



UNIVERSIDAD DEL MAR
CAMPUS PUERTO ÁNGEL

**Obtención de metabolitos primarios a partir de un
cultivo a escala piloto de *Rhodorus marinus*
(Rodophyta)**

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de Licenciado en Biología
Marina

Presenta

Alexis Luna Hernández

Director

M. en C. Alejandra Torres Ariño

Co-Director

Dr. Raúl Salas Coronado

Resumen

Rhodospirillum rubrum es una microalga roja de fácil cultivo y de cosecha rápida. Esta microalga presenta un contenido alto de un pigmento fotosintético rojo denominado ficoeritrina. *R. rubrum* se considera una especie potencialmente activa para la producción de metabolitos primarios con un gran valor e interés biotecnológico. En el presente trabajo se caracterizó un cultivo a escala piloto de la microalga *R. rubrum* conservada en diferentes medios de cultivo con distinta composición química; f/2 y QFF. Se obtuvo un registro de las variables físico-químicas durante 24 días de cultivo. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de las proteínas totales y las ficobiliproteínas. A partir de estos últimos extractos se realizó la purificación de B-ficoeritrina. Para la extracción y cuantificación de proteínas totales, se utilizó el método colorimétrico de Lowry. Respecto a la extracción y determinación de ficobiliproteínas, se llevó a cabo mediante fragmentación manual y sonicación utilizando un buffer de fosfatos, el concentrado líquido se analizó en un espectrofotómetro UV-VIS. La B-ficoeritrina se purificó mediante una precipitación con sulfato de amonio al 90% y posteriormente se aplicó una cromatografía de exclusión por tamaño, finalizando con una cromatografía de intercambio iónico. El índice de pureza de la proteína se determinó por una relación de absorbancias a las longitudes de ondas de 280 nm y 545 nm. Los resultados obtenidos muestran diferencias tanto en el crecimiento y contenido intracelular de *R. rubrum*. Los valores más altos en biomasa húmeda, se obtuvieron en los cultivos con medio QFF. La composición de la biomasa en este medio fue de un 15.08% de proteína en base seca, 16.17 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ficoeritrina y un índice de pureza de la B-ficoeritrina igual a 3.5. Los resultados obtenidos mostraron que la composición nutritiva de los distintos medios de cultivo, influyen tanto en el crecimiento y composición e influyen fuertemente en la calidad *R. rubrum*. Aun así, esta microalga roja podría ser una opción viable para la recuperación de esta cromoproteína o emplearse para la generación de un bioproducto.

Palabras claves: Caracterización, ficobiliproteínas, medio de cultivo f/2 y QFF, microalga roja, purificación.

Dedicatoria

*A mis padres **Catalina Hernández** y **Jorge Luna** por brindarme su confianza, amor y apoyo incondicional y a mis hermanos **Nery** y **Floricela** por darme los ánimos para seguir siempre adelante.*

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día”

Agradecimientos

A la **Universidad del Mar Campus Puerto Ángel** por la formación como Biólogo Marino.

Agradezco infinitamente a mi directora de tesis **M. en C. Alejandra Torres Ariño** por su apoyo moral y económico, cariño, sus consejos, paciencia y tiempo dedicado para desarrollar este proyecto. Así como por compartir conmigo sus aventuras y pasión por este maravilloso mundo de microorganismos. Gracias Darla por tu amistad y las fotografías de la tesis.

Al **Dr. Raúl Salas Coronado**, por disponerme un espacio para trabajar durante mis estancias profesionales, por compartir sus conocimientos y que a pesar de la distancia siempre mostró gran interés por el buen desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Edson Edinho Robles** por su asesoramiento, espacio y tiempo para trabajar en este proyecto, por compartir sus conocimientos químicos de una manera muy particular.

Al **M en C. Gerardo Esteban Leyte** y la **M. en C. Nadia Valeria Herrera**, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por el aporte de críticas para el mejoramiento del manuscrito de la tesis.

A **Yann Guezenc** de la Universidad de Brest (Francia), quien realizó una estancia bajo la dirección de la M. en C. Alejandra Torres Ariño y nos apoyó en algunas de las determinaciones.

A los técnicos del LBM **Alejandra Honda Merino** y **Nadia Valeria Herrera Herrera**, quienes me asistieron cuando lo necesité.

Al **Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (LBM)** por permitirme formar parte de su equipo para mi desempeño académico y desarrollar mis experimentos, así como el ser el espacio que vio mis inicios como profesional al participar como Técnico asistente.

A las instalaciones de la **Universidad Tecnológica de la Mixteca**, principalmente a los laboratorios de Productos Naturales y Alimentos, por permitirme realizar parte de este trabajo en dichas instalaciones.

A mis **docentes, amigos y compañeros** que directa o indirectamente se vieron involucradas en mi formación universitaria

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Descripción	Pág.
1	Células y agregaciones de la microalga <i>Rhodorus marinus</i> , Olympus Microscopio, 100X. Foto: Alejandra Torres Ariño.....	6
2	Diagrama experimental para evaluación del potencial de la microalga <i>Rhodorus marinus</i>	13
3	Cepa de <i>Rhodorus marinus</i> clave RHOM de la colección de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.....	14
4	Preparación de contenedores. A) De 20 L para la producción de biomasa, B) De 5 L para la obtención del inóculo.....	17
5	Esquema de desarrollo para los cultivos RHOM, desde el cultivo madre del cepario hasta obtener el cultivo final para la producción de biomasa. Fotos: Alejandra Torres Ariño	18
6	Procedimiento para la determinación de proteínas de la microalga <i>R. marinus</i> . A) Toma de muestra, B) Filtrado de volumen conocido y eliminación de sales, C) Guardado en sobres de aluminio, D) Selección de muestras, E) Maceración y homogeneización de muestras, F) Adición de NaOH al 0.1 N para llevar a cabo la hidrólisis alcalina, G) Sonicado de las muestras, H) Centrifugado para obtener el extracto alcalino. Fotos: Alejandra Torres Ariño ...	22
7	Obtención de biomasa del cultivo RHOM. A) Biomasa obtenida del contenedor de 20 L, B) Biomasa fresca almacenada en tubos cónicos Falcon, C) Biomasa seca.....	24
8	Análisis de ficobiliproteínas de biomasa RHOM. A) Separación del extracto líquido después de una centrifugación, B) Transferencia del sobrenadante de la extracción de RHOM a una celda de 1 cm de camino de haz para medir absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible, C) Muestra en la celda con el extracto de RHOM rico en ficobiliproteínas. Fotos: Alejandra Torres Ariño.....	26
9	Diagramas de columna para cromatografía. A) De exclusión molecular, técnica para la separación de macromoléculas disueltas por tamaño, consiste de una fase estacionaria (sólida) y la fase móvil (líquida) (Vázquez 2018), B) De intercambio iónico, técnica para la separación de iones y moléculas polares con base al tipo de carga complementaria (Castaños 2015).....	29
10	Muestras recuperadas después de pasar por las columnas de cromatografías.....	30
11	Producción de RHOM en contenedores de 20 L con distintos medios de cultivo. A, C y E) Medio f/2; B, D y F) Medio QFF.....	31

Figura No.	Descripción	Pág.
12	Tendencia del pH en los cultivos RHOM con diferentes medios de cultivos f/2 y QFF durante 24 días.....	33
13	Curva de salinidad de los cultivos RHOM en distintos medios de cultivos; f/2 y QFF durante 24 días.....	34
14	Curva de temperatura (°C) promedio dentro del laboratorio para los cultivos RHOM durante 24 días.....	36
15	Curva de crecimiento de <i>R. marinus</i> determinada mediante el método de recuento celular con cámara de Neubauer. A) f/2, B) QFF, C) Promedio en ambos medios y D) Representación logarítmica.....	37
16	Incremento en peso seco de <i>R. marinus</i> en medio QFF (A), f/2 (B) y el promedio en ambos medios (C).....	38
17	Valores de proteína en los medios de cultivo f/2 y QFF, representados en porcentaje respecto al peso seco (%).....	39
18	Concentración de ficoeritrina en los cultivos de RHOM en los medios f/2 y QFF, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	41
19	Valores de ficocianina en los medios de cultivo f/2 y QFF expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	42
20	Contenido de aloficocianina en los medios de cultivo f/2 y QFF, expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Descripción	Pág.
I	Principales especies de cianobacterias y microalgas con potencial biotecnológico.....	2
II	Componentes de los medios f/2 y QFF utilizados para el cultivo de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	15
III	Componentes de la solución de metales traza para el medio f/2....	16
IV	Valores de concentración para ficobiliproteínas en medio f/2 y QFF.....	45
V	Degradación de pigmentos presentada durante el análisis de la biomasa seca f/2 y QFF.....	45
VI	Valores de salinidad del extracto, después de pasar por la columna de exclusión molecular.....	46
VII	Valores de salinidad del extracto, después de haber pasado por una columna de intercambio iónico y lavado de columna con buffer.....	46
VIII	Absorbancias a 280 y 545 nm obtenidas para la fracción rica en B-ficoeritrina.....	46

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Resumen.....	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice de figuras.....	IV
Índice de Tablas.....	V
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	7
3 JUSTIFICACIÓN.....	11
4 HIPÓTESIS.....	12
5 OBJETIVOS.....	12
5.1 General.....	12
5.2 Particular.....	12
6 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	13
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1 Origen de la microalga.....	14
7.2 Preparación de medios de cultivo.....	14
7.3 Preparación de contenedores.....	16
7.4 Preparación de inóculo.....	17
7.5 Parámetros físicos y químicos.....	18
7.6 Conteo celular y obtención de la curva de crecimiento.....	19
7.7 Determinación de peso seco.....	19
7.8 Evaluación bioquímica.....	20
7.9 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	20
7.10 Protocolo del método Lowry.....	21
7.11 Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas.....	23
7.11.1 Preparación de buffer de fosfato de sodio 0.01 M/cloruro de sodio 1 M a pH 7.....	23
7.12 Obtención de biomasa para evaluación de ficobiliproteínas.....	23
7.13 Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas, primer grupo.....	24
7.14 Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas, segundo grupo.....	25
7.15 Cuantificación espectrofotométrica de ficobiliproteínas.....	27
7.16 Purificación de la B-ficoeritrina.....	27
7.17 Diseño de experimentos y análisis estadístico.....	30
8 RESULTADOS.....	32
8.1 Condiciones de cultivo de RHOM a escala laboratorio.....	32
8.2 Concentración de hidrógenos (pH).....	32
8.3 Salinidad.....	34
8.4 Temperatura.....	35
8.5 Curva de crecimiento y peso seco.....	36
8.6 Proteínas.....	39
8.7 Cuantificación de ficobiliproteínas en los cultivos de RHOM.....	40

	Pág.
8.7.1 Cuantificación de ficobiliproteínas, primer grupo.....	40
8.7.2 Cuantificación de ficobiliproteínas, segundo grupo.....	44
8.8 Purificación de la B-ficoeritrina.....	45
9 DISCUSIÓN.....	47
9.1 Comportamiento celular.....	47
9.2 Salinidad.....	48
9.3 pH.....	49
9.4 Temperatura.....	50
9.5 Cinética de crecimiento.....	50
9.6 Evaluación bioquímica.....	51
9.7 Ficopigmentos.....	52
9.8 Purificación de la B-ficoeritrina.....	55
10 CONCLUSIONES.....	56
11 REFERENCIAS.....	58