL de medio como se muestra en la Figura 4, con concentraciones de EOPO al 10, 15, 20, 25 % (v/v) y un control sin EOPO. Se inocularon con una concentración inicial conocida de 10,000 cel/mL a partir de un cultivo inicial.

Después de 21 días de incubación se recolectó el medio en tubos falcón de 50 mL para la cuantificación del EPS producido



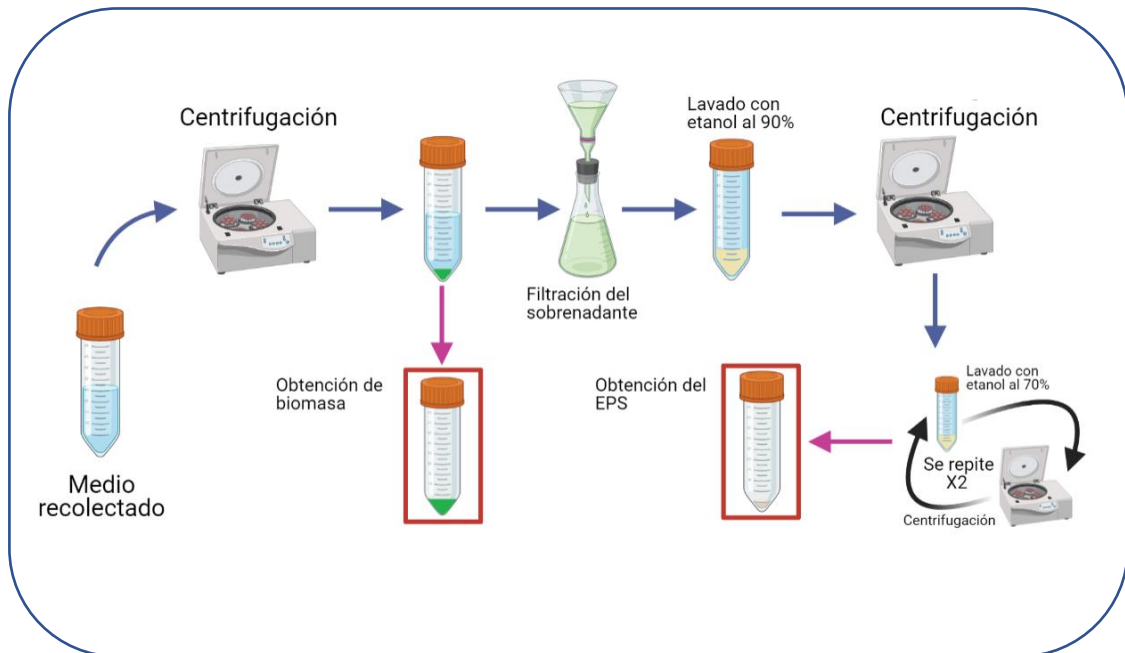
**Figura 4.** Metodología general para las pruebas de Producción de EPS con el EOPO a diferentes concentraciones

### 4.9.1 Recolección de la Biomasa y el EPS

El medio de cultivo recolectado en los tubos falcón fue centrifugado a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Después de esto el sobrenadante se transfirió a otros tubos falcón de 50 mL, mientras que la biomasa se llevó a conservar a una temperatura de -20°C para su posterior secado. Una vez obtenido el sobrenadante este se filtró por medio de un filtro whatman con un diámetro de poro de 0.2  $\mu$ m. Enseguida se

agregaron 2 volúmenes de etanol al 96% por cada volumen de sobrenadante filtrado. La mezcla se guardó por 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la precipitación del EPS. Finalizando el tiempo de almacenamiento las muestras se volvieron a centrifugar a 10,000 rpm por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El sobrenadante obtenido se desechó y el pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% para purificar la pastilla de EPS obtenida. Entre cada uno de los lavados se llevó a cabo una centrifugación a 9,500 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar los lavados se desechó el sobrenadante y el pellet se secó por evaporación a temperatura ambiente por un tiempo de 25 minutos como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Metodología utilizada para el proceso de recolección de biomasa y EPS de *N. oleoabundans*

#### 4.9.2 Concentrado y Pesado de la Biomasa y EPS

Al finalizar el proceso de evaporación del EPS, se procedió a determinar el peso seco de cada una de las muestras incluyendo las muestras de biomasa almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  como se muestra en la Figura 6. El proceso de secado se realizó a través de un concentrador al vacío, a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  y presión de 5 Thors con un tiempo de corrida de 5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se pesaron cada una

de las muestras en la balanza analítica. Para esto anteriormente se pesaron cada uno de los tubos sin la muestra, con el fin de obtener una diferencia entre el peso inicial y el peso final con el EPS.



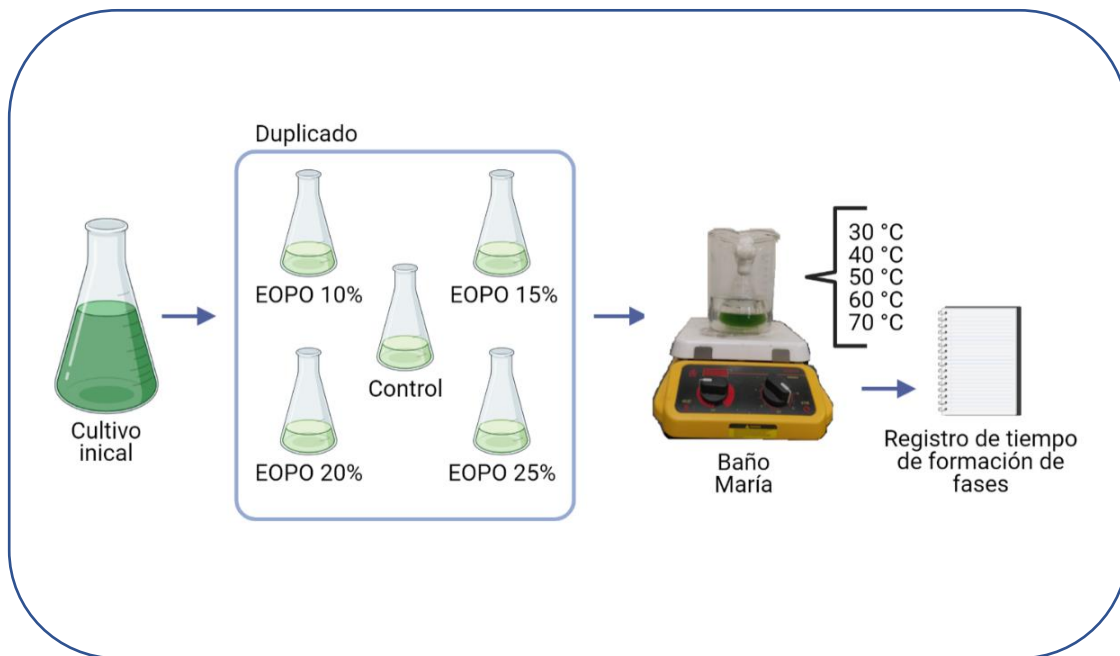
**Figura 6.** Procedimiento general para la obtención de los pesos de la biomasa y el pellet del EPS

#### **4.10 Generación de Fases con el EOPO**

Para obtener las condiciones para la separación de fases en un sistema de fermentación extractiva, se midieron diferentes temperaturas, concentraciones de EOPO y el tiempo de formación de las fases en cada uno de los sistemas estudiados. Para esto se partió de un cultivo inicial como se describe anteriormente en la sección 4.8 en donde se inocularon 5 matraces por duplicado con medio de cultivo partiendo de una concentración inicial de 10,000 cel/mL, los cuales se dejaron incubando bajo condiciones estándar por un período de 12 días. Después del período de incubación se añadieron 4 diferentes concentraciones del EOPO (10, 15, 20 y 25%(v/v)) y dos matraces sin EOPO como controles del experimento como se muestra en la Figura 7.

Una vez añadidas cada una de las concentraciones de EOPO se procedió a someter a cada uno de los matraces a diferentes temperaturas para observar la

formación de fases. El cambio de temperatura se llevó a cabo por baño María colocando en la plancha térmica un vaso de precipitado de 1,000 mL con 400 mL de agua bidestilada. Las temperaturas a las cuales fueron sometidos los matraces fueron de 30, 40, 50, 60 y 70 °C. Al momento de alcanzar la temperatura deseada se sumergió el matraz con medio en el vaso de precipitado donde se midió el tiempo de formación de dos fases, dejando como un tiempo límite de formación de 25 minutos. Este procedimiento se repitió para cada una de las concentraciones de EOPO.



**Figura 7.** Esquema general para las pruebas de formación de dos fases

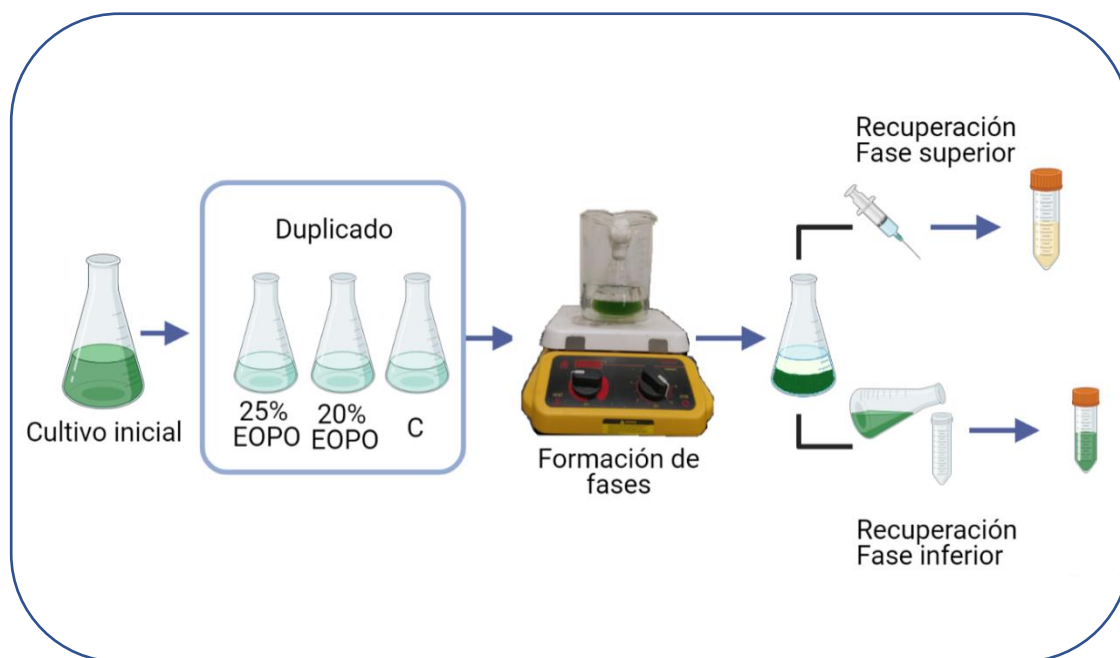
#### 4.11 Caracterización de EPS en sistemas de fermentación extractiva

Una vez obteniendo las mejores condiciones (temperatura, tiempo de formación de fases y concentración de EOPO) para la separación de fases se caracterizó la cantidad de EPS producida en un sistema de fermentación extractiva siguiendo la metodología de la figura 8. Para esto se partió de un cultivo inicial como se describe anteriormente en la sección 4.6., Una vez obtenido el cultivo inicial, se inocularon por duplicado matraces de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo con una concentración inicial de 10,000 cel/mL dejándolos incubar por un período de 12 días bajo condiciones

estándar. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadieron dos concentraciones de EOPO (20, 25% v/v) y un control sin el EOPO.

Una vez inoculado cada uno de los medios con la concentración de EOPO correspondiente, se procedió con la formación de fases utilizando una temperatura de 70 °C para todos los matraces. El cambio de temperatura se logró por baño María como se muestra en la metodología descrita en la sección 4.10. Una vez que se observó la presencia de las dos fases se procedió a separar físicamente cada una de las fases del medio de cultivo. La fase superior del sistema se extrajo del medio de cultivo por medio de una jeringa de 10 mL., El contenido recuperado se depositó en tubos Falcon de 50 mL. Una vez que se extrajo toda la fase superior del sistema, la fase restante (inferior) se traspasó de manera manual en tubos Falcon de 50 mL.

Ya obtenidas cada una de las fases en los tubos Falcon, se procedió a centrifugar cada uno de los tubos a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, en donde se separó la biomasa del sobrenadante, a partir de aquí para el proceso de obtención de EPS se siguió la metodología descrita en la sección 4.9.1 y 4.9.2 para el proceso de pesado de la biomasa y EPS obtenido.

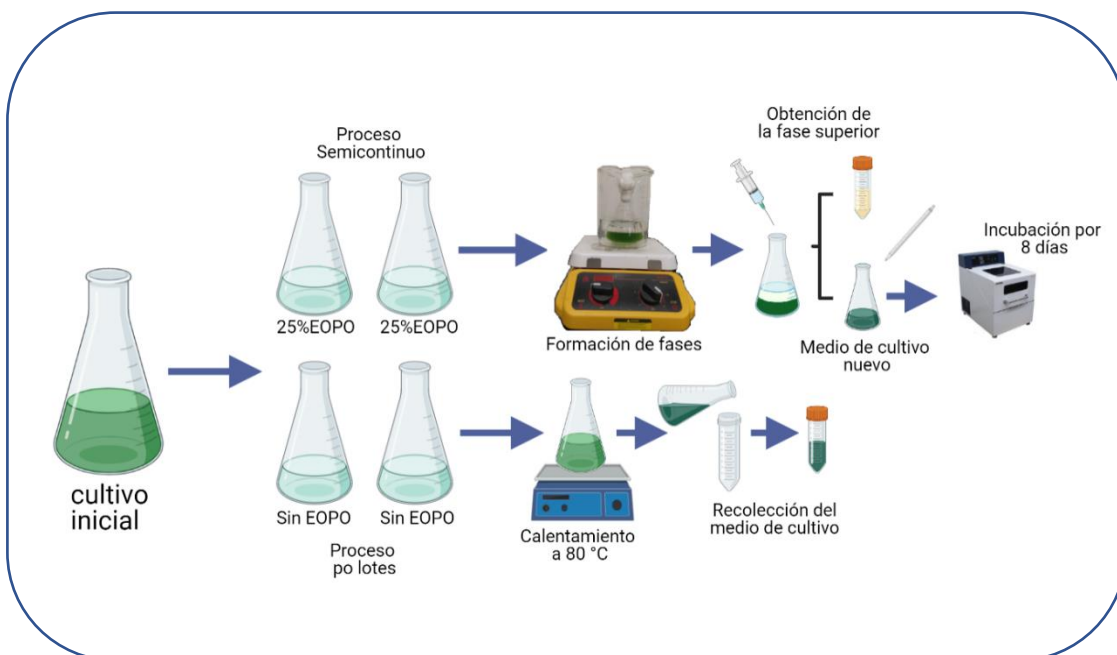


**Figura 8.** Proceso general para el sistema de fermentación extractiva implementado para la recuperación de EPS

#### **4.12 Prueba de producción de EPS bajo un sistema semicontinuo**

Para poder comprobar la eficiencia de la técnica de fermentación extractiva, se aplicó un sistema semicontinuo para la producción de EPS en donde se buscó el rendimiento y la factibilidad del proceso comparándolo con un sistema por lotes convencional como se muestra en la Figura 9.

Para esto primero se preparó un cultivo inicial siguiendo la metodología presente en la sección 4.8. Una vez obtenido el cultivo inicial se inocularon con una concentración inicial de 10,000 cel/mL cuatro matraces con 50 mL de medio de cultivo que fueron incubados bajo condiciones estándar por un período de 12 días. Después del tiempo de incubación 2 de los matraces fueron inoculados con una concentración del 25% de EOPO (cultivo 1 y 2) mientras los otros 2 fueron utilizados para la prueba por lotes (cultivo 3 y 4). Para la formación de fases, los cultivos con EOPO se sometieron a una temperatura de 70 °C, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.10. Una vez que se obtuvieron las dos fases se procedió a extraer la fase superior del sistema en una campana de flujo laminar por medio de una jeringa de 10 mL., El contenido fue depositado en tubos falcón de 50 mL. Después de remover la fase superior, esta fue remplazada por el mismo volumen tomado con la jeringa medio de cultivo fresco como se muestra en la Figura 8., Una vez agregado el medio de cultivo fresco este pasó a incubarse bajo condiciones estándar por un período de 8 días. Los 2 matraces que no fueron inoculados con el EOPO al finalizar la fase de incubación fueron sometidos a una temperatura de 80 °C por un lapso de 10 minutos. Al finalizar el calentamiento, el contenido de los matraces fue vaciado en tubos falcón de 50 mL para posteriormente ser centrifugados. El proceso de centrifugación y obtención de EPS se llevó a cabo de acuerdo con las secciones 4.9.1 y 4.9.2



**Figura 9.** Metodología empleada para el sistema de fermentación extractiva implementado para la recuperación de EPS

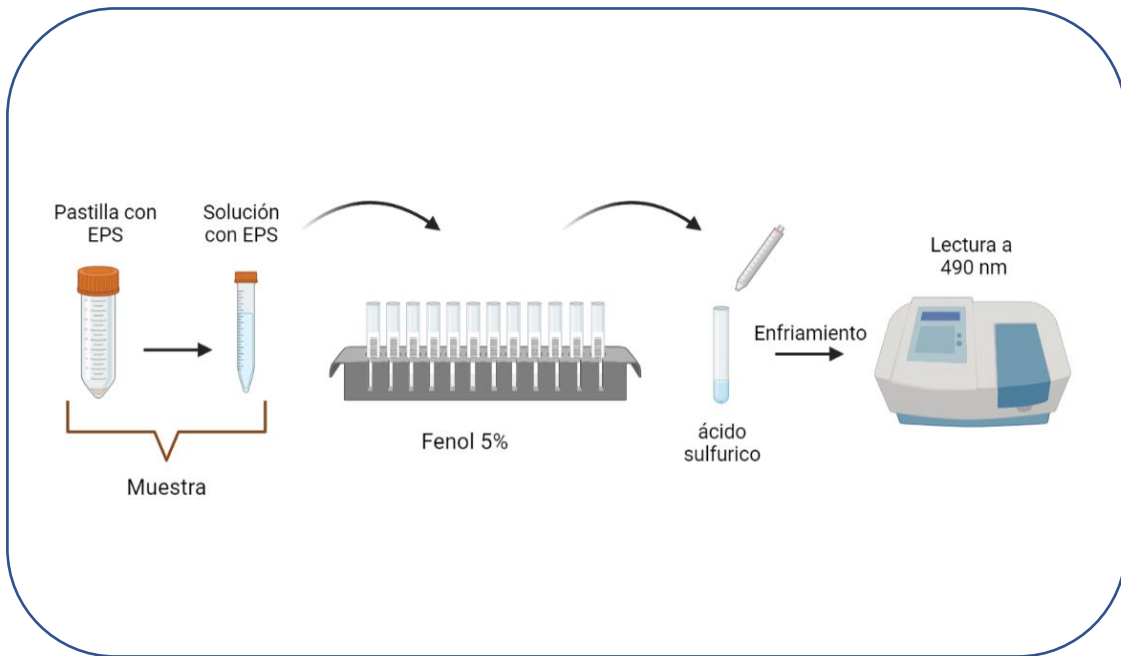
#### 4.13. Confirmación de EPS por el método de azúcares totales

Una vez que se obtuvieron las pastillas de los EPS correspondiente en cada una de las pruebas de producción correspondientes al apartado 4.12, se utilizó el método de azúcares totales para demostrar la presencia de azúcares en el precipitado final obtenido después de concentrar el EPS. Para la prueba se tomó la pastilla obtenida en las pruebas de fermentación extractiva con un 25% de EPOO para diluirlas posteriormente en 5 mL de agua destilada hasta disolver por completo el precipitado.

Se realizó una curva de calibración por triplicado utilizando una solución de 100 mL de glucosa al 0.1% en diferentes concentraciones (Material Suplementario. Figura 31). Una vez que se prepararon cada una de las concentraciones se añadió 0.5 mL de fenol al 5% en cada uno de los tubos en donde se agitaron suavemente por un minuto. Posteriormente se añadieron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado a cada uno de los tubos que se dejaron enfriando en hielo por 10 minutos. Transcurridos los 10 minutos se procedió a leer las absorbancias en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 490 nm. Para el análisis de la muestra se tomaron 25  $\mu$ L de la



solución con la pastilla disuelta que se depositó en un tubo de ensayo con 475  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Una vez disuelto, de igual manera se añadió como se describió anteriormente el fenol al 5% y el ácido sulfúrico concentrado para posteriormente llevar a cabo las lecturas en el espectrofotómetro como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Metodología general para la prueba de azúcares totales aplicada a las muestras obtenidas de la prueba de producción

#### 4.14. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa minitab 18 el cual se utilizó para la realización de la prueba ANOVA y Tukey con los valores obtenidos de concentración celular, utilizando diferentes concentraciones de EOPO. También se empleó el programa STATISTICA 10 (TIBCO® Data Science) en el cual se realizaron todos los gráficos correspondientes al modelo de Gompertz.

## CAPITULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Pruebas de viabilidad con el EOPO

Para la evaluar la viabilidad de la microalga en presencia del agente termosensible (EOPO) se utilizaron 3 distintas concentraciones del EOPO 12,000 (10, 20 y 30%) además de un control., El crecimiento celular fue monitoreando por conteo celular a partir de una cámara de Neubauer. Como se muestra en la Figura 11 todos los matraces fueron inoculados con una concentración inicial de 10, 000 cel/mL partiendo desde el mismo punto base sin mostrar crecimiento aparente de ningún tipo.



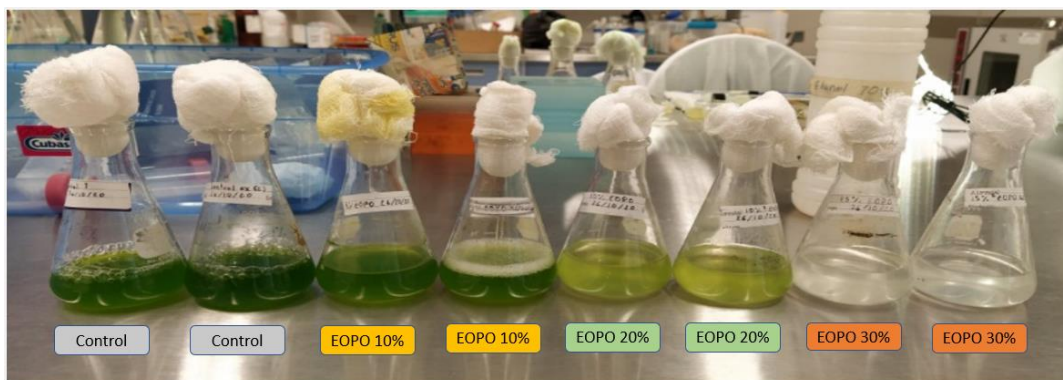
**Figura 11.** Primer día de incubación de los matraces inoculados con diferentes concentraciones de EOPO: A) Control. B) Matraces con 10% de EOPO. C) Matraces con 20% de EOPO. D) Matraces con 30% de EOPO

A partir del octavo día de incubación se apreció un cambio color verde en los medios control y con un 10% de EOPO en respuesta al crecimiento positivo por parte de la microalga. Para el matraz con un 20% de EOPO, empezó a mostrar signos positivos de crecimiento a partir del treceavo día de incubación como se muestra en la figura 12.

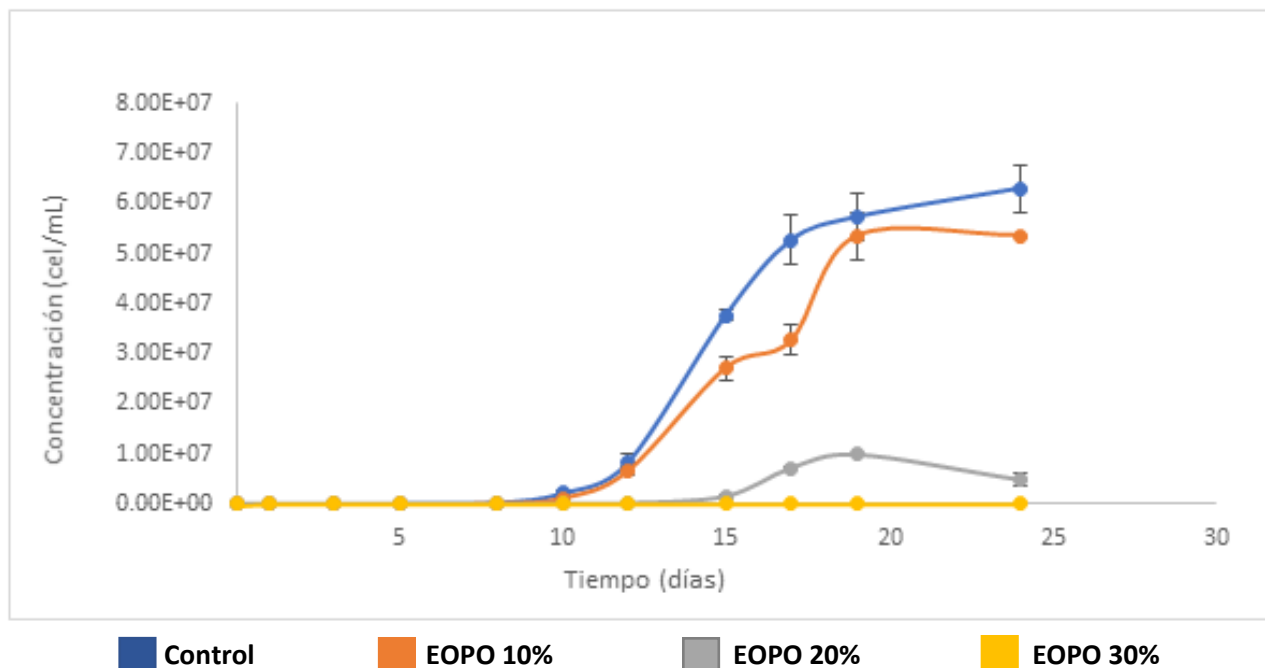


**Figura 12.** A) Matraces control después de 8 días de incubación. B) Matraces con 10% de EOPO después de 8 días de incubación. C) Matraces con 20% de EOPO después de 13 días de incubación

Al finalizar el período de incubación se realizó una comparación visual entre cada uno de los matraces con diferentes concentraciones de EOPO, en donde se pudo apreciar un decremento en el color de los medios de cultivo. Esta falta de color se fue haciendo más notoria con el incremento de la concentración del EOPO. Siendo el matraz control el que presentaba una mayor presencia de pigmento a comparación de los matraces con 30% de EOPO, los cuales no presentaron ningún tipo de pigmentación como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Matraces correspondientes a la prueba de viabilidad al finalizar el tiempo de incubación de 24 días



**Figura 14.** Curva de crecimiento de *N. oleoabundans* bajo diferentes concentraciones del EOPO 12,000 en un plazo de 24 días

Como se puede observar en la Figura 14 la presencia del agente termosensible en diferentes concentraciones en el medio de cultivo afectó el crecimiento de *N. oleoabundans*. Se puede apreciar que la concentración con un 10% de EOPO estableció una mayor similitud al matraz control, el cual se mantuvo en crecimiento constante por alrededor de 18 días, al contrario del matraz con un 30% de EOPO el cual se mantuvo estático, sin presentar algún indicio de crecimiento durante todo el experimento, permaneciendo de forma inactiva los 24 días de incubación.

En cuanto al matraz con un 20% de EOPO, este presentó crecimiento significativo junto con una pigmentación verde característica de la presencia de la microalga en el medio de cultivo hasta el día 15 del experimento, teniendo una fase de retardo de 5 días en comparación con el matraz control y el de 10% los cuales presentaron un comportamiento similar en el décimo día como se muestra en la Figura 13. Sin embargo, el crecimiento que presentó el matraz con una concentración del 20% de EOPO fue disminuyendo después del día 19 hasta el final del experimento.

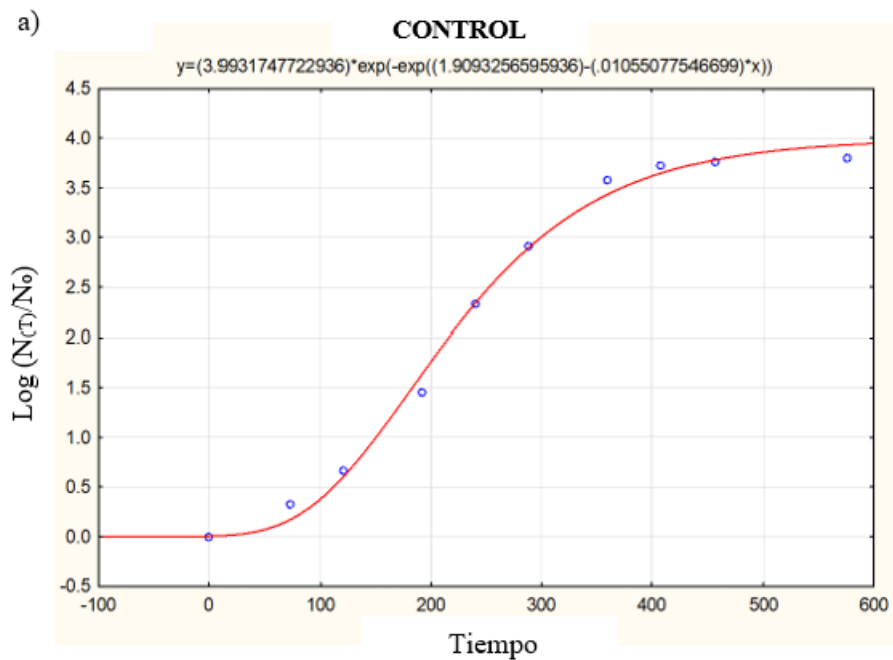
Para confirmar que existe un efecto significativo en el crecimiento de *N. oleoabundans* al implementar diferentes concentraciones del EOPO se realizó una prueba ANOVA unifactorial con un alfa del 0.05, en donde se utilizó como referencia la concentración celular obtenida una vez que los cultivos entraron a una fase estacionaria después de 19 días de incubación. Como resultado del análisis estadístico (Material suplementario tabla 8) se observó que bajo las 3 concentraciones de EOPO, existía una diferencia significativa entre la concentración celular de cada uno de los matraces, siendo el matraz control el de una mayor concentración y el matraz con un 20% de EOPO el de menor concentración.

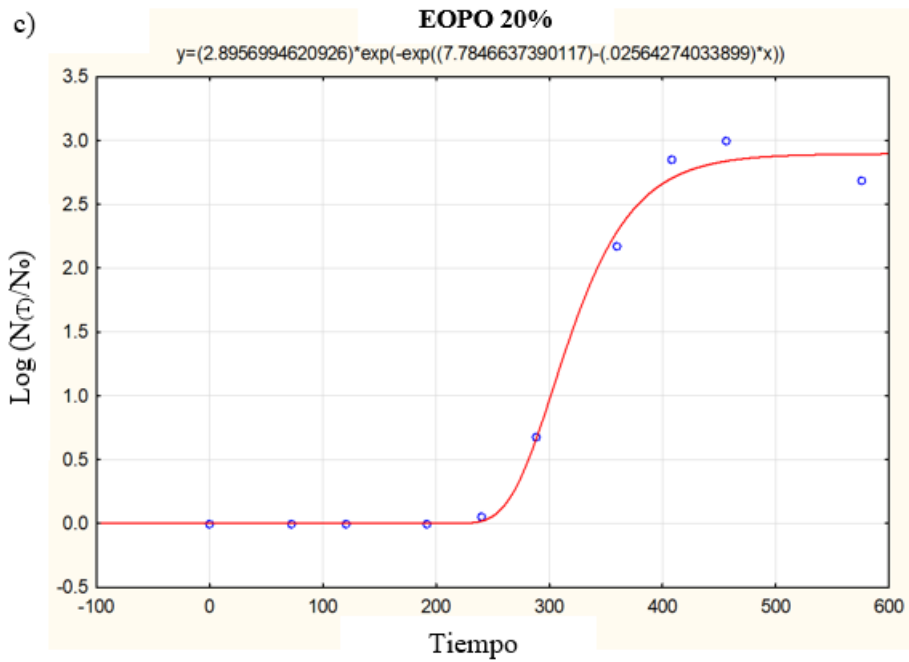
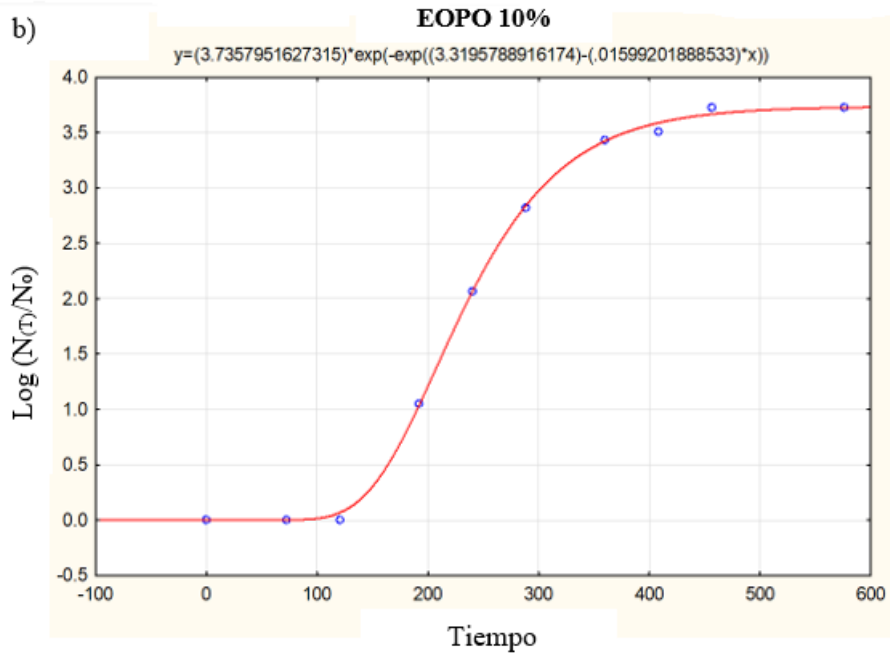
A partir de esta prueba estadística se buscó si existía una diferencia significativa entre cada una de las medias de los tratamientos, para esto se realizó la prueba de Tukey que confirmó que entre el control y los matraces con 10% de EOPO no existía una diferencia significativa, de igual manera se observó el mismo comportamiento con los matraces con un 20 y 30% de EOPO los cuales no mostraron diferencia significativa. Sin embargo, al comparar el control y el matraz con un 10% de EOPO con las medias de los matraces con un 20 y 30% de EOPO, se podía apreciar una diferencia significativa entre ellos (Material suplementario tabla 9).

**Tabla 3.** Valores obtenidos a través del modelo matemático de Gompertz aplicado a las cinéticas de crecimiento de *N. oleoabundans*

<b>Medio</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>R</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Control</b>	3.9931	0.0105	180.96	0.9974	0.9948
<b>10%</b>	3.7358	0.0159	207.57	0.9994	0.9997
<b>20%</b>	2.8957	0.0256	303.58	0.9934	0.9967

En cuanto a los resultados obtenidos a través de la cinética de crecimiento de *N. oleoabundans* utilizando el del modelo matemático de Gompertz, se pudo observar que tanto las concentraciones con un 10 y 20% de EOPO tuvieron una fase de retraso en el crecimiento mucho más extendida (M) en comparación con el matraz control como se muestra en la Tabla 3, este efecto se puede corroborar con las gráficas de la Figura 15 en donde se puede apreciar una pausa más prolongada en el crecimiento de *N. oleoabundans* a partir de una mayor concentración de EOPO empleado en el medio de cultivo. Además, de una población celular mayor (D) en los sistemas con menor concentración del agente termosensible.





**Figura 15.** Ajuste del modelo matemático de Gompertz para el crecimiento *N. oleoabundans* bajo diferentes concentraciones del EOPO 12,000 A) Matraz Control B) Matraz con 10% de EOPO C) Matraz con 20 % de EOPO

A partir de los resultados mostrados anteriormente, se puede destacar que la presencia del EOPO en el medio de cultivo afecta significativamente el desarrollo de la microalga y entre más alta es la concentración del polímero más repercute en su desarrollo. Esto se puede apreciar al comparar los valores obtenidos por el matraz control en la Tabla 3 con los matraces con un 10 y 20% de EOPO, en donde se indica que el matraz control tiene la mayor población máxima alcanzada y el menor tiempo de duración en la fase de latencia. En cuanto al matraz con un 30% de EOPO, este no se incluyó para su estudio en el modelo de Gompertz al no mostrar crecimiento durante todo el experimento manteniéndose constante con el mismo valor.

## 5.2 Recuperación de Biomasa y EPS con el EOPO

Para las pruebas de producción de EPS a partir de las diferentes concentraciones de EOPO se pudo apreciar una mayor concentración de EPS en los sistemas con una menor concentración de polímero como se muestra en la Tabla 4. Una vez que se aumentaba la concentración del EOPO en el medio de cultivo, la recuperación de EPS fue siendo menor hasta llegar a la concentración con un 25% de EOPO del cual ya no se pudo obtener EPS.

**Tabla 4.** Valores obtenidos EPS para las pruebas de producción con diferentes concentraciones de EOPO después de 21 días

Concentración de EOPO	EPS recuperado en 150 mL	Desviación estándar	Biomasa recuperada en 150 mL	Desviación estándar
Sin EOPO	0.6135 g	0.032	0.9609 g	0.008
10%	0.4222 g	0.017	0.6961 g	0.028
15%	0.0588 g	0.058	0.4069 g	0.018
20%	0.0089 g	0.008	0.0818 g	0.016
25%	0 g	-	0 g	-



Para el caso de la biomasa se siguió un patrón similar en donde a medida que aumento la concentración del EOPO la cantidad de biomasa recuperada disminuyó en gran medida. Cabe destacar que para el matraz con un 25% de EOPO a partir del día 12 empezó a presentar coloración verde, indicativo del crecimiento de la microalga en el medio de cultivo. Sin embargo, después del día 16 este se volvió de nueva cuenta incoloro, manifestando de nueva cuenta la ausencia de microalga.

### 5.3 Generación de fases con el EOPO

Para llevar a cabo el proceso de formación de fases todos los matraces fueron sometidos a baño María a diferentes temperaturas como se muestra en la Figura 16, registrando el tiempo necesario para poder llegar a ver la correcta formación de cada una de las fases del sistema. Para esto, se estableció un tiempo límite de 25 minutos.

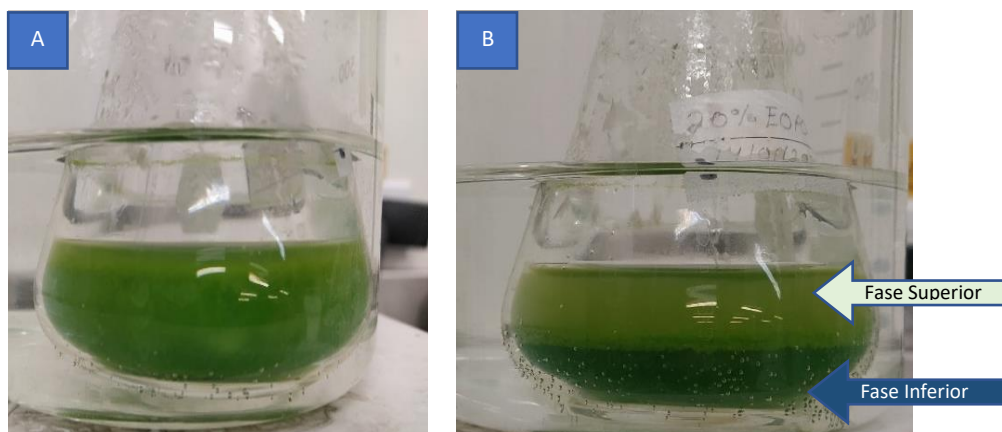


**Figura 16. A) Matraces utilizados para la formación de fases B) Baño María**

Los resultados obtenidos de cada una de las pruebas se pueden observar en la Tabla 5. A partir de estos datos obtenidos se puede apreciar que para las concentraciones del 10 y 15% de EOPO no ocurrió una separación de fases en ninguno de los medios, siendo únicamente las concentraciones con un 20 y 25% de EOPO las que permitieron la correcta visualización de ambas fases

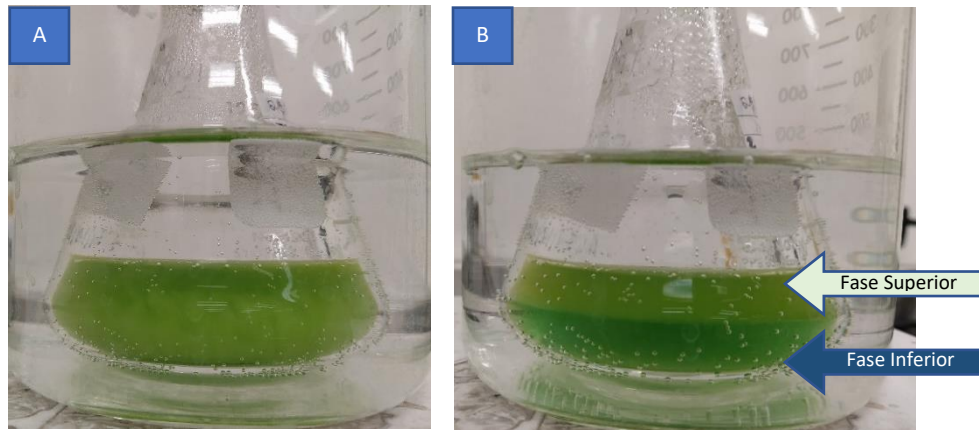
**Tabla 5.** Tiempos obtenidos para la generación de fases con las diferentes concentraciones de EOPO y temperaturas de formación.

Concentración de EOPO	Temperaturas	Tiempo de formación promedio	Desviación estándar
10%	30 °C – 70°C	No presentó formación	----
15%	30 °C – 70°C	No presentó formación	----
20%	30 °C – 60 °C	No presentó formación	----
	70 °C	19 min y 32 seg	64 seg
25%	30 °C – 50 °C	No presentó formación	----
	60 °C	Incompleta	----
	70 °C	14 min y 48 seg	58 seg



**Figura 17.** Formación de fases utilizando una temperatura de 70 °C con una concentración del 20% de EOPO A) Proceso inicial de formación de fases B) Obtención final de fases

Como se puede observar tanto en la Figura 17 como en la Figura 18 las concentraciones con un 20 y 25% de EOPO permitieron la correcta visualización de ambas fases, pudiéndose distinguir claramente la separación entre el medio de cultivo y el agente termosensible después de un período de tiempo determinado. En ambas figuras, se puede apreciar una fase inferior caracterizada por un color verde muy oscuro de apariencia densa y una fase superior mucho más clara y fluida en comparación con la fase inferior.



**Figura 18.** Formación de fases utilizando una temperatura de 70 °C con una concentración del 25% de EOPO A) Proceso inicial de formación de fases B) Obtención final de fases

Entre los tiempos para la generación de las dos fases, el sistema con un 25% de EOPO con una temperatura de 70 °C mostró la formación de fases en un menor tiempo (aproximadamente 14 minutos) a comparación del sistema con un 20% de EOPO el cual se presentó después de un tiempo aproximado de 19 minutos. Cabe destacar que a pesar de que ambas fases se generaron a partir de una temperatura de 70 °C, el sistema con un 25% de EOPO con una temperatura de 60 °C presentó indicios para que eventualmente se presentaran las dos fases, esto al poder apreciar el reacomodo de la biomasa en la fase inferior del sistema como se muestra en la Figura 19. Sin embargo, como el tiempo de formación excedió el tiempo límite de 25 minutos este se interrumpió y se reportó como incompleta en la Tabla 5.

Cabe destacar que un comportamiento muy común que se podía observar dentro de la formación de las fases era la presencia de una interfase en la cual se podía observar parte de la biomasa (Material Suplementario Figura 28). Esta fase era mucho más notoria en los matraces con un 25% de EOPO.

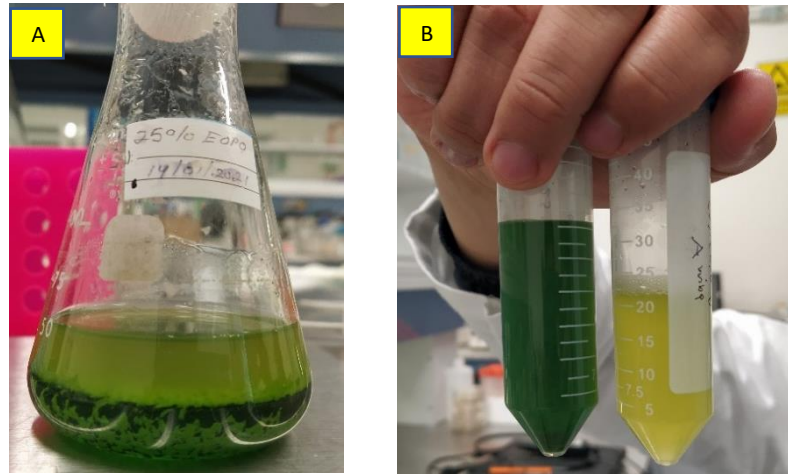


**Figura 19.** Formación de fases incompleta utilizando una temperatura de 60 °C con una concentración del 25% de EOPO

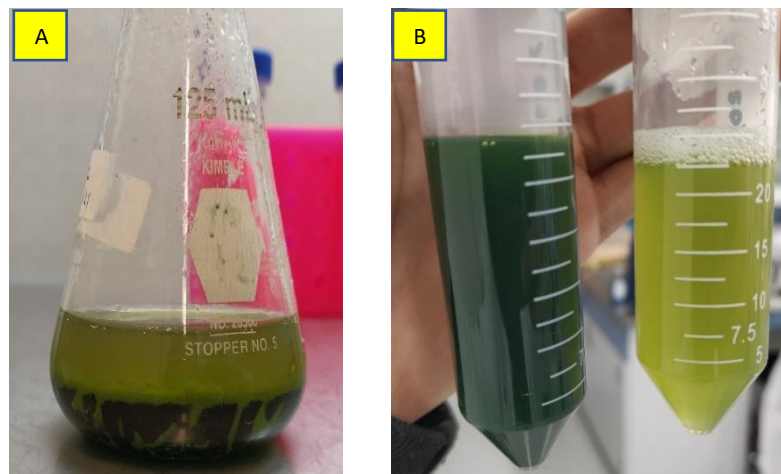
Para las demás concentraciones de EOPO utilizadas en el estudio (10, 15 y 20%) los medios se mantuvieron estáticos sin la presencia de algún cambio significativo durante el efecto constante de la temperatura por lo que se descartó su aplicación en la fermentación extractiva.

#### **5.4 Producción de EPS en sistemas de fermentación extractiva**

Para la prueba de fermentación extractiva con el EOPO, se llevó a cabo la formación de fases empleando las dos concentraciones de EOPO que permitieron su correcta visualización (20 y 25%) utilizando una temperatura de 70 °C. Una vez llevado el proceso de separación se recuperaron cada una de las fases en tubos Falcon como se muestra en las Figuras 20 y 21 con el fin de obtener los rendimientos de EPS y Biomasa en cada una de las fases.



**Figura 20.** Proceso de fermentación extractiva con 25% de EOPO A) Separación de fases B) Recuperación de ambas fases en tubos Falcon



**Figura 21.** Proceso de fermentación extractiva con 20% de EOPO A) Separación de fases B) Recuperación de ambas fases en tubos Falcon

Los rendimientos obtenidos de EPS se muestran en la Tabla número 6, en donde se puede apreciar que para ambas concentraciones de EOPO la mayor parte del EPS se concentró en la fase superior del sistema, recuperando cantidades mayores al 70% de EPS, mientras que, en la fase inferior la recuperación del EPS fue menor al obtener valores menores al 32%. La concentración con 25% de EOPO mostró una mayor cantidad recuperada de EPS a comparación del sistema con una concentración del 20% de EOPO, teniendo un porcentaje más alto en la fase superior del sistema.

**Tabla 6.** Porcentajes de EPS y biomasa recuperado de la fase inferior y fase superior de los sistemas de fermentación con un 20 y 25% de EOPO.

<b>Concentración de EOPO</b>	<b>Control de Fases</b>	<b>Porcentaje de EPS</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Porcentaje de Biomasa</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Sin EOPO</b>	Control	100%	<b>2.9%</b>	100%	5.2%
<b>25%</b>	Fase superior	74.90%	0.4%	27.64%	4.13%
	Fase Inferior	25.10%	0.2%	72.35%	2.05%
<b>20%</b>	Fase superior	68.22%	0.8%	33.42%	3.05%
	Fase Inferior	31.78 %	0.3%	66.57 %	0.6%

En cuanto a los rendimientos de biomasa obtenidos durante el experimento, se pueden observar una mayor concentración de biomasa a en la fase inferior del sistema como se muestra en la Tabla 6. Tanto para los sistemas con un 20 y 25% de EOPO la concentración de la biomasa fue superior en la fase inferior del sistema indicando una preferencia de la biomasa por esta fase. Cabe destacar que la concentración de biomasa en la fase inferior en el sistema con un 25% de EOPO fue mayor en comparación con el matraz con un 20% de EOPO.

### **5.5 Generación de EPS en un sistema semicontinuo**

Para comparar el rendimiento de EPS obtenido por medio de la fermentación extractiva bajo un sistema de producción, se realizó una prueba utilizando un método de fermentación sumergida por lotes vs un sistema semicontinuo empleando la técnica de fermentación extractiva en 50 ml con una concentración de EOPO del 25%, utilizando las condiciones probadas en los experimentos anteriores para la formación de fases.

Tras los 12 días de incubación se procedió a recuperar el EPS de ambos sistemas. Para el caso de los matraces con EOPO (cultivo 1 y 2), se les volvió administrar la misma cantidad de medio que fue sustraída para la obtención de EPS, para dejarlos nuevamente en incubación por un período de 8 días. Sin embargo, el crecimiento celular disminuyó considerablemente hasta llegar a la muerte celular una vez que se llevó a cabo la formación de las dos fases (Material Suplementario Figura 30). Esto también se pudo corroborar al presentar un cambio físico en el medio al cambiar la coloración del medio por un color opaco el cual podría manifestar la pérdida de la microalga en el medio de cultivo como se muestra en la figura 22. Debido a la pérdida de viabilidad del medio se realizó una única extracción de la fase superior del sistema semicontinuo y por lotes.

**Tabla 7.** Producción de EPS obtenida en 12 días en los sistemas semi continuo y por lotes.

Tiempo	30 mL de Sobrenadante EOPO		50 mL de cultivo Batch	
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
12 días	0.1563 g	0.1640 g	0.3506 g	0.3777 g
<b>Total producido</b>	0.3203 g		0.7283 g	

En cuanto para el EPS obtenido en cada uno de los sistemas, este se secó y posteriormente se pesó en la balanza analítica. Como se aprecia en la Tabla 7 la cantidad de EPS recuperado en el proceso por lotes fue mayor en comparación del sistema semicontinuo ya que la cantidad de EPS obtenido por el sistema batch fue de un 56% más con respecto al sistema semicontinuo. Además, cabe destacar que, para la obtención del sobrenadante de cada uno de los sistemas, ambos fueron sometidos a altas temperaturas por un período de tiempo ya definido.



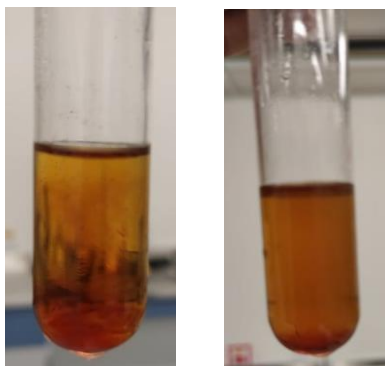


**Figura 22.** Cambio de coloración del Matraz 1 después de realizar la separación de fases con el EOPO 12, 000

### **5.6 Detección de azúcares por el método de ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales**

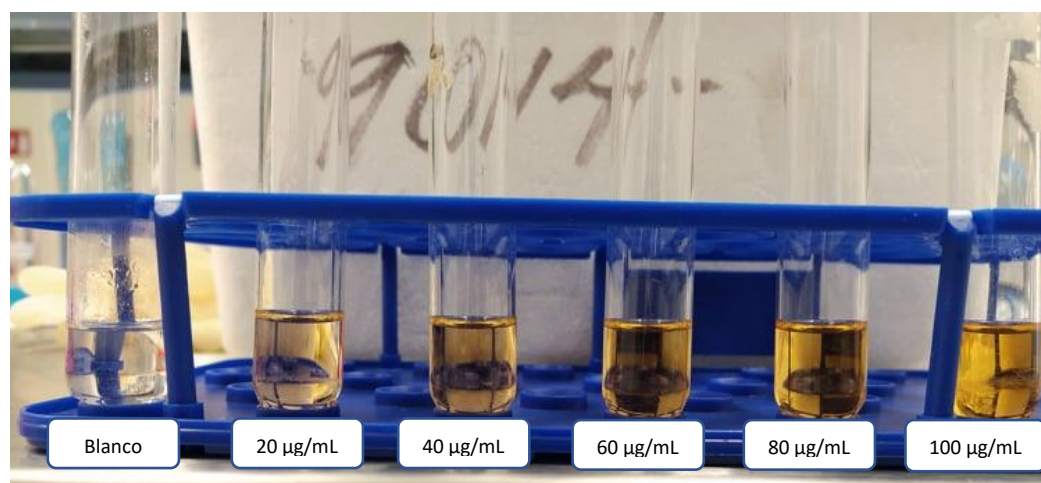
Para determinar la presencia del exopolisacárido en la pastilla obtenida al final del proceso de secado en el concentrador, se realizó la prueba de ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales. A partir de esta prueba colorimétrica realizada se buscó la confirmación del EPS a partir del cambio de color amarillo dorado al reaccionar con el fenol en cada una de las muestras empleadas. Como se muestra en la Figura 23 ambas muestras obtenidas de las pruebas de producción resultaron positivas al mostrar el cambio de color, indicando la presencia de azúcares en la pastilla obtenida del sobrenadante durante el proceso de fermentación extractiva.





**Figura 23.** Cambio de color de las muestras de las pastillas indicando la presencia positiva de azúcares en cada uno de los tubos

Para determinar la concentración de azúcares en cada uno de los tubos se realizó una curva de calibración (Material Suplementario Figura 31) utilizando la glucosa como estándar de las cuales se fueron obteniendo diferentes tonalidades en cada una de las concentraciones como se muestra en la Figura 24 a partir de la concentración de azúcar en cada uno de los tubos. Las concentraciones calculadas de azúcares resultaron en  $79.48 \mu\text{g/mL}$  con una desviación estándar de 0.09 para la muestra 1 y para la muestra 2 una concentración de  $63.40 \mu\text{g/mL}$  con una desviación estándar de 0.01.



**Figura 24.** Concentraciones de glucosa utilizadas para la elaboración de la curva de calibración para carbohidratos totales

## CAPITULO 6

### DISCUSIÓN

#### 6.1 Viabilidad del medio de cultivo con el EOPO 12,000

La presencia del EOPO 12,000 en el medio de cultivo genera un gran impacto sobre el crecimiento de *N. oleabundans* al modificar las condiciones que propician su crecimiento. Entre las principales alteraciones a su medio destaca el incremento de viscosidad, producido por la presencia del EOPO, el cual ya ha sido documentado por Show y colaboradores (2012) quienes reportaron que al utilizar un EOPO de alto peso molecular en la recuperación de lipasas trajo un aumento en la viscosidad del medio, trayendo como consecuencia una disminución en el crecimiento celular y en la producción de lipasa. Se conoce que la viscosidad es una de las principales propiedades que caracterizan al medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo, en general si este parámetro es alterado de manera drástica influye directamente en las características reológicas presentes en el medio de cultivo. Esto último es un problema que suele presentarse en fermentaciones aérobicas, debido al grado de dificultad presente en la solubilización de moléculas como el oxígeno el cual es comúnmente requerido en grandes cantidades por los sistemas microbianos (Medrano Roldan, 1992).

En el caso específico de las microalgas como *N. oleabundans* que poseen la capacidad de excretar polisacáridos a su medio de cultivo, desarrollan cierta tolerancia a este tipo de condiciones ya que los polisacáridos, pueden provocar un aumento de la viscosidad en los medios de cultivo y estos suelen mostrar un comportamiento reológico no newtoniano (Li *et al.*, 2020). Este efecto puede reflejarse a partir de la fase de latencia en los medios con concentraciones del 10 y 20% de EOPO en donde se puede apreciar una extensión en el tiempo de adaptación, siendo el medio de cultivo con 20% de EOPO el de mayor duración, con una fase lag de 264.58 horas.

Sin embargo, a pesar de que la microalga logró desarrollarse bajo estas condiciones, es claro que su crecimiento fue afectado de manera drástica al comparar la concentración celular alcanzada por el control, con la de los cultivos con EOPO.

Estos últimos, presentaron diferencias en los valores obtenidos en el modelo matemático de Gompertz, en parámetros como el crecimiento máximo (M) que está relacionado directamente con las condiciones del medio (pH, temperatura, sustrato, etc.) en donde un valor muy bajo representa un crecimiento desbalanceado al no encontrar las condiciones propicias para su desarrollo (Darvehei et al., 2018) y la población máxima alcanzada (D) que se relaciona con la biomasa producida en cada uno de los medios. A partir de estos parámetros el medio con un 20% de EOPO el más afectado, presentó un mayor tiempo en alcanzar el crecimiento máximo, además de un valor muy bajo para la población máxima.

La disminución de los valores con respecto al control relacionados con el crecimiento de *N. oleabundans*, se pueden atribuir a la pérdida de homogeneidad en el medio de cultivo, ya que una vez que se cuenta con un medio altamente viscoso, se emplean diferentes métodos de mezcla para mantener de manera uniforme los componentes presentes en el medio. Al permanecer estático o con un sistema de mezclado deficiente se puede llegar a ver la presencia de aglomerados celulares los cuales limitan los procesos de transferencia de calor y absorción de nutrientes (Seviour et al., 2011). Como consecuencia, las células tienden a juntarse en espacios reducidos buscando las mejores condiciones que puedan propiciar su desarrollo en el medio de cultivo. Sin embargo, al ser espacios muy reducidos, los nutrientes necesarios para el crecimiento se encuentran de manera muy limitada resultando en la alteración del metabolismo de la microalga, trayendo como consecuencia una ralentización del crecimiento celular o inclusive la muerte, lo que podría explicar la ausencia de crecimiento en el matraz con un 30% de EOPO, además de la pérdida de viabilidad del cultivo con un 20% de EOPO. Como efecto adicional, al disminuir la tasa de absorción del agua por el incremento de la viscosidad en el medio, puede resultar en una tasa de fotosíntesis reducida, esto al limitar gran parte de los iones hidrógeno obtenidos del agua libre (Petkov & Bratkova, 1997).

En general el uso del EOPO 12,000 ha sido probado en diferentes estudios en donde se han obtenido resultados no tan satisfactorios para el crecimiento celular y la expresión del producto de interés. Esto lo corroboran estudios como el de Show y

colaboradores (2012) quienes probaron diferentes pesos moleculares de EOPO para la producción de lipasa en un sistema de fermentación extractiva con *Burkholderia cepacia*, donde encontraron una disminución significativa en la producción de lipasa cuando el medio de cultivo contenía EOPO con un peso molecular de 12,000. Otro ejemplo más reciente en el cual se vio de manera similar un efecto negativo en el crecimiento del microorganismo de estudio, fue documentado por Medina-Ramirez y colaboradores (2020) en donde estudiaron la viabilidad del EOPO 12, 000 con *Rhodotorula mucilaginosa*, observando que a partir de las 96 h la viabilidad de los cultivos que contenían este agente empezó a decrecer, observándose a las 168 h que había una diferencia de viabilidad entre los 2 controles y los cultivos con el EOPO de aproximadamente más de un 35%.

Cabe destacar que, mediante el uso de otros agentes termosensibles con un peso molecular menor, es posible llevar a cabo un sistema de fermentación extractiva más eficiente al manejar condiciones que no estresen tanto a la microalga y de esta manera pueda llevar a cabo un mejor desarrollo permitiendo una mayor producción y recuperación del EPS. Entre los agentes termosensibles más utilizados para acoplarse a procesos de producción/recuperación, destaca el EOPO 3900 el cual ha sido utilizado en sistemas de fermentación extractiva en *Bacillus cereus* para la recuperación compuestos como gamma-ciclodextrina (Lin *et al.*, 2018) y en *Burkholderia cepacia* para la recuperación de lipasas (Show *et al.*, 2012) ya que al tratarse de un EOPO con un menor contenido de PO presenta una menor viscosidad e hidrofobicidad (Berggren *et al.*, 1995).

## **6.2 Recuperación de EPS y Biomasa con el EOPO**

En cuanto a la biomasa y el EPS recuperado en cada uno de los sistemas con el EOPO destaco la disminución de estos dos componentes con el aumento de la concentración de EOPO en el medio de cultivo. Este comportamiento puede relacionarse como se mencionó con anterioridad en la sección 6.1 a que en grandes concentraciones de EOPO con alto peso molecular puede desencadenar un efecto nocivo en la microalga, llegando afectar su crecimiento y la producción de EPS.

Se han encontrado resultados similares en cuanto a la producción de biomasa como el de Ooi y colaboradores (2011) donde realizaron una comparación entre la biomasa obtenida de un cultivo de *Burkholderia pseudomallei* a partir de diferentes concentraciones de PEG, en el cual obtuvieron una menor concentración de biomasa a medida que se aumentó el peso molecular del PEG; demostrando que los procesos de fermentación extractiva con polímeros de alto peso molecular puede limitar el crecimiento de los microorganismos y de esta forma afectar directamente la síntesis de metabolitos de interés. Cabe destacar que en el caso de la biomasa producida por *N. oleoabundans* otro factor que juega un rol importante es el tipo de crecimiento al que es sometida, ya que se conoce que bajo condiciones mixotróficas la obtención de biomasa tiende a ser menor en comparación a un medio de crecimiento fototrófico, que suele presentar una mayor producción en comparación con medios mixotróficos y Heterotróficos (Abu Hajar et al., 2017).

Para el caso específico del EPS, está claro que su producción está vinculada de forma importante con la viabilidad de la microalga. Sin embargo, pueden existir otros factores que estén siendo afectados por la alta concentración del EOPO. En la actualidad todavía no está claro cómo es que la microalga es capaz de absorber o interactuar con los azúcares libres en su medio, pero estos mecanismos pueden ser alterados o interrumpidos por la alta viscosidad presente en el medio alterando la producción y excreción de los polisacáridos a su medio. Aun así, los mecanismos moleculares y la vía de metabolismo de la biosíntesis de EPS de *N. oleoabundans* a partir de azúcares son poco conocidos y se requieren más estudios para una mejor comprensión de la síntesis de EPS de *N. oleoabundans*.

### **6.3 Formación de fases con el EOPO**

Los medios de cultivo con concentraciones del 20 y 25% de EOPO (v/v), resultaron favorables para la formación del sistema ATPS al apreciar la separación correcta de cada una de las fases del sistema. A pesar de encontrar sistemas bifásicos que utilizan concentraciones mayores de polímero como el descrito por Ketnawa y colaboradores (2014) en el que emplearon una concentración del 40% del EOPO 3900

para la formación de fases en un sistema de recuperación de proteasas alcalinas, no es necesario el empleo de grandes concentraciones del polímero para la obtención de fases, ya que es un conjunto de diversos factores los que participan en el correcto funcionamiento del sistema, entre ellos el peso molecular del polímero empleado.

Dado que el peso molecular del polímero termosensible utilizado es muy alto (12,000) la concentración no tuvo que ser sumamente alta para llevar a cabo la formación de las fases, ya que se conoce que estos polímeros termosensibles aumentan su hidrofobicidad al aumentar su peso molecular (Huang & Forciniti, 2002). Sin embargo, muchos de estos sistemas funcionan con concentraciones menores al 40%, ya que trabajan en conjunto en combinación con otros polímeros termosensibles o sales inorgánicas con la finalidad de favorecer la generación de las fases, como se observa en el trabajo realizado por Leong y colaboradores (2017) en el cual a través del EOPO 3900 a una concentración del 14% (p/p) en combinación con sulfato de amonio a una concentración del 12% (p/p), obtuvieron las mejores condiciones para la elaboración del sistema ATPS para la extracción de polihidroxialcanoatos (PHAs).

Otro aspecto importante que destacó en la formación de las fases con las concentraciones de EOPO previamente mencionadas fue la temperatura a la que fueron sometidos los medios de cultivo. La presencia de ambas fases se obtuvo empleando una temperatura de 70 °C para ambas concentraciones de EOPO (10 y 20%) por un tiempo alrededor de los 20 minutos. A pesar de encontrar la temperatura que permitiera la obtención del sistema bifásico, resalta que esta se encuentra muy por encima de la temperatura óptima de crecimiento de *N. oleabundans* la cual está establecida entre los 26-29 °C (Giovanardi *et al.*, 2014). Este podría llegar a ser un factor crítico en un sistema de producción semicontinuo ya que la microalga sería sometida a un gran estrés por un tiempo muy prolongado, lo que daría como resultado la pérdida de viabilidad de las células en cultivo. Además, el utilizar altas temperaturas puede llegar a afectar la estructura y composición de los EPS, alterando las propiedades bioactivas presentes en estas biomoléculas (Delattre *et al.*, 2016).

Debido a todos los factores vinculados a la temperatura utilizada para el proceso de formación de fases, que abarcan desde la viabilidad del cultivo hasta un mayor costo

del proceso por la energía empleada en el sistema de producción, se opta por trabajar bajo intervalos de temperatura no tan alejados del rango óptimo de crecimiento del microorganismo, ya que para procesos como la fermentación extractiva es necesario mantener el medio cultivo siempre en un estado de producción continua el cual permita reutilizar el medio la mayor cantidad de veces posible (Iqbal et al., 2016).

La mayoría de estos procesos de formación de ATPS se manejan con intervalos de temperatura de 30 a 45 °C, de manera que la temperatura utilizada para la formación de fases permite el crecimiento del microorganismo, facilitando de esta manera la extensión del sistema ATPS al favorecer su desarrollo en el medio de cultivo sin alterar su metabolismo y al mismo tiempo recuperar en la fase opuesta el metabolito de interés excretado al medio de cultivo. Este tipo de condiciones han sido probadas en estudios como el de Leong y colaboradores (2019) quienes aplicaron de manera continua la formación de fases para la recuperación de poli [(R)-3-hidroxi-butirato] (PHB) utilizando a *C. necátor* como microorganismo productor, manteniendo el sistema activo por un lapso de 60 horas utilizando una temperatura de 30 °C. A partir de estas condiciones obtuvieron un crecimiento de biomasa de 1.8 g/L, así como la mayor acumulación de PHB de 0.29g/L, en comparación con las demás temperaturas empleadas en la formación del sistema ATPS.

### **6.3 Caracterización del sistema de fermentación extractiva**

A partir del proceso de fermentación extractiva utilizando las concentraciones del 20 y 25% de EOPO, se pudo recuperar la mayor parte del EPS en la parte superior de ambos sistemas, teniendo un mayor rendimiento por parte del medio con un 25% de EOPO. La parte superior del medio representaba la fase más hidratada con un mayor contenido de agua, manifestando la fase con mayor solubilidad donde se presentó la mayor parte del EPS, mientras que la fase inferior exhibió un comportamiento hidrofóbico en el cual albergó la mayor parte de la biomasa y el EOPO.

La presencia del EPS en la fase superior se debe a las fuertes interacciones moleculares entre los diversos azúcares que conforman los polisacáridos y el agua. Los

polisacáridos al ser moléculas compuestas por múltiples cadenas largas de carbohidratos, adquieren una alta solubilidad como resultado de su capacidad para establecer enlaces de hidrógeno con el agua (Suarez Ruiz et al., 2018). Esta alta afinidad es la responsable por su desplazamiento hacia la fase más hidratada que en este caso corresponde a la fase superior.

Sin embargo, no todos los sistemas que trabajan con polímeros termosensibles exhiben el mismo comportamiento de partición ya que este puede verse afectado por múltiples factores como el peso molecular y la concentración del polímero, el tipo y la composición de los componentes de las fases, la temperatura del sistema y el pH del sistema. Esto se puede apreciar en investigaciones como el estudio realizado por Suarez Ruiz y colaboradores (2020) en donde probaron 2 diferentes sistemas ATPS como método de fraccionamiento de carbohidratos en *N. oleoabundans*, encontrando que al momento de la formación de las fases, la fase más soluble rica en agua quedó en el fondo del sistema mientras que la fase más hidrófoba donde se concentró el polímero se encontró en la parte superior del sistema. Este tipo de fenómenos se presentan debido a las características de partición del polímero empleado que para este estudio correspondía a un PEG400 junto con las sales inorgánicas utilizadas (citrato de potasio y dihidrogenofosfato de colinio) para favorecer la solubilidad del sistema modificando las condiciones que propician esta separación.

En cuanto a la biomasa obtenida, la mayor parte se estableció en la parte inferior del sistema, este comportamiento puede explicarse a partir que muchos de los elementos que conforman la biomasa como lípidos, clorofila y pigmentos carotenoides son moléculas hidrófobas por lo que su comportamiento de partición estaría más inclinado hacia la fase menos hidratada (Chang et al., 2018). Sin embargo, uno de los fenómenos que se vio al momento de llevar a cabo la separación de las fases es la formación de una interfase en donde parte de la biomasa se acumuló.

En comparación con lo reportado en la literatura se ha llegado observar este tipo de fenómeno en sistemas ATPS en donde se emplearon polímeros termosensibles de una masa molecular muy alta, como lo demuestra el estudio realizado por (Chavez-Santoscoy y colaboradores (2010) en donde observaron que al utilizar aun PEG con un



peso molecular mayor (de 1000 a 20000) obtenían como resultado la concentración de biomasa en la interfase. Este comportamiento según la literatura consultada indica que al haber un aumento en la masa molecular del polímero provoca un aumento en el volumen excluido en ambas fases del sistema, lo que resulta en macromoléculas y partículas suspendidas que se concentran en la interfaz.

#### **6.4 Rendimiento de EPS por fermentación extractiva**

Los rendimientos obtenidos de EPS por fermentación extractiva en comparación con otros sistemas de extracción fueron menores en comparación con lo reportado en la literatura. En el trabajo realizado por Wu y colaboradores (2011) obtuvieron una cantidad de 5 g/L de EPS empleando como fuente principal de carbono la lactosa, utilizando un método de extracción por calor, en el cual el cultivo fue sometido a aproximadamente a 80°C seguido de un proceso de centrifugación donde la fracción retenida fue sometida a varios lavados con etanol hasta concentrarse a presión reducida.

Más recientemente Li y colaboradores (2020) obtuvieron un rendimiento máximo de 1 g/L utilizando glucosa como fuente de carbono, el método que emplearon para la recuperación del EPS se llevó a cabo de forma convencional sometiendo al medio de cultivo a temperaturas muy altas seguido de un proceso de centrifugación y lavados con etanol para su precipitación.

En general existe un gran umbral relacionado a las condiciones ideales para obtener un mayor rendimiento de EPS, ya que se sabe que existen múltiples factores que pueden influir en su producción como la temperatura, viscosidad del medio, ciclos de luz, fuente de carbono, la concentración de la fuente de carbono, los componentes del medio de cultivo entre otros (Villay et al., 2013). Hasta la fecha el único resultado que no ha sido contradictorio entre los estudios realizados es la capacidad de producir EPS a partir de un crecimiento mixotrófico.

La disminución de EPS obtenido durante el presente proyecto se le puede atribuir principalmente a dos factores que destacan por favorecer la inhibición del

crecimiento de la microalga y someterla a un gran estrés. La temperatura empleada para la formación de fases representa uno de estos factores al someter al medio de cultivo a una temperatura de 70 °C por un período de tiempo prolongado favoreciendo el proceso de desnaturalización de algunas proteínas de la pared celular ocasionando un proceso de muerte celular (Phong et al., 2018). La viscosidad del medio generada por el EOPO representa otro de estos factores al cambiar las propiedades reológicas del medio llegando a alterar el metabolismo de la microalga al limitar los nutrientes presentes en su medio de cultivo, lo que podría limitar la producción de EPS.

Sin embargo, aunque aún no existen estudios detallados que especifique la síntesis de estos EPS, se conoce que la presencia de monosacáridos como la glucosa en su medio de cultivo pueden activar algún tipo de señal para la producción de EPS. Esto podría ser factible ya que la glucosa es un nutriente omnipresente para las células eucariotas, y no solo sirve como fuente de carbono de EPS, sino que también ejerce efectos reguladores similares a los de las hormonas (Rolland et al., 2001).

## **6.5 Rendimiento de EPS en un sistema semicontinuo**

Una vez que se extrajo el medio de cultivo del sistema batch y se realizó la separación de fases en el sistema semicontinuo para la obtención de la fase superior, el medio de cultivo mostró un característico color amarillo el cual está relacionado con la pérdida de viabilidad de la microalga (Marcilhac et al., 2014). Esto puede ser atribuido a la temperatura empleada para la generación de fases como se discute en la sección 6.2 del presente trabajo.

De igual forma se volvió a añadir medio fresco, buscando la recuperación de la microalga. Sin embargo, ya no se encontró crecimiento en los matraces con el agente termosensible, indicando la pérdida de viabilidad del cultivo ocasionado por las condiciones a las que fue sometidas. En cuanto al EPS obtenido, solo se pudo realizar una única extracción para ambos sistemas en donde se encontró una mayor recuperación de EPS por parte del sistema por lotes, obteniendo un rendimiento mayor del 56% en comparación con el sistema de extracción fermentativa. A partir de los

resultados obtenidos por el proceso semicontinuo se manifestó que, a través del estrés provocado por el cambio de temperatura y presencia del agente termosensible en el medio de cultivo, no favorecieron las condiciones para llevar a cabo un proceso de recuperación semicontinuo el cual permitiera el reciclado del EOPO.

En comparación con otros métodos ya reportados para la recuperación de EPS como la extracción asistida por ultrasonido o tratamientos con resinas iónicas, la fermentación extractiva requiere de un tiempo prolongado para obtener una mayor recuperación, ya que a partir del cambio de solubilidad generado por el calor del medio es que empiezan emigrar cada uno de los componentes del sistema (Darani et al., 2021), por lo que un tiempo corto podría interferir en la recuperación total del EPS presente en el medio. A partir de las altas temperaturas empleadas para la separación de las fases con el EOPO 12,000 no se puede mantener un largo periodo de tiempo para la activación de las fases, ya que a altas temperaturas la viabilidad de la microalga se vio altamente afectada, de manera que su exposición a un largo período de tiempo no permitiría la realización de un proceso semicontinuo.

A pesar de que no se encontraron las condiciones ideales para trabajar con el EOPO 12,000 bajo un sistema semicontinuo, en el proceso de fermentación extractiva existen alternativas que pueden desarrollarse para que este enfoque pueda funcionar. Entre las variables que representaron un mayor problema para la producción y recuperación del EPS destacó la temperatura empleada para la formación de fases, así como la viscosidad proveniente del polímero de alto peso molecular empleado. Como alternativa a este problema se emplean polímeros termosensibles de menor peso molecular como el EOPO 3900 el cual Leong y colaboradores (2017) demostraron ser factible para la recuperación de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando una concentración del 5, 10 y 15% empleando temperaturas menores a 35°C lo que permitió el crecimiento de *C. necátor* en el medio de cultivo para la producción de PHA.

## **6.6 Detección de EPS por el método de ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales**

Para corroborar la presencia del EPS en la pastilla obtenida después del proceso de secado en el concentrador durante las pruebas de fermentación extractiva, se realizó la prueba carbohidratos totales. A partir de esta prueba se corroboró la presencia de azúcares al mostrar el color amarillo en cada uno de los tubos indicando la presencia positiva de azúcares. Además, la concentración de cada una de las muestras indicó un alto valor de estas moléculas presentes en la pastilla obtenida, demostrando la extracción de azúcares a partir del proceso de fermentación extractiva. Aunque el método es capaz de detectar prácticamente todas las clases de carbohidratos, incluidos los mono, di, oligo y polisacáridos, no es capaz de identificar cual de estos son los que están presentes en la muestra (López-legarda et al., 2017). Sin embargo, es un método de confirmación de alta fidelidad para identificar carbohidratos, debido a la reacción colorimétrica que se desencadena el fenol con el furfural y hidroximetil furfural derivado de la deshidratación de las hexosas y pentosas (Nielsen, 2019).

Cabe destacar que una de las ventajas que facilitó el proceso de extracción y detección del EPS es que hasta el momento no se ha documentado otra biomolécula que sea excretada al medio de cultivo por parte de *N. oleoabundans* a partir de un medio de crecimiento mixotrófico o heterotrófico (Giovanardi et al., 2014). Sin embargo, no obstante, puede existir una situación específica en la cual la microalga en respuesta a ciertos estímulos pueda llegar a excretar a su medio otro tipo de metabolitos como lo reportado en el estudio de Wu y colaboradores (2011) quienes fueron los primeros en documentar la producción del EPS de manera accidental cuando estudiaban las características de crecimiento de la cepa en tres modos de cultivo diferente.

Aunque no se descarta la excreción de otros metabolitos al medio de cultivo por parte de *N. oleoabundans*, las condiciones para la producción del EPS aún siguen teniendo varias interrogantes, por lo que para aprovechar al máximo esta cualidad es necesario llevar a cabo más estudios en cuanto a la producción de EPS de *N. oleoabundans*, incluyendo la caracterización del producto por técnicas como,

cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) (Xiao & Zheng, 2016).

## CAPITULO 7

### CONCLUSIONES

- I. Se encontró diferencia significativa en la viabilidad del cultivo a partir de una concentración del 20% del agente termosensible con respecto al control
- II. La generación de fases en un medio de cultivo con el EOPO 12000 fue posible al utilizar una concentración del polímero del 20 y 25% (v/v) a una temperatura de 70 °C con un tiempo formación entre 14 y 19 minutos.
- III. Las condiciones del sistema para la formación de las dos fases permitieron la recuperación de EPS del medio de cultivo con una concentración del 25% de EOPO utilizando una temperatura de 70 °C obteniendo rendimientos de hasta 0.2781 g/L.
- IV. La mayor parte del EPS se recuperó en la fase superior del sistema al ser de mayor carácter hidrofílico, mientras que el agente termosensible junto con la mayor parte de la biomasa se concentró en la fase inferior del sistema por sus propiedades hidrofóbicas.
- V. Las condiciones por las que se llevó a cabo la formación de las dos fases con el EOPO 12,000 no permitieron el desarrollo de un proceso semicontinuo empleando la técnica de fermentación extractiva para la producción/recuperación de EPS al comprometer la viabilidad del cultivo.
- VI. Los rendimientos obtenidos de EPS utilizando la fermentación extractiva acoplada con el EOPO 12000, son menores en comparación con los métodos tradicionales reportados en la literatura.
- VII. Se rechaza la hipótesis al no cumplir con las condiciones para el desarrollo de un proceso de producción/recuperación de EPS

## **CAPITULO 8**

### **PERSPECTIVAS**

En el presente trabajo se trabajó con un EOPO con un peso molecular de 12,000, buscando un alto grado de compatibilidad con la microalga la cual permitiera un entorno que propiciara las mejores condiciones para el desarrollo de la microalga, así como una mayor obtención EPS a partir de un sistema ATPS. Sin embargo, como se ha mencionado en varias publicaciones este polímero representa un alto grado de viscosidad en el medio de cultivo, por lo que sería de mayor relevancia trabajar con un polímero de menor peso molecular como el EOPO 3900 con el cual se han mostrado resultados positivos en la recuperación de múltiples metabolitos de interés.

Ya que es reciente el descubrimiento de la capacidad de *N. oleoabundans* de secretar estos EPS a su medio de cultivo a través de un crecimiento mixotrófico, muchos de los factores que participan en la síntesis de estas biomoléculas aún se desconocen, por lo que sería conveniente involucrar la medición de más parámetros como el pH, ciclos de luz y oscuridad, así como diferentes fuentes de carbono.

Una vez que se conozcan cada una de las variables que son significativas para la producción de EPS se podría realizar un diseño de experimentos el cual tendría como propósito optimizar la producción de EPS.

Finalmente, el análisis de la composición del EPS, así como los ensayos de actividad inmunoreguladoras podrían arrojar resultados prometedores ya que se conoce que, dependiendo del método de recuperación utilizado, suelen cambiar la composición o el orden de los monosacáridos que conforman el EPS producido por *N. oleoabundans* y con ello su posible aplicación futura en la industria.

## CAPITULO 9

### MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla 8.** Análisis de Varianza para la concentración celular

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cantidad de polímero	3	5.19614E+15	1.73205E+15	18.96	0.008
Error	4	3.65348E+14	9.13371E+13		
Total	7	5.56149E+15			

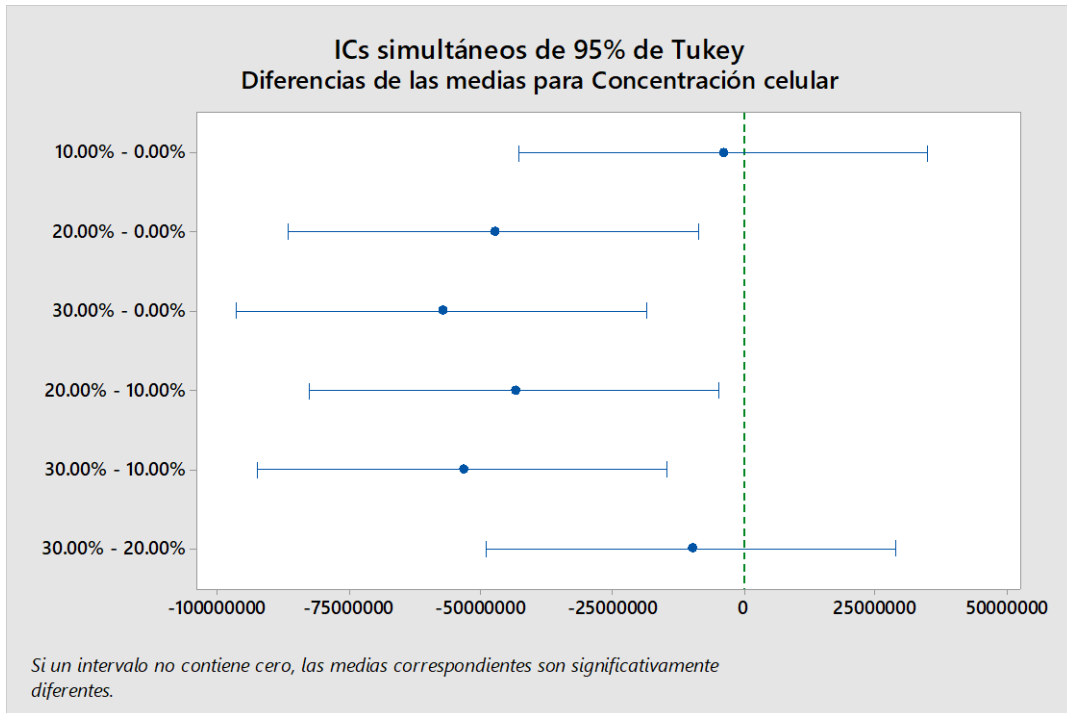
**Tabla 9.** Análisis de medias por la prueba de Tukey para la concentración celular

#### Método de Tukey con una confianza de 95%

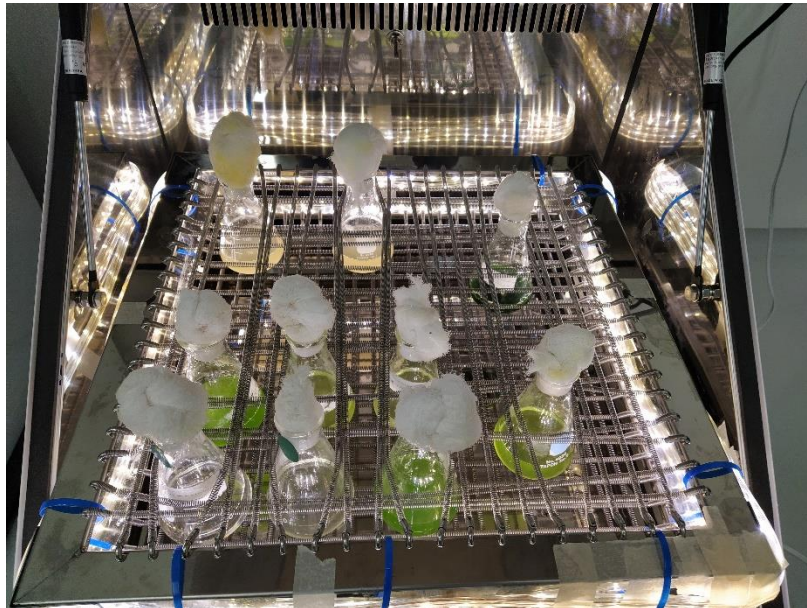
Cantidad de polímero	N	Media	Agrupación
0.00%	2	57326250	A
10.00%	2	53430000	A
20.00%	2	9922500	B
30.00%	2	10110	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

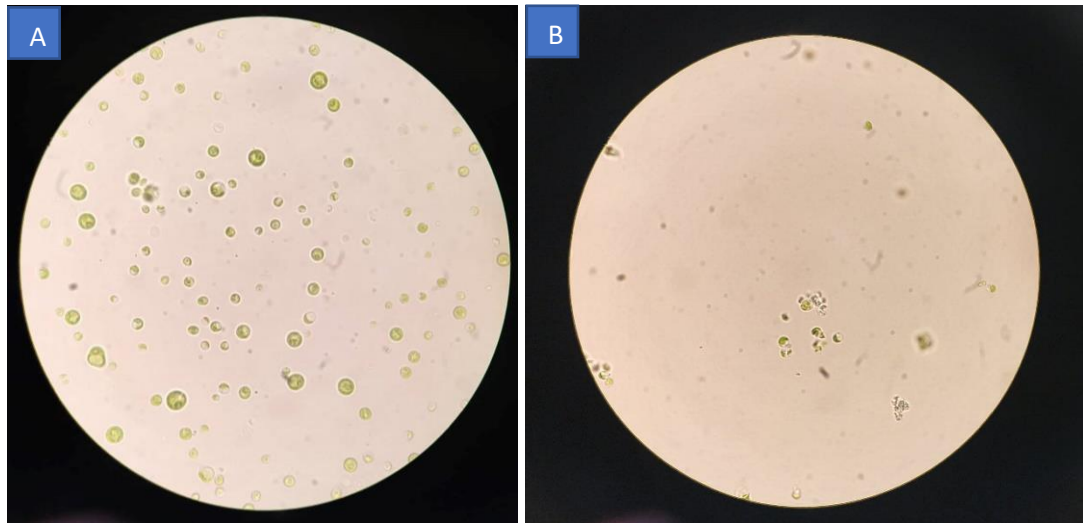




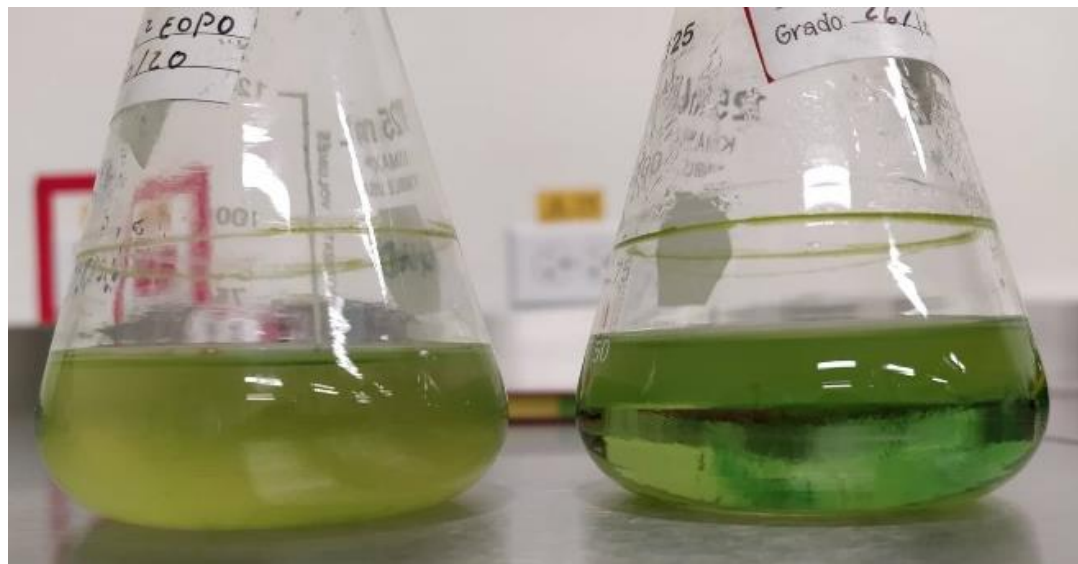
**Figura 25.** Representación gráfica de las diferencias de las medias para la concentración celular obtenidas por la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%



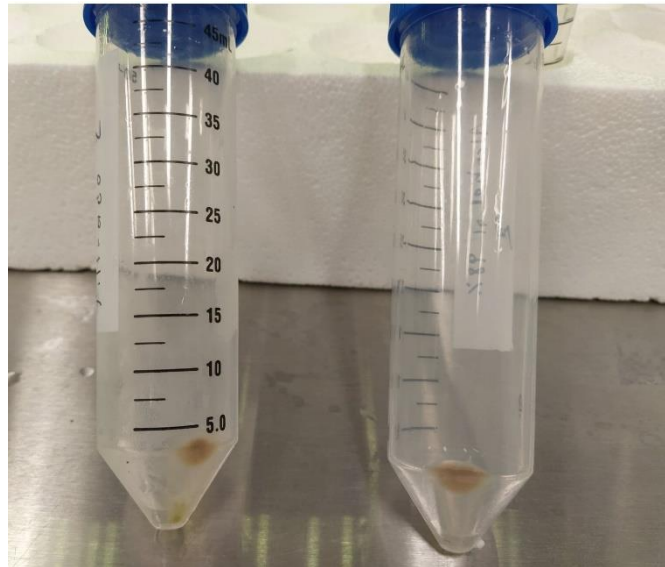
**Figura 26.** Condiciones la incubadora para el crecimiento de *N. oleoabundans*



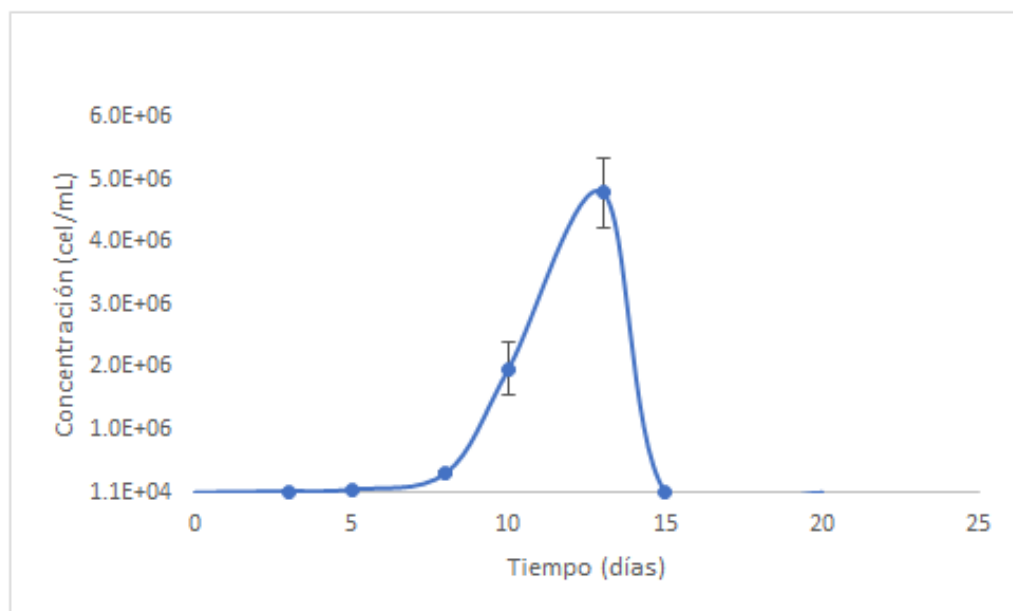
**Figura 27.** Crecimiento celular observado en las pruebas de viabilidad después de terminar el período de incubación A) Matraz control B) Matraz con 20% de EOPO



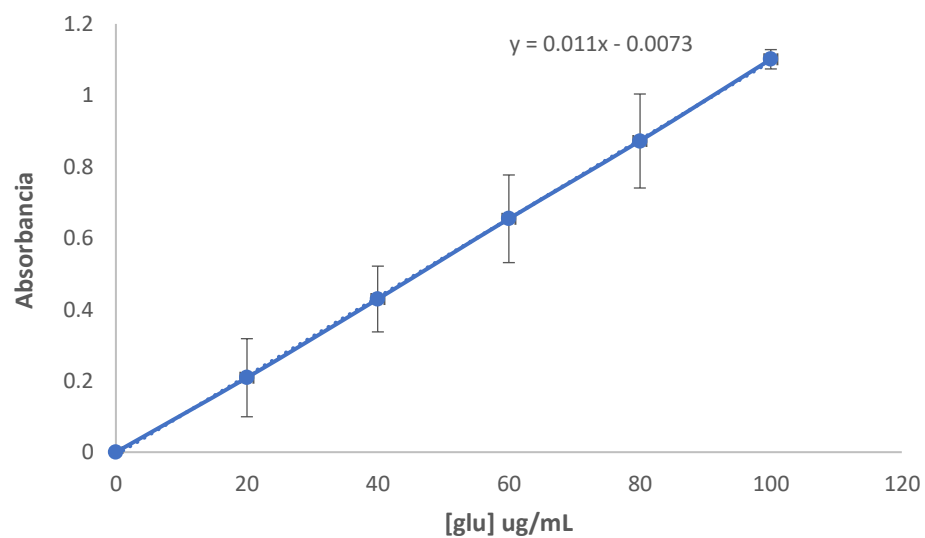
**Figura 28.** Formación de fases con una concentración del 25% de EOPO antes y después del tratamiento térmico



**Figura 29.** Precipitación del EPS obtenido de los matraces con un 20% de EOPO después del tiempo de incubación de 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$



**Figura 30.** Curva de crecimiento correspondiente al sistema de producción semicontinuo utilizando una concentración del 25% de EOPO



**Figura 31.** Curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de carbohidratos totales

## CAPITULO 10

### BIBLIOGRAFIA

- Abu Hajar, H. A., Riefler, R. G., & Stuart, B. J. (2017). Cultivation of the microalga *Neochloris oleoabundans* for biofuels production and other industrial applications (a review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(6), 640–653. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060096>
- Angelini, S., National, I., Cerruti, P., National, I., Santagata, G., National, I., Immirzi, B., & National, I. (2016). *Microbial Factories* (Issue April). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3000.7449>
- Angelis, S., Novak, A. C., Sydney, E. B., Soccol, V. T., Carvalho, J. C., Pandey, A., Noseda, M. D., Tholozan, J. L., Lorquin, J., & Soccol, C. R. (2012). Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1092–1106. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9642-7>
- Badhwar, P., Kumar, P., & Dubey, K. K. (2019). Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37314-y>
- Bafana, A. (2013). Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.016>
- Banik, R. M., Santhiagu, A., Kanari, B., Sabarinath, C., & Upadhyay, S. N. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 337–348. <https://doi.org/10.1023/A:1023940809095>
- Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B. H., & Rito-Palomares, M. (2008). Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies. *Chemical Engineering and Technology*, 31(6), 838–845. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800068>
- Berggren, K., Johansson, H. O., & Yjernelid, 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), 67–79. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00657-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00657-5)
- Bermúdez, J., Rosales, N., Loreto, C., Briceño, B., & Morales, E. (2004). Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 179–183. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000021754.59894.4a>
- Camacho, F., Macedo, A., & Malcata, F. (2019). Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short

- review. *Marine Drugs*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060312>
- Chang, Y. K., Show, P. L., Lan, J. C. W., Tsai, J. C., & Huang, C. R. (2018). Isolation of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* microalga using Ionic liquid based aqueous two-phase system. *Bioresource Technology*, 270(September), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.138>
- Chavez-Santoscoy, A., Benavides, J., Vermaas, W., & Rito-Palomares, M. (2010). Application of Aqueous two-phase systems for the potential extractive Fermentation of Cyanobacterial products. *Chemical Engineering and Technology*, 33(1), 177–182. <https://doi.org/10.1002/ceat.200900286>
- Chen, B., You, W., Huang, J., Yu, Y., & Chen, W. (2010). Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 833–840. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0240-y>
- Cho, S. H., Dahnum, D., Cheong, S. H., Lee, H. W., Lee, U., Ha, J. M., & Lee, H. (2020). Facile one-pot synthesis of ZnBr<sub>2</sub>immobilized ion exchange resin for the coupling reaction of CO<sub>2</sub>with propylene oxide. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 42(April), 101324. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101324>
- Cisneros Ruiz, M., & Rito Palomares, M. (2005). ESTRATEGIAS DE BIOINGENIERIA PARA LA RECUPERACION PRIMARIA DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4(0), 131–139. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62040111.pdf>
- Cruz Filho, R. F. da, dos Santos, J. G., Palheta, R. A., Santos-Ebinuma, V. C., Viana Marques, D. de A., & Teixeira, M. F. S. (2020). Comparison of conventional and extractive fermentation using aqueous two-phase system to extract fibrinolytic proteases produced by *Bacillus stearothermophilus* DPUA 1729. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1805756>
- Darani, S. F., Ahsaie, F. G., Pazuki, G., & Abdolrahimi, S. (2021). Aqueous two-phase systems based on thermo-separating copolymer for partitioning of doxorubicin. *Journal of Molecular Liquids*, 322(xxxx), 114542. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114542>
- Darvehei, P., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97(July), 233–258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- De Philippis, R., Ena, A., Paperi, R., Sili, C., & Vincenzini, M. (2000). Assessment of the potential of Nostoc strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 401–407. <https://doi.org/10.1023/a:1008161815801>
- Delattre, C., Guillaume, P., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharide. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
- Filomena, M., Raposo, D. J., Maria, A., Morais, B. De, Manuel, R., & Costa, S. (2015). *Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications*. 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- Freitas, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245(PartB), 1674–1683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Gil, M. M., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2011). On the Use of the Gompertz Model to Predict Microbial Thermal Inactivation Under Isothermal and Non-Isothermal Conditions. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 17–25. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9032-2>
- Giovanardi, M., Baldisserotto, C., Ferroni, L., Longoni, P., Cella, R., & Pancaldi, S. (2014). Growth and lipid synthesis promotion in mixotrophic *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) cultivated with glucose. *Protoplasma*, 251(1), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0531-x>
- Gómez-Loredo, A., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2014). Partition behavior of fucoxanthin in ethanol-potassium phosphate two-phase systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(11), 1637–1645. <https://doi.org/10.1002/jctb.4514>
- Grima, E. M., Acie, F. G., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites : process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491–515.
- Huang, Y., & Forciniti, D. (2002). Ethylene oxide and propylene oxide random copolymer/sodium chloride aqueous two-phase systems: Wetting and adsorption on dodecyl-agarose and polystyrene. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(7), 786–795. <https://doi.org/10.1002/bit.10169>
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., & Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>
- Jatoi, A. S., Baloch, H. A., Mazari, S. A., Mubarak, N. M., Sabzoi, N., Aziz, S., Soomro, S. A., Abro, R., & Shah, S. F. (2021). A review on extractive fermentation via ion exchange adsorption resins opportunities, challenges, and future prospects. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01417-w>

- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2014). Thermoseparating Aqueous Two-Phase System for the Separation of Alkaline Proteases from Fish Viscera. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 49(14), 2158–2168. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.919595>
- Kim, Y. H., & Moon, S. H. (2001). Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electrodialysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(2), 169–178. <https://doi.org/10.1002/jctb.368>
- Kleinegris, D. M. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2011). Two-phase systems: Potential for in situ extraction of microalgal products. *Biotechnology Advances*, 29(5), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.018>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Kumar, A., Laroche, C., Marcati, A., Violeta, A., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., & Michaud, P. (2013). Bioresource Technology Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology*, 145, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.038>
- Kumar, D., Kaštánek, P., & Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, 115(2), 234–241. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i2/234-241>
- Lemos, D. A., Sonego, J. L. S., Cruz, A. J. G., & Badino, A. C. (2018). In situ extractive ethanol fermentation in a drop column bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(5), 1381–1387. <https://doi.org/10.1002/jctb.5504>
- Leong, Y. K., Show, P. L., Lan, J. C. W., Krishnamoorthy, R., Chu, D. T., Nagarajan, D., Yen, H. W., & Chang, J. S. (2019). Application of thermo-separating aqueous two-phase system in extractive bioconversion of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16. *Bioresource Technology*, 287(May), 121474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121474>
- Leong, Y. K., Show, P. L., Lan, J. C. W., Loh, H. S., Yap, Y. J., & Ling, T. C. (2017). Extraction and purification of Polyhydroxyalkanoates (PHAs): application of Thermoseparating aqueous two-phase extraction. *Journal of Polymer Research*, 24(10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1307-3>
- Li, Y., Wang, C., Liu, H., Su, J., Lan, C. Q., Zhong, M., & Hu, X. (2020). Production, isolation and bioactive estimation of extracellular polysaccharides of green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, 48(March), 101883. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101883>
- Lian, J., Wijffels, R. H., Smidt, H., & Sipkema, D. (2018). The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 806–818. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13296>
- Lin, Y. K., Show, P. L., Yap, Y. J., Ariff, A., Bin Mohamad Annuar, M. S., Lai, O. M., Ling,



- T. C., & Ng, E. P. (2018). Extractive bioconversion of gamma-cyclodextrin and recycling of cyclodextrin glycosyltransferase in liquid biphasic system using thermo-separating polymer. *Frontiers in Chemistry*, 6(SEP), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00448>
- Liu, L., Pohnert, G., & Wei, D. (2016). Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Marine Drugs*, 14(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/md14100191>
- López-legarda, X., Taramuel-gallardo, A., & Arboleda-, C. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180–198.
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A. M., Ziebal, C., Bernet, N., & Béline, F. (2014). Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Research*, 64, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.012>
- Meanwell, R. J. L., & Shama, G. (2008). Production of streptomycin from chitin using *Streptomyces griseus* in bioreactors of different configuration. *Bioresource Technology*, 99(13), 5634–5639. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.036>
- Medina-Ramirez, C. F., Castañeda-Guel, M. T., Fernanda Alvarez-Gonzalez, M., Montesinos-Castellanos, A., Morones-Ramirez, J. R., López-Guajardo, E. A., & Gómez-Loredo, A. (2020). Application of extractive fermentation on the recuperation of exopolysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. *Fermentation*, 6(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040108>
- Medrano Roldan, H. (1992). *Estudio sobre los parametros de fermentación de importancia industrial durante la propagación de Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4 para producción de bioinsecticidas*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J., & Martinez, A. (2013). Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-100>
- Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>
- Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., Ninova, M. S., & Kussovski, V. K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1533–1540. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12122>
- 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, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.028>

- Ng, H. S., Teoh, A. N., Lim, J. C. W., Tan, J. S., Wan, P. K., Yim, H. S., Show, P. L., & Lan, J. C. W. (2017). Thermo-sensitive aqueous biphasic extraction of polyphenols from *Camellia sinensis* var. *assamica* leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *79*, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.02.018>
- Nielsen, S. S. (2019). *Correction to: Food Analysis Laboratory Manual*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_32)
- Oleksy-sobczak, M., Klewicka, E., & Piekarska, L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *122*, 109055. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109055>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.014>
- Othman, M., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2017). Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. *Frontiers in Microbiology*, *8*(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02285>
- Palaniraj, A., & Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, *106*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035>
- Patel, A. K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A. V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., & Michaud, P. (2013). Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology*, *145*, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.038>
- Petkov, G. D., & Bratkova, S. G. (1997). Viscosity of algal cultures and estimation of turbulence in devices for the mass culture of microalgae. *Bulgarian Academy of Sciences*, 99–104.
- Phong, W. N., Show, P. L., Ling, T. C., Juan, J. C., Ng, E. P., & Chang, J. S. (2018). Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Research*, *31*(May 2017), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.005>
- Pierre, G., Delattre, C., Dubessay, P., Jubeau, S., Vialleix, C., Cadoret, J., Probert, I., & Michaud, P. (2019). What Is in Store for EPS Microalgae in the Next Decade? *Molecules*, *24*(23), 4296.
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(8), 578–592. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- 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*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.01.009>

- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), 310–317. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01805-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01805-9)
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 849–855. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x>
- Seviour, R. J., McNeil, B., Fazenda, M. L., & Harvey, L. M. (2011). Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 170–185. <https://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. (2012). 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.131>
- Sinha, J., Dey, P. K., & Panda, T. (2000). Aqueous two-phase: The system of choice for extractive fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 476–486. <https://doi.org/10.1007/s002530000342>
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., & Laroche, C. (2016). Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresource Technology*, 213, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.075>
- Suarez Ruiz, C. A., Baca, S. Z., van den Broek, L. A. M., van den Berg, C., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2020). Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. *Algal Research*, 46(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101801>
- Suarez Ruiz, C. A., Emmery, D. P., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., & van den Berg, C. (2018). Selective and mild fractionation of microalgal proteins and pigments using aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(9), 2774–2783. <https://doi.org/10.1002/jctb.5711>
- Talyshinsky, M. M., Souprun, Y. Y., & Huleihel, M. M. (2002). Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International*, 2, 14–17. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-2-8>
- Teke, G. M., & Pott, R. W. M. (2021). Design and evaluation of a continuous semipartition bioreactor for in situ liquid-liquid extractive fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 58–71. <https://doi.org/10.1002/bit.27550>
- 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, 732–735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.030>
- Wang, B., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2015). Investigation of relationship between lipid and *Monascus* pigment accumulation by extractive fermentation. *Journal of*

*Biotechnology*, 212, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.019>

- Wu, N., Li, Y., & Lan, C. Q. (2011). Production and Rheological Studies of Microalgal Extracellular Biopolymer from Lactose Using the Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(4), 935–942. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0351-z>
- Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Yalcin, I., Hicsasmaz, Z., Boz, B., & Bozoglu, F. (1994). Characterization of the extracellular polysaccharide from freshwater microalgae *Chlorella* sp. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 158–165). <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1032>
- Zhang, J., Liu, L., & Chen, F. (2019). Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 976–983. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.117>

**CAPÍTULO 11**  
**RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Carlos Iván Avila Velasco

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias

Con Orientación en Microbiología Aplicada

**Tesis:**

Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* mediante  
fermentación extractiva con agentes termosensibles

**Campo de estudio:**

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

**Datos personales:**

Nacido en Monterrey, Nuevo León el 21 de septiembre de 1995

Hijo de José Carlos Avila López y Bacilia Velasco Medellin

**Educación:**

Egresado de la Licenciatura en Biotecnología Genómica de la UANL, 2014-2018

