

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS		Código	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ	REVISÓ		APROBÓ		
Jefe División de Biblioteca	Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad		

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): JESSICA DAYANA APELLIDOS: BECERRA MARTÍNEZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): ANDRÉS FERNANDO APELLIDOS: BARAJAS SOLANO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): DISEÑO DE MEDIO DE CULTIVO PARA MAXIMIZAR PRODUCCIÓN DE ALOFICOCIANINAS EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

RESUMEN

La aloficocianina (“otra proteína azul de algas”) es una proteína que contiene pigmentos captadores de luz denominados ficocianobilinas. Forma parte de la familia de las ficobiliproteínas, intervienen en la fotosíntesis de ciertas bacterias y algas. Las cianobacterias o algas verde-azules son los organismos fotosintetizadores aeróbicos más antiguos del planeta; algunos pueden fijar nitrógeno molecular, mientras que otros pueden incorporar y almacenar fósforo, contribuyendo significativamente a la producción primaria acuática.

PALABRAS CLAVE: Cianobacterias, Aloficocianinas, Termotolerantes.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 34 PLANOS: ILUSTRACIONES: CD ROOM: 1

Copia No Controlada

DISEÑO DE MEDIO DE CULTIVO PARA MAXIMIZAR PRODUCCION DE
ALOFICOCIANINAS EN CIANOBACTERIAS TERTERMOTOLERANTES

Elaborado por:

JESSICA DAYANA BECERA MARTÍNEZ

1611389

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSE DE CÚCUTA

2023

DISEÑO DE MEDIO DE CULTIVO PARA MAXIMIZAR PRODUCCION DE
ALOFICOCIANINAS EN CIANOBACTERIAS TERTERMOTOLERANTES

JESSICA DAYANA BECERA MARTÍNEZ

1611389

Informe Final modalidad Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero (a)
Biotecnológico (s)

Director:

Andrés Fernando Barajas Solano, Biólogo, PhD.

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSE DE CÚCUTA

2023



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 03 marzo de 2023

HORA: 10:00 A.M.

LUGAR: UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER - SB302

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "DISEÑO DE MEDIO DE CULTIVO PARA MAXIMIZAR PRODUCCIÓN DE ALOFICOCIANINAS EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES".

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO ANA MARÍA ARISMENDY PABON
EDWIN JAVIER DUARTE GÓMEZ
GERMAN LUCIANO LOPEZ BARRERA

ENTIDAD: UFPS

DIRECTOR: ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SÓLANO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Jessica Dayana Becerra Martínez	1611389	4.5

OBSERVACIONES: MERITORIA.

FIRMA DE LOS JURADOS

Ana María Arismendy P.

Edwin Javier Duarte G.

German Luciano López Barrera

Ana Maria Arismendy Pabon

Edwin Javier Duarte Gómez

German Luciano López Barrera

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular

Yane A. Tenorio

Agradecimientos

Me gustaría extender mi más sincero agradecimiento primeramente a Dios por su misericordia cada día y que todo sucede ya que el así lo permite, a mis padres, Hernan Becerra Bautista y Ana Edi Martínez Villamizar también a mi Director: Andrés Fernando Barajas Solano, Co-Directora: Janet Bibiana García Martínez compañeros pero en especial a mi compañera Doris Yezenia Baena Contreras por el apoyo incondicional. Jessica Dayana Becerra Martínez.

Contenido

	pág.
Introducción	11
1. Problema	13
1.1 Título	13
1.2 Descripción del Problema	13
1.3 Objetivos	14
2. Marco Referencial	15
2.1 Antecedentes	15
3. Diseño Metodológico	16
3.1 Tipo de Investigación	16
3.2. Población y Muestra	16
3.3 Hipótesis	16
3.4. Fases de la Investigación	16
4. Resultados	21

5. Conclusiones	30
6. Recomendaciones	31
Identificar la especie de la Cepa UFPS 004.	31
Referencias Bibliográficas	32

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Cianobacterias en crecimiento.	21
Figura 2. Superficie de respuesta de deseabilidad del diseño propuesto.	27
Figura 3. Comparación entre BG11 y BG11_APC.	29

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. Medio BG11.	17
Tabla 2. Diseño de caracterización de mínimos experimentos tipo V.	19
Tabla 3. Análisis ANOVA para Concentración de biomasa (g/L).	22
Tabla 4. Análisis ANOVA para Concentración de APC (% p/p).	23
Tabla 5. Análisis ANOVA para pureza de APC.	25
Tabla 6. Medio BG11 Vs BG11_APC.	28

Resumen

La aloficocianina (“otra proteína azul de algas”) es una proteína que contiene pigmentos captadores de luz denominados ficocianobilinas. Forma parte de la familia de las ficobiliproteínas, intervienen en la fotosíntesis de ciertas bacterias y algas.

Las cianobacterias o algas verde-azules son los organismos fotosintetizadores aeróbicos más antiguos del planeta; algunos pueden fijar nitrógeno molecular, mientras que otros pueden incorporar y almacenar fósforo, contribuyendo significativamente a la producción primaria acuática.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos con potencial biotecnológico y juegan un papel muy importante en la industria ya que se utiliza comúnmente como suplemento alimenticio debido a su composición particular (por ejemplo, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitamina, fibras, exopolisacáridos y colorantes) y su alta actividad antioxidante. También dentro de estas encontramos las Aloficocianinas con la cual podemos realizar ciertos suplementos alimentarios, maquillaje, colorantes, pigmentos.

Este trabajo de investigación está basado en seleccionar del cepario de INNOValgae las Cianobacterias con mayor producción de Aloficocianina APC (UFPS001-UFPS011) aisladas previamente de termales localizados en el Departamento Norte de Santander. De las cepas la que más produjo Aloficocianina fue la 004 y por esto se procede a preparar medio para inocular la Cepa madre la cual se debe dejar en crecimiento con una condición de 12 horas luz 12 horas oscuridad en un periodo de 15 a 20 días.

Luego de esto para cada experimento se realizan distintos tipos de medios (BG11), excluyendo un componente principal el cual es el ácido cítrico y estos son sometidos a diferentes concentraciones.

Introducción

Las cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, son un grupo de bacterias autótrofas oxigénicas gramnegativas y fotosintéticas compuestas por alrededor de 150 géneros y 2000 especies. Tienen un nivel de organización simple y se dividen en especies unicelulares, filamentosas y formadoras de colonias. Debido a la gran flexibilidad de las adaptaciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas y reproductivas, se encuentran en ambientes terrestres y, principalmente, en ambientes acuáticos, siendo más comunes en agua dulce. (Godoy et al, 2021). En las cianobacterias se encuentran pigmentos fotosintéticos, llamados ficobiliproteínas que se agregan en la célula como ficobilisomas, que se unen a una membrana tilacoidal del cloroplasto. Las ficobiliproteínas cianobacterianas se pueden dividir en tres clases principales; ficoeritrina (PE) (color rojo), ficocianina (PC) (color azul) y la aloficocianina (APC) (color verde azul). (Saniye et al, 2018)

La ficocianina es un complejo pigmento-proteína de la familia de las ficobiliproteínas captadoras de luz, presente con la aloficocianina y la ficoeritrina. Es un pigmento de color azul claro y absorbe luz naranja y roja a 620nm y emite fluorescencia a aproximadamente 650nm. (Khandual et al, 2021); La principal aplicación de la ficobiliproteína (PBP) es la utilización como colorantes naturales en sustitución de los sintéticos actuales colorantes en la industria alimentaria y cosmética. (Mogany et al, 2018). En cuanto a los metabolitos secundarios, las cianobacterias son responsables de producir una alta gama de compuestos de alto valor, con un importante potencial farmacéutico y varias aplicaciones, como compuestos de toxicidad animal, antibacterianos, anticoagulantes, antifúngicos, antiinflamatorios, antiprotazoarios, agentes antivirales, antitumorales y citotóxicos. (Godoy et al, 2021)

Este estudio presenta una nueva cianobacteria del género *Oscillatoria* sp. aislado de las aguas termales de la ciudad de cúcuta, en Colombia, que ha demostrado ser un cepa prometedora en la producción de Aloficocianinas, para lograr lo anterior se propusieron los siguientes objetivos: Determinar los principales macro y micronutrientes que afectan la producción de biomasa y

acumulación de aloficocianina; Mejorar la relación entre macro y micronutrientes que optimicen la producción de biomasa y Aloficocianina.

Para lograr lo anterior se proponen las siguientes etapas: (1) Mejoramiento del medio de cultivo para cianobacterias termotolerantes, (2) optimización de los parámetros abióticos críticos (ciclo luz/oscuridad, intensidad lumínica y pH inicial) que favorezcan la producción de biomasa, colorantes (APC).

1. Problema

1.1 Título

DISEÑO DE MEDIO DE CULTIVO PARA MAXIMIZAR PRODUCCIÓN DE ALOFICOCIANINAS EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES.

1.2 Descripción del Problema

Varios géneros de cianobacterias, se han propuesto como una alternativa para muchas aplicaciones biotecnológicas. También se ha comprobado su uso potencial para transformar la energía luminosa en formas renovables de productos de gran utilidad en industrias como la alimentaria y la farmacéutica (Fuenmayor, *et a.*, 2009). Debido al gran potencial que tienen este género de cianobacterias en la producción de aloficocianinas, este estudio va enfocado en obtener más información acerca de estos microorganismos pues la información que se encuentra en literatura es muy limitada.

Actualmente se usan los colorante comúnmente utilizados son las antocianinas, los carotenoides, las betalaínas y las clorofilas en otros (Prado,2020), en la industria se usa por lo general colores como rojos, anaranjados, y amarillos, y por la poca comercialización los colores azules y verdes, no son muy usados en la industria por eso nace la necesidad de investigar nuevas cepas de Cianobacterias productoras de Aloficocianinas , ya que esta integrante de la familia de la Ficobiliproteínas se caracteriza por ser un colorante natural verde azulado.(Prado,2020) .

Debido al crecimiento del mercado de pigmentos para el uso de colorantes naturales en la industria de alimentos: goma de mascar, productos deshidratados, helados, gelatinas, entre otros, se requieren nuevas estrategias de producción que sean amigables con el medio ambiente y, a su vez, con la salud del consumidor.

Por ello, gracias a sus destacables ventajas frente a los otros procesos de obtención, la obtención biotecnológica de pigmentos ha adquirido un gran interés en la industria de alimentos, dado esto se ha propuesto el diseño de medios de cultivo con diferentes concentraciones de nutrientes para así determinar qué medio de cultivo resulta más eficiente y con mayor producción de aloficocianinas siendo de gran utilidad para esta industria, por ser de origen biológico, este tipo de pigmentos es de bajo costo, fácil acceso y el bioproceso permite alcanzar altos rendimientos del mismo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general. Diseñar un medio de cultivo que maximice la producción de Aloficocianinas en cianobacterias termotolerantes.

1.3.2 Objetivos específicos. Determinar los principales macro y micronutrientes que afectan la producción de biomasa y acumulación de Aloficocianina.

Mejorar la relación entre macro y micronutrientes que optimicen la producción de biomasa y Aloficocianina.

2. Marco Referencial

2.1 Antecedentes

La familia de Ficobiliproteínas tiene como integrantes las Ficocianina(C-PC), Aloficocianina (A-PC), y la Ficoeritrina (PE) estas generan un color característico de cada uno de los nombrados estos colorantes que son usados presente en los alimentos cosméticos y farmacéuticas, actualmente, la mayoría de los colorantes utilizados en la industria son sintéticos. Con las nuevas formas de reducir daños y problemas de salud en las personas consumidoras y en el medio ambiente, con relación a lo anterior se busca alternativas naturales que no generen daños y sean más amigables con el medio ambiente, Por sus propiedades colorantes, naturaleza no tóxica y fácil disponibilidad (García,2018) de estos colores naturales tales como antocianinas, ficocianinas y genipina usados como aditivos alimentarios naturales con beneficios para la salud. (Prado, 2020),

Los pigmento de Ficobiliproteínas está limitado por la gama de colores que proporciona, esto nos crea la necesidad de encontrar vías de bajo costo, con una mejor eficiencia en la extracción y purificación (Garcia,2018),los estudios previos de estas Ficobiliproteínas se centran principalmente en mejorar los métodos de cosechado de biomasa y extracción, para obtener una colorante con altos índices de pureza, por lo tanto la maximización del medio para las cianobacterias termotolerantes, se considera una opción de bajo costo, amigable con el medio ambientes, estudios han comprobado que la optimización mejora el rendimiento de producción de las Ficobiliproteínas.(Garcias,2018)

Se han identificado microorganismos capaces de sintetizar las Ficobiliproteínas o en algunas especies de cianobacterias predominan mayor producción de uno de los tres colorantes que integran la familia de las Ficobiliproteínas. Estos microorganismos incluyen especies *Spirulina Platensis*(Safari R,2016), *Arthrospira Maxima*,(A. Chandrlekha,2019),*Arthrospira Platensis* (Daniele Carullo,2020) y *Oscillatoria pseudogeminata* (Thangaraj,2021),entre otras especies endémicas.

3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de Investigación

La investigación que se desarrollará será de tipo experimental ya que permite comparar diferentes tratamientos de concentración de macro y micronutrientes. Así mismo, los conceptos teóricos sobre la naturaleza del problema serán corroborados por medio de la evaluación de los resultados obtenidos.

3.2. Población y Muestra

Se empleará una cepa de cianobacterias termotolerantes con alta capacidad de producir aloficocianina, la cual fue aislada previamente de termales localizados en el departamento de Norte de Santander.

3.3 Hipótesis

¿Es posible maximizar la concentración de aloficocianina producida por una cepa de cianobacteria termotolerante?

3.4. Fases de la Investigación

Reactivación de la cepa

La cepa UFPS004 se mantendrá en medio BG11 sólido a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 27°C . Para su conservación, una vez cada 35 días las cepas serán reinoculadas en tubos de 10 mL con 4 mL de medio BG11 sólido fresco.

Tabla 1. Medio BG11.

COMPONENTE	SOLUCIÓN STOCK (g*L ⁻¹ dH ₂ O)	CANTIDAD UTILIZADA	Concentración final en el medio (M)
Ácido cítrico	6	1 ml	3.12 X 10 ⁻⁵
Amonio citrato férrico	6	1 ml	3 X 10 ⁻⁵
NaNO ₃	--	1.5 g/L	1.76 X 10 ⁻²
K ₂ HPO ₄	40	1 ml	1.75 X 10 ⁻⁴
MgSO ₄	75	1 ml	3.04 X 10 ⁻⁴
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 ml	2.45 X 10 ⁻⁴
Na ₂ CO ₃	20	1 ml	1.89 X 10 ⁻⁴
MgNa ₂ EDTA	1	1 ml	2.79 X 10 ⁻⁶
Solución de metales		1 ml	
H ₃ BO ₃	--	2.86 g	4.63 X 10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	--	1.81 g	9.15 X 10 ⁻⁶
ZnSO ₄ .7H ₂ O	--	0.22 g	7.65 X 10 ⁻⁷
CuSO ₄ .5H ₂ O	79	1 ml	3.16 X 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	--	0.93 g	1.61 X 10 ⁻⁶
Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	49.9	1 ml	1.70 X 10 ⁻⁷

Fuente: Andersen et al 2005.

Producción inicial de biomasa

Cada una de las cepas cultivará en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL_{aire}/min, una radiación de 100 μmol m⁻² s⁻¹ y un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas durante 20 días. Al finalizar el tiempo de cultivo, los frascos se desconectarán del flujo del aire y se dejarán decantar por 1 hora. el medio se centrifugará a 3500 rpm durante 20 minutos (20°C).

Cuantificación de aloficocianina

La biomasa obtenida será sometida a extracción de ficocianinas empleando el método descrito por Chen et al (2017). Los filtros se suspenderán en 10 mL de solución buffer fosfato (0,15M, pH 7.0) y aproximadamente 1 gramo de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro), la solución se mezclará empleando un vortex a 1500 rpm durante 30 minutos. Una vez terminado el proceso la muestra se almacenará en nevera a 4°C durante 24 horas. Para separar las células del extracto la muestra se someterá a una separación por centrifugación a 3400 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante será colectado y medido en un espectrofotómetro a 620 y 652 nm. El cálculo de la concentración de ficocianinas se realizará empleando las ecuaciones escritas por Bennett y Bogorad (1973) (Eq1):

$$APC \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{OD_{652} - 0.208(OD_{620})}{5.09} \quad \text{Eq 1.}$$

Finalmente, la pureza de los extractos fue determinada empleando las ecuaciones descritas por Patil et al., (2006) y Sobiechowska-Sasim et al (2014) (Eq 2):

$$APC = \frac{OD_{652}}{OD_{280}} \quad \text{Eq 2.}$$

Diseño de experimentos

Para lograr lo anterior se empleará un diseño de caracterización de mínimos experimentos tipo V (8 factores, 2 niveles) empleando el software Design Expert 13. Los experimentos se encuentran en la tabla 2. Cada uno de los experimentos se cultivará en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL_{aire}/min. Al finalizar el tiempo de cultivo, los frascos se desconectarán del flujo del aire y se dejarán decantar por 1 hora. el medio se centrifugará a 3500 rpm durante 20 minutos (20°C). La biomasa recolectada se empleará para la determinación de ficocianinas.

Tabla 2. Diseño de caracterización de mínimos experimentos tipo V.

Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8
	A: Fe-Citrate solution	B: NaNO ₃	C: K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	D: MgSO ₄ · 7H ₂ O	E: CaCl ₂ · 2H ₂ O	F: Na ₂ CO ₃	G: MgNa ₂ EDTA ·H ₂ O	H: Trace metals solution
	mL	g/L	Ml	mL	mL	mL	mL	mL
1	1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
3	1	0,3	0,2	0,2	1	0,2	1	1
4	0,2	1,5	0,2	1	0,2	1	0,2	1
5	0,2	1,5	0,2	0,2	1	1	1	1
6	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
7	0,2	0,3	1	0,2	1	0,2	0,2	0,2
8	0,2	1,5	1	0,2	0,2	1	0,2	1
9	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
10	0,2	1,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1
11	1	0,3	1	1	0,2	0,2	1	1
12	1	1,5	0,2	1	1	0,2	1	1
13	1	1,5	0,2	0,2	0,2	1	1	1
14	0,2	1,5	1	1	0,2	0,2	1	1
15	0,2	1,5	0,2	0,2	0,2	1	0,2	0,2
16	1	0,3	0,2	1	0,2	1	1	0,2
17	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

18	0,2	0,3	1	1	1	0,2	1	0,2
19	0,2	0,3	1	1	1	1	0,2	1
20	0,2	1,5	1	0,2	1	1	1	0,2
21	0,2	1,5	0,2	0,2	0,2	0,2	1	0,2
22	1	1,5	0,2	1	0,2	0,2	0,2	0,2
23	1	1,5	0,2	0,2	1	1	1	0,2
24	1	0,3	1	1	1	0,2	0,2	1
25	1	1,5	1	0,2	1	0,2	1	1
26	1	0,3	1	0,2	0,2	1	1	0,2
27	0,2	0,3	1	0,2	0,2	0,2	1	1
28	0,2	1,5	1	1	1	0,2	0,2	0,2
29	1	1,5	1	1	0,2	1	1	0,2
30	0,2	0,3	1	1	0,2	0,2	0,2	0,2
31	1	0,3	1	1	1	1	1	1
32	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	1	0,2	1
33	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
34	1	0,3	0,2	0,2	1	1	0,2	1
35	0,2	0,3	0,2	1	1	0,2	0,2	0,2
36	1	1,5	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
37	1	1,5	0,2	0,2	1	0,2	0,2	0,2
38	1	1,5	1	1	1	1	0,2	1
39	0,2	0,3	0,2	1	0,2	0,2	1	1
40	0,2	0,3	0,2	0,2	1	1	1	0,2
41	1	0,3	1	1	1	1	0,2	0,2
42	0,2	1,5	0,2	1	1	1	1	0,2
43	1	0,3	1	1	0,2	1	0,2	1

La presente monografía se llevó a cabo con la ayuda de la siguiente metodología: selección de base de datos, revisión bibliográfica, selección de información, organización de la información y análisis de la información.

Se buscó la información relacionada a 5 años anteriores a este periodo en artículos de revisión, artículos científicos, tesis de investigación y de doctorado, la información fue analizada para generar contenido grafico respectivo de ser necesarios, y se realizó una síntesis de esta para rescatar los datos más relevantes en coherencia y concordancia con los objetivos planteados.

4. Resultados

La producción de la cepa 004 se realizó sin mayores inconvenientes, ya que la cepa posee la capacidad de crecer en temperaturas entre 25-29°C y altas radiaciones, lo cual le permite crecer rápidamente (figura 1).



Figura 1. Cianobacterias en crecimiento.

El análisis de ANOVA para la concentración de biomasa se presenta en la tabla 3. De acuerdo con los resultados, el valor del F-value (3.24) indica que el modelo obtenido es significativo, por lo cual, las variables estudiadas afectan el crecimiento de la cepa, y por ende la concentración final de biomasa. En este caso, solo el Cloruro de calcio (E), afecta la concentración de biomasa. Por otra parte, varias interacciones resultaron ser estadísticamente significativas, estas interacciones son: AB, AC, AE, AF, AH, CH, FG Por otro lado, el valor del “Lack of Fit F-value” no es significativo en relación con el error puro, por lo tanto, los datos no se encuentran afectados por errores experimentales. Por otra parte, El valor del R^2 de 0.67 demuestra que el modelo es significativo.

Tabla 3. Análisis ANOVA para Concentración de biomasa (g/L).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1,10	16	0,0690	3,24	0,0042 significant
A-Fe Citrate solution	0,0280	1	0,0280	1,31	0,2628
B-NaNO ₃	0,0125	1	0,0125	0,5872	0,4507
C-K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,0598	1	0,0598	2,80	0,1065
D-MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,0842	1	0,0842	3,94	0,0581
E-CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1197	1	0,1197	5,61	0,0259
F-Na ₂ CO ₃	0,0009	1	0,0009	0,0415	0,8402
G-MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	0,0059	1	0,0059	0,2754	0,6044
H-Trace metals solution	0,0487	1	0,0487	2,28	0,1433
AB	0,1038	1	0,1038	4,86	0,0368
AC	0,1780	1	0,1780	8,34	0,0079
AE	0,2743	1	0,2743	12,85	0,0014
AF	0,2262	1	0,2262	10,60	0,0032
AH	0,1673	1	0,1673	7,84	0,0097
CE	0,0850	1	0,0850	3,98	0,0570
CH	0,1074	1	0,1074	5,03	0,0340
FG	0,3681	1	0,3681	17,25	0,0003
Curvature	0,0000	1	0,0000	0,0011	0,9733
Residual	0,5335	25	0,0213		
Lack of Fit	0,3263	21	0,0155	0,3001	0,9709 not significant
Pure Error	0,2071	4	0,0518		
Cor Total	1,64	42			
R²	0,6743		Adeq Precision	10,4979	C.V. % 25,86
Adjusted R²	0,4659		Std. Dev.	0,1461	
Predicted R²	0,1017		Mean	0,5649	

El análisis ANOVA para la concentración de APC (% p/p) se presenta en la tabla 4. De acuerdo con los resultados, el valor del F-value (4,89) indica que el modelo obtenido es significativo, por lo cual, las variables estudiadas afectan la síntesis de APC. En este caso, se obtuvo que la concentración de buffer citrato (A), Na_2CO_3 (F), y la solución de traza de metales (H). Por otra parte, varias interacciones resultaron ser estadísticamente significativas, estas interacciones son: AH, BD, BE, CF, DH, EF, EG, EH, GH. Por otro lado, el valor del “Lack of Fit F-value” no es significativo en relación con el error puro, por lo tanto, los datos no se encuentran afectados por errores experimentales. Por otra parte, El valor del R^2 de 0.94 demuestra que el modelo es significativo, además, el ajuste entre el R^2 predicho y el R^2 ajustado es inferior a 0.2, lo anterior demuestra que el error obtenido es mínimo y la previsión de los datos es significativa.

Tabla 4. Análisis ANOVA para Concentración de APC (% p/p).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4,95	30	0,1650	4,89	0,0029	significant
A-Fe Citrate solution	0,2053	1	0,2053	6,09	0,0297	
B- NaNO_3	0,0007	1	0,0007	0,0214	0,8862	
C- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,0043	1	0,0043	0,1261	0,7287	
D- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0751	1	0,0751	2,23	0,1616	
E- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0137	1	0,0137	0,4048	0,5366	
F- Na_2CO_3	0,2107	1	0,2107	6,25	0,0280	
G- $\text{MgNa}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0958	1	0,0958	2,84	0,1178	
H-Trace metals solution	0,2859	1	0,2859	8,48	0,0130	
AB	0,0385	1	0,0385	1,14	0,3066	
AC	0,1196	1	0,1196	3,55	0,0841	
AD	0,0513	1	0,0513	1,52	0,2409	
AF	0,0498	1	0,0498	1,48	0,2477	
AG	0,0846	1	0,0846	2,51	0,1393	
AH	0,1667	1	0,1667	4,94	0,046	

					2	
BD	0,1698	1	0,1698	5,03	0,0445	
BE	0,2206	1	0,2206	6,54	0,0251	
BF	0,0215	1	0,0215	0,6366	0,4405	
BG	0,0148	1	0,0148	0,4376	0,5208	
CD	0,1448	1	0,1448	4,29	0,0605	
CE	0,1178	1	0,1178	3,49	0,0862	
CF	0,5535	1	0,5535	16,41	0,0016	
DE	0,1435	1	0,1435	4,25	0,0615	
DF	0,1138	1	0,1138	3,37	0,0911	
DG	0,0782	1	0,0782	2,32	0,1537	
DH	0,2901	1	0,2901	8,60	0,0125	
EF	0,1794	1	0,1794	5,32	0,0397	
EG	0,2161	1	0,2161	6,41	0,0264	
EH	0,2834	1	0,2834	8,40	0,0134	
FH	0,1046	1	0,1046	3,10	0,1037	
GH	0,3684	1	0,3684	10,92	0,0063	
Residual	0,4048	1	0,0337			
Lack of Fit	0,1197	8	0,0150	0,2099	0,9708	not significant
Pure Error	0,2851	4	0,0713			
Cor Total	5,35	4				
		2				
R²	0,944		Adeq Precision	10,1573	C.V. %	15,81
Adjusted R²	0,7354		Std. Dev	0,1837		
Predicted R²	0,6381		Mean	1,16		

El análisis de ANOVA para la pureza de APC se presenta en la tabla 5. De acuerdo con los resultados, el valor del F-value (4.78) indica que el modelo obtenido es significativo, por lo cual, las variables estudiadas afectan el crecimiento de la cepa, y por ende la concentración final de biomasa. En este caso, se obtuvo que el sulfato de magnesio (D), el Cloruro de calcio (E), y el Carbonato de sodio (F) son los nutrientes que más afectan la pureza. Por otra parte, varias interacciones resultaron ser estadísticamente significativas, estas interacciones son: AB, AC, AF, AH, CD, DE, DF, FH. Por otro lado, el valor del “Lack of Fit F-value” no es significativo en relación con el error puro, por lo tanto, los datos no se encuentran afectados por errores experimentales. Por otra parte, El valor del R^2 de 0.81 demuestra que el modelo es significativo.

Tabla 5. Análisis ANOVA para pureza de APC.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,1847	20	0,0092	4,78	0,0004	Significant
A-Fe Citrate solution	0,0015	1	0,0015	0,7550	0,3947	
B-NaNO ₃	0,0002	1	0,0002	0,0922	0,7644	
C-K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,0044	1	0,0044	2,27	0,1465	
D-MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,0086	1	0,0086	4,42	0,0477	
E-CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,0277	1	0,0277	14,35	0,0011	
F-Na ₂ CO ₃	0,0309	1	0,0309	15,96	0,0007	
G-MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	0,0082	1	0,0082	4,22	0,0525	
H-Trace metals solution	0,0008	1	0,0008	0,4182	0,5249	
AB	0,0166	1	0,0166	8,59	0,0080	
AC	0,0317	1	0,0317	16,42	0,0006	
AF	0,0262	1	0,0262	13,54	0,0014	
AH	0,0475	1	0,0475	24,57	< 0,0001	
BH	0,0080	1	0,0080	4,16	0,0542	
CD	0,0338	1	0,0338	17,46	0,0004	
CF	0,0070	1	0,0070	3,60	0,0716	
DE	0,0192	1	0,0192	9,95	0,0048	
DF	0,0150	1	0,0150	7,77	0,0110	
DG	0,0070	1	0,0070	3,63	0,0707	
FG	0,0023	1	0,0023	1,17	0,2908	
FH	0,0530	1	0,0530	27,41	< 0,0001	
Curvature	0,0003	1	0,0003	0,1447	0,7075	
Residual	0,0406	21	0,0019			
Lack of Fit	0,0139	17	0,0008	0,1231	0,9993	not significant
Pure Error	0,0267	4	0,0067			

Cor Total	0,2256 42		
R²	0,8198	Adeq Precision 8,7750	C.V. % 14,03
Adjusted R²	0,6482	Std. Dev. 0,0440	
Predicted R²	0,5152	Mean 0,3135	

A partir de los diferentes resultados fue posible obtener las respectivas superficies de respuesta que permiten identificar el comportamiento de la interacción entre los nutrientes más importantes en la concentración de biomasa, síntesis de APC y su pureza. De acuerdo con la superficie de respuesta en la figura 3., los nutrientes que más afectan las tres respuestas son NaNO_3 y el buffer de citrato, permitiendo obtener una deseabilidad superior a 0.8/1.0.

El NaNO_3 es la fuente principal del Nitrógeno que se encuentra en el medio, el Nitrógeno juega un papel importante para la viabilidad celular ya que este ayuda a regular la síntesis de APC que a su vez funciona como un almacén de Nitrógeno, esta fuente ayuda a mejorar el rendimiento máximo de concentración de biomasa y de síntesis de APC.

Sin embargo, hasta ahora, el buffer citrato no ha sido considerado como un nutriente crítico para la producción de biomasa de ninguna cianobacteria, ya que su principal función es la de mantener el pH del medio y mediar reacciones intermediarias fotosintéticas. Es por esto, que este es el primer trabajo en el cual el buffer citrato es importante en el crecimiento celular, al igual que en la síntesis de APC. Determinando el ajuste de las concentraciones óptimas de estos componentes del medio de cultivo (especialmente N, P, K y C) por consiguiente el ajuste de los nutrientes es fundamental para mejorar la producción y pureza de APC.

Por otro lado, la concentración de metales traza influye en el crecimiento y producción de metabolitos en diferentes especies de cianobacterias. Aunque estos se requieren en cantidades mínimas. Los componentes más notables son el hierro, el cobalto, el zinc, el níquel, el manganeso, el cobre, el boro, el vanadio y el molibdeno, cabe resaltar que el hierro es un componente muy

importante ya que se ha encontrado que hace que las cianobacterias tengan un mayor crecimiento, estos macronutrientes y micronutrientes afectan la acumulación de pigmentos y la producción de biomasa

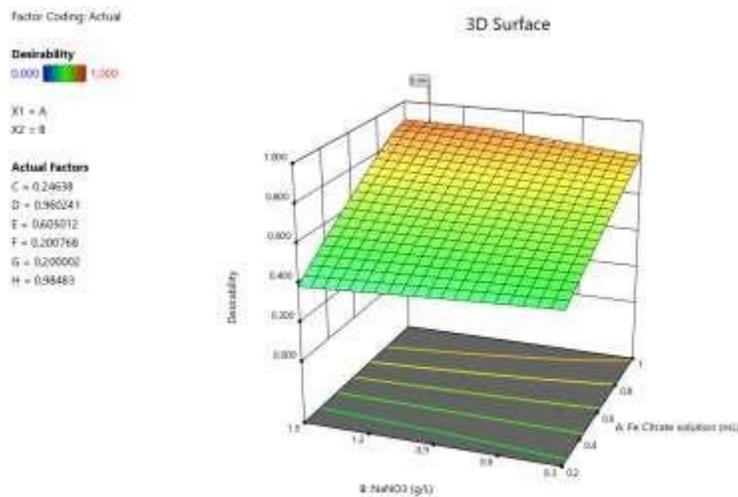


Figura 2. Superficie de respuesta de deseabilidad del diseño propuesto.

A partir de lo anterior, el Software identifica los valores de los diferentes nutrientes, con cuales es posible proponer la optimización del medio BG11 para maximizar la concentración de biomasa, APC y su pureza, respectivamente. En la tabla 6 se presenta la concentración de los diferentes nutrientes para el medio BG11_APC. Tomando como base las concentraciones, se destaca una reducción en la concentración de cada nutriente utilizado en el medio, esto contribuye a la reducción de gastos en comparación al medio BG11 este disminuye la cantidad utilizada de cada componente. Esto permite reducir la pérdida de nutrientes en la producción a escala industrial.

Tabla 6. Medio BG11 Vs BG11_APC.

NUTRIENTE	BG11	BG11_APC
	mL/L	mL/L
Fe Citrate solution	1	0.99
NaNO ₃	1.5 (g/L)	1.36 (g/L)
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1	0.24
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1	0.96
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1	0.6
Na ₂ CO ₃	1	0.2
MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	1	0.2
Trace metals solution	1	0.98

El nuevo medio propuesto fue probado para determinar si maximiza la concentración de biomasa, APC y su pureza respectivamente, para lograr lo anterior, se realizaron nuevos cultivos usando las concentraciones descritas anteriormente, y los resultados fueron analizados empleando un análisis de T-test. La figura 4 muestra la comparación entre el BG11.

Si bien el medio BG11_APC tuvo una reducción significativa de sus componentes, aunque unos son más influyentes que otros en la producción de APC, concentración, Biomasa y pureza. En la figura 4 las concentraciones obtenidas en el medio BG11 fueron menores que las obtenidas de BG11_APC con la influencia en los cambios de las concentraciones de los nutrientes, se obtuvieron que algunos nutrientes influyen más, tales como en la concentración de APC figura 4a, se destaca que las variables que más afecta la síntesis son: Buffer citrato, solución de metales y Na₂CO₃ con una reducción en los componentes del medio de 0.99, 0.98 y 0.2 ayudando a aumentar la producción hasta casi 2.0 % p/p también se destaca las interacciones que se dan en la tabla 4.

La pureza influye de manera significativa ya que como se puede observar en la figura 4b su MgSO₄ · 7H₂O 0.96, CaCl₂ · 2H₂O 0.6, Na₂CO₃ 0.2 estos tuvieron una alta concentración a diferencia de los demás componentes, pero fue menor en comparación al medio original.

En la producción de biomasa el componente que afecta es el CaCl_2 .

Mas sin embargo hay interacciones entre componentes que afectan significativamente e influyen en la producción de biomasa como en la pureza y estos son AB, AC, AF por el contrario en la interacción AH, intervienen en las tres variables.

Particularmente el componente $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ no tiene ninguna influencia en la producción de biomasa así mismo el componente $\text{MgNa}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ no influye en la pureza de APC y la biomasa no repercute.

El componente Na_2CO_3 interviene tanto en la concentración y pureza de APC, aunque se reduce a 0.2 como componente este aumenta la producción y mejora la pureza.

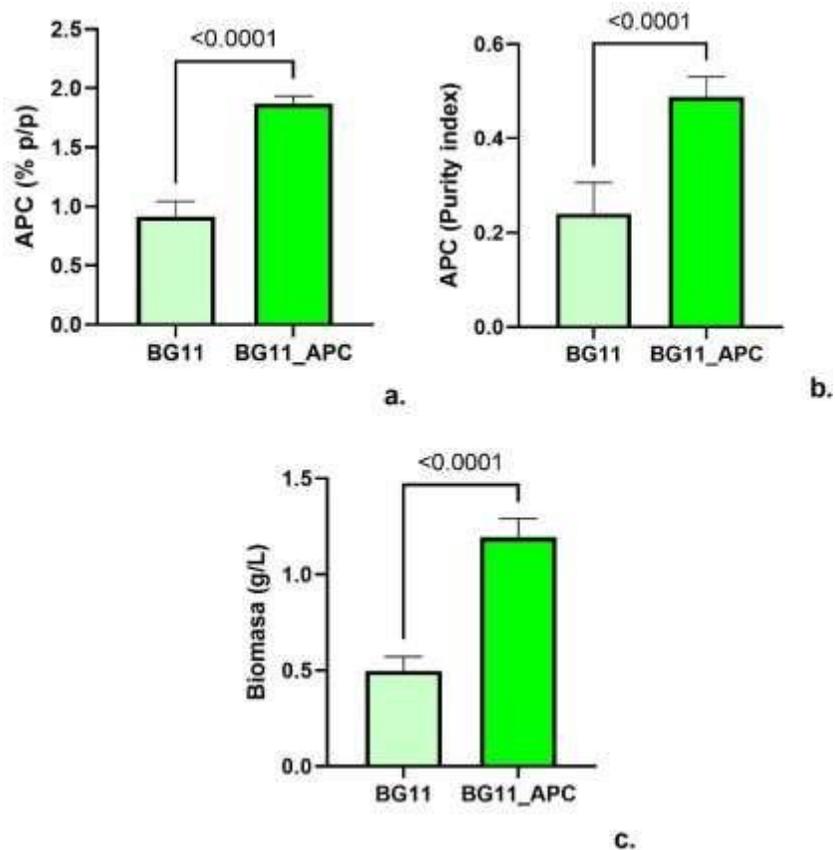


Figura 3. Comparación entre BG11 y BG11_APC.

5. Conclusiones

Los principales macro y micronutrientes que influye en la síntesis APC y su pureza, con respecto a la cianobacteria *Leptolyngbia sp* UFPS004 en la pureza influye $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el Na_2CO_3 , en la biomasa el componente que influye es $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y para la concentración de APC son los siguientes buffer citrato, Na_2CO_3 , los componentes más destacados son el Na_2CO_3 como fuente de carbono que interviene directamente en la síntesis de APC y pureza, y el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que interviene en la concentración de biomasa y pureza de APC, el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es fuente nutricional indispensable para crecimiento y desarrollo de las cianobacterias obteniendo mejora en su producción.

Este estudio demostró que la viabilidad en la producción de APC para la cianobacteria *Leptolyngbia sp* UFPS004 mediante la optimización de los macro y micronutrientes en el medio BG11, el metabolismo de las cianobacterias probablemente podría alterarse para adquirir la composición bioquímica intracelular deseada manteniendo las condiciones de cultivo nombradas anteriormente, esta técnica es conveniente para mejorar la síntesis de Aloficocianina a nivel internacional para ser empleados como suministros comerciales como colorante natural que puede ser empleado en la industria alimentaria farmacéutica y cosmética.

La relación entre los macro y micronutrientes que fueron más significativas y que mejoran el proceso son estas interacciones AB (Amonio Citrato Férrico/ NaNO_3), AC (Amonio Citrato Férrico/ K_2HPO_4), AF (Amonio Citrato Férrico/ Na_2CO_3) las anteriores mencionadas fueron notables en la pureza y la biomasa aun así la interacción AH (Amonio Citrato Férrico/Solución de metales) fue la que más destaco representativamente dentro de las tres biomosas, concentración de APC y pureza. El resultado fue satisfactorio ya que se pudo obtener un medio que maximizo la producción de Aloficocianina en cianobacterias con un mínimo contenido de cada nutriente al medio general normalmente utilizado obteniendo niveles de pureza a traza de obteniendo niveles de pureza óptimos para el uso de biocolorantes.

6. Recomendaciones

Es importante tener en cuenta que el medio optimizado puede ser usado en estudio de producción a gran escala

Se puede emplear un método fed-batch para aumentar los índices de pureza obtenidos con el medio BG11_APC.

Realizar estudios avanzados como procesos de purificación para APC obtenida

Referencias Bibliográficas

Batista, C. y Gómez, Gretel (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27 (3),17-24.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825002>

Carullo D, Pataro G, Donsì F y Ferrari G (2020) Eléctrico Pulsado Extracción de objetos valiosos asistida por campos Compuestos de *Arthrospira Platensis*: efecto de la polaridad del pulso y calentamiento suave.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm#sent/FFNDWMtTtjgBpHTSvXXbvTtbqKCBkRQf?projector=1&messagePartId=0.4>.

Chandralekha Ayekpam, Hamsavi G.K., Raghavarao K.S.M.S., Extracción eficiente de colorante azul natural de calidad alimentaria a partir de biomasa seca de *Spirulina platensis* utilizando métodos ecológicos, *Procesamiento de Alimentos y Bioproductos*, volumen 129, 2021, Páginas

84-93, ISSN 0960-3085, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.07.006>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308521001164>).

Díaz Domínguez, G., Marsán suárez, V., & del Valle Pérez, L. (2016). Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(4). Recuperado de <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/451/262>.

D Irawati *et al* 2020 *IOP Conf. Ser.: Medio Ambiente Terrestre. ciencia* 441 012050.

<https://iopscience>.

Hernández-Míreles, T., & Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2006). Proceso para la purificación del colorante proteico b-ficoeritrina producido por *Porphyridium cruentum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5(2),131-143. [fecha de Consulta 4 de Marzo de 2022]. ISSN: 1665-2738. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62050204>.

Hernández Jazmín; Cañizares Olivia (2016). Optimización de las condiciones de cultivo de un consorcio microbiano fotosintético de uso potencial como biofertilizante. departamento de biotecnología y bioingeniería.
[https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1368/SSIT0013959.pdf?sequence=](https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1368/SSIT0013959.pdf?sequence=1)

Jonte, Lorena, & Fuenmayor, Gisela, & Rosales-Loaiza, Néstor, & Morales, Ever (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29 (1), 21-25. [fecha de Consulta 25 de Agosto de 2022]. ISSN: 1317-973X.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416353005><https://www.redalyc.org/pdf/1994/199416353005.pdf>.

MacColl, R. (2004). Aloficocianina y transferencia de energía. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1657 (2-3), 73-81. doi:10.1016/j.bbabi.2004.04.005 | Lector mejorado de Elsevier

Morones Ramírez, J. R., Martínez, V. A., Rocha, O. L., López, D. N., Villarreal-Chiu, J. F., & Cárdenas., M. E. (1 de Abril de 2015). Colorantes y pigmentos microbianos en la belleza cosmética. Recuperado el 2022.

<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num4/art32/index.html>.

Patil, G.; Chethana, S.; Sridevi, A. S.; Raghavarao, K. S. M. S. Method to Obtain C-Phycocyanin of High Purity. *J. Chromatogr. A* 2006, 1127 (1), 76–81.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>.

Vizcaíno, L. G. (1 de Julio de 2018). Purificación y caracterización fisicoquímica de proteínas procedentes de microalgas marinas. aplicación como colorante. Recuperado el 15 de Agosto de 2022.

https://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/9246/1/TFG_Lilian_Garcia_Vizcaino_4918.pdf

Zuorro A., Leal-Jerez, A., Morales-Rivas, L.K., Mogollón-Londoño, S.O., Sanchez-Galvis E.M.,

García-Martínez J.B., and Barajas-Solano, A,F, ACS Omega 2021 6 (16), 10527-10536, DOI:

10.1021/acsomega.0c04665