

|  |   |               |                 |
|--|---|---------------|-----------------|
|  | <b>GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS<br/>BIBLIOTECARIOS</b> | <b>Código</b> | FO-SB-<br>12/v0 |
|  | ESQUEMA HOJA DE RESUMEN                                   | <b>Página</b> | 1/80            |

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): OLGA MICHELLE APELLIDOS: GALVIS CAMPEROS

NOMBRE(S): GINA GABRIELA APELLIDOS: LEAL PEREZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): ANDRES FERNANDO APELLIDOS: BARAJAS SOLANO

CODIRECTOR:

NOMBRE(S): CRISÓSTOMO APELLIDOS: BARAJAS FERREIRA

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS (EPS) A PARTIR DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII

RESUMEN

*Botryococcus braunii* es una microalga muy atractiva y reconocida industrialmente, debido a sus metabolitos extracelulares compuestos por hidrocarburos y exopolisacáridos (EPS); los EPS poseen aplicaciones de alto valor, tales como, antivirales, anticoagulantes, antitumorales, entre otros; por ende, en el presente estudio se evaluaron las condiciones necesarias para la producción de exopolisacáridos, a partir de ensayos experimentales. El mantenimiento de la cepa tuvo modificaciones debido a la presencia de contaminación, en el cual fue agregado un coctel de antibióticos conformado por ampicilina (antibacteriano), cefatoxima (antibacteriano) y carbendazim (fungicida), para el mejoramiento del rendimiento de la microalga en cuanto a la producción de biomasa. Las gráficas de FTIR revelaron la presencia de carbonos (sp<sup>2</sup>, sp<sup>3</sup>), grupos alquinos, amidas entre otros grupos funcionales en la composición de los EPS. Las condiciones óptimas de luz evaluadas por un diseño de ciclos, demostraron que el fotoperiodo luz-oscuridad 16:8 favorece la producción de biomasa (0,8 g/L) y mejora el porcentaje de EPS (12 %) al ser directamente proporcionales. Los diagramas de Pareto y la superficie de respuesta obtenidas revelan que la fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>) y la fuente de carbono (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) son las que más contribuyen en la producción de biomasa y EPS hasta valores de 1,2 g/L y 0,2 g/L respectivamente, en concentraciones de 0,35 g/L de NaNO<sub>3</sub> y 0,14 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

PALABRAS CLAVE: Microalga, *Botryococcus Braunii*, ensayos, exopolisacaridos, cepa.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 80 PLANOS:      ILUSTRACIONES:      CD ROOM: 1

| Elaboró                      |            | Revisó            |            | Aprobó            |            |
|------------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|------------|
| Equipo Operativo del Proceso |            | Comité de Calidad |            | Comité de Calidad |            |
| <b>Fecha</b>                 | 24/10/2014 | <b>Fecha</b>      | 05/12/2014 | <b>Fecha</b>      | 05/12/2014 |

COPIA NO CONTROLADA

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS  
(EPS) A PARTIR DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

OLGA MICHELLE GALVIS CAMPEROS

GINA GABRIELA LEAL PEREZ

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

2020

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS  
(EPS) A PARTIR DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

OLGA MICHELLE GALVIS CAMPEROS

GINA GABRIELA LEAL PEREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniero Biotecnológico

Director:

Biol, Ph.D. ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

Codirector:

Ing. Químico, MSc. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

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

2020

## **Dedicatoria**

Agradecemos primeramente a Dios, por habernos permitido llegar a esta etapa tan importante de nuestra formación profesional, por siempre acompañarnos, darnos sabiduría y entendimiento. Por nunca dejarnos desfallecer y por siempre bendecirnos con todo su amor.

Yo Gina Leal Pérez, dedico este logro a toda mi familia, en especial a mis padres Gabriel Leal y Ana Pérez por ser mi base, mis pilares, a mi hermana Valentina Leal por siempre estar para mí, también quiero dar infinitas gracias a la familia Otero, en especial Carlos Otero por el apoyo en todo el proceso de formación.

Yo Michelle Galvis, dedico este logro a toda mi familia, en especial a mi mamá Lenid Camperos por ser mi luz, a mis abuelos Antonio Camperos y Olga Lázaro y a David Flórez por ser mi apoyo incondicional.

Al Biol, Ph.D. Andrés Fernando Barajas Solano, por guiarnos y apoyarnos durante nuestro proceso de formación, por todo el tiempo dedicado, por brindarnos su confianza y motivación.

A nuestros compañeros de estudio, pero en especial a Leidy Sánchez y Nicolaz Carvajal, por su apoyo y colaboración en todo momento; y a todas aquellas personas que de una u otra manera aportaron a la realización de este proyecto.

Todo esto ha sido posible gracias a ustedes.

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 26 DE JUNIO DE 2020

**HORA:** 10:00 A.M.

**LUGAR:** CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS (EPS) A PARTIR DE *Botryococcus braunii*.”

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA  
GERMAN RICARDO GELVES ZAMBRANO  
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

**ENTIDAD:** UFPS

**DIRECTOR:** ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO  
**CODIRECTOR:** CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

| NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE      | CODIGO  | CALIFICACION |
|-------------------------------|---------|--------------|
| Olga Michelle Galvis Camperos | 1611148 | 4.7          |
| Gina Gabriela Leal Pérez      | 1611214 | 4.7          |

**OBSERVACIONES:** MERITORIA.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza    German Ricardo Gelves Zambrano    Juan Carlos Ramírez Bermúdez

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_



CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA  
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN  
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Cúcuta

Señores

BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS

Ciudad

Cordial saludo:

Gina Gabriela Leal Pérez y Olga Michelle Galvis Camperos, identificado(s) con la C.C. N.º 1.093.141.850 y 1.093.797.199, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado como

Evaluación de un sistema para la producción de exopolisacáridos (EPS) a partir de *Botryococcus braunii* presentado y aprobado en el año 2020

requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico; autorizo(amos) a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que “los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Gina Gabriela Leal Pérez  
CC. 1093141850

Olga Michelle Galvis Camperos  
C.C. 1093797199

FIRMA Y CEDULA

## Contenido

|                                | <b>pág.</b> |
|--------------------------------|-------------|
| Introducción                   | 14          |
| 1. Problema                    | 16          |
| 1.1 Titulo                     | 16          |
| 1.2 Planteamiento del Problema | 16          |
| 1.3 Formulación del Problema   | 19          |
| 1.4 Justificación              | 19          |
| 1.5 Objetivos                  | 26          |
| 1.5.1 Objetivo general         | 26          |
| 1.5.2 Objetivos específicos    | 26          |
| 1.6 Alcances y Limitaciones    | 26          |
| 1.6.1 Alcances                 | 26          |
| 1.6.2 Limitaciones             | 26          |
| 1.7 Delimitaciones             | 26          |
| 1.7.1 Delimitación espacial    | 26          |
| 1.7.2 Delimitación temporal    | 27          |
| 2. Marco Referencial           | 28          |
| 2.1 Marco Teórico              | 28          |
| 2.2 Marco Legal                | 30          |
| 3. Diseño Metodológico         | 31          |
| 3.1 Tipo de Investigación      | 31          |
| 3.2 Población y Muestra        | 31          |

|   |    |
|---|----|
| 3.3 Hipótesis   | 31 |
| 3.4 Fases de la Investigación                         | 31 |
| 3.4.1 Metodología                                     | 31 |
| 3.4.1.1 Mantenimiento de Cepa                         | 31 |
| 3.4.1.2 Método de separación de Biomasa               | 32 |
| 3.4.1.3 Caracterización Fisicoquímica de EPS          | 33 |
| 3.4.1.4 Condiciones de Cultivo para Producción de EPS | 33 |
| 4. Resultados y Análisis                              | 36 |
| 4.1 Mantenimiento de Cepa                             | 36 |
| 4.2 Método de Separación de Biomasa                   | 46 |
| 4.3 Condiciones de Cultivo para Producción de EPS     | 48 |
| 5. Conclusiones                                       | 58 |
| 6. Recomendaciones                                    | 59 |
| Referencias Bibliográficas                            | 60 |
| Anexos  | 79 |



## Lista de Tablas

|   | <b>pág.</b> |
|---|-------------|
| Tabla 1. Productos o metabolitos a partir de microalgas           | 22          |
| Tabla 2. Variables del diseño de experimentos                     | 32          |
| Tabla 3. Condiciones de luz y oscuridad para la producción de EPS | 34          |
| Tabla 4. Diseño de experimento no-factorial                       | 35          |
| Tabla 5. Diseño de experimento no-factorial                       | 50          |
| Tabla 6. Producción de biomasa y EPS a partir de diferentes cepas | 56          |
| Tabla 7. Ecuaciones para producción de biomasa y EPS              | 57          |

## Lista de Figuras

|  | <b>pág.</b> |
|--|-------------|
| Figura 1. Caracterización de <i>Botryococcus braunii</i> en objetivo 100X  | 36          |
| Figura 2. Inóculo madre de <i>Botryococcus braunii</i> . (izquierda) Reactores a los 14 días de crecimiento (derecha)          | 37          |
| Figura 3. Pellet de <i>B. braunii</i> contaminado  | 38          |
| Figura 4. Biomasa suspendida de <i>B. braunii</i> después de eliminación de contaminantes                                      | 39          |
| Figura 5. Concentración de biomasa, EPS (izquierda) y concentración de cenizas (derecha)                                       | 40          |
| Figura 6. Concentración de carbohidratos, proteínas y otros compuestos (% p/p) del EPS   | 41          |
| Figura 7. Espectrometría infrarroja (FTIR) a muestra de <i>B. braunii</i>  | 44          |
| Figura 8. Espectrometría infrarroja (FTIR) a muestra de <i>B. braunii</i> 2  | 45          |
| Figura 9. Presencia de células en medio concentrado y escasa separación de células por centrifugación                          | 46          |
| Figura 10. Separación de células por electroflotación  | 47          |
| Figura 11. Biomasa en los diferentes ciclos de luz: oscuridad. B. Porcentaje de EPS en los diferentes ciclos de luz: oscuridad | 49          |
| Figura 12. A. Análisis de Pareto para la producción de biomasa. B. Superficie de respuesta del modelo C/N/P para biomasa       | 52          |
| Figura 13. A. Análisis de Pareto para la producción de EPS. B. Superficie de respuesta del modelo C/N/P para EPS               | 53          |

## Lista de Anexos

|  | <b>pág.</b> |
|--|-------------|
| Anexo 1. Método para eliminación de bacterias y hongos (Modificado de Mustapa et al, 2016) | 80          |

## Resumen

*Botryococcus braunii* es una microalga muy atractiva y reconocida industrialmente, debido a sus metabolitos extracelulares compuestos por hidrocarburos y exopolisacáridos (EPS); los EPS poseen aplicaciones de alto valor, tales como, antivirales, anticoagulantes, antitumorales, entre otros; por ende, en el presente estudio se evaluaron las condiciones necesarias para la producción de exopolisacáridos, a partir de ensayos experimentales. El mantenimiento de la cepa tuvo modificaciones debido a la presencia de contaminación, en el cual fue agregado un coctel de antibióticos conformado por ampicilina (antibacteriano), cefatoxima (antibacteriano) y carbendazim (fungicida), para el mejoramiento del rendimiento de la microalga en cuanto a la producción de biomasa. Las gráficas de FTIR revelaron la presencia de carbonos ( $sp^2$ ,  $sp^3$ ), grupos alquinos, amidas entre otros grupos funcionales en la composición de los EPS. Las condiciones óptimas de luz evaluadas por un diseño de ciclos, demostraron que el fotoperiodo luz-oscuridad 16:8 favorece la producción de biomasa (0,8 g/L) y mejora el porcentaje de EPS (12 %) al ser directamente proporcionales. Los diagramas de Pareto y la superficie de respuesta obtenidas revelan que la fuente de nitrógeno ( $NaNO_3$ ) y la fuente de carbono ( $Na_2CO_3$ ) son las que más contribuyen en la producción de biomasa y EPS hasta valores de 1,2 g/L y 0,2 g/L respectivamente, en concentraciones de 0,35 g/L de  $NaNO_3$  y 0,14 g/L de  $Na_2CO_3$ .

## Abstract

*Botryococcus braunii* is a very attractive and industrially recognized microalgae, due to its extracellular metabolites composed of hydrocarbons and exopolysaccharides (EPS); EPS have high value applications, such as antiviral, anticoagulant, antitumor, among others; therefore, in the present study the necessary conditions for the production of exopolysaccharides were evaluated, based on experimental tests. The maintenance of the strain had modifications due to the presence of contamination, in which a cocktail of antibiotics made up of ampicillin (antibacterial), 13iolácea13a (antibacterial) and carbendazim (fungicide) was added, to improve the performance of the microalgae as regards to biomass production. The FTIR graphs revealed the presence of carbons ( $sp^2$ ,  $sp^3$ ), alkynes, amides, among other functional groups in the composition of EPS. The optimal light conditions evaluated by a cycle design, demonstrated that the 16: 8 light-dark photoperiod favors the production of biomass (0.8 g/L) and improves the percentage of EPS (12%) by being directly proportional. The Pareto diagrams and the response surface obtained reveal that the nitrogen source ( $NaNO_3$ ) and the carbon source ( $Na_2CO_3$ ) are the ones that contribute the most in the production of biomass and EPS up to values of 1.2 g/L and 0,2 g/L respectively, in concentrations of 0.35 g/L of  $NaNO_3$  and 0.14 g/L of  $Na_2CO_3$

## Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procarióticos (cianobacterias) o eucariotas (algas) que se pueden encontrar en todos los ecosistemas de la Tierra. Debido a su estructura multicelular, unicelular o simple, son resistentes a condiciones ambientales extremas (Mata, Martins & Caetano, 2010). La gran diversidad de algas también se presta a ser materia prima o punto de partida para un conjunto de productos y aplicaciones (Oilgae, 2014); su importancia aumenta en la economía mundial como una fuente de biomasa que contiene metabolismos valiosos tales como: carbohidratos, proteínas, pigmentos, lípidos, vitaminas, minerales y otros., (Cybulska et al., 2016). Estos metabolitos actualmente se desarrollan para su uso en productos cosméticos y farmacéuticos (Raja, Hemaiswarya & Rengasamy, 2007). Los ejemplos incluyen los polisacáridos de cianobacterias utilizados en productos para el cuidado personal de la piel y extractos de *Botryococcus braunii*, que contienen oligopéptidos que pueden promover la firmeza de la piel (Jaspars, et al., 2016). En las industrias farmacéuticas, candidatos a fármacos con propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y anti- infecciosas se han identificado actividades (Romano, et al., 2016), por ejemplo, la adenosina de *Phaeodactylum tricornutum*, puede actuar como un agente anti-arrítmico para el tratamiento de la taquicardia y el metabolito del alga verde *Caulerpin* se presenta en estudios de actividades antituberculosas (Lauritano et al., 2016).

Las microalgas han sido cultivadas a gran escala y de manera distribuida por la industria en países como Japón, Corea, Taiwán y China estamos hablando en áreas alrededor de 80,000 hectáreas en total; en los demás países se puede decir que sus cultivos son a una escala más baja y tradicionalmente han sido cultivadas en estanques o en fotobiorreactores (Oilgae, 2014). En los años 1970 se realizaron varios intentos para poder cultivar algas marinas que serían usadas para

biocombustibles pero esto no logro ser muy viable (Oilgae, 2014). Ciertos países también buscan día a día encaminarse en la producción de microalgas como lo es Francia, Alemania y países bajos consiguiendo así un gran aumento a escala industrial (Pérez, 1997; Buck y Buchholz ,2004; Reith et al., 2005).

Las microalgas segregan sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los EPS son una fuente abundante de biopolímeros naturales, diversos y versátiles de alto peso molecular (tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos), los cuales se acumulan en la superficie de las células microbianas formando una matriz heterogénea (Flemming y Wingender, 2010). Las investigaciones sobre la composición y sus características son importantes para comprender el mecanismo de producción y sus propiedades para posibles aplicaciones. Los principales componentes de EPS incluyen polisacáridos, proteínas (enzimas y proteínas estructurales), ácido nucleico (ADN), lípidos, sustancias húmicas, ácido urónico y componentes inorgánicos (Decho, 1990).

Si bien los componentes no azucarados son menores que los polisacáridos en cantidad generalmente están unidos a los residuos de azúcar y son importantes para transmitir características únicas al EPS (Decho, 1990). El rango de polímeros en EPS y las fracciones de componentes específicos están influenciados por varios factores incluyendo: la especie, cepa, tipo de sustrato, disponibilidad de nutrientes, condiciones de operación (p. Ej., Temperatura, pH, fuerza cortante y salinidad), fisiología y edad (Zhou, Mopper & Passow, 1998). Los EPS realizan una variedad de funciones, ya que se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos tales como: transporte y transformación de materia orgánica y ciclo biogeoquímico de elementos. Además, los EPS son una importante fuente de carbono para diferentes organismos en la cadena alimenticia porque son ricos en carbono orgánico (Xiao & Zheng, 2016).

## 1. Problema

### 1.1 Título

Evaluación de un sistema para la producción de exopolisacáridos (EPS) a partir de *botryococcus braunii* .

### 1.2 Planteamiento del Problema

Los EPS son biopolímeros naturales y variables, se encuentran mezclados con polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, estos se encargan de sostener en una unión las células microbianas para establecer una matriz heterogénea (Flemming & Wingender, 2010; Xiao & Zheng, 2016). Así mismo cumplen un papel significativo biotecnológicamente sus componentes y todos sus elementos pueden llegar a adquirir diferentes aplicaciones donde la biología se toma un lugar importante, además se sabe que estas sustancias suelen ser agentes antitumorales, anticoagulantes, antivirales, en general poseen una cantidad de usos que recibirán una atención y en particular diferentes investigaciones bastante aprovechables para el mundo (Xiao & Zheng, 2016). Si bien los EPS se encuentran más en dos grupos de algas (rojas y cianobacterias) no se conocen ejemplos de otros grupos de microalgas (como verdes o diatomeas) que posean la capacidad de sintetizar este tipo de metabolito. Otro de los problemas es identificar las condiciones de cultivo (nutrientes, ciclo luz/oscuridad, y tiempo de cultivo) que permitan maximizar la deposición de los EPS.

Los EPS son principalmente utilizados en diferentes industrias, de igual manera para obtener estas sustancias, se debe gracias a una variedad de microalgas como principal nos encontramos con algas rojas y cianobacterias (Blackburn, S. I., Tokai University Press, Hadano, Japan, 2005). Las algas rojas son una de las especies más abundantes en los tres tipos de algas marinas además



muchas de ellas poseen una cantidad favorable de polisacáridos de la pared celular (Hayashi et al., 2011). Según estudios se habla que para llegar a producir EPS en microalgas se debe tener muy en cuenta las capacidades ambientales que pueden llegar afectar o ayudar a su crecimiento donde se requiere una gran cantidad de nutrientes que le servirán como soporte, también por medio de microalgas verdes como la *Chlorophyta* han sido extraídos los EPS en este caso su uso fue para producción de bioetanol de tercera generación, en este análisis emplearon diferentes métodos que ayudan a detectar la presencia de estas sustancias como cuantificación e identificación de carbohidratos totales y azúcares reductores (DNS y HPLC) y diferentes ensayos espectrofotométricos (De biotecnología, 2012). Además los EPS suelen ser producidos como se nombró anteriormente por algas y organismos que suelen encontrarse en aguas residuales ya que estas poseen muy buenas ventajas y un alto porcentaje de crecimiento que los favorece, una de las especies más utilizadas fueron las algas verdes *Chlorella Vulgaris* siendo productores de estas sustancias (Nelson et al., 1996). Según la literatura nos habla de diferentes estudios que fueron elaborados hace más de setenta años, por medio de Lewin y Moore; juntos analizaron estos diferentes microorganismos donde observaron su producción pudiendo ser capsular o disuelta (Lewin, Ralph. 1956).

Así mismo encontramos diferentes diatomeas que mediante sus características químicas han demostrado ser productores de exopolisacáridos uno de ellos es la *Bacillariophyta* donde su estudio arrojó cantidades de heropolisacáridos con diferentes porciones de proteínas, sulfatos, azúcares metilados y ácidos urónicos (Shniukova & Zolotareva, 2015). Estas sustancias poseen una cantidad de actividades biológicas que son de gran importancia, siendo antiinflamatorias, antiparasitario, donde también adquieren actividades hipoglucemiantes e hipocolesterolemicas por otro lado si se incrementa las diferentes metodologías y aumenta la competitividad de

microalgas de tal manera que se identifique y se logre producir las cantidades deseadas (Delattre, Pierre, Laroche & Michaud, 2016). A pesar de la existencia de diferentes estudios muchos no han sido en su totalidad completos se sabe que la producción de exopolisacáridos se debe a microalgas y cianobacterias, pero casi nunca se mencionan los porcentajes o concentraciones, es decir la cantidad de EPS por celda o por gramo, obteniendo estos resultados de alguna literatura podemos comparar y observar la eficacia de estas sustancias (Delattre, Pierre, Laroche & Michaud, 2016).

Por consiguiente los medios de cultivos son utilizados para las diferentes especies que se estén trabajando al igual todos los medios presentan sus mismo componentes pero pueden variar en cantidades, sin embargo sería de gran importancia que se llegase a simplificar y fuese más específico que nutrientes necesita esa especie para obtener una mejor producción de EPS, al igual los nutrientes principales son el N, P, S al no obtener estos elementos en los cultivos genera un impacto (González & Ballestros, 2012).

Existen diferentes procesos de extracción, uno de ellos es por medio de la precipitación alcohólica, sin embargo hay que tener en cuenta los factores que se ajusten a las condiciones del ambiente, sobre todo para hacer una extracción y purificación muy específica no debe haber ninguna contaminación (Azeredo et al., 2003; Bertocchi et al., 1990; Liu & Fang, 2002; Takahashi et al. 2009). Sobre las algas rojas se dice que estas se envuelven dentro de un gel de polisacáridos sulfatados, muchos proponen una estrategia general con el fin de extraer los EPS por medio de centrifugación o microfiltración y así limpiar las microalgas (Li et al., 2011; Ye et al., 2005; Zhang et al., 2008). Otro de los métodos más utilizados para la detección de EPS es la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) esta nos ayuda a obtener información de los diferentes grupos funcionales vibracionalmente activos que se utilizan para

dar respuesta a el contenido de polisacáridos, otro de sus usos es que este puede apartar los diferentes polisacáridos cambiando asimismo su composición ya que cada sustancia da una respuesta específica (Mathlouthi & Koenig, 1987).

Podemos decir que aún falta investigar mucho sobre estas sustancias debemos seguir explorando todas sus propiedades fisicoquímicas y biológicas ya que su potencial es bastante alto, se busca poder obtener mucha información que nos sirva hacia futuro, podríamos estar hablando también de una posible disminución de costos para la explotación de microalgas (Delattre et al., 2016); del mismo modo la mayoría de microalgas suelen excretar Una cantidad de EPS esto nos suele decir que existe una cantidad favorable de carbono orgánico (Passow, 2002). Sin embargo, no siempre la detección de los EPS suele ser muy eficaz ya que las condiciones o si llegase a ver la disminución o las condiciones que presenta su medio, hasta el momento estas son sintetizadas por microalgas (Dubois et al., 1956).

### **1.3 Formulación del Problema**

Si bien los Exopolisacáridos se encuentran presentes con mayor frecuencia en dos grupos de algas (rojas y cianobacterias), no es común encontrar especies pertenecientes a los *Chlorophyta* (u otra división filogenética) que posean la capacidad de sintetizar este tipo de metabolito, por lo tanto, el mayor problema a resolver es identificar las condiciones de cultivo (nutrientes, ciclo luz/oscuridad, y tiempo de cultivo) que permitan maximizar la deposición de los EPS.

### **1.4 Justificación**

Un gran número de productos comerciales se han derivado de microalgas y cianobacterias; además de ser una de las fuentes más ricas de proteínas, algunas especies producen otros

compuestos de valor agregado, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, vitaminas o esteroides (Raposo, Morais y Bernardo de Morais, 2013) estos incluyen productos para la nutrición humana y animal, antioxidantes, sustancias colorantes, fertilizantes y acondicionadores de suelos; una variedad de productos especializados como biofloculantes, polímeros biodegradables, cosméticos, productos farmacéuticos e isótopos estables con fines de investigación (Oilgae, 2014). Otras microalgas son altas productoras de hidrocarburos, que se pueden convertir en biodiesel o hidrógeno, que se pueden usar como una fuente alternativa de energía. Algunos de los PUFA producidos son esenciales como los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 que pueden incluirse en alimentos funcionales o nutraceuticos. Otras microalgas, o sus productos derivados, se utilizan en la industria farmacéutica, cosméticos, talasoterapia, como biofertilizantes, o como agentes para reparar partículas del suelo, como alimento para animales, en acuicultura o incluso en tratamientos de efluentes. En las industrias nutraceuticas, *Arthrospira* (*Spirulina*) y *Chlorella* son las especies más importantes en la comercialización de alimentos saludables y suplementos nutricionales con diversos beneficios para la salud (Kang et al., 2013).

El cultivo a gran escala de microalgas industriales se ha desarrollado rápidamente en todo el mundo (Tabla 1) debido a la variedad de productos que pueden derivarse de estas. La mayoría de las aplicaciones se comercializan con éxito en diferentes sistemas de cultivo. Se sabe que una amplia gama de microalgas puede liberar abundantes compuestos bioactivos extracelulares (proteínas, polisacáridos y otros biopolímeros) en el medio (Raposo, Morais & Morais, 2013; Berry, et al., 2008). Además algunos compuestos alelopáticos de microalgas que se utilizan como herbicidas inocuos para el medio ambiente o agentes de control biológico con perspectivas directas para su uso biotecnológico (Gantar et al., 2008), por otro lado la recuperación mejorada de petróleo (EOR) que utiliza biopolímeros extracelulares de microalgas puede ser un campo de

aplicación próximo (Wu, Li & Lan, 2011). Por lo tanto, las microalgas podrían ser potencialmente utilizadas en alimentos, productos farmacéuticos, acuicultura, cosméticos y la industria del petróleo, y así ser digna de desarrollo para su comercialización.

El interés en las microalgas está creciendo cada vez más, una ventaja de trabajar con microalgas es el hecho de que son fáciles de cultivar. Al ser controlado fácilmente, permite la producción de polisacáridos, o cualquier otro compuesto con propiedades similares (Raposo, Morais & Bernardo de Morais, 2013) (tabla 1). Los EPS comprenden un grupo de importantes biopolímeros de alto peso molecular que se secretan de microorganismos (microalgas) (Delbarre-Ladrat et al., 2014; Xiao & Zheng, 2016). Muchas microalgas, especialmente una variedad de algas rojas (*Rhodella 21iolácea* y *Porphyridium marinum*) y cianobacterias, son productoras de EPS. El EPS probablemente puede proteger a las células del estrés desfavorable en el ambiente natural (Prajapat & Patel, 2013); además, las EPS están involucradas en las interacciones de célula a célula, la adhesión y la formación de biofilm (Dertli, Mayer & Narbad, 2015; Ghafoor, Hay & Rehm, 2011). Se han hallado una variedad de aplicaciones tales como, su propiedad antiinflamatoria y su papel en el sistema inmunomodulador, también pueden usarse como lubricantes para articulaciones óseas (Raposo, Morais & De Morais, 2013). Además son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como espesantes y aditivos gelificantes, que mejoran la calidad y la textura de los alimentos (Feldmane, Semjonovs & Ciprova, 2013). Actualmente, las EPS han recibido mucha atención por sus propiedades antibacterianas, antioxidantes y anticancerígenas, que llevan al desarrollo de candidatos farmacéuticos prometedores (Nguyen & Nguyen, 2014; Mahendran et al., 2013); muchos estudios ya han resaltado las actividades farmacológicas de la EPS de microalgas rojas. Los polisacáridos de *P. cruentum* exhiben actividad antiviral contra varios tipos de virus, como el virus de la estomatitis

vesicular (VSV), el virus de la peste porcina africana (ASFV) y el virus Vaccinia (VACV), así como la actividad antibacteriana contra *Salmonella enteritidis* (Huang, Chen & You, 2005; Raposo, Morais & Morais, 2014). Además, los productos degradados de la EPS de *P. cruentum* mostraron actividades antitumorales e inmunomoduladoras (Sun, Wang & Zhou, 2012). Además de *P. cruentum*, otras especies de *Porphyridium* también exudan EPS que exhiben efectos hipocolesterolémicos y pueden alterar la morfología intestinal en ratas (Dvir et al., 2000; Dvir et al., 2009). Además del EPS de microalgas rojas, el EPS de cianobacterias, como *Arthrospira platensis*, y el dinoflagelado *Gyrodiniumim pudicum* también muestran actividades farmacológicas antivirales, antibacterianas y antioxidantes (Rafika et al., 2011; Yim, et al., 2004). Dado que los EPS se liberan en el medio de cultivo, se pueden recuperar y purificar fácilmente (Bafanaa, 2013).

**Tabla 1. Productos o metabolitos a partir de microalgas**

| Microalga  | Producto o Metabolito   | Industria                            | Aplicaciones   | Referencia   |
|--|---|--------------------------------------|--|--|
| <i>Arthrospira sp.</i><br><i>Arthrospira platensis</i> | Ficocianina / aloficocianina y biomasa<br>EPS<br>(Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Rha, Xyl, Man, Gal, Glc, Ara, Fuc | Alimentaria<br>Cosmética<br>Medicina | Alimentos saludables, cosméticos y aditivos.<br>Antiviral, antioxidante, antibacterial, antitumoral. | Pignolet et al. (2013); Carlsson, van Beilen, Möller y Clayton. (2007). Pulz y Gross. (2004). Trabelsi et al. (2009). Rafika et al. (2011). Rechter et al. (2006); Morais et al. (2010). |

| Microalga   | Producto o Metabolito  | Industria  | Aplicaciones  | Referencia  |
|---|--|--|---|---|
| <i>Aurantiochytrium sp</i>  | Escualeno  | Cosmética  | Pigmentador   | Mourelle et al. (2016).   |
| <i>Botryococcus braunii p.</i><br><i>Chlorella zofingensis</i><br><i>Chlorella Ellipsoidea</i><br><i>Chlorella vulgaris</i><br><i>Chlorella stigmatophora</i> | Cantaxantina<br>Luteína<br>Violaxantina<br>Anteraxantina<br>Zeaxantina<br>Biomasa, factor de crecimiento de <i>Chlorella</i> (CGF) y clorofila | Acuicultura<br>Avicultura<br>Alimentaria<br>Medicina | Pigmentador de alimentos<br>Antioxidante<br>Alimentos saludables, suplementos dietéticos y aditivos.<br>Actividades antiinflamatorias, inmunomoduladoras. | Rubio Fernández et al. (2017).<br>Pignolet et al. (2013).<br>Carlsson et al. (2007).<br>Pulz y Gross. (2004).<br>Rasmussen, y Morrissey. (2007).<br>Guzman et al. (2003). |
| <i>Dunaliella salina</i>  | Glicerol<br>β-Caroteno   | Médico-Farmacéutica<br>Cosmética<br>Alimenticia      | Pigmentadores de alimentos, vitamina A y antioxidante.  | Acacio-Chirino et al. (2013).   |
| <i>Gyrodinium impudicum</i>   | EPS (Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Gal   | Medicina   | Antiviral, antitumorales.   | Yim, Kim, Ahn y Lee. (2007).<br>Yim et al. (2004.)<br>Yim, Son, Pyo y Lee. (2005).  |
| <i>Haematococcus pluvialis</i>  | Carotenoides (Astaxantina)   | Farmacéutica<br>Cosmética<br>Acuicultura             | Pigmentador (acuicultura) y antioxidante.   | Kurmen, González y Klotz, (2013).   |
| <i>Isochrysis galbana</i>   | Ácidos grasos (DHA)  | Alimentaria para animales                            | Nutrición animal como alimento vivo.  | Pignolet et al. (2013).<br>Carlsson et al. (2007).  |
| <i>Lyngbya majuscula</i> (Cianobacteria)  | Moduladores inmunes  | Farmacéutica<br>Alimentaria                          | Productos farmacéuticos y nutrición.  | Pignolet et al. (2013).<br>Carlsson et al.  |

| Microalga  | Producto o Metabolito   | Industria  | Aplicaciones  | Referencia  |
|--|---|--|---|---|
|  |   |  |   | (2007). Osborne, Webb y Shaw. (2001).   |
| <i>Nostoc</i> sp.  | EPS (Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Rha, Xyl, Man, Gal, Glc  | Medicina   | Metal-vinculante, inhibe la formación del colesterol, regeneración de huesos, anticancerígeno.  | Mona y Kaushik. (2015). Rasmussen et al. (2009).  |
| <i>Odontella aurita</i>  | Ácidos grasos (EPA, DHA)<br>Carotenoide (Fucoxantina)   | Farmacéutica<br>Alimentaria<br>Cosmética                           | Productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos para bebés.   | Pignolet et al. (2013). Carlsson et al. (2007). Pulz y Gross. (2004). Moreau et al. (2006).   |
| <i>Phaedactylum tricornutum</i>  | Carotenoides (Fucoxantina) y ácidos grasos (EPA)<br>EPS (Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc, Rib | Alimentaria para animales<br>Cosmética<br>Farmacéutica<br>Medicina | Productos farmacéuticos, cosméticos, nutrición animal como alimento vivo.<br>Actividades antiinflamatorias, inmunomoduladoras.  | Pignolet et al. (2013). Carlsson et al. (2007). Guzman, Gato y Calleja. (2001). Oilgae. (2014) Willis et al (2013). Guzman et al. (2003). |
| <i>Porphyridium</i> sp.<br><i>Porphyridium cruentum</i><br><i>Porphyridium marinum</i> | EPS (Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Xyl, Gal, Glc, GlcA, Man.<br>Polisacáridos, ácidos grasos (EPA, DHA) y ficoeritrina.       | Alimentaria<br>Medicina<br>Farmacéutica<br>Cosmética               | Alimentos saludables, nutraceuticos y funcionales, antioxidantes, antivirales, hipocolesterolémica, inmunomoduladora, antitumorales.<br>Anti-lipidémico, antiglicémico, hipoglucemiantes, | Dvir et al., (2000); Dvir et al., (2009). Geresh et al. (2009). Dvir et al. (2009); Huleihel et al. (2002); Tannin-Spitz et al. (2005);   |



| Microalga  | Producto o Metabolito                                 | Industria                      | Aplicaciones   | Referencia  |
|--|---|--------------------------------|--|---|
|  |   |                                | antitumorales.<br>Actividad antimicrosporídica   | Matsui et al. (2003); Geresh et al. (2002b). Garcia et al., (1996); Guzman-Murillo y Ascencio. (2000). Dvir et al. (2009); Huang et al. (2006). Raposo, Morais y Morais. (2013); Sun, Wang Shi y Ma. (2009). Roussel et al. (2015). Pignolet et al. (2013). Carlsson et al. (2007). |
| <i>Rhodella reticulate</i>                             | EPS (Polisacárido)<br>Azúcar<br>Principal: Xyl, Gal   | - Alimenta-<br>taria<br>Medica | Anti-lipidémico, antiglicémico, eliminación de radicales libres, actividad antioxidante, antivirales, hipoglucemiantes, antitumorales. | Chen et al. (2010). Geresh et al. (2002b). Dvir et al. (2009); Huang et al. (2006).   |
| <i>Scenedesmus spp.</i><br><i>Scenedesmus obliquus</i> | Carotenoides (Luteína)<br>Polihidroxi-alca-<br>noatos | Acuicultura<br>Plásticos       | Antioxidante<br>Plástico biodegradable   | García-Cañedo, et al. Pedetti Díaz y Vaccaro Esteves. (2017).   |

Fru: Fructosa; Xyl: Xilosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; Ara: Arabinosa; Rha: Ramnosa; Fuc:

Fucosa; Man: Manosa; Rib: Ribosa

## 1.5 Objetivos

**1.5.1 Objetivo general.** Evaluar las condiciones para la producción de Exopolisacáridos (EPS) en una cepa de *Botryococcus braunii*.

**1.5.2 Objetivos específicos.** Desarrollar un método para la separación y cuantificación de los EPS del medio de cultivo.

Determinar las características fisicoquímicas de los EPS.

Determinar las condiciones de cultivo que favorezcan la producción de los EPS.

## 1.6 Alcances y Limitaciones

**1.6.1 Alcances.** Con este proyecto se pretende determinar cuáles son las mejores condiciones (Temperatura, pH, Tiempo, etc.) y relación de carbono/nitrógeno/fosforo que permita la producción óptima de EPS. Se espera que el presente proyecto contribuya al desarrollo de procesos para la aplicación de los EPS en futuros trabajos.

**1.6.2 Limitaciones.** La existencia de condiciones indeseables como daño o pérdida del material microbiano con el cual se pretende trabajar y equipos de trabajo dentro del laboratorio, así como la contaminación de la microalga lo que dificultaría la ejecución del proceso y la evaluación de la producción de biomasa; además demora en compra y despacho de reactivos y algunos equipos, generando un obstáculo en la continuidad del proyecto.

## 1.7 Delimitaciones

**1.7.1 Delimitación espacial.** Este proyecto se llevará a cabo en los laboratorios de calidad ambiental, de la Universidad Francisco De Paula Santander, Sede Campos Elíseos.

**1.7.2 Delimitación temporal.** El presente trabajo de investigación tendrá una duración aproximada de 12 meses a partir de su aprobación.

## 2. Marco Referencial

### 2.1 Marco Teórico

Los polisacáridos extracelulares (EPS) son la mayor parte de las sustancias poliméricas extracelulares producidas por microorganismos (Jindal, Singh & Khattar, 2011). Existen en dos formas principales; como una cápsula asociada con la superficie celular o secretada fuera de la célula, ya sea a los alrededores o permanecer unida a la superficie celular (Tallon, Bressollier & Urdaci, 2003). Exhiben una gran variedad de estructuras químicas basadas en combinaciones de hasta 40 monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. La mayoría de los polisacáridos se forman a partir de un rango relativamente limitado de hexosas, tales como la glucosa, galactosa o manosa y pentosas, como la xilosa, pero existen muchos otros azúcares complejos. Sus funciones fisiológicas y ecológicas son diversas debido a que desempeñan funciones especiales en la protección de los microorganismos que los producen. Se cree que las EPS protegen las células contra sustancias antimicrobianas, desecación, bacteriófagos, estrés osmótico y anticuerpos (Mata et al., 2006; Tallon et al., 2003); y en determinados casos son llevadas a la explotación industrial como hidrocoloides, materiales de origen biológico y agentes biológicos activos (Soanen, N. Da Silva, Gardarin, Michaud & Laroche, 2016).

Por otro lado los EPS de microalgas tienen sus ventajas y ciertas limitaciones, a pesar de su alto potencial en diferentes campos, los EPS han tenido un bajo rendimiento, todo depende de una cantidad de factores, como la nutrición, los componentes, el diseño del cultivo, su proceso de recuperación y purificación (Bafanaa, 2013). Además, los EPS facilitan una adhesión celular y se

encargan de la protección contra condiciones ambientales negativas, es importante reconocer que estas sustancias sirven como reservas de carbono y energía (Surayot, U., et al. 2014).

Podemos encontrar diferentes etapas que hacen parte de la extracción de EPS en microalgas y cianobacterias uno de los principales es la producción de azúcares como moléculas precursoras, segundo la unión de enzimas que catalizan la transferencia de la glucosa, seguidamente se lleva a cabo el procesamiento y exportación de polímeros llevando un control del extracelular (Rossi & De Philippis, 2016).

Los EPS representan una clase biotecnológicamente importante de fuente renovable de biopolímeros estructurales y diversos que poseen bioactividades únicas para posibles aplicaciones biológicas de alto valor, por ejemplo, en la desintoxicación de metales pesados, el EPS de *Nostoc linckia* muestra la capacidad de biosorción de los iones Co (II) y Cr (VI) (Mona & Kaushik, 2015); por otra lado en la eliminación de materia sólida de los depósitos de agua, los EPS de microalgas con capacidad de complejación de metales tiene una importancia ecológica potencial y puede utilizarse como quelato natural de metales, especialmente en los procesos de purificación biológica de agua (Freire-Nordi, Vieira & Nascimento, 2005); otras aplicaciones se centran en la producción de alimentos como diversos compuestos de gelatina, en la industria farmacéutica para la cobertura de cápsulas o nuevos fármacos antitumorales/virales, para la suspensión de pigmentos, para la fabricación textil, como emulsionantes y detergentes en cosméticos, etc., (Kumar, Kviderova, Kastanek & Lukavsky, 2017). Las aplicaciones de EPS de alto valor existen en el campo biomédico, debido a que poseen una cantidad de propiedades que lo hacen interesantes, se ha demostrado que los polisacáridos obtienen propiedades inhibitorias contra una variedad de virus, bacterias y tumores (Sed, G., Cicci, A., & Bravi, M. 2017). Además, donde sus usos incluyen terapia del cáncer y curación ósea, así mismo las aplicaciones tópicas de EPS

incluyen vendajes para heridas en pacientes con quemaduras, úlceras crónicas o pérdida extensa de tejido (Mancuso Nichols et al., 2009).

## **2.2 Marco Legal**

De acuerdo con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), acordado en Río de Janeiro el 5 de julio de 1992, reafirma la soberanía de los Estados sobre sus recursos biológicos y genéticos. Al mismo tiempo, el CDB estableció el compromiso de facilitar regímenes de acceso bajo términos mutuamente acordados. Los Estados son también los responsables de la conservación de la diversidad biológica y de su utilización sostenible. Posteriormente, en el año 2000 en Colombia se expidió el Decreto 309 sobre investigación en recursos biológicos, el cual reglamenta los permisos de estudio con fines de investigación científica sobre diversidad biológica (PEFIC). Esta norma se apoya en el principio constitucional que garantiza y promueve la libertad de enseñanza, aprendizaje e investigación, así como en el deber del Estado de proteger la diversidad e integridad del ambiente. De acuerdo con la Ley 99 de 1993 corresponde al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT) coordinar y promover la investigación sobre el medio ambiente y los recursos naturales, establecer el Sistema Nacional de Información Ambiental y organizar el inventario de biodiversidad y de los recursos genéticos nacionales, así como regular la importación y exportación de especies de flora y fauna silvestres.

### 3. Diseño Metodológico

#### 3.1 Tipo de Investigación

El trabajo será en modalidad de investigación, ya que se espera determinar experimentalmente las condiciones necesarias para la producción de exopolisacáridos (EPS) en una cepa de *Botryococcus braunii*.

#### 3.2 Población y Muestra

Se empleará la cepa *Botryococcus braunii* aislada de un termal del departamento del Norte de Santander.

#### 3.3 Hipótesis

A partir de las características fisicoquímicas de los exopolisacáridos (EPS) segregados de forma natural por una cepa de *Botryococcus braunii*, es posible determinar las variables que favorezcan su producción.

#### 3.4 Fases de la Investigación

**3.4.1 Metodología.** Se explica a continuación:

**3.4.1.1 Mantenimiento de Cepa.** *Botryococcus braunii* se mantendrá en medio Bold Basal (Andersen, Berges, Harrison, & Watanabe, 2005) en reactores de 500 mL con 250 mL de volumen de trabajo. El medio se agitará mediante la inyección de aire estéril (0,6vvm) y una radiación constante de  $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**3.4.1.2 Método de separación de Biomasa.** Se determinará la eficiencia de 3 métodos (centrifugación, floculación química y electroflotación) para la separación de la biomasa celular del medio y los EPS. Para realizar las pruebas se emplearán 250 mL de cultivo de 25 días.

**Centrifugación.** El medio se separa en tubos FALCON de 15 mL. Las muestras se centrifugarán a 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante (medio con EPS) se almacenará para pruebas posteriores.

**Floculación.** La biomasa se separa de acuerdo con la metodología propuesta por Mena-López et al (2018). Para lograr lo anterior se desarrollará un diseño de experimentos no-factorial con superficie de respuesta  $4^3$  (4 factores, 3 niveles) en los cuales se determinará la concentración de floculante (mg/L), pH, agitación (rpm) y tiempo de agitación (minutos) (tabla 2). Para cada uno de los experimentos propuestos primero se agregará el floculante y luego se ajustará el pH. Una vez ajustado el pH la muestra se agitará de acuerdo con las especificaciones del diseño de experimentos. Una vez finalizado el tiempo de agitación, la muestra se mantendrá a 60 rpm durante 15 minutos para la formación de flóculos. Una vez terminado los experimentos, el sobrenadante (medio con EPS) se almacenará para pruebas posteriores.

**Tabla 2. Variables del diseño de experimentos**

|                | <b>FACTORES</b> |                                 |    |                 |              |
|----------------|-----------------|---------------------------------|----|-----------------|--------------|
|                |                 | Concentración floculante (mg/L) | pH | Agitación (rpm) | Tiempo (min) |
| <b>NIVELES</b> | -1              | 50                              | 5  | 200             | 3            |
|                | 0               | 100                             | 7  | 300             | 4            |
|                | 1               | 150                             | 9  | 400             | 5            |



**Electroflotación.** El alga se concentrará a partir del método descrito por Castellanos-Estupiñán et al (2018). 250 mL de medio serán vertidos en una cámara con 13 electrodos de aluminio conectados a una fuente de poder de 50W (1Amp, 50V). La muestra se agitará a 300 rpm durante 30 minutos. El alga (parte superior) será separada por decantación y el sobrenadante (medio con EPS) se almacenará para pruebas posteriores.

**Separación de EPS.** Los medios libres de biomasa se someterán al proceso descrito por Jain et al (2005) para la separación de EPS. El medio se diluirá en 3 veces su volumen en etanol analítico frío (relación 1:3), la mezcla medio etanol se dejará a -20°C durante 8 horas. Finalizado el tiempo la muestra será centrifugada a 3400 durante 30 minutos, el precipitado (EPS) será recuperado y secado a 50°C durante 12 horas.

**3.4.1.3 Caracterización Físicoquímica de EPS.** Una vez obtenido el método más eficiente de separación de biomasa y EPS se cultivarán 10 litros de alga durante 25 días y se separarán los EPS. El concentrado final será enviado a los laboratorios de caracterización físicoquímica de la escuela de ingeniería química, donde se determinará su composición. La concentración total de azúcares se determinará por el método de Dubois et al (1956), el contenido de proteínas por Lowry (Peterson, 1977). Además, se determinará su viscosidad, composición por infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FTIR) y su ultraestructura por espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).

**3.4.1.4 Condiciones de Cultivo para Producción de EPS.** Una vez obtenido la caracterización físicoquímica de los EPS se procederá a evaluar el efecto del ciclo luz-oscuridad y relación C/N/P que favorezca la producción de EPS.

**Ciclo Luz-Oscuridad.** El efecto del tiempo de exposición a la luz se determinará de acuerdo con los experimentos propuestos en la tabla 3. Para cada uno de los ciclos, 2 reactores de 500 mL con 250 mL de volumen se cultivarán con un flujo de aire estéril (0,6 vvm) durante 25 días. Al final del tiempo la biomasa se concentrará de acuerdo con el método más eficiente obtenido previamente.

**Tabla 3. Condiciones de luz y oscuridad para la producción de EPS**

|                          | <b>Experimentos</b> |          |          |
|--------------------------|---------------------|----------|----------|
|                          | <b>1</b>            | <b>2</b> | <b>3</b> |
| <b>Luz (Horas)</b>       | 12                  | 16       | 24       |
| <b>Oscuridad (Horas)</b> | 12                  | 8        | 0        |

**Separación de EPS.** Los medios libres de biomasa se someterán al proceso descrito por Jain et al (2005) para la separación de EPS. El medio se diluirá en 3 veces su volumen en etanol analítico frío (relación 1:3), la mezcla medio etanol se dejará a -20°C durante 8 horas. Finalizado el tiempo la muestra será centrifugada a 3400 durante 30 minutos, el precipitado (EPS) será recuperado y secado a 50°C durante 12 horas. La concentración total de azúcares se determinará por el método de Dubois et al (1956) y el contenido de proteínas por Lowry (Peterson, 1977).

**Relación C/N/P.** Una vez obtenido el ciclo que más afecte de forma positiva la formación de EPS se evaluará la relación C/N/P. Para lograr lo anterior se desarrollará un diseño de experimentos no-factorial con superficie de respuesta  $3^3$  (3 factores, 3 niveles) en los cuales se determinará la concentración de carbonato de sodio (medio BG11), nitrato de sodio (medio BOLD) y buffer fosfato (medio BOLD) (tabla 4). Para cada uno de los experimentos se prepara 1 reactor de 500 mL con 250 mL de volumen y flujo de aire estéril (0,6 vvm) durante 25 días. Al

final del tiempo la biomasa se concentrará de acuerdo con el método más eficiente obtenido previamente.

**Tabla 4. Diseño de experimento no-factorial**

|                | <b>FACTORES</b> |                           |                         |                       |
|----------------|-----------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
|                |                 | Carbonato de sodio (mL/L) | Nitrato de sodio (mL/L) | Buffer fosfato (mL/L) |
| <b>NIVELES</b> | -1              | 2                         | 5                       | 5                     |
|                | 0               | 3                         | 7                       | 7                     |
|                | 1               | 4                         | 9                       | 9                     |

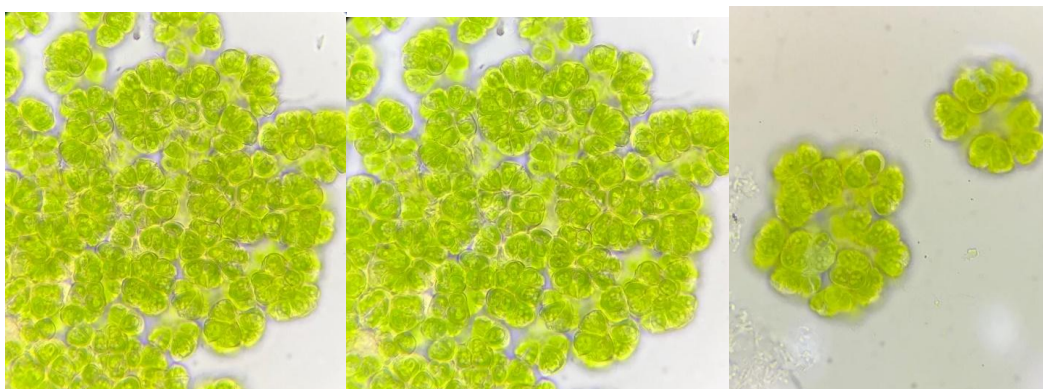
**Separación de EPS.** Los medios libres de biomasa se someterán al proceso descrito por Jain et al (2005) para la separación de EPS. El medio se diluirá en 3 veces su volumen en etanol analítico frío (relación 1:3), la mezcla medio etanol se dejará a -20°C durante 8 horas. Finalizado el tiempo la muestra será centrifugada a 3400 durante 30 minutos, el precipitado (EPS) será recuperado y secado a 50°C durante 12 horas. La concentración total de azúcares se determinará por el método de Dubois et al (1956) y el contenido de proteínas por Lowry (Peterson, 1977).

## 4. Resultados y Análisis

### 4.1 Mantenimiento de Cepa

#### Caracterización microscópica

Se llevo a cabo la caracterización microscópica de la cepa encontrada en el laboratorio de INNOValgae; para poder observar sus estructuras en el microscopio se llevó al objetivo de 100X. Se hallaron colonias compactas de forma irregular y células alargadas; a partir de estas propiedades, se identificó que la microalga presente en la cepa era *Botryococcus braunii* basándonos en los estudios morfológicos realizados a microalgas por Guamán & González (2016) (figura 1).



**Figura 1. Caracterización de *Botryococcus braunii* en objetivo 100X**

#### Mantenimiento de *Botryococcus braunii*

Los reactores con inóculo mostraron un crecimiento rápido pasados 14 días como se muestra en la figura 2, esto se debe a factores tales como el suministro de CO<sub>2</sub>, que produce un aumento de biomasa al ser inyectada una concentración de este en el cultivo (Villareal y Viatcheslav, 2015); por otro lado, cuando los cultivos experimentan un ciclo de luz: oscuridad (12:12), se

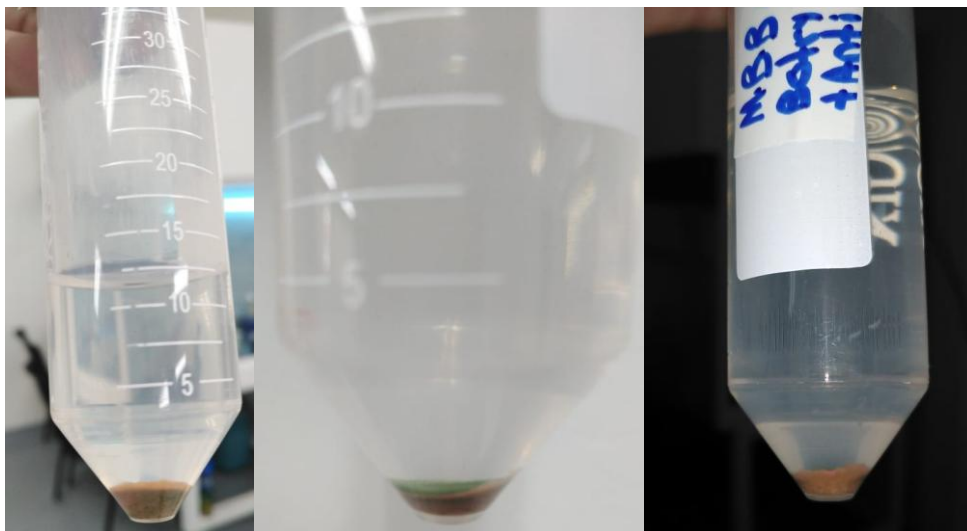
obtiene una mayor productividad de biomasa, carbohidratos y exopolisacáridos durante un día. Por lo tanto, un ciclo de luz: oscuridad es necesario para mejorar el rendimiento de *B. braunii* (García et al, 2018). Asimismo, al agregar antibiótico al medio de cultivo fresco, se redujo el marco de contaminación, siendo un parámetro esencial para el buen crecimiento de *B. braunii*; estos tres factores permitieron obtener un óptimo crecimiento en el cultivo.



**Figura 2. Inóculo madre de Botryococcus braunii. (izquierda) Reactores a los 14 días de crecimiento (derecha)**

### **Recuperación de Botryococcus braunii**

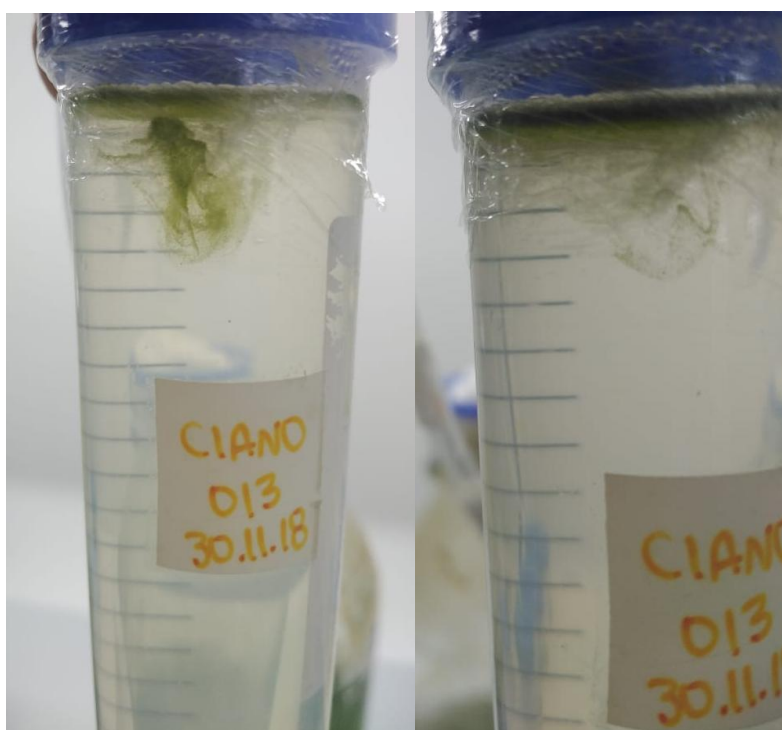
Las prácticas de mantener el cultivo de microalgas en un estado estable durante un largo período de tiempo y el muestreo directo de la naturaleza inevitablemente unen el problema del crecimiento masivo de bacterias y hongos (Mustapa et al, 2016), como se muestra en la figura 3 donde se presenta una contaminación por levadura y la microalga se recubre en ella, se puede observar que en la parte superior se encuentran células de *B. braunii* y debajo de ella su contaminación.



**Figura 3. Pellet de *B. braunii* contaminado**

Para remover la contaminación por parte de la bacteria presente en el medio se determinó emplear un coctel de antibióticos (ampicilina, cefotaxima y carbendazim) basado en el trabajo de Mustapa et al, 2016. En la figura 4 encontramos tubos de recuperación al haber agregado el coctel de antibióticos, mostrando un precipitado de células libres de *B. braunii*. Los antibióticos actuaron mejorando notablemente el cultivo mediante los pases realizados, cada antibiótico que constituía el coctel actuó de la siguiente manera; en primer lugar la ampicilina, es una penicilina de amplio espectro, que forma parte de la aminopenicilina en el grupo de los  $\beta$ -lactámicos, proporcionando un efecto bactericida mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, dado que las paredes celulares de las bacterias en crecimiento se sintetizan constantemente, la inhibición de la síntesis es efectiva para controlar el crecimiento (Sharma, Singh & Singh, 2013). Por otro lado, la cefatoxima expresa resistencia a las enzimas  $\beta$ -lactamasas que son producidas por bacterias para inhibir el efecto bactericida. Debido a estas razones, se espera que la combinación de ampicilina y cefotaxima produzca un efecto sinérgico en el tratamiento de cóctel (LeFrock, Prince & Leff, 1982); por último, el carbendazim, que

inhibe varios procesos como el transporte intracelular, el mantenimiento de la forma y la movilidad celular a través de los cilios y la acción flagelar, uniéndose completamente al microtúbulo del hongo para la inhibición completa del crecimiento (Davidse, 1986). La combinación del cóctel de ampicilina, cefatoxima y carbendazim revelo ser una solución apropiada para descontaminar *B. braunii*. En el anexo 1 se presenta la metodología descrita sobre la preparación del coctel de antibióticos para la recuperación de *B. braunii*.



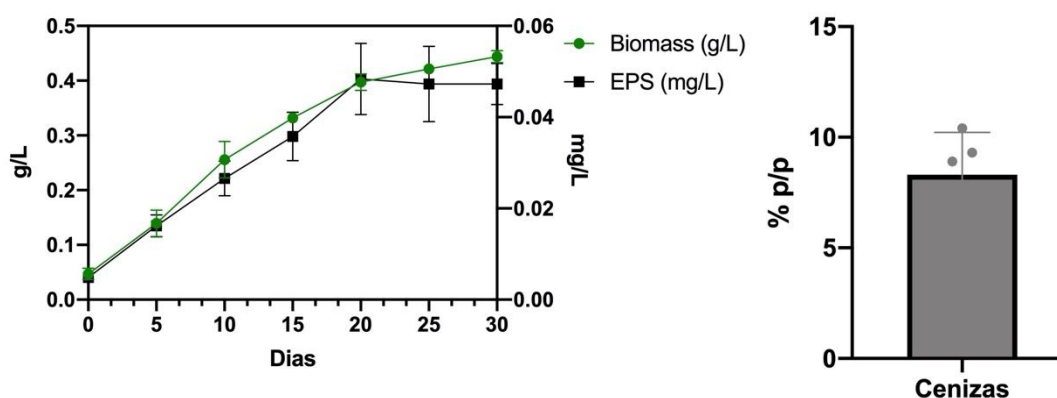
**Figura 4. Biomasa suspendida de *B. braunii* después de eliminación de contaminantes**

#### **Producción de biomasa y concentración de EPS**

A partir de los cultivos purificados de *B. braunii* se desarrollaron cultivos en reactores (4 reactores) de 500 mL con 250 mL de volumen de trabajo, cada reactor se mantuvo en agitación mediante la inyección de aire estéril (0,6vvm), ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas y una

radiación constante de  $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 30 días. De acuerdo con los resultados (figura 5), se pudo obtener hasta  $0.44 \text{ g/L}$  de biomasa de *B. braunii*, cabe resaltar que la concentración de EPS durante los 30 días fue cercana al 10%, con un valor final de  $0.0542 \text{ g/L}$ . En comparación con otros estudios la productividad de *B. braunii* oscila entre 3 a  $4 \text{ gr/L}$ , en condiciones favorables para su concentración (Cabanelas et al., 2015 , Eroglu et al., 2011), pero, en un medio modificado en nutrientes, su máxima producción es del  $0,65 \text{ g/L}$  (Dayananda et al., 2005); es decir, el rendimiento de biomasa se ve afectado tanto por las condiciones del medio de cultivo, como por su cantidad de nutrientes; también cabe destacar que el rendimiento de EPS es directamente proporcional a la cantidad de biomasa obtenida.

La materia inorgánica o ceniza de microalga adquiridas de cada filtro, varían dependiendo de su peso seco. Según literatura, el porcentaje óptimo de cenizas en una muestra de *B. braunii* oscila entre el 22-23% (Zhu & Lee, 1994), en este estudio se alcanzando un porcentaje entre el 5-10% de residuos inorgánicos (minerales, etc.), este valor varía dependiendo de la cantidad de muestra procesada, como de la cantidad de dichos residuos; en la figura 5 podemos apreciar los resultados obtenidos.

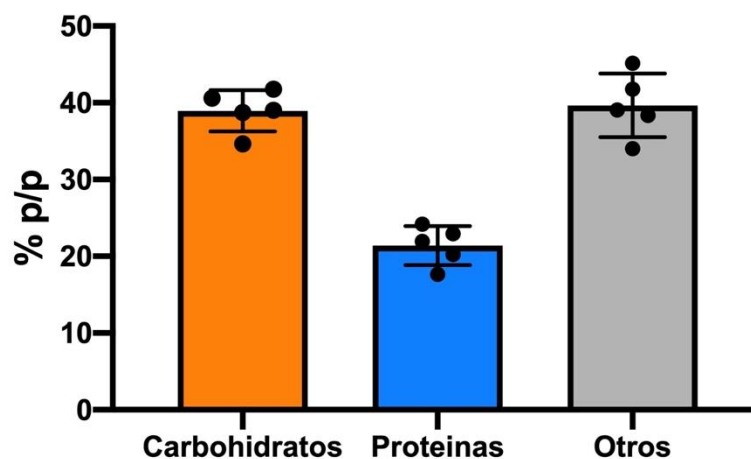


**Figura 5. Concentración de biomasa, EPS (izquierda) y concentración de cenizas (derecha)**



## Caracterización del EPS

El porcentaje de proteínas alcanzado en esta prueba fue del 20%, en comparación con la proporción alcanzada por Sydney et al. (2010), siendo del  $39,61 \pm 3.2\%$ , este tipo de dato puede variar dependiendo de la cantidad de biomasa producida por la microalga, es decir, esta biomasa puede contener otro tipo de compuestos tales como, azúcares, lípidos, pigmentos, cenizas, etc. (Sydney et al, 2010); en una mayor proporción y comprender un bajo porcentaje de proteínas. Por otro lado, un estudio reciente demostró que la composición de carbohidratos del EPS varía según el contenido de macro y micronutrientes de los medios de cultivo (Díaz & Atehortúa, 2014), es decir que, a mayor cantidad, mayor producción de estos, como lo podemos reflejar en la figura 6, alcanzado un porcentaje hasta del 40%.



**Figura 6. Concentración de carbohidratos, proteínas y otros compuestos (% p/p) del EPS**

## Caracterización Físicoquímica de EPS (FTIR)

La zona 1 se caracteriza por la presencia de alcoholes, alquinos y tramos de N-H, pero no siempre se hallarán curvaturas representativas de estos grupos funcionales, debido a que las

muestras tienden a variar según su composición. El primero de estos se identifica al tener una forma particular de U (figura 7) (1), comparado con los resultados obtenidos por Wang (2011) y Turu et al. (2016), se corrobora la presencia de este compuesto en el rango estipulado, además también se puede dar esta existencia del compuesto por la solubilidad y absorción de agua que se presenta en *B. braunii* (Lim et al., 2005; Karbowski et al., 2011); por otro lado, la presencia de este también se pudo dar por la utilización de alcohol para la precipitación de la muestra. El segundo se reconoce, por tener un pico agudo y marcado, pero en este caso no se halló en el rango respectivo para él; por último, señalaremos a las aminas o amidas (N-H), que se singularizan por estiramientos continuos que poseen (2) (figura 7), estos picos pueden presentarse, pero no da la seguridad que allí se encuentren, debido a que se debe observar su fórmula molecular para asegurarse de que exista un nitrógeno en su molécula (“Infrared Spectroscopy”, 2013). En la figura 8, se pudo ratificar la presencia tanto de alcoholes, como de tramos de N-H.

La banda de absorción en la zona 2 va desde 3200 a 2700  $\text{cm}^{-1}$ , donde se buscó la presencia de carbonos  $\text{Sp}^2$ ,  $\text{Sp}^3$ , aldehídos y ácidos carboxílicos. El primero de ellos se singulariza por picos cortos (figura 7 y 8) (1), dichos resultados se contrastaron con los obtenidos por Sharma et al. (2014), en donde los picos se presentan en la misma zona, entre 3000-2950  $\text{cm}^{-1}$ . Respecto a  $\text{Sp}^3$ , las principales bandas de absorción se encuentran en la región de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  donde las vibraciones de los enlaces C-H de los metilos se encuentran en las bandas 2956 y 2874  $\text{cm}^{-1}$  (Miller & Dumas, 2010), el rango mencionado anteriormente hace referencia a picos pequeños encontrados en la figura 7 (2). Con referencia a los aldehídos y ácidos carboxílicos, no se encontraron picos correspondientes para cada uno.

En la zona 3, se debían mostrar picos en un rango de  $2092.30\text{ cm}^{-1}$  que se debe a los grupos alquinos presentes y el otro a grupos nitrilo (-CN) (Gaebler et al., 2013); pero, solo se localizó un grupo funcional (figura 7) que en este caso fue el alquino.

La zona 4, posee una banda de absorción entre los  $1750$  y  $1720\text{ cm}^{-1}$  la cual corresponde al grupo éster (Miller & Dumas, 2010), el cual podemos confirmar en la figura 7 y 8; por otro lado, el pico de  $1637.82\text{ cm}^{-1}$  es una característica de las vibraciones de flexión de una amida (Shende, Gade y Rai, 2017), que se presenta en ambas muestras. En cuanto a los aldehídos, ácidos carboxílicos y cetonas no se localizan, estos tienen características similares a los que, si se hallaron, pero en los rangos donde se deberían apreciar su pico no se encontraron.

Por último, en la zona 5 el pico entre  $1680$ - $1620\text{ cm}^{-1}$  mostro la presencia de alquenos. El estiramiento alrededor de  $1600$ - $1450\text{ cm}^{-1}$  se asignó para la presencia de bencenos, su característica especial es formar 2 picos consecutivos, uno más grande que el otro, lo cual lo hace diferenciarse de una mejor manera (figura 7) (“Infrared Spectroscopy”, 2013).

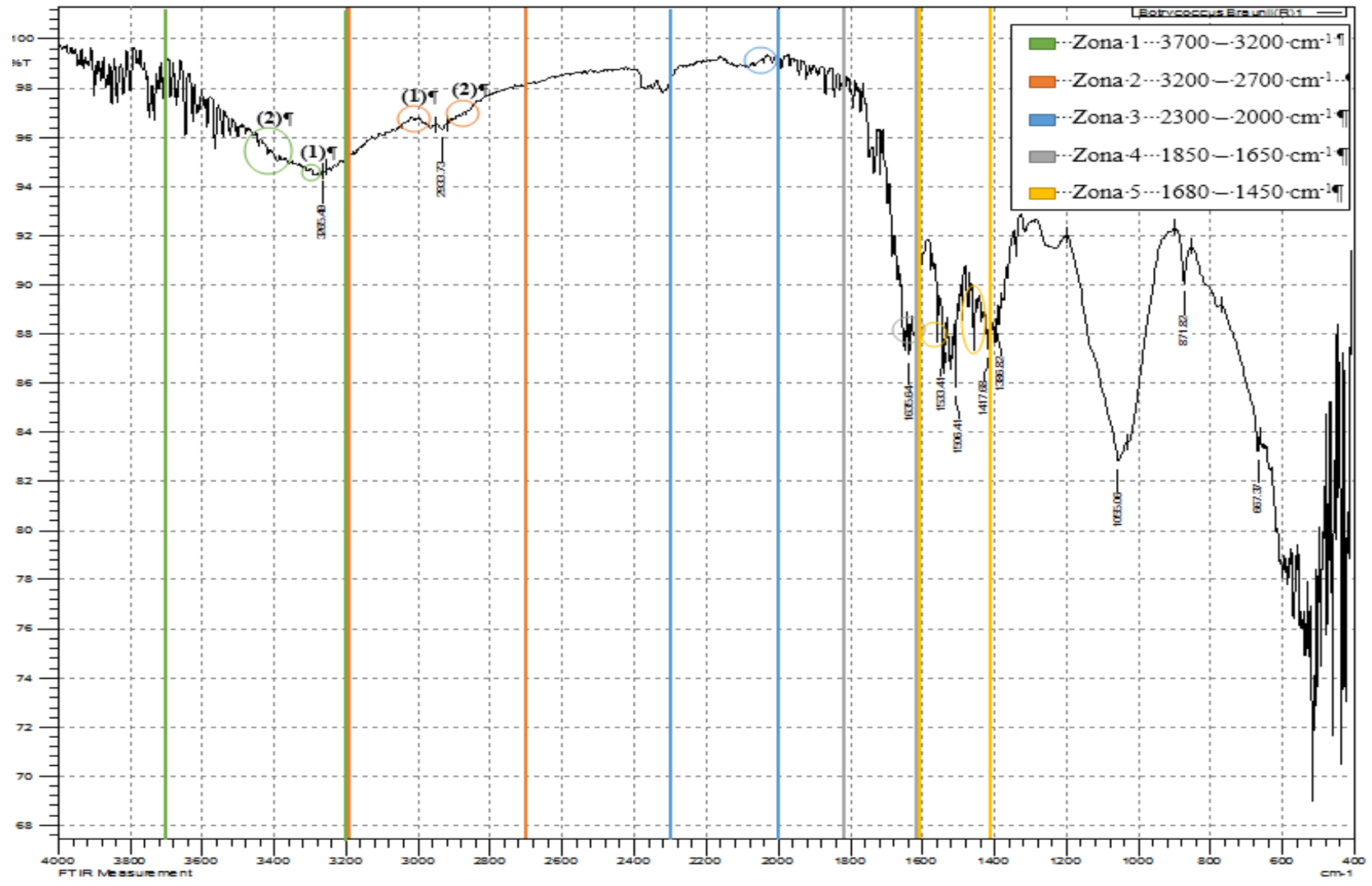


Figura 7. Espectrometría infrarroja (FTIR) a muestra de *B. braunii*

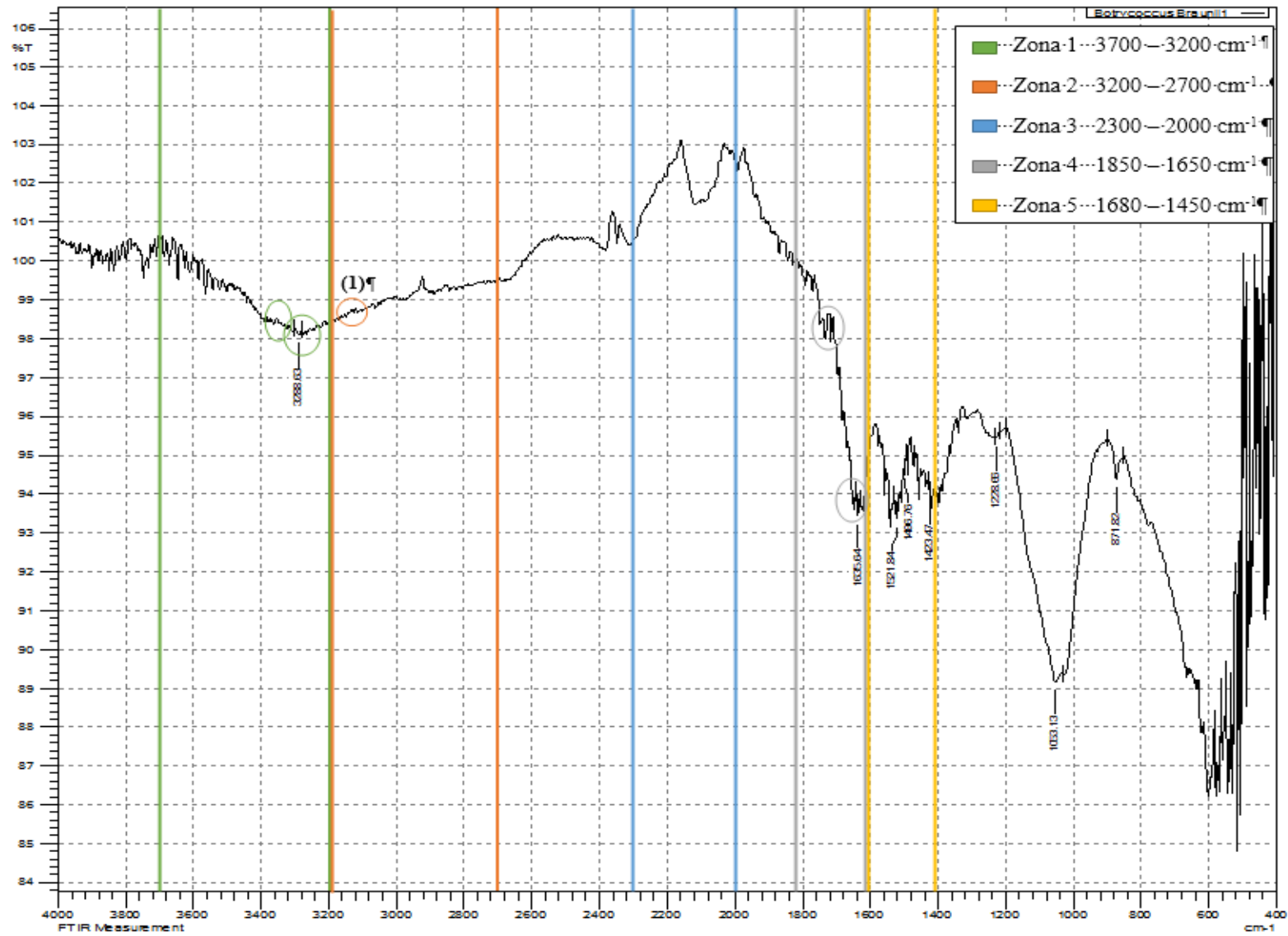
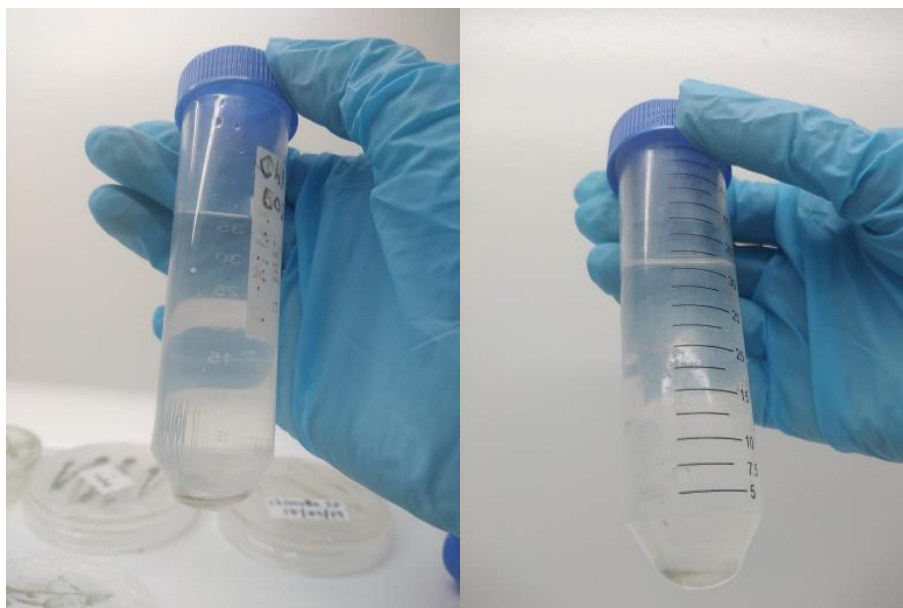


Figura 8. Espectrometría infrarroja (FTIR) a muestra de *B. braunii* 2

## 4.2 Método de Separación de Biomasa

### Centrifugación y Separación de EPS

En la separación de células por centrifugación (figura 9) se obtuvo un resultado desfavorable, debido a que la biomasa no tuvo desglose óptimo para ser evidenciado; por otra parte, se encontró una alta presencia de células en el medio, principalmente en la parte superior de los tubos falcón, allí se concentró más cantidad de células, debido a su alto peso molecular.



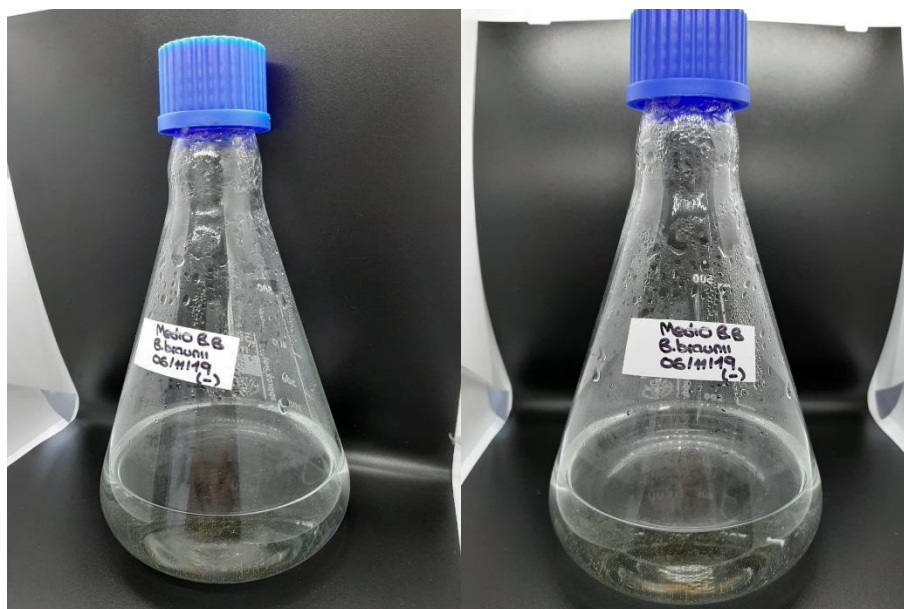
**Figura 9. Presencia de células en medio concentrado y escasa separación de células por centrifugación**

### Floculación

La floculación en este caso no fue realizada. Según Mera, (2015) explico que debe ser recomendable hacer una centrifugación previa a una floculación, siendo este método calificado como el mejor proceso de separación de las microalgas cultivadas. Los resultados señalados

anteriormente de centrifugación no fueron favorables de esta manera no se realizó esta técnica, si bien esta sirve para procesar grandes volúmenes en tiempos relativamente rápidos al contrario de las muestras y los pequeños volúmenes con los que se trabajaron.

### Electroflotación



**Figura 10. Separación de células por electroflotación**

En la separación de células por electroflotación, no fue necesario llevarlo a cabo, debido a que en el momento de espera mientras se realizaba una muestra control, el Erlenmeyer que contenía la muestra a procesar, se disgregó formando una capa en la parte superior de este, concentrándose allí la mayor cantidad de células en el medio.

### 4.3 Condiciones de Cultivo para Producción de EPS

#### Ciclo luz-oscuridad

El cultivo mantenido a ciclo luz: oscuridad 16:8 alcanzó la mayor producción de biomasa siendo 0,8 g/L (figura 9 A), en confrontación con el ciclo 12:12 que obtuvo 0,5 g/L y 24:0 con 0,6 g/L. Los resultados obtenidos por Dayananda et al. (2007) fueron de 2.0 g/L de biomasa en 16:8, ratificando así que este ciclo cumple con las condiciones óptimas para una buena obtención de esta. La cantidad obtenida en g/L tanto en la muestra analizada, como en la comparada varía dependiendo de la cantidad de muestra procesada. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la luz es uno de los factores más fuertes que afecta el crecimiento y el almacenamiento de productos de algas (Scott et al., 2010), debido a que, puede aumentar o disminuir la producción.

Con respecto a lo figura 9 C, podemos observar que el porcentaje de EPS es directamente proporcional a la cantidad de biomasa que obtuvimos. En el ciclo 16:8 se consiguió un porcentaje del 12% de EPS, siendo significativo para la cantidad de muestra analizada, en comparación con la proporción alcanzada por Dayananda et al. (2007) siendo del 33% en ciclo 16:8, la producción de EPS bajo las condiciones del ciclo fue óptima. Los porcentajes obtenidos en los otros ciclos nos indica que *B. braunii* puede adaptarse a diferentes condiciones para la producción de EPS, pero siendo unas más eficientes que otros.



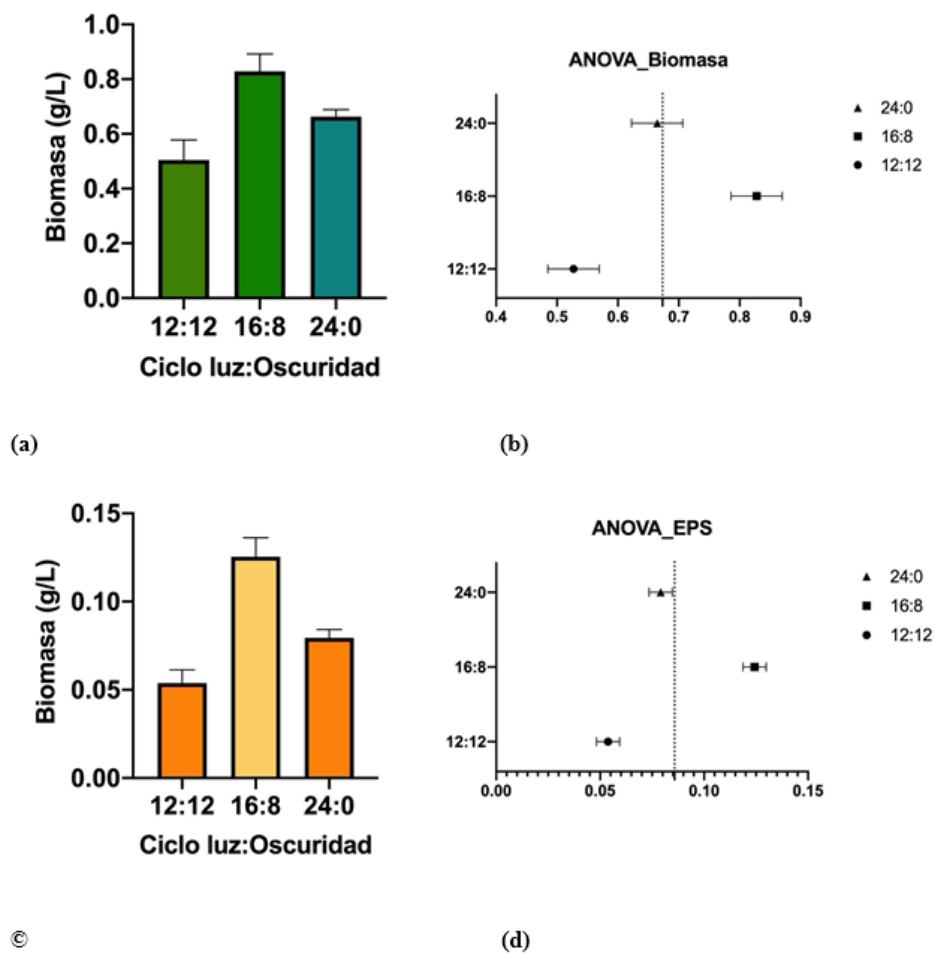


Figura 11. Biomasa en los diferentes ciclos de luz: oscuridad. B. Porcentaje de EPS en los diferentes ciclos de luz: oscuridad

### Relación C/N/P

Para este modelo C/N/P se diseñó un modelo no-factorial con superficie de respuesta  $3^3$  (3 factores, 3 niveles), para determinar las condiciones óptimas de nutrientes para el crecimiento de *B. braunii* y producción de EPS; las concentraciones de nutrientes utilizadas están descritas en la tabla 5.

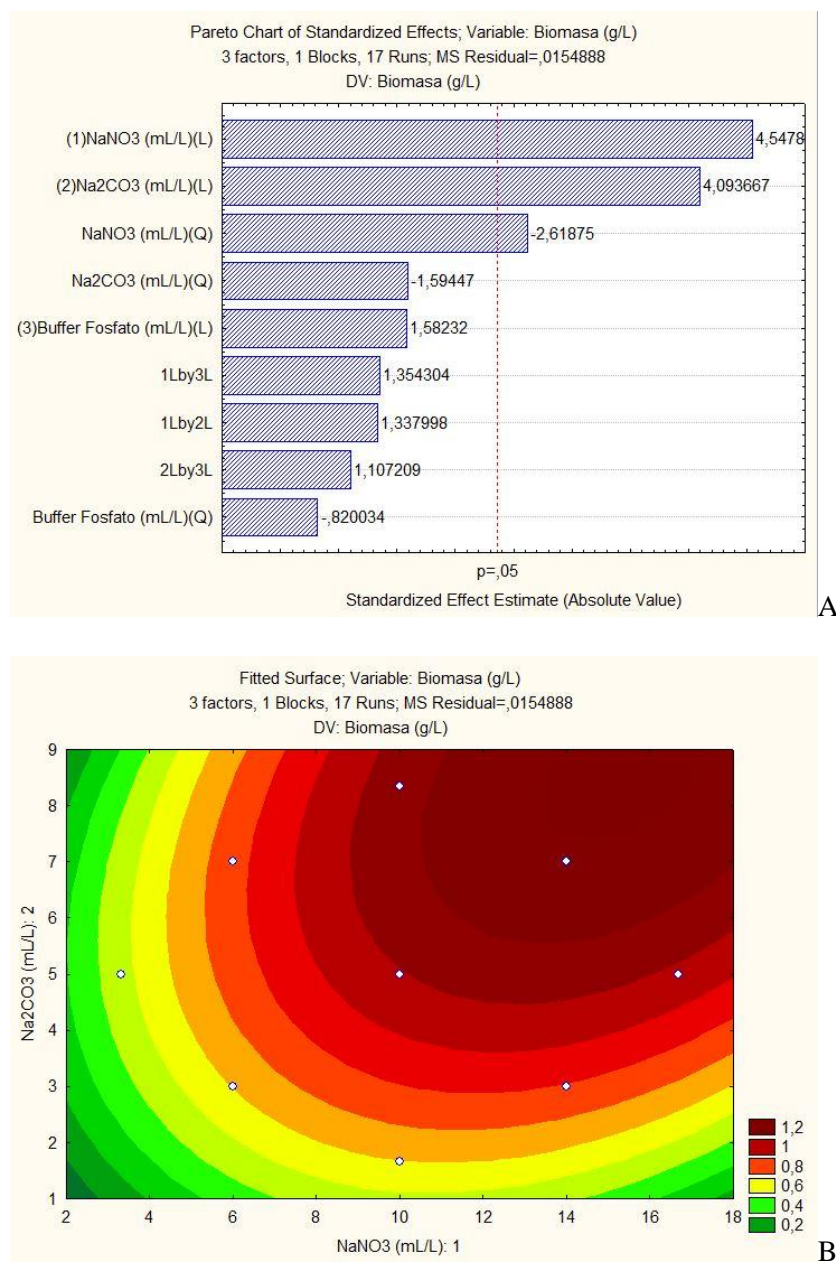
**Tabla 5. Diseño de experimento no-factorial**

|      | NaNO <sub>3</sub> (mL) | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL) + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mL) |       |
|------|------------------------|--------------------------------------|---|-------|
| 13   | 0,200                  | 0,033                                | 0,140   | 0,140 |
| 17 © | 0,200                  | 0,100                                | 0,140   | 0,140 |
| 8    | 0,280                  | 0,060                                | 0,100   | 0,100 |
| 10 © | 0,200                  | 0,100                                | 0,140   | 0,140 |
| 3    | 0,280                  | 0,060                                | 0,180   | 0,180 |
| 4    | 0,280                  | 0,140                                | 0,100   | 0,100 |
| 9    | 0,280                  | 0,140                                | 0,180   | 0,180 |
| 6    | 0,120                  | 0,060                                | 0,180   | 0,180 |
| 7    | 0,120                  | 0,140                                | 0,100   | 0,100 |
| 16   | 0,200                  | 0,100                                | 0,207   | 0,207 |
| 1    | 0,120                  | 0,060                                | 0,100   | 0,100 |
| 2    | 0,120                  | 0,140                                | 0,180   | 0,180 |
| 15   | 0,200                  | 0,100                                | 0,073   | 0,073 |
| 11   | 0,066                  | 0,100                                | 0,140   | 0,140 |
| 5 ©  | 0,200                  | 0,100                                | 0,140   | 0,140 |
| 12   | 0,334                  | 0,100                                | 0,140   | 0,140 |
| 14   | 0,200                  | 0,167                                | 0,140   | 0,140 |

Los resultados obtenidos de la aplicación del diseño de experimentos fueron ajustados empleando modelos lineales (L) y quadraticos (Q). De acuerdo con el análisis de Pareto (figura 12<sup>a</sup>), la fuente de nitrógeno (1) y la fuente de carbono (2) son los factores que más influyen en la producción de biomasa de *B. braunii*. Por otra parte, la superficie de respuesta obtenida (figura 12B) a partir de los resultados nos permite determinar que a concentraciones elevadas de NaNO<sub>3</sub> de 14 mL/L (0,35 g/L) y 7 mL/L (0,14 g/L) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> es posible maximizar la producción de biomasa hasta valores cercanos a 1.2 g/L. Finalmente, se encontró que el buffer fosfato (3) evaluado en las concentraciones de este trabajo no afecta la producción de biomasa.

Los resultados obtenidos en el rendimiento de biomasa fue 0.14 g/L según su fuente de carbono (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). De acuerdo con Barajas-Solano et al., (2016) *B. braunii* alcanzó una producción de biomasa 0.75 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, los datos antes mencionados son significativos en

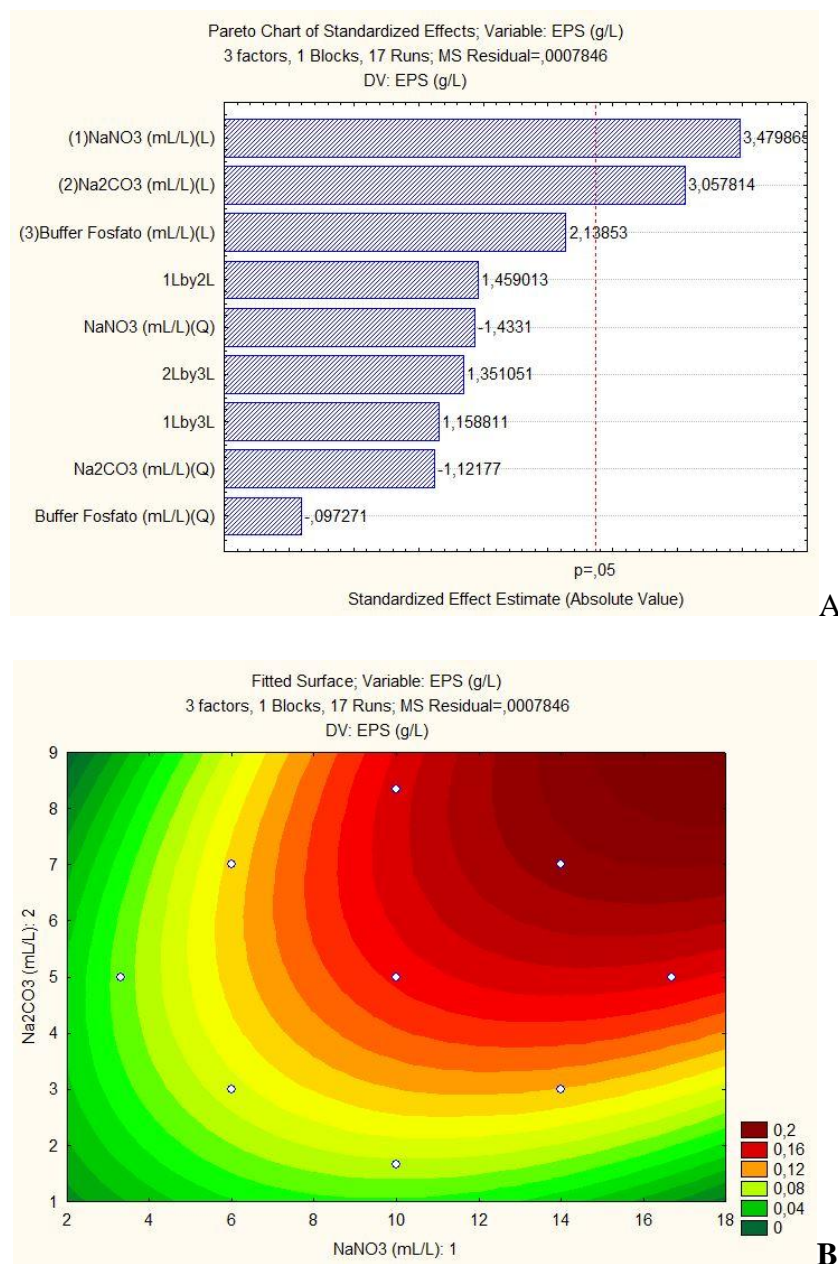
ambas investigaciones. Asimismo, Barajas, Guzmán & Kafarov (2016) sostienen que al emplear el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) consiguieron una producción de biomasa de 1 a 2 g/L, de esta manera superaron la producción que esperaban según los autores. Por otra parte, el efecto de la fuente de nitrógeno, fue favorable dando como resultado 0.35 g/L de  $\text{NaNO}_3$ . Bayona y Garcés, (2014) describen el uso de doble fuente de nitrógeno ( $\text{KNO}_3$  y  $\text{NaNO}_3$ ) y determinan que a mayor concentración de nitrato elevan la producción final de biomasa. Asimismo, lo explica Rodríguez, (2012) donde la productividad de la biomasa es directamente proporcional a la cantidad de nutrientes presentes en el medio como en este caso nitrado de sodio, claramente esto se ve reflejado en diagrama de Pareto (figura 10<sup>a</sup>).



**Figura 12. A. Análisis de Pareto para la producción de biomasa. B. Superficie de respuesta del modelo C/N/P para biomasa**

Con respecto a la producción de EPS, las fuentes tanto de carbono como de nitrógeno contribuyen también a la obtención de este; en la figura 13<sup>a</sup> y 13B nos permite observar que a concentraciones de 14 mL/L de NaNO<sub>3</sub> (0,35 g/L) y 7 mL/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,14 g/L), se obtiene

una productividad cercana a 0,2 g/L; según Metzger & Largeau (2005), la producción de EPS es una característica normal de *B. braunii*, y que esta síntesis no ocurre en medios deficientes en nitrógeno; por otro lado, la fuente de fósforo no afecta significativamente el rendimiento de EPS.



**Figura 13. A. Análisis de Pareto para la producción de EPS. B. Superficie de respuesta del modelo C/N/P para EPS**

De acuerdo con la tabla 6, y en comparación con los resultados obtenidos, la producción de biomasa y EPS principalmente se debe a diferentes factores, como la composición de su medio, ciclos de luz: oscuridad, entre otros. El nitrógeno es uno de los nutrientes más importante para el crecimiento de microalgas, debido a que es el principal elemento para la síntesis de metabolitos (Peccia et al., 2013), pero para cumplir su función debe estar en ciclos de luz óptimos, y concentraciones adecuadas; referente con los estudios evaluados, el ciclo de luz: oscuridad 16:8 es uno de los más óptimos para la absorción tanto de N como de C, por otro lado, la luz influye permitiendo una mayor producción de exopolisacáridos, como fue en *B. braunii* LB 572 donde obtuvo una producción de 1,6 g/L (Dayananda et al., 2007) de exopolisacáridos, con un ciclo de luz 16:8 de esta manera ratificamos que la mejor condición para el aumento de EPS y biomasa es en este ciclo.

Los valores obtenidos, varían dependiendo de la cantidad de muestra procesada, es decir, cuando se obtiene más cantidad de EPS, es debido a la alta cantidad de biomasa. En las diferentes cepas analizadas, la fuente de C puede ser agregada directamente en el medio de cultivo o ser inyectada en ciclos al medio, pero esta última puede afectar el crecimiento del alga (Arbeláez, 2018), en comparación con los resultados obtenidos, nuestra fuente tanto de nitrógeno como de carbono, suplió las necesidades del alga para así producir una alta cantidad de biomasa y EPS a escala de laboratorio.

Asimismo, en la tabla 6 se observa claramente que, si existe una limitación en la concentración de nutrientes, disminuye su crecimiento celular. De esta manera debe existir un compromiso entre la tasa de crecimiento y la alta producción de EPS que se quiere obtener y llevar a cabo condiciones que beneficien la especie con la que se esté trabajando como en este caso los autores señalan que maximicen el suministro de dióxido de carbono y tener en cuenta

que factores como el pH y la temperatura pueden afectar su producción (Delattre et al, 2016). Mahesh et al, (2019) informó que la producción de EPS en *Scendesmus* sp aumentó durante el inicio donde fueron puestas las condiciones de nitrógeno, a su vez la tabla 6 refleja la variabilidad de fuentes tanto de carbono y nitrógeno que suelen ser usadas en investigaciones y diferentes especies siendo pilares esenciales para llevar a cabo el estudio que se desee realizar.

**Tabla 6. Producción de biomasa y EPS a partir de diferentes cepas**

| Cepa                            | Fuente de carbono (g/L)         |      | Fuente de nitrógeno (g/L) |      | Ciclo luz: oscuridad | Biomasa (g/L) | EPS       | Referencia                     |
|---------------------------------|---------------------------------|------|---------------------------|------|----------------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| <i>Scenedesmus sp.</i>          | Glucosa                         | 10   | Nitrato                   | 0,6  | -                    | 3.46          | -         | Ren et al. (2013)              |
| <i>Chlorella sp.</i>            | CO <sub>2</sub>                 | -    | NaNO <sub>3</sub>         | -    | 16:8                 | 2.76          | 1.46 g/L  | Cheirsilp et al. (2016)        |
| <i>Achnanthes brevipes</i>      | -                               | -    | NaNO <sub>3</sub>         | -    | 16:8                 | -             | 0.035 g/L | Guerrini et al. (2000)         |
| <i>B. braunii</i> (LB572)       | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 0.02 | NaNO <sub>3</sub>         | 1.5  | 16:8                 | 2.0           | 1.6 g/L   | Dayananda et al. (2007)        |
| <i>B. braunii</i> (SAG 30.81)   | CO <sub>2</sub>                 | -    | KNO <sub>3</sub>          | -    | 16:8                 | 1,2           | 32%       | Thomson, I. (2006)             |
| <i>Cylindrotheca closterium</i> | CO <sub>2</sub>                 | -    | KNO <sub>3</sub>          | -    | 12:12                | -             | 0.042 g/L | Alcoverro et al. (2000)        |
| <i>B. braunii</i>               | CO <sub>2</sub>                 | -    | KNO <sub>3</sub>          | 0,4  | 18:6                 | 5,4           | 3,3 g/L   | Gouveia et al. (2017)          |
| <i>B. braunii</i>               | glucosa                         | 2,5  | KNO <sub>3</sub>          | 0,4  | 16:8                 | 4,55          | 29,7%     | Zhang et al. (2011)            |
| <i>B. braunii</i>               | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 7    | NaNO <sub>3</sub>         | 14   | 16:8                 | 1,187         | 0,18 g/L  | Este estudio                   |
| <i>Scenedesmus sp</i>           | CO <sub>2</sub>                 | -    | NaNO <sub>3</sub>         | 0.02 |                      | -             | 0.122 g/L | Sivaramakrishnan et al. (2020) |
| <i>B. braunii</i>               | CO <sub>2</sub>                 | -    | KNO <sub>3</sub>          | 0.05 | 16:8                 | 0.65          | -         | Dayananda et al. (2005)        |
| <i>B. braunii</i> (AC768)       | CO <sub>2</sub>                 | -    | KNO <sub>3</sub>          | 0.4  | 18:6                 | 0.18          | -         | Gouveia et al. (2017)          |



Por último, a partir de los resultados se pudo obtener una ecuación cuadrática para mejorar la producción de EPS y biomasa. De acuerdo con las ecuaciones 1 y 2, donde X es la fuente de nitrógeno y Y es la fuente de carbono, se espera obtener una producción de biomasa hasta del 1,187 g/L y de EPS de 0,18 g/L (tabla 7).

**Tabla 7. Ecuaciones para producción de biomasa y EPS**

| <b>Ecuación 1 (Biomasa)</b>   | <b>X<br/>(mL/L)</b> | <b>Y<br/>(mL/L)</b> | <b>Z<br/>(g/L)</b> |
|---|---------------------|---------------------|--------------------|
| $z = 0,0364415952081 + 0,071558234901923 * x - 0,0061063271103897 * x^2 + 0,058943367961306 * y - 0,014871737012987 * y^2 + 0,0073591874999999 * x * y + 0,0074488750000001 * x + 0,012179625 * y - 0,38603351$ | 14                  | 7                   | 1,187              |
| <b>Ecuación 2 (EPS)</b>   |                     |                     |                    |
| $z = 1,251656568866 + 0,002577787472466 * x - 0,00075212132203734 * x^2 - 0,0063147514988839 * y - 0,0023549138595779 * y^2 + 0,0018061671875 * x * y + 0,0014345359375 * x + 0,003345034375 * y - 1,5063569$   | 14                  | 7                   | 0,18               |

## 5. Conclusiones

Se determinó que el coctel de antibióticos (ampicilina, cefatoxima, carbendazim) actuó efectivamente frente a la contaminación que se produjo en *B. Braunii*, logrando eliminar y reducir el hongo u levadura que estuvo recubriendo la microalga.

Las condiciones de cultivo de *Botryococcus braunii* con mayor rendimiento fue el ciclo luz: oscuridad 16:8 donde se alcanzó una producción de biomasa de 0.8 g/L y un porcentaje de EPS del 12 % siendo un valor favorable y significativo para la cantidad de muestra analizada.

Se analizó la relación de C/N/P con respecto a la producción de EPS, las dos fuentes más significativas fueron C/N dando como resultados 0.35 g/L de  $\text{NaNO}_3$  y 0.14 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , estas fuentes logran elevar sustancialmente la producción de biomasa; sobre la fuente de fosfato su cantidad no afecta el rendimiento de EPS.

Se demostró que, en cuanto a los métodos de separación, no fue necesario llevarlos a cabo en su totalidad ya que con una muestra control se obtuvo una capa superior con una gran concentración de células en el medio.

Se identificaron diferentes grupos funcionales en la composición de EPS por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), en diferentes zonas se halló la presencia de alcoholes, alquinos, amida y bencenos acorde a los rangos establecidos por la metodología de este.

## 6. Recomendaciones

Se debe evaluar la mejor condición de cultivo para su máxima producción, dependiendo el metabolito de interés a producir.

*B. braunii*, se debe mantener en un medio con antibiótico para evitar contaminación, debido a que su cultivo es muy susceptible a esto. En el anexo 1 se encuentran establecidos los cálculos para realizar el coctel de antibiótico dependiendo los mL o L de cultivo a realizar.

### Referencias Bibliográficas

- Acacio, N., Zumalacárregui, L., Almera, J., Barreno, D., Betancourt, R. & Colina, R., et al. (2013). Desarrollo de un procedimiento para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella* sp. en la salina Las Cumaraguas. *Revista Cubana de Química*, 25(2), 15-19.
- Alcoverro, T., Conte, E. & Mazzella, L. (2000). Production of mucilage by the Adriatic epipellic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *Journal of Phycology*, 36(6), 1087-1095. and pigments. *Aquac. Int.* 24 (1), 313–326.
- Arbeláez, A. (2018). Análisis modelación y mejoramiento del proceso productivo de la microalga *Botryococcus braunii* con fines energéticos. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Azeredo, J., Henriques, M., Sillankorva, S., Oliveira, R. (2003). Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci. Technol.* 47(1), 175–179.
- Bafana, A. (2013). Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate polymers*, 95(2), 746-752.
- Barajas, A. (2016). Diseño Conceptual De Un Sistema De Produccion De La Microalga *Botryococcus Braunii* En Fotobioreactores Como Materia Prima Para La Produccion De Biocombustibles De Tercera Generacion. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Barajas, A., Guzmán, A. & Kafarov, V. (2016). Efecto de la relación carbono-nitrógeno para la producción de biomasa, hidrocarburos y lípidos en el *Botryococcus braunii* UIS 003. *Chemical Engineering Transactions*, 1(2), 18-23.

- Bayona, K. & Garcés, L. (2014). Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of applied phycology*, 26(5), 2087-2095.
- Berry, J., Gantar, M., Perez, M., Berry, G. & Noriega, F. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine drugs*, 6(2), 117-146.
- Bertocchi, C., Navarini, L., Cesàro, A. & Anastasio, M. (1990). Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydrate polymers*, 12(2), 127-153.
- Blackburn, S. I., Frampton, D. M. F., Jameson, I. D., Brown, M. R., Mansour, M. P., Negri, A. P., Nichols, P. D., Parker, N. S., Robert, S., Volkman, J. K., and Bolch, C. J., *Algal Culture Collections and the Environment*, (Tokai University Press, Hadano, Japan, 2005). pp. 29–63.
- Buck, B. H., & Buchholz, C. M. (2004). The offshore-ring: a new system design for the open ocean aquaculture of macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 16(5), 355-368.
- Cabanelas, I., Marques, S., De Souza, C., Druzian, J. & Nascimento, I. (2015). *Botryococcus*, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. *Algal Research*, 11(2), 43-49.
- Carlsson, A., Van Beilen, J., Möller, R., Clayton, D. (2007). *Micro- and Macro-Algae: Utility for Industrial Applications*; Bowles: Newbury.
- Cybulska, J., Halaj, M., Cepák, V., Lukavský, J. & Capek, P. (2016). Nanostructure features of microalgae biopolymer. *Starch Stärke*, 68(8), 629-636.

- Cheirsilp, B., Mandik, Y., Prasertsan, P. (2016). Evaluation of optimal conditions for cultivation. *Aquacult*, 24(2), 213-326.
- 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.
- Davidse L. (1986). Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review Phytopathology*, 1(3), 43-65.
- Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S. & Ravishankar, G. (2005). Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, 40(9), 3125-3131.
- Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M., Shamala, T. & Ravishankar, G. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31(1), 87-93.
- De Biotecnología. (2012). Producción de bioetanol de tercera generación mediante la bioconversión de exopolisacáridos (EPS) extraídos del cultivo in vitro de una microalga verde (Chlorophyta). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/316758738\\_Produccion\\_de\\_bioetanol\\_de\\_tercera\\_generacion\\_mediante\\_la\\_bioconversion\\_de\\_exopolisacaridos\\_eps\\_extraidos\\_del\\_cultivo\\_in\\_vitro\\_de\\_una\\_microalga\\_verde\\_chlorophyta](https://www.researchgate.net/publication/316758738_Produccion_de_bioetanol_de_tercera_generacion_mediante_la_bioconversion_de_exopolisacaridos_eps_extraidos_del_cultivo_in_vitro_de_una_microalga_verde_chlorophyta)
- Decho, A. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role (s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Revista Anual*, 28(7), 73–153.

- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C. & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 34(7), 1159-1179.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 34(7), 1159-1179.
- Delbarre, C., Siquin, C., Lebellenger, L., Zykwinska, A. & Collicec, S. (2014). Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in chemistry*, 2(85), 26-36..
- Dertli, E., Mayer, M. & Narbad, A. (2015). Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC microbiology*, 15(1), 8-12.
- Díaz, K. & Atehortúa, L. (2014) Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Appl Phycol*, 24(2), 2087–2095.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dvir, I., Chayoth, R., Sod, U., Shany, S. & Nyska, A., et al. (2000). Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *British journal of Nutrition*, 84(4), 469-476.

- Dvir, I., Stark, A., Chayoth, R., Madar, Z. & Arad, S. (2009). Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats. *Nutrients*, 1(2), 156-167.
- Eroglu, E., Okada, S. & Melis, A. (2011). Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *Journal of applied phycology*, 23(4), 763-775.
- Feldmane, J., Semjonovs, P., Ciprovica, I. (2013). Potential of exopolysaccharides in yoghurt production. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol*, 7(8), 456–459.
- Flemming, H. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 623-629.
- Freire, C., Vieira, A. & Nascimento, O. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena* spiroides extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry*, 40(6), 2215-2224.
- Gaebler, A., Milan, R., Straub, L., Hoelper, D. & Kuerschner, L., et al. (2013). Alkyne lipids as substrates for click chemistry-based in vitro enzymatic assays. *Journal of lipid research*, 54(8), 2282-2290.
- Gantar, M., Berry, J., Thomas, S., Wang, M. & Perez, R., et al. (2008). Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS microbiology ecology*, 64(1), 55-64.
- Garcia, D., Morales, E., Dominguez, A., Fábregas, J. (1996). Productividad mixotrófica del exopolisacárido sulfatado com la microalga marina *Porphyridium cruentum*. In



Comunicaciones del III Congreso Ibérico de Biotecnología—Biotec'96; Universidad de Valladolid: Valladolid, España.

García, J., Cristiani, E., Flores, C., Ponce, T. & Olivia, R. (2018). Obtención de Carotenoides a partir de la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. Recuperado de: <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/20939/1/1014195821.pdf>

García, R., Cabanelas, I. Sijtsma, L., Kleinegris, D. & Barbosa, M. (2018). Production of exopolysaccharide by *Botryococcus braunii* CCALA 778 under laboratory simulated Mediterranean climate conditions. *Algal research*, 29(7), 330-336.

Geresh, S., Arad, S., Levy, O., Zhang, W. (2009). Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr*, 4(25), 343–349.

Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J. (2002). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Biophys.* 50(8), 179–187.

Ghafoor, A., Hay, I. & Rehm, B. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(15), 5238-5246.

Gonzalez, C., Ballestros, M. (2012) . Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol*, 30(9), 1655–1661.

Gouveia, J., Ruiz, J., Van den Broek, L., Hesselink, T. & Peters, S., et al. (2017). *Botryococcus braunii* strains compared for biomass productivity, hydrocarbon and carbohydrate content. *Journal of biotechnology*, 248(8), 77-86.

- Guamán, M. & González, N. (2016). Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Corporación para la Investigación Energética. Laboratorio de Biotecnología Energética, Quito, Ecuador.
- Guerrini, F., Cangini, M., Boni, L., Trost, P. & Pistocchi, R. (2000). Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *Journal of Phycology*, 36(5), 882-890
- Guzmán, S., Gato, A., Calleja, J. (2001). Anti-Inflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother*, 15(8), 224–230.
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire, M. & Calleja, J. (2003). Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother*, 17(2), 665–670.
- Guzmán, M. & Ascencio, F. (2000). Anti-Adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of the red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Laboratorio de Microbiologic*, 30(8), 473–478.
- Hayashi, L., Santos, A., Faria, G., Nunes, B. & Souza, M., et al. (2011). *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 337-343.
- Huang, J., Chen, B. & You, W. (2005). Studies on separation of extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum* and its anti-HBV activity in vitro. *Revista Drugs*, 24(5), 18–21.

- Huang, J., Liu, L., Yu, Y., Lin, W. & Chen, B., et al. (2006). Reduction in the blood glucose level of exopolysaccharide of *Porphyridium cruentum* in alloxan-induced diabetic mice (in Chinese). *Fujian Norma*. 22(5), 77–80.
- Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J. & Arad, S. (2002). Activity of *Porphyridium* sp. Polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 50(19), 189–200.
- Infrared Spectroscopy. (2013). Luminiscence Infraroja Recuperado de <http://www.ifsc.usp.br/~lavfis2/BancoApostilasImagens/ApLuminescencia/Infrared%20Spectroscop1.pdf>
- Jaimes, N. & Kafarov, V. (2015). Desarrollo preliminar de una metodología de suministro de CO<sub>2</sub> a cultivos de *Botryococcus braunii* para la producción de biocombustibles. *Revista ION*, 28(2), 33-50.
- Jaspars, M., De Pascale, D., Andersen, J., Reyes, F. & Crawford, A., et al. (2016). The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 151-158.
- Jindal, N., Singh, D. & Khattar, J. (2011). Cinética y caracterización físico-química de los exopolisacáridos producidos por la cianobacteria *Oscillatoria formosa*. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*, 27(1), 2139 – 2146.
- Kang, H., Salim, H., Akter, N., Kim, D. & Kim, J. et al. (2013). Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal

- microflora population of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(1), 100-108.
- Karbowiak, T., Ferret, E., Debeaufort, F., Voilley, A. & Cayot, C. (2011). Investigation of water transfer across thin layer biopolymer films by infrared spectroscopy. *J Membrane ciencia*, 370(78), 82–90.
- Kumar, D., Kviderová, J., Kaštánek, P. & Lukavský, J. (2017). The green alga *Dictyosphaerium chlorelloides* biomass and polysaccharides production determined using cultivation in crossed gradients of temperature and light. *Engineering in Life Sciences*, 17(9), 1030-1038.
- Kurmen, J., González, G. & Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104.
- Lauritano, C., Andersen, J., Hansen, E., Albrigtsen, M. & Escalera, L., et al. (2016). Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science*, 3(68), 15-19.
- LeFrock J., Prince R. & Leff R. (1982). Mechanism of action, antimicrobial activity, pharmacology, adverse effects, and clinical efficacy of cefotaxime. *Pharmacotherapy*. 2(8), 174-84.
- Lewin, R. (1956). Extracellular Polysaccharides of Green Algae. *Canadian Journal of Microbiology* 2(1), 665-72.
- Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H. & Li, N., et al. (2011). Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochem*. 46(5), 1104–1109

- Lim, J., Joo, J., Kim, O., Kim, H. & Kim, S. (2005). Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1. *Carbohyd Polym* 61(9), 296–303.
- Lowry, O, Rosbrough, N, Farr, A. & Randall, R (1951). Medición de proteínas con el reactivo de fenol. *Revista Chemical*, 193(9), 265–275.
- Mahendran, S., Saravanan, S., Vijayabaskar, P., Anandapandian, K. & Shankar, T. (2013). Antibacterial potential of microbial exopolysaccharide from *Ganoderma lucidum* and *Lysinibacillus fusiformis*. *Int. J. Revista de ciencias*, 4(8), 501–505.
- Mahesh, R., Naira, V. & Maiti, S. (2019). Concomitant production of fatty acid methyl ester (biodiesel) and exopolysaccharides using efficient harvesting technology in flat panel photobioreactor with special sparging system via *Scenedesmus abundans*. *Bioresource technology*, 278(5), 231-24.
- Mancuso, C., Nairn, K., Glattauer, V., Blackburn, S. & Ramshaw, J., et al. (2009). Screening microalgal cultures in search of microbial exopolysaccharides with potential as adhesives. *The Journal of Adhesion*, 85(2), 97-125.
- Mata, J., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S. & Bressollier, P., et al. (2006). Exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas *Halomonas ventosae* y *Halomonas anticariensis* recientemente descritas. *Research in Microbiology*, 157(1), 827 – 835.
- Mata, T. Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Revista de energia*, 14(9), 217–232.

- Mathlouthi, M. & Koenig, J. (1987). Vibrational spectra of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Bioquímica* 44(7), 82–89.
- Matsui, S., Muizzudin, N., Arad, S. & Marenus, K. (2003) Sulfated polysaccharides from red microalgae anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 104(8), 13–22.
- Mera, S. (2015). Optimización del proceso de centrifugación para separar biomasa proveniente de microalgas. Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador.
- Metzger, P. & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(5), 486-496.
- Miller, L. & Dumas, P. (2010). From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current opinion in structural biology* 20(5), 649–656.
- Moheimani, N. & Borowitzka, M. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 13-25.
- Mona, S. & Kaushik, A. (2015). Chromium and cobalt sequestration using exopolysaccharides produced by freshwater cyanobacterium *Nostoc linckia*. *Ecological engineering*, 82(5), 121-125.
- Morais, M., Stillings, C., Dersch, R., Rudisile, M. & Pranke, P., et al. (2010). Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Bioresour. Technol.* 101(5), 2872–2876.

- Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R. & Guedes, R., et al. (2006). Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental toxicology and pharmacology*, 22(1), 97-103
- Mourelle, M., Gómez, C., Legido, J. & Legido, N. (2016). Innovación en el uso de microalgas en termalismo. *Cynical hydrological*, 31(5), 53-64.
- Mustapa, M., Sallehudin, N., Mohamed, M., Noor, N. & Raus, R. (2016). Decontamination of *Chlorella* sp. culture using antibiotics and antifungal cocktail treatment. *ARNP*, 11(8), 104-109.
- Yarrow, M., Leonard, W., Lion, M. Schuler, L. & Ghiorse, W. (1996). Modeling Oligotrophic Biofilm Formation and Lead Adsorption to Biofilm Components. *Environmental Science and Technology*, 30(6), 2027-035.
- Nguyen, D. & Nguyen, T. (2015). Detection on antioxidant and cytotoxicity activities of exopolysaccharides isolated in plant-originated *Lactococcus lactis*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 7(1), 33-38.
- Osborne, N., Webb, P. & Shaw, G. (2001). The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environment International*, 27(5), 381-392.
- Patel, A. & Prajapat, J. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 8(7), 1-8.

- Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J. & Zimmerman, J. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in biotechnology*, 31(3), 134-138.
- Pedetti, P. & Vaccaro, V. (2017). Utilización de microalgas para la potencial producción de polihidroxicarboxilatos. Recuperado de: <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/3570>
- Pérez, R. (1997). Ces algues qui nous entourent. Conception actuelle, role dans la biosphere, utilisations, culture. Editions Efrimer Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(8), 781-796.
- Pulz, O. & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(8), 635–648.
- Rafika, C., Lamia, T., Rym, B., Meya, E. & Hela, O., et al. (2011). Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biologia. Technology*, 54(9), 831–838.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 517-523.
- Raposo, M., De Morais, R. & Bernardo, A. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233-252.
- Raposo, M., De Morais, A. & De Morais, R. (2014). Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life sciences*, 101(1-2), 56-63.



- Rasmussen, H., Blobaum, K., Jesh, E., Park, Y. & Lu, F. (2009). Hypocholesterolemic effect of *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing, an edible blue-green alga. *Journal Europa*, 48(9), 387-394
- Rasmussen, R. & Morrissey, M. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Revista de nutricion*, 52(8), 237–292.
- Rechter, S., König, T., Auerochs, S., Thulke, S. & Walter, H. (2006). Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res.* 72(3), 197–206.
- Reith, J., Deurwaarder, B., Hemmes, K., Curvers, A. & Brandeburg, W. (2005) Bio-offshore. Grootschalige teelt van zeevieren in combinatie met offshore windparken in de Noordzee. *ECN*, 7(4), 189-193.
- Ren, H., Liu, B., Ma, C., Zhao, L. & Ren, N. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 143.
- Rodríguez, A., Luna, S. & Andrés, F. (2012). Efecto De La Relacion Carbono/Nitrogeno En La Productividad De Biomasa Y Lipidos En Cultivos De *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 En Fotobiorreactores A Escala De Laboratorio. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C. & Ruocco, N. (2017). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine environmental research*, 128(8), 58-69.

- Rossi, F. & De Philippis, R. (2016). Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis. In *The physiology of microalgae*, 8(9), 565-590.
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P. & Laroche, C. (2015). Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharide from algae and their potential to control honeybee noseemis. *Carbohydr. Polym.*, 13(3), 213–220.
- Rubio, D., Barrera, N., Fonseca, L., Baquero, J. & Eduardo, C. (2017). Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. Recuperado de: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6436/1/COL0046961-2017-1-IQ.pdf>
- Scott, S., Davey, M., Dennis, J., Horst, I. & Howe, C., et al. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Biotechnol.*, 21(5), 277–286.
- Sed, G., Cicci, A. & Bravi, M. (2017). Extraction and Purification of Exopolysaccharides from Exhausted *Arthrospira platensis* (Spirulina) Culture Systems. *Chemical Engineering Transactions*, 57(5), 211-216.
- Sharma S., Singh, L. & Singh, S. (2013). Comparative study between penicillin and ampicillin. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 8(4), 291-294.
- Sharma, B., Purkayastha, D., Hazra, S., Gogoi, L. & Bhattacharjee, C., et al. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using a freshwater green alga, *Prasiola crispa*. *Materials Letters*, 116(3), 94-97.
- Shende, S., Gade, A. & Rai, M. (2017). Large-scale synthesis and antibacterial activity of fungal-derived silver nanoparticles. *Environmental Chemistry Letters*, 15(3), 427-434.

- Shniukova, E. & Zolotareva, E. (2015). Diatom exopolysaccharides: a review. *International Algae* 17(4), 50–67.
- Sivaramakrishnan, R., Suresh, S., Pugazhendhi, A., Pauline, J. & Incharoensakdi, A. (2020). Response of *Scenedesmus* sp. to microwave treatment: Enhancement of lipid, exopolysaccharide and biomass production. *Bioresource Technology*, 8(4), 123562.
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P. & Laroche, C. (2016). Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresource technology*, 213(8), 231-238.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q. & Ma, C. (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Revista Internacional de Biologia macromol.* 45(8), 42–47.
- Sun, L., Wang, L. & Zhou, Y. (2012). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1206-1210.
- Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A. Tabarsa, M., et al. (2014). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *International journal of biological macromolecules*, 68(2), 233-240.
- Sydney, E., Sturm, W., De Carvalho, J., Thomaz, V. & Larroche, C., et al. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource technology*, 101(15), 5892-5896.

- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D. & Orvain, F. (2009). Optimizing extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Freshwat*, 60(3), 1201–1210.
- Tallon, R., Bressollier, P. & Urdaci, M. (2003). Aislamiento y caracterización de dos exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus plantarum* EP56 *Research in Microbiology*, 154 (3), 705 – 712.
- Tannin, T., Bergman, M., Moppes, D., Grossman, S. & Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the redmicroalga *Porphyridium* sp. *Appl. Phycol.* 17(5), 215–222.
- Trabelsi, L., Trabelsi, L., Ouada, H., Bacha, H. & Ghoul, M. (2009). Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* 21(7), 405–412.
- Turu, I., Turkcan, C., Kazan, A., Yildiz, E. & Akgol, S., et al. (2016). Synthesis and characterization of cryogel structures for isolation of EPSs from *Botryococcus braunii*. *Carbohydrate polymers*, 150(8), 378-384.
- Wang, B. (2011). Chemical characterization and ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion. *Macromol*, 48(7), 386–391.
- Willis, A., Chiovitti, A., Dugdale, T. & Wetherbee, R. (2013). Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): structure, composition, and adhesive characteristics. *Phycol.* 49(8), 937–949.

- Wu, N., Li, Y. & Lan, C. (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.
- Xiao, R. & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology advances*, 34(7), 1225-1244.
- Yim, J., Kim, S., Ahn, S., Lee, C. & Rhie, K., et al. (2004). Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Marine biotechnology*, 6(1), 17-25.
- Yim, J., Son, E., Pyo, S. & Lee, H. (2005). Novel sulfated polysaccharide derived from redtide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo. *Mar. Biotechnol.* 7(1), 331–338.
- Yim, J., Kim, S., Ahn, S. & Lee, H. (2007). Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresour. Technol.* 98(7), 361–367.
- Zhang, G., Ji, S., Gao, X., Liu, Z. (2008). Adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with polymeric ultrafiltration membranes. *J. Ciencias*, 309(8), 28–35.
- Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W. & Shen, G. (2011). Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1710-1715.
- Zhou, J., Mopper, K. & Passow, U. (1998). The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnol. Oceanogr.* 43 (8), 1860–1871.

Zhu C, Lee Y. (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* 9(8), 189–194

## **Anexos**

**Anexo 1. Método para eliminación de bacterias y hongos (Modificado de Mustapa et al, 2016)**

Las cantidades descritas de antibióticos son para 500mL de medio Bold Basal.

1. Se preparo medio Bold Basal siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio INNOValgae.

2. Se tomaron 20 tubos Falcon de 50mL, los cuales fueron auto-clavados junto con el medio preparado.

3. Los antibióticos utilizados en este coctel fueron ampicilina, cefotaxima y carbendazim. La dosis de cada uno se calculó de la siguiente de manera:

**Ampicilina**

$$700\mu\text{g} \times \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \times 500\text{mL} = 350\text{mg/mL}$$

**Cefotaxima**

$$200\mu\text{g} \times \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \times 500\text{mL} = 100\text{mg/mL}$$

**Carbendazim**

$$0,1\mu\text{g} \times \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \times 500\text{mL} = 0,05\text{mg/mL}$$

4. En cabina de flujo laminar, al medio ya preparado se le agregaron las dosis establecidas anteriormente.

5. Finalmente, en los 20 tubos Falcon se añadieron 25mL del medio con antibiótico.

**Nota:** La concentración del inculo celular dependerá del nivel de contaminación presente en la muestra.