



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Producción y caracterización química parcial del
pigmento de *Brachybacterium sp.***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química Farmacéutica

AUTOR

Liz Katerine MENDOZA JULCA

ASESOR

Dra. Luisa Pacífica NEGRÓN BALLARTE

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

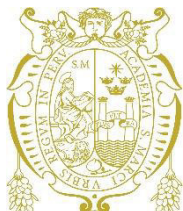
Referencia bibliográfica

Mendoza L. Producción y caracterización química parcial del pigmento de *Brachy bacterium sp.* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Liz Katerine Mendoza Julca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46967110
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luisa Pacifica Negrón Ballarte
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07237298
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0523-7958
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40957382
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	20904674
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Juan José Ponce Cobos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10303874

Datos de investigación	
Línea de investigación	Microorganismos de interés industrial, ambiental y bioprocesos
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Oficina de Fomento a la Investigación Científica del Consejo Superior de Investigaciones del Vicerrectorado de Investigación y Facultad de Farmacia y Bioquímica. Código N° 0043/FFBUI/2013. R.D. N° 00093-FFB-D2013
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Jirón: Puno N°: 1002 Latitud: -12.05496798631775 Longitud: -77.02338671273681
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2013 - 2015
URL de disciplinas OCDE	Biología agrícola, Biología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



Tesis Liz
Mendoza_22-10-202

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PARCIAL DEL PIGMENTO DE
Brachy bacterium sp.”**

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

LIZ KATERINE MENDOZA JULCA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

17 (Diecisiete) – Aprobado con mención honrosa

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR (R.D. N.º 000346-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes
- Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
- Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar
- Mg. Juan José Ponce Cobos

Lima, 07 de abril de 2022.



Firmado digitalmente por ZAVALETA
PESANTES Amparo Iris FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 07.04.2022 18:46:07 -05:00

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Presidenta

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la gracia y la fuerza de voluntad para la obtención de este logro profesional.

A mis abuelos: Julio y Valeriana, por su cariño, consejos y confianza depositada en mí.

A mi tío Jorge, por todo su apoyo de forma incondicional durante esta fase de mi vida.

A mis padres: César y Myriam, por proporcionarme su cariño y su apoyo diario.

A Jackelyn B. y Pablo L. por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Luisa Negrón Ballarte, por su orientación, tiempo y paciencia brindada en la elaboración de este trabajo, facilitando la ejecución y su correcto término.

A la Doctora Amparo Zavaleta, por el apoyo brindado.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM por haberme brindado sus espacios para la ejecución de esta tesis.

A todos mis amigos del Laboratorio por su ayuda en la realización de la tesis.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Planteamiento del problema.....	1
I.2. Objetivos	2
I.2.1. Objetivo general.....	2
I.2.2. Objetivos específicos	2
I.3. Importancia y alcance de la investigación (justificación)	2
I.4. Limitaciones de la investigación	2
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
II.1. Marco teórico	3
II.2. Antecedentes del estudio	14
II.3. Bases teóricas.....	16
II.4. Glosario de términos	18
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	20
III.1. Hipótesis	20
III.2. Variables	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
IV.1. Área de estudio	21
IV.2. Diseño de investigación	21
IV.3. Población y muestra.....	21
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información	21
V. RESULTADOS	28
V.1. Presentación y análisis de los resultados.....	28
VI. DISCUSIÓN.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	45
VIII. RECOMENDACIONES.....	46
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
X. ANEXOS.....	54

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Agar BEA	Agar Bilis Escualina
Agar TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
ARN	Ácido Ribonucleico
CMC	Carboximetilcelulosa
DO	Densidad Óptica de Absorbancia
FDA	Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration) de los EE. UU.
FeCl ₃	Cloruro de Hierro
HCl	Ácido Clorhídrico
LB	Medio de Cultivo LB (Luria Bertani)
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
O ₂	Oxígeno
PB	Par de Bases
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
pH	Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones de Hidrógeno (Expresada en Molaridad)
R ²	Coeficiente de Determinación
TAE	Tris, Ácido Acético, EDTA
TSA	Agar Trypticosa Soya
TSB	Caldo Trypticosa Soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
RPM	Revoluciones por Minuto

RESUMEN

En el medio ambiente hay muchos organismos que producen pigmentos, tales como hongos, levaduras y bacterias. Por tal motivo, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la producción y caracterización parcial del pigmento de *Brachybacterium sp.* El trabajo experimental se llevó a cabo en tres pasos. En primer lugar, se determinó las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración salina para la producción de biomasa y pigmento. Posteriormente, se extrajo el pigmento y se realizó un diseño experimental para optimizar la producción del pigmento amarillo variando el pH, la concentración salina y la temperatura. Por último, se caracterizó parcialmente el pigmento por medio de una marcha fitoquímica. Se evaluó la producción de pigmento en las siguientes condiciones: pH 5 a 9, temperatura de 10 a 42 °C y concentración salina 0,9% a 10,0%. Se observó la máxima producción de pigmento a pH 8, temperatura 37 °C y concentración salina 0,9%. El pigmento fue obtenido por extracción con metanol. Los extractos de pigmentos fueron analizados por espectrofotometría a 403 nm, lo que indica que el pigmento es un posible carotenoide. Los datos obtenidos en la primera fase se utilizaron para el diseño factorial, del cual se reveló que de 2 factores (pH y temperatura) tienen gran influencia en la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* ($p < 0,05$) y las óptimas condiciones serían pH 7,5; concentración salina 2% y 35 °C. En la marcha fitoquímica se observó la presencia de carbohidratos, proteínas y núcleos esteroideos.

Palabras clave:

Brachybacterium sp., pigmento, producción.

SUMMARY

In the environment there are many organisms that produce pigments, such as fungi, yeasts and bacteria. Therefore, the main objective of this work was to study the production and partial characterization of pigment *Brachybacterium sp.* The experimental work was carried out in three steps. First, was determined the optimum conditions of pH, temperature and salt concentration for biomass production and pigment. Subsequently, was removed the pigment and an experimental design to optimize production of the yellow pigment concentrations varying pH, salt concentration and temperature. Finally, the pigment is partially characterized by a phytochemical action. Pigment production was assessed the following conditions: pH 5 to 9, temperature 10 to 42 °C and salt concentration of 0.9% to 10,0%. The maximum pigment production was observed at pH 8, 37 °C temperature and concentration 0.9% saline. The pigment was obtained by extraction with methanol. Pigment extracts were analyzed by spectrophotometry at 403 nm, indicating that the pigment is a carotenoid possible. The data obtained in the first phase were used for the factorial design, which revealed that 2 factors (pH and temperature) have great influence on the production of pigment *Brachybacterium sp.* ($p < 0,05$) and the optimal conditions would be pH 7,5; 2% salt concentration and 35 °C. In the phytochemical up the presence of carbohydrates, protein and steroid nuclei was observed.

Key word:

Brachybacterium sp., pigment, production.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema

El color es un factor importante y es probablemente una de las primeras características percibidas en un producto. Los pigmentos naturales extraídos de vegetales y microorganismos son una gran alternativa debido a que son más seguros que los colorantes artificiales.

En los últimos años, los estudios relacionados a la obtención de estos colorantes se han intensificado, esto con el objetivo de reemplazar a los colorantes sintéticos los cuales han sido asociados a efectos adversos y tóxicos en los alimentos.

No obstante, la extracción de colorantes a partir de plantas y animales requiere procesos muy costosos, debido al bajo rendimiento de las materias primas y al lento crecimiento de estos. Por otro lado, los microorganismos son fáciles de aislar, seleccionar, mantener, modificar genéticamente y conservar; además poseen una gran velocidad de crecimiento, asimilan desechos alimenticios y producen alta cantidad de pigmento por célula cultivada.

Los pigmentos bacterianos ofrecen ventajas en términos de producción debido al fácil manejo y control de los parámetros de cultivo como pH, temperatura, concentración salina, micronutrientes, entre otros; con el cual se optimiza la producción de estos pigmentos.

Actualmente, la búsqueda de pigmentos microbianos se ha incrementado por la gran demanda en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, textil, etc. Desde este punto de vista y teniendo en cuenta que Perú posee una gran diversidad microbiana, se presenta esta investigación utilizando una cepa nativa productora de pigmentos de gran interés industrial.

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Producir y caracterizar parcialmente el pigmento de *Brachyacterium sp.* L5.

I.2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la curva de crecimiento y producción del pigmento de *Brachyacterium sp.* L5.
2. Determinar las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración salina para la producción de pigmento por *Brachyacterium sp.* L5.
3. Aplicar un modelo estadístico para la optimización de la producción del pigmento de *Brachyacterium sp.* L5.
4. Caracterizar parcialmente el pigmento de *Brachyacterium sp.* L5 por medio de una marcha fitoquímica.

I.3. Importancia y alcance de la investigación (justificación)

- La producción de pigmentos bacterianos ofrece ventajas en términos de producción debido a una fácil técnica de cultivo y el manejo de parámetros (pH, temperatura, concentración salina, etc.), con el cual, se optimiza la producción de estos pigmentos, en contraste a los obtenidos de plantas y/o animales, en los cuales se utiliza mucho tiempo y gran cantidad de sustrato.
- Este pigmento bacteriano tiene aplicación en diferentes industrias como textil, alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras, por ser biodegradables y, por lo tanto, limpios y sostenibles. Por otro lado, no se han realizados muchos estudios sobre la extracción y producción del pigmento en cepas del género *Brachyacterium sp.*

I.4. Limitaciones de la investigación

- Falta de implementación de técnicas de purificación y concentración.
- Técnicas de análisis de la composición de la estructura química costosas.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

1. Pigmentos

1.1. Definición: Los pigmentos son sustancias químicas capaces de absorber la luz en el intervalo de longitud de onda⁽⁵⁵⁾. Estos compuestos y su producción dependen específicamente de la estructura del cromóforo, la cual capta la energía y la excitación generada por el electrón de una órbita exterior. Es así, como la energía que no se absorbe se refleja posteriormente, siendo captada por el ojo humano y descifrada como el color^(1,2).

1.2. Clasificación: Son clasificados según sus características, entre ellas el origen de los pigmentos, la estructura del cromóforo y si son aditivos alimenticios, los cuales pueden ser certificados y no certificados, según la FDA⁽³⁾.

Los pigmentos naturales comprenden una amplia gama de compuestos estructuralmente diversos que, debido a la polaridad de la molécula y las propiedades químicas y físicas, se dividen en dos grupos: pigmentos solubles en agua (moléculas hidrófilas) y pigmentos solubles en lípidos (moléculas hidrófobas). Las antocianinas rojo-azul-púrpura y las betalaínas rojas son generalmente solubles en agua, mientras que las clorofilas verdes y los carotenoides amarillo-naranja-rojo son liposolubles⁽⁵⁶⁾.

Los pigmentos naturales pueden ser obtenidos de dos fuentes principales: plantas y microorganismos. Los pigmentos de plantas tienen numerosas desventajas como la inestabilidad a la luz, el calor o el pH, baja solubilidad y a menudo no son disponibles a lo largo del año.

Las ventajas de producción de pigmentos bacterianos incluyen el rápido y fácil crecimiento en el medio de cultivo, la independencia de

condiciones meteorológicas y la diversidad de colores. De allí, la producción de pigmentos microbianos es ahora uno de los campos emergentes de investigación para demostrar su potencial para varios usos industriales ⁽⁴⁾.

1.3. Pigmentos microbianos: La producción de pigmentos microbianos es un fenómeno reciente (Tabla 1) ⁽⁵⁸⁾.

Tabla 1. Desarrollo cronológico de pigmentos microbianos⁽⁵⁸⁾

Año	Descripción
1856	El pigmento de la malva de Perkin fue descubierto y el colorante del alquitrán fue sintetizado.
1884	<i>Monascus sp.</i> fue un cultivo tradicional, utilizado en el oriente para hacer el vino de arroz rojo y el arroz rojo chino.
1954	El primer pigmento de carotenoide extraído del <i>Cryptococcus</i> fue comercializado.
1963	Comenzó la producción de carotenoides de <i>Rhodotorula sp.</i>
1970	La Astaxantina fue aislada de <i>Phaffia rhodozyma</i> por primera vez.
Principios de la década de 1980	Se inició el uso de betacaroteno de <i>Dunaliella salina</i> .
1985	Los productos de betacaroteno fueron producidos comercialmente por Betatene Limited Corporation, así como, el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> a gran escala para su producción.

Fuente: Mishra, Bishwambhar, Sunita Varjani, and G. Karthikeya Srinivasa Varma. "Agro-industrial by-products in the synthesis of food grade microbial pigments: An eco-friendly alternative." Green Bio-processes. Springer, Singapore, 2019. 245-265.

Los microorganismos como hongos, levaduras y bacterias producen una gran variedad de biopigmentos como carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas, monascinas, violaceína o índigo ⁽⁵⁷⁾.

Algunos microorganismos están asociados a los alimentos que nosotros comemos y son responsables de la formación de ciertos productos alimenticios por el proceso de fermentación y pueden ser utilizados también como una fuente de alimento, bajo la forma de proteínas celulares, y suplementos alimenticios, bajo la forma de pigmentos, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, y enzimas. De esta manera, los pigmentos de fuentes microbianas son una buena alternativa.

Los colorantes naturales se utilizan en alimentos para niños, cereales de desayuno, pastas, salsas, queso procesado, jugos de fruta, productos lácteos vitaminados, y algunas bebidas energéticas⁽⁶⁾.

Los pigmentos naturales poseen actividad anticancerígena, contienen pro-vitamina A y tienen algunas características deseables, como estabilidad a la luz, calor y pH⁽⁵⁾. Así, el sector alimenticio ha llegado a estar cada vez más interesado en el uso de la tecnología microbiana para producir pigmentos para su uso en alimentos. Esto también ayuda a superar la preocupación por los efectos adversos de la adición de colorantes sintéticos en productos alimenticios.

Además, los colorantes naturales, no serán solo beneficiosos para la salud de seres humanos, también será de ayuda a la preservación de la biodiversidad, ya que disminuirá los daños de productos químicos lanzados al ambiente durante la producción de colorantes sintéticos⁽⁶⁾.

1.1.1. Clasificación de pigmentos bacterianos: Teniendo en cuenta las características químicas, algunos de los pigmentos naturales más importantes son los carotenoides, flavonoides, tetrapirroles y algunas xantófilas como la astaxantina. El pigmento de más uso en las industrias es el β -caroteno que

se obtiene de algunas microalgas y cianobacterias. La Astaxantina es extraída de *Phaffia rhodozoa* y de *Haematococcus pluvialis*, es un pigmento rojo de gran valor comercial y es usado en alimentos, productos farmacéuticos e industria de la acuicultura. Los microorganismos que tienen la capacidad de producir pigmentos en altas concentraciones incluyen especies como las de *Monascus*, *Paecilomyces*, *Serratia*, *Cordyceps*, *Streptomyces* y aquellas que producen pigmentos de color amarillo rojizo y azules son *Penicillium herquei* y *Penicillium atrovenerum*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus Sarcina*, *Monascus purpureus*, *Phaffia rhodozyma*, *Bacillus sp.*, *Achromobacter*, *Yarrowia* y *Phaffia* (Tabla 2). Los hongos que producen los pigmentos de monascus, han sido utilizado en la producción de alimentos tradicionales asiáticos del este, tales como vino, rojo del arroz y cuajada de habichuelas rojas⁽⁷⁾.

Tabla 2. Lista de microorganismos productores de pigmentos

MICROORGANISMO	MOLÉCULA	COLOR
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxantina	Rosado oscuro
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaxantina	Rosado oscuro
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Cantaxantina	Rojo oscuro
<i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Zeaxantina	Amarillo
<i>Achromobacter</i>	Zeaxantina	Crema
<i>Bacillus</i>	Zeaxantina	Marrón
<i>Brevibacterium sp.</i>	Zeaxantina	Amarillo naranja
<i>Corynebacterium michigannise</i>	Zeaxantina	Gris-crema
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigodina	Azul
<i>Rugamonas rubra</i> <i>Streptoverticillium</i>	Prodigiosina	Rojo

<i>rubrireticuli, Vibrio gaogenes, Alteromonas rubra</i>		
<i>Rhodococcus maris</i>	Prodigiosina	Rojo azulado
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Rosado rojizo
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Cantaxantina	Rojo oscuro
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stafiloxantina, Zeaxantina	Amarillo dorado
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violaceina	Púrpura
<i>Serratia marcescens, Serratia rubidaea</i>	Prodigiosina	Rojo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina	Azul verdoso
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xantomonadina	Amarillo
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceina	Púrpura

Fuente: Elaboración propia.

La astaxantina es principalmente proveída por *Xanthophyllomyces dendrorhous* (levadura roja) y *Haematococcus Pluvialis* (alga verde). La producción de astaxantina usando *Agrobacteria aurantiacum* ha sido menos investigado con respecto a *Xanthophyllomyces dendrorhous*⁽⁸⁾.

Penicillium oxalicum es un hongo con la propiedad de producir un colorante rojo que se puede aplicar en las industrias del alimento y cosmética⁽⁹⁾.

Algunos ejemplos de pigmentos naturales son:

- Riboflavina: es una vitamina hidrosoluble amarilla producida por diversos microorganismos. La síntesis química actualmente está siendo reemplazada por procedimientos biotecnológicos competitivos usando la *Ashbya gossypii* de los ascomicetos, el hongo filamentoso

Candida famata, o una bacteria como *Bacillus subtilis*. Se emplea en alimentos como los cereales, salsas, queso procesado, jugos de fruta, productos lácteos vitaminados, y algunas bebidas energéticas⁽¹⁰⁾.

- β -caroteno: *Phycomyces* y *Mucor circinelloides* refieren a una principal fuente de β -caroteno. La Comisión Europea considera que el β -caroteno generado por la fermentación de la *Blakeslea trispora* es semejante al material químicamente sintetizado usado como colorante en el alimento y es por lo tanto aceptable su uso como agente colorante en los comestibles⁽¹¹⁾.
- Cantaxantina: es el principal pigmento carotenoide que varía de un color anaranjado a rosado oscuro y es producido por *Bradyrhizobium* (colonias aisladas de nódulos del vástago de la especie *Aeschynomene*) y *Halobacterium spp.* La Cantaxantina es un potente antioxidante e inhibe la oxidación de lípidos en liposomas⁽¹²⁾.
- Carotenoides: son pigmentos que van de tonalidades amarillos a los naranja-rojizos y son ubicuos en naturaleza. Un gran número de microorganismos producen este pigmento tal como *Serratia* y *Streptomyces*. Los carotenoides son ampliamente utilizados como colorantes en los alimentos. Gran parte de microorganismos que producen carotenoides pertenecen a *Myxococcus*⁽¹³⁾, *Streptomyces*⁽¹⁴⁾, *Mycobacterium*, *Agrobacteria*⁽¹⁵⁾ y *Sulfolobus*⁽¹⁶⁾.
- Prodigiosina: es un pigmento rojo, producido por varios microorganismos, tales como, *Serratia marcescens*, *Vibrión psychoerythrus*, *Rugamonas rubra*; actinomicetos, tales como, *Streptoverticillium rubrireticuli* y otras eubacterias. Este pigmento es conocido por tener actividad antibacteriana, antimalárica, antineoplásica y antibiótica⁽¹⁷⁾.

- Picocianina: es un pigmento azul, producido por cianobacterias que contienen la clorofila A. Este colorante azul es conocido por el nombre Espirulina (alga azulverdosa), el cual también es el nombre de un suplemento dietético rico en proteínas y consiste en cianobacterias secas.
- Violaceina: es un pigmento versátil proveniente de *Chromobacterium violaceum*, que posee diversas actividades biológicas. Este ha ganado importancia en diversas industrias, tales como, cosmética, alimenticia, textil y médica.
- Astaxantina: es un pigmento naranja rojizo y es producido por microorganismos, tales como, levadura roja *Xanthophyllomyces dendrorhous*, algas verdes *Heamatococcus pluvialis*, *Agrobacterium aurantiacum* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*⁽¹⁸⁾.

2. *Brachybacterium sp.*

2.1. Generalidades del género *Brachybacterium sp.*: El género *Brachybacterium* pertenece a la familia Dermabacteraceae, clase Actinobacteria y suborden Micrococccineae; sus miembros son bacterias grampositivas que contienen ADN con alto porcentaje de guanina y citosina. Desde que el género fue descrito en 1988⁽¹⁹⁾, 16 especies han sido aisladas de diferentes ambientes como es el *Brachybacterium alimentarium*, *B. conglomeratum*, *B. faecium*, *B. fresconis*, *B. muris*, *B. nesterenkovi*, *B. paraconglomeratum*, *B. phenoliresistens*, *B. rhamnosum*, *B. sacelli*, *B. saurashtrense*, *B. squillarum*, *B. tyrofermentans* y *B. zhongshanense*⁽²⁰⁾.

2.2. Características morfológicas: Las bacterias del género *Brachybacterium sp.* varían su morfología, desde una forma cocoide (irregular) en la fase estacionaria hasta las barras cortas en la fase exponencial⁽²¹⁾. , *B. squillarum* posee un diámetro de 1,0 – 1,5 µm

en su forma cocoide, mientras que *B. nesterenkovi*, *B. faecium*, *B. conglomeratus* y *B. rhamnosum* poseen un diámetro de 0,5 – 1 μm . En la fase exponencial todos miden aproximadamente 2 μm . Este cambio característico se observa en la figura 1. Las células no poseen movilidad y no forman endoesporas^(22, 23, 24).

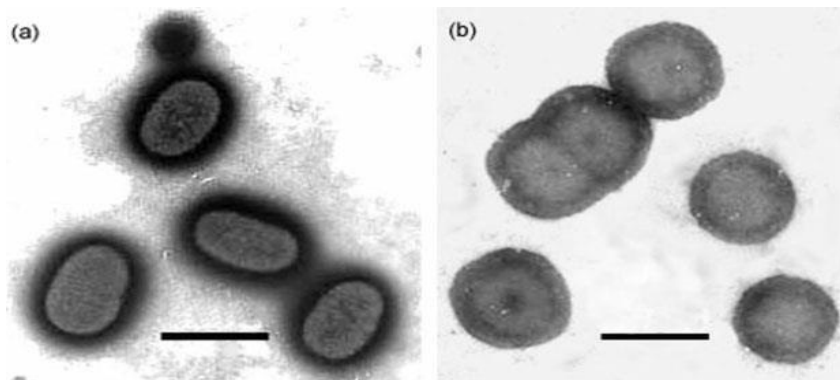


Figura 1. Características morfológicas de *Brachybacterium sp.* en la fase exponencial. (a; barras) y estacionaria (b; cocoide)

2.3. Biología de *Brachybacterium sp.*:

2.3.1. Forma de reproducción: División celular.

2.3.2. Floculación: Las bacterias son competentes, bajo ciertas condiciones de estrés, de producir quistes y flóculos, aumentando la supervivencia de las mismas. Este acontecimiento puede generarse como resultado de la edad, el estrés por falta de agua o las circunstancias del cultivo. Durante el crecimiento, *Brachybacterium sp.*, bajo ciertas condiciones de cultivo, se promueve la síntesis de polisacáridos extracelulares y se induce la formación de agregados celulares⁽²⁵⁾.

2.3.3. Requerimientos nutricionales de *Brachybacterium sp.*:

Las especies de *Brachybacterium sp.*, difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono (Tabla 3). Estas bacterias usan para su

crecimiento diferentes monosacáridos y disacáridos, siendo la glucosa la más utilizada; sin embargo, *B. squillarum* sp., *B. muris* y *B. nesterenkovii*, no pueden utilizarla como única fuente de carbono en crecimiento. Además, la producción de pigmentos bacterianos es afectado por el tipo de carbono como glucosa, fructuosa, maltosa, lactosa, galactosa, etc. La glucosa y otros oligosacáridos son la mejor fuente para el crecimiento y producción de pigmentos. Cuando al microorganismo se le agota la fuente de carbono exógena y se encuentra bajo estrés nutricional, forma agregados celulares conocidos con el nombre de quistes, que le permiten sobrevivir y tomar carbono almacenado de forma endógena. Este proceso es regulado por su ciclo metabólico. Sin embargo, el crecimiento empleando los hidratos de carbono es más restringido en algunas especies, como el *B. tyrofermentans*, debido a que no degrada D-fructuosa, Maltosa, D-arabinosa y sucrosa⁽²⁶⁾.

Tabla 3. Características de diferentes especies del género *Brachybacterium*

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Producción de ureasa	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Producción de H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Formación de indol	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	(+)
Reducción de nitrato	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:										
4 °C	-	-	-	+	+	-	ND	+	+	-
37 °C	+	(+)	+	+	-	(+)	ND	+	-	+
42 °C	(+)	-	-	-	-	-	ND	(+)	-	(+)
Crecimiento a:										
pH 5,0	-	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-
pH 10,0	+	-	-	-	-	+	ND	-	-	+
Crecimiento en la presencia de NaCl al 15%	-	+	-	-	+	+	(+)	+	(+)	+
Hidrólisis de:										
Caseína	-	-	-	+	+	-	ND	-	-	-

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Almidón	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Tween 20	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tween 80	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de ácido a partir de:										
D-Arabinosa	+	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-
D-Fructuosa	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DL-Lactosa	+	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-
Maltosa	+	-	(+)	+	-	-	+	(+)	-	+
D-Manosa	(+)	(+)	-	+	(+)	+	+	-	+	-
Melibiosa	-	-	-	+	+	+	ND	+	+	+
Rafinosa	-	-	(+)	+	+	+	-	-	(+)	-
L-Ramnosa	+	(+)	-	-	+	(+)	-	-	(+)	-
D-Ribosa	+	-	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sucrosa	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
D-Xilosa	-	-	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
Peptidoglicano con:										
Glicina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido aspártico	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Lípido(s) polar(es) desconocido(s) distintivo(s):										
Glicolípido	GL3	GL3		GL3		GL3	GL3	GL3	GL3	GL3
Fosfolípido	PL1, 2	PL1, 2	PL1-3	PL1-3	PL1	PL1, 2		PL1-4	PL1, 2	PL1-3
Fosfoglicolípido				PGL				PGL		PGL
Lípido polar	L1-3, 5-7	L1-4	L1, 3-5, 7	L1-3	L5, 6	L1-6		L1-3, 5, 6	L1, 2, 6-8	L1-3, 5
Aminofosfoglicolípido							APGL1, 2			APGL1, 2
Sistema quinona:										
MK-6	3%							1%		
MK-7	88%	63%	99%	100%	64%	67%	Predominante	93%	98%	98%
MK-8	9%	36%	1%		36%	27%		6%	2%	2%
MK-9		1%								
MK-7(H ₂)						6%				

Especies: 1, *B. muris* C3H-21^T; 2, *B. sacelli* DSM 14566^T; 3, *B. nesterenkovi* CCM 2432; 4, *B. rhamnosum* DSM 10240^T; 5, *B. alimentarium* CCM 4520^T; 6, *B. fresconis* DSM 14564^T; 7, *B. paraconglomeratum* DSM 46341^T; 8, *B. faecium* CCM 4372^T; 9, *B. tyrofermentans* CCM 4521^T; 10, *B. conglomeratum* CCM 2589^T.

Fuente: Buczolits, S., Schumann, P., Weidler, G., Radax, C., & Busse, H. J. (2003). *Brachybacterium muris* sp. nov., isolated from the liver of a laboratory mouse strain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1955-1960.

2.4. Efectos de factores fisicoquímicos sobre *Brachybacterium sp.*:

2.4.1. pH: Las condiciones de pH varían en las especies de *Brachybacterium sp.* *Brachybacterium zhongshanense* necesita un rango de pH de 5 a 8 para su adecuado crecimiento, mientras que *Brachybacterium squillarum* crece en un rango de 6,0 a 9,0, con pH óptimo de 7,0, en condiciones aerobias. *B. Nesterenkovii* y *B. rhamnosum* crecen un pH óptimo de 5,0⁽²⁰⁻²⁸⁾.

2.4.2. Temperatura: Especies de *Brachybacterium sp.* solicitan un rango de temperatura de crecimiento que varían de 25 a 30 °C, excepto para *B. zhongshanense*, cuyo rango de temperatura es de 25 a 40 °C y para *B. nesterenkovii*, que crece entre 18 a 37 °C. El cambio de este aspecto influye significativamente en el metabolismo. Si la temperatura no es la adecuada, puede reducir o inhibir la formación de metabolitos secundarios, como los pigmentos⁽²⁰⁾.

2.4.3. Concentración salina: Las especies de *Brachybacterium sp.* crecen óptimamente en concentraciones de NaCl de 0 a 7%, a excepción de *B. muris* que crece hasta NaCl 10% y de *B. nesterenkovii* que crece óptimamente en un rango de NaCl de 0 a 0,5%⁽²²⁾.

2.4.4. Aireación: Las células de esta bacteria se multiplican normalmente en presencia de oxígeno, pero hay excepciones, como *B. zhongshanense*, que posee un buen crecimiento en anaerobiosis, y *B. muris*, que crece en condiciones microaeróbicas⁽²⁰⁾.

2.5. Pigmento del género *Brachybacterium sp.*: Muchos representantes del suborden Microccocineae producen pigmentos,

los cuales varían de colores desde un amarillo a una tonalidad rojiza, de diferente composición e intensidad⁽²⁹⁾.

Muchos de estos organismos analizados han reportado la producción de carotenoides de diferentes tipos y pesos moleculares, por ejemplo, algunas especies y subespecies del género *Brevibacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Agromyces* y *Leucobacter chromiireducens* subsp. *solipictus* y, en algunos de ellos, son inducidos por la luz.

En el análisis de los pigmentos, se debe tomar en cuenta las condiciones de crecimiento que pueden ejercer efecto en la formación y la producción de pigmentos^(30, 31, 32, 33).

La producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* varía según especie. Ejemplos de este, tenemos *B. zhongshanense*, el cual posee un color crema en placas de LB; *B. squillarum*, posee un color amarillo; *B. muris*, cuyas colonias son translucidas con una pigmentación ligeramente amarilla; *B. nesterenkovii*, las colonias se observan de color amarillo limón en agar BEA; y *B. conglomeratum* con colonias de color amarillas y amarillas verdosas^(20,28).

II.2. Antecedentes del estudio

El género *Brachybacterium* pertenece a la familia Dermabacteraceae, clase Actinobacteria y suborden Micrococccineae; sus miembros son bacterias grampositivas que contienen DNA con alto porcentaje de guanina y citosina^(19, 22). Desde que el género fue descrito en 1988, 14 especies han sido aislado de diferentes ambientes como es el *Brachybacterium alimentarium*, *B. conglomeratum*, *B. faecium*, *B. fresconis*, *B. muris*, *B. nesterenkovii*, *B. paraconglomeratum*, *B. phenoliresistens*, *B. rhamnorum*, *B. sacelli*, *B. saurashtrense*, *B. squillarum*, *B. tyrofermentans*, y *B. zhongshanense*^(23,26).

Muchos de los representantes del suborden Micrococccineae producen pigmentos, los cuales típicamente van desde amarillo al rojo. La composición química de los pigmentos no está regularmente determinado en estudios taxonómicos de representantes del sub orden Micrococccineae⁽²⁸⁾. Se ha aislado una cepa de *Brachy bacterium sp.*, que posee un pigmento amarillo desconocido, el cual se producirá y caracterizará en esta tesis. De acuerdo al estudio de Saitama, 2008⁽⁴⁹⁾, *Brachy bacterium sp.* cepa LB25 produce una amilasa formadora de maltooligosacaridos el cual mejora la producción selectividad de maltotriosas con la adición de dimetilsulfoxido y de etanol, como resultado, el porcentaje de maltotriosas formadas en presencia de etanol fue mayor que la formada por la amilasa industrial de *Micro bacterium imperiale*. En China, un grupo de investigadores aislaron una cepa de *Brachy bacterium zhongshanense sp.* al cual le midieron su capacidad de degradar celulosa utilizando como sustrato tallo de la paja de arroz seco. Posteriormente, se determinó el porcentaje de descomposición de celulosa que realizó dicha cepa, el cual fue de $3,64 \pm 1,29\%$ después de 6 días de incubación.

Los microorganismos pigmentados han despertado el interés de la comunidad científica por su papel en estudios taxonómicos y su potencial biotecnológico en procesos como la fermentación y los bioprocesos en la ingeniería⁽⁵⁰⁾. La más grande distribución de pigmentos son los carotenoides. Estos juegan un papel importante en la bacteria en el proceso de la fotosíntesis, previniendo el daño solar y confiriendo resistencia oxidativa (debido a la formación de radicales libres en la bacteria). Los pigmentos morados y azules en bacterias son menos comunes, la violacina (pigmento morado) ha sido encontrada en el género *Chromobacterium*, *Janthinobacter* y *Iodobacter*⁽⁵¹⁾, la Indogoidina (pigmento azul) ha sido encontrado en bacterias que pertenecen al género *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Corynobacterium* y *Vosegesella*⁽⁵²⁾. La expresión de los pigmentos puede ser afectada por un número de factores exógenos, incluyendo la disponibilidad de oxígeno, la condición alimenticia, la temperatura, la edad de la colonia, y la variación de tensión⁽⁵³⁾.

Guoxia Zhang y col., 2007⁽²⁰⁾ estudiaron fenotípicamente 6 especies del género *Brachybacterium* sp. (*B. muris*, *B. nesterenkovii*, *B. rhamnosum*, *B. sacelli*, *B. fresconis*, *B. paraconglomeratum*), la mayoría de estas crecen óptimamente en un rango de temperatura de 27-30 °C, pH de 5-10, NaCl 5-10% y todos crecen aeróbicamente. De todos ellos *B. muris* pudo degradar D-manosa, sucrosa, maltosa, D-fructuosa y L-ramnosa; y *B. rhamnosum*, D-manosa, sucrosa, maltosa, D-fructuosa y sorbitol, todas fuentes de carbono. Gargi Goswami y col., 2007⁽⁴²⁾ estudiaron una cepa de pigmentación amarilla y se observó que la producción del color comenzaba en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y se prolongaba hasta el término de la fase estacionaria. Al mismo tiempo, se extrajo el pigmento por medio de solventes orgánicos, usando metanol, el cual fue analizado por medio del espectrofotómetro UV-Vis, obteniéndose picos en 437 nm, indicando que el pigmento posiblemente es carotenoide.

II.3. Bases teóricas

1. Diseño factorial: El aumento del coste de la experimentación y el reducido tiempo implica la ejecución única de experimentos indispensables. Es así, como el método tradicional de modificar un sólo factor no siempre representa la opción ideal.

El diseño estadístico de la experimentación contempla estrategias óptimas para obtener los resultados buscados. Entre ellos, encontramos a los diseños factoriales.

Los factoriales se definen como la mezcla de elementos, tales como el fósforo, nitrógeno, niveles de concentrado, entre otros, necesarios para obtener tratamientos en diseños experimentales. A través de esto, la información final de los experimentos es variada, facilitando la contrastación de los niveles de cada factor, así como también, los resultados que se obtienen de las combinaciones.

Estos diseños se dividen, principalmente, en dos: los diseños factoriales completos y fraccionados⁽³⁴⁾.

1.1. Diseño factorial completo: Se emplea cuando el número de factores a estudiar está entre dos y cinco ($2 < k < 5$), rango en el cual el tamaño se encuentra entre cuatro y 32 tratamientos, cantidad manejable en muchas situaciones experimentales.

1.2. Diseño factorial fraccionado: Favorece el estudio de un número elevado de factores con un número de experimentos mucho menor que los diseños factoriales completos.

- Diseño factorial 2^k : En estos diseños, cada factor se estudia a sólo dos niveles, donde los experimentos abarcan las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores. Los cuales se suelen denotar (+) y (-), en donde k es el número de factores a controlar.
- Diseño factorial 3^k : Abarca principalmente k factores en tres niveles cada uno, bien sea inferior (-), intermedio (·) o superior (+). La adición de un tercer nivel permite modelar con una relación cuadrática la relación entre la respuesta y cada factor.

La figura 2 muestra el domino experimental combinado para los dos factores expresado en unidades codificadas y particularizado para las variables de la reacción. Cada punto es un posible experimento.

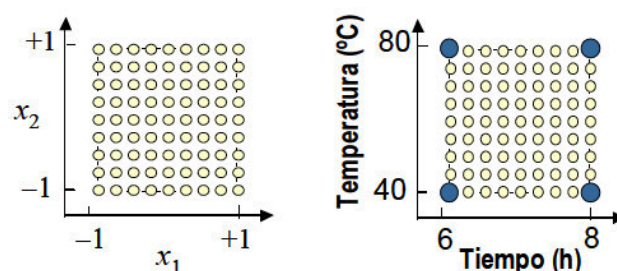


Figura 2. Domino experimental para dos factores continuos expresado en variables codificadas (izquierda) y variables reales (derecha). Los experimentos de los vértices corresponden al diseño factorial completo 2^2 .

La experimentación más económica (mínimo número de experimentos) es aquella en la que cada factor toma sólo dos valores (niveles). Y la que proporcionará la información con menor incertidumbre es aquella en la que estos valores son los extremos del dominio experimental, -1 y +1. La figura 3 muestra la matriz de experimentos que se obtiene combinando los dos niveles de los dos factores. Cada fila es un experimento y cada columna es un factor estudiado. Este diseño se denomina factorial completo 2^2 (el 2 de la base indica que cada factor toma sólo dos valores). La posición de estos 4 ($=2^2$) experimentos en el dominio experimental se muestra en la Figura 3⁽³⁵⁾.

	Matriz de experimentos		Plan de experimentación		Respuesta (% rendimiento)	
	x_1	x_2	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Ejemplo 1	Ejemplo 2
1	-	-	6	40	49 (y_1)	49 (y_1)
2	+	-	8	40	54 (y_2)	80 (y_2)
3	-	+	6	80	73 (y_3)	73 (y_3)
4	+	+	8	80	80 (y_4)	54 (y_4)

Figura 3. Diseño factorial completo 2^2 , plan de experimentación y respuestas observadas.

II.4. Glosario de términos

1. **Agar.** Soporte de cultivo en microbiología, para el crecimiento de bacterias, hongos y virus bacteriófagos.
2. **Biocolor.** Pigmento de origen bacteriano.
3. **Caracterización.** Proceso general y amplio por el cual la estructura y/o identidad de un material o sustancia y sus propiedades son probadas y medidas.
4. **Cepa.** Población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular, la que usualmente es propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.
5. **Colorante.** Sustancia soluble en agua, capaz de teñir y dar un nuevo color a un tejido, alimento, etc.; puede ser de origen natural o sintético.

6. **Diseño experimental.** Técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental.
7. **Lisis.** Proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material celular.
8. **Marcha fitoquímica.** Serie de pasos donde se observan reacciones como cambio de color, fluorescencia, reacciones para determinar la existencia de un tipo de compuesto químico de los productos naturales de las plantas.
9. **Mordiente.** Sustancia, como el Lugol, que aumenta la afinidad de la célula por el colorante. Suele añadirse después del colorante en determinadas tinciones diferenciales.
10. **Optimización.** Método para determinar los valores de las variables que intervienen en un proceso o sistema para que el resultado sea el mejor posible.
11. **Pigmento.** Sustancia colorante que se encuentra en las células de los seres vivos.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

Las condiciones óptimas de producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* son determinadas.

III.2. Variables

- pH
- Concentración Salina
- Temperatura

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

IV.2. Diseño de investigación

Experimental.

IV.3. Población y muestra

Brachybacterium sp. L5.

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

1. Materiales

1.1. Biológicos. *Brachybacterium sp.* L5 del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que fue aislado de las aguas termales del distrito de Huaraz, en la provincia de Huaraz, en el departamento de Ancash.

1.2. Medio de cultivo. Se utilizó el medio TSB y TSA (Anexos 1 y 2) para la preparación de medios líquidos y sólidos respectivamente.

2. Instrumentos y equipos:

- Balanza Analítica
- Tubos de ensayo
- Micropipetas de 1000 μ L, 20 μ L y 2 μ L
- Pipetas 10 mL
- Incubadora
- Baño María
- pHmetro
- Autoclave

- Refrigeradora
- Placas Petri
- Agitador
- Matraces de vidrio 100mL y 1000mL

3. Método experimental

3.1. Reactivación de *Brachybacterium sp.* L5. Se inició la activación de la bacteria en un medio TSB. El tiempo de activación fue de 3 días a 37 °C. Posteriormente, fue sembrado en medio TSA para su respectiva caracterización.

3.2. Preparación del inóculo: Se utilizaron inóculos de 2 días en una cantidad igual al 5% del volumen total del cultivo.

3.3. Caracterización fenotípica. Se utilizaron criterios fenotípicos (fisiológicos, bioquímicos y morfológicos) para la descripción de la familia *Dermobacteraceae* según Park y col., 2011⁽¹⁹⁾.

3.3.1. Forma y pigmentación de las colonias. La forma y la pigmentación de las colonias fueron evaluadas mediante la siembra en estrías de la cepa en el medio de cultivo TSA durante 72 horas de incubación a 37 °C.

3.3.2. Tinción Gram. Se realizó una coloración Gram para determinar la morfología de las bacterias aisladas. Se utilizó un medio de cultivo de 48 horas y se procedió a colocar unas gotas en el portaobjetos, posteriormente se aplicó el primer colorante, cristal violeta durante un minuto, se lavó con abundante agua. Se agregó el mordiente Lugol, para la fijación del colorante anterior y se decoloró con alcohol de 96° por 20 segundos. Se cubrió el portaobjetos con el colorante safranina, por 1 minuto; finalmente se observó con objetivo de inmersión⁽³⁵⁾.

3.3.3. Prueba bioquímica. se realizaron pruebas bioquímicas con agar triple azúcar y hierro (TSI) (medio de cultivo diferencial

con el propósito de determinar las fermentaciones de hidratos de carbono y la producción de ácido sulfúrico), agar citrato Simmons (medio definido, selectivo y diferencial que prueba la capacidad de un organismo para usar citrato como única fuente de carbono e iones de amonio como única fuente de nitrógeno), y catalasa (comprobar si un microorganismo posee la enzima catalasa). Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 3 días⁽³⁶⁾.

3.3.4. Hidrólisis Enzimática. La cepa *Brachybacterium sp.* L5 fue evaluada en diferentes agares conteniendo los sustratos: gelatina, almidón, CMC 1%, ADN, Tween 80 1% y aceite de oliva 1%. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 3 días.

3.4. Optimización del crecimiento bacteriano

3.4.1. pH. Se evaluó el crecimiento de *Brachybacterium sp.* L5 en medio líquido con extracto de levadura 0,5% en el rango de pH de 5,0 a 9,0. Los valores de pH evaluados fueron: 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 9,0. El pH fue ajustado con NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N antes del autoclavado. Los cultivos se ejecutaron de forma triple y fueron incubados a 37 °C por 3 días. Luego se determinó el crecimiento celular a 600 nm.

3.4.2. Temperatura. Se evaluó el crecimiento de *Brachybacterium sp.* L5 en medio TSB a 10, 22, 30, 37 y 40 °C. Los cultivos se ejecutaron por triplicado y se incubaron por 3 días. Luego se determinó el crecimiento celular a 600 nm.

3.4.3. NaCl. Se determinó la tolerancia al NaCl mediante la estimación del crecimiento celular en términos de absorbancia a 600 nm en medio líquido con extracto de levadura 0.5% a las siguientes concentraciones de NaCl: 0,9; 3,0; 5,0 y 10,0. Se utilizaron inóculos de 2 días en una cantidad igual al 5% del volumen total del cultivo. Los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron durante 3

días a 37 °C. Posteriormente se determinó el crecimiento celular a 600 nm.

3.5. Crecimiento bacteriano y producción de pigmentos. Se realizó la cinética de crecimiento de *Brachybacterium sp.* L5 en el medio TSB. La curva de crecimiento se ejecutó en un matraz de 1 L con un volumen de 200 mL con agitación a 120 RPM y 37 °C, siendo inoculado con un subcultivo de 2 días en un volumen igual a 5% del volumen total.

Se tomaron alícuotas de 1 mL cada 3 horas hasta completar las 72 horas con la finalidad de evaluar valores óptimos de concentración de *Brachybacterium sp.* L5. Se realizó por duplicado y se utilizó el Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 100v Thermo Electron Corporation.

La concentración celular se determinó por espectrofotometría a 600 nm, según el método descrito por Asker D. y col.⁽³⁷⁾. Para calcular los parámetros cinéticos se elaboraron curvas de crecimiento, graficando DO 600 nm en función del tiempo de incubación en horas.

3.5.1. Parámetros evaluados

3.5.1.1. Determinación de biomasa. Se ejecutó a través de las diluciones seriadas en base 10 y el recuento en placa, utilizando la técnica de microgota⁽³⁸⁾. Asimismo, se realizaron las diluciones desde 10⁻² hasta 10⁻⁷. Posteriormente, se inocularon 20 µL y se incubó a 37 °C por 3 días para la lectura.

Se calculó el número de UFC/mL mediante la fórmula:

$$\text{UFC/mL} = N \times D \times 50$$

N: Número de colonias por placa.

D: Factor de dilución.

50: Factor de corrección.

3.5.1.2. Extracción del pigmento. La extracción del pigmento se realizó por el método de Asker y Ohta, 1999, con algunas modificaciones. Se tomó 1 mL del cultivo en la fase logarítmica de crecimiento y se centrifugó a 10000 RPM x 10 min. El pellet celular se resuspendió en agua destilada para lisarlas. El pigmento se extrajo con metanol por medio de centrifugaciones a 10000 RPM x 10 min hasta la decoloración del pellet. El pigmento extraído se analizó en un espectrofotómetro en el rango de 380 a 500 nm⁽³⁹⁾.

3.6. Optimización de la producción del pigmento

3.6.1. pH. Se evaluó la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 en medio líquido con extracto de levaduras 0,5% en el rango de pH de 5,0 a 9,0. Los valores de pH evaluados fueron: 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 9,0. El pH fue ajustado con NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N antes del autoclavado. Los cultivos se ejecutaron por triplicado y fueron incubados a 37 °C durante 60 horas. Luego se determinó la concentración del pigmento a 403 nm.

3.6.2. Temperatura. Se evaluó la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 en medio TSB bajo las siguientes temperaturas de incubación: 10, 22, 30, 37 y 40 °C. Los cultivos se ejecutaron por triplicado y se incubaron durante 60 horas. Luego se determinó la concentración del pigmento a 403 nm.

3.6.3. NaCl. Se determinó la tolerancia al NaCl en el medio de extracto de levaduras 0,5% a las siguientes concentraciones de NaCl: 0,9; 3,0; 5,0 y 10,0. Los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Posteriormente se determinó el crecimiento celular a 403 nm.

3.7. Aplicación de modelo factorial en la producción del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5. Se utilizó el diseño factorial fraccionado que permite variar simultáneamente varios factores de ensayo. En estos diseños, cada factor se estudia sólo a dos niveles (-1 y +1) y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores. Se evaluaron 3 factores fisicoquímicos: el pH, temperatura y concentración salina con sus respectivos niveles: 7,5 a 9,0, 35 a 39 y 0 a 2%, respectivamente. Todos los cultivos fueron preparados en matraces de 100 mL, conteniendo 20 mL de medio de cultivo con extracto de levadura 0,5%. Los medios fueron inoculados al 5%, utilizando un subcultivo de 2 días. Se incubaron a 37 °C por 60 horas en un “shaker” a 120 RPM.

3.8. Caracterización del pigmento

3.8.1. Marcha fitoquímica. Se ejecutaron las siguientes reacciones químicas:

- Reacción con FeCl₃ 1%: Se utiliza 10 gotas de reactivo con 1 mL del extracto. Es característica para compuestos fenólicos^(59, 60, 61, 62).
- Reacción con gelatina / NaCl (solución al 1% de gelatina y al 10% de cloruro de sodio): Se utiliza 10 gotas de reactivo con 1 mL del extracto. El precipitado cuantioso manifiesta la presencia de taninos^(60, 61).

- Reacción de Shinoda: Se deposita el extracto, se añaden pequeñas partes de Mg metálico y gotas de HCl concentrado^(59, 60, 61, 62).
- Reacción de Dragendorff (Yoduro de Bismuto y Potasio): Se utiliza 10 gotas de reactivo con 1 mL del extracto. La coloración naranja o roja manifiesta la presencia de alcaloides^(60, 61, 62).
- Reacción de Mayer (Yoduro de Mercurio y Potasio): Se utiliza 10 gotas de reactivo con 1 mL del extracto. La coloración blanca e inmediata manifiesta la presencia de alcaloides^(60, 62).
- Índice afrosimétrico o prueba de la espuma: Se utiliza un tubo de ensayo para la misma. Se procede al depósito de 1 mL del extracto y 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se agita durante 30 segundos, considerando la presencia positiva de saponinas si la espuma es mayor a 5mm luego de los 15 minutos^(60, 62).
- Reacción de Liebermann–Burchard: Se añaden gotas de ácido acético más 3 mL de $\text{Ac}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (50:1) a 1 mL del extracto. Si manifiesta un color azul verdoso o incluso verde se presenta un núcleo esteroidal o triterpenoidal^(60, 61, 62).
- Reacción de Molish: A 1 mL del extracto se le añaden gotas del reactivo α -naftol, posteriormente agregar por las paredes H_2SO_4 concentrado. La presencia de anillo violáceo indica la presencia de azúcares⁽⁶¹⁾.
- Reacción de Fehling: A 1 mL del extracto se le añaden gotas del reactivo Fehling A y Fehling B. Calentar por 15 minutos en baño María. La presencia de precipitación rojo ladrillo indica la presencia de azúcares⁽⁶²⁾.
- Reacción de Ninhidrina: A 1 mL de extracto se le añaden pocas gotas de solución de ninhidrina. Posteriormente, se calienta en baño de agua hirviendo por 10 minutos. Una

coloración violácea azulada, indica la presencia de proteínas^(60, 61, 62).

V. RESULTADOS

V.1. Presentación y análisis de los resultados

1. Caracterización fenotípica

1.1. Forma y pigmentación de las colonias. Se realizó la siembra en estrías de la cepa *Brachybacterium sp.* L5 en el medio de cultivo TSA, obteniéndose colonias de coloración amarillenta, forma circular, lisas y de margen definido (Figura 4).

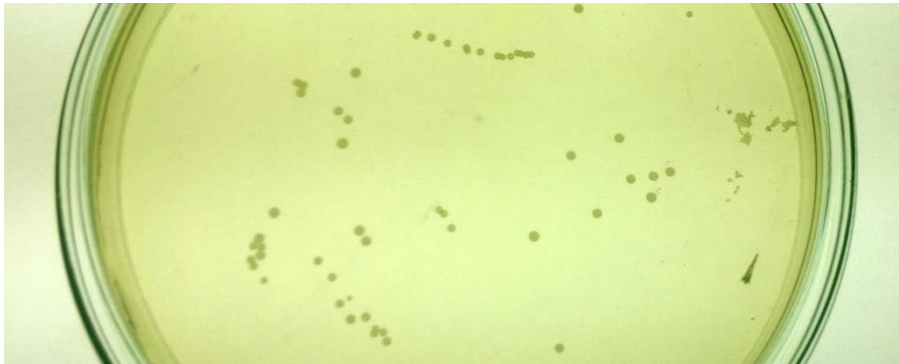


Figura 4. Características macroscópicas de *Brachybacterium sp.* L5 en medio TSA

1.2. Tinción Gram. Se aplicó el colorante cristal violeta por un tiempo determinado, el mordiente Lugol, la decoloración con alcohol de 96° y el colorante safranina, evidenciándose finalmente células Gram positivas en forma de bacilo en la fase logarítmica y cocoide en la fase estacionaria.

1.3. Prueba bioquímica. Se realizó la prueba bioquímica con agar triple azúcar y hierro (TSI) donde el aislado dio como resultado pico amarillo/ fondo amarillo (A/A) sin liberación de gas⁽³⁹⁾. Asimismo, en la prueba catalasa arrojó positivo a la enzima.

1.4. Hidrólisis enzimática. El aislado hidrolizó la gelatina y el Tween 80 bajo las condiciones ensayadas, dando negativo a las pruebas en los agares almidón, CMC, ADN y aceite de oliva.

2. Optimización del crecimiento bacteriano

2.1. pH. Se evaluó el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5 en un medio líquido con extracto de levadura 0,5% a diferentes valores de pH, donde el mayor crecimiento celular se produjo a pH 8 y el menor a pH 5, sin diferencias significativas entre el pH 6 y 7. A partir de pH 8 el crecimiento celular disminuyó (Figura 5).

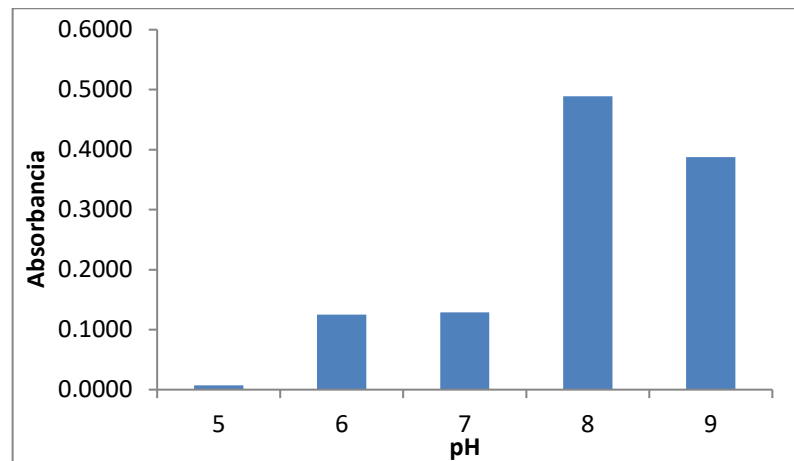


Figura 5. Efecto del pH en el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5

2.2. Temperatura. Se evaluó el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5 en medio TSB a diferentes temperaturas, obteniendo un mayor crecimiento celular a 37°C. Por el contrario, el menor crecimiento se manifestó a 10°C, a partir del cual hubo un incremento proporcional al aumento de la temperatura hasta los 37 °C; disminuyendo la masa celular posterior a este valor (Figura 6).

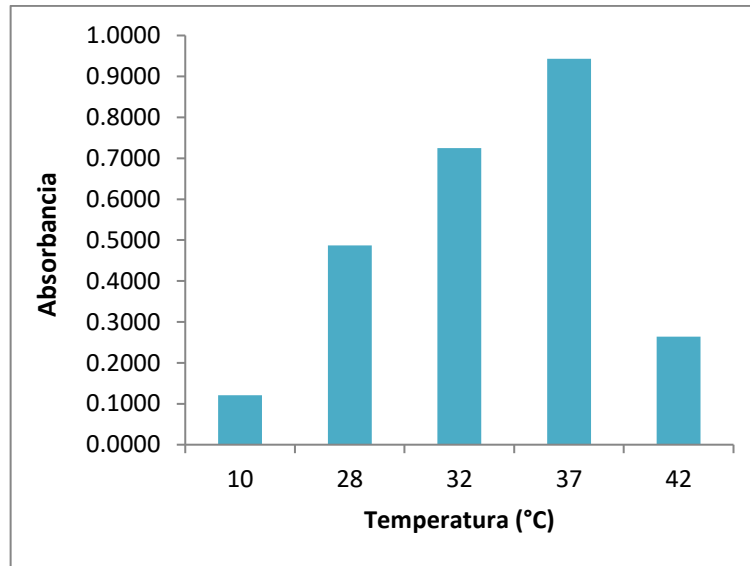


Figura 6. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5

2.3. Porcentaje NaCl. Se empleó un medio líquido con extracto de levadura 0,5% con diferentes concentraciones de NaCl, donde el mayor crecimiento se observó a 0,9% a partir del cual hubo una disminución del crecimiento proporcional al incremento de las sales. Asimismo, el menor crecimiento se observó al 10% de NaCl (Figura 7).

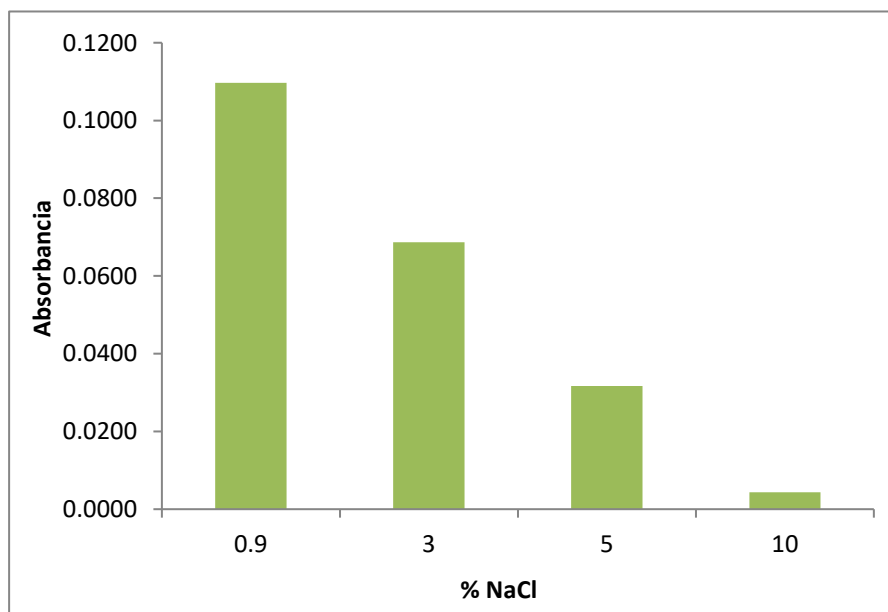


Figura 7. Efecto de la NaCl en el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5

3. Cinética de crecimiento celular y producción de pigmentos. La exploración de la cinética de crecimiento celular y de la producción del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5 permitió conocer el tiempo de incubación adecuado para conseguir la acumulación máxima de biomasa y pigmentos.

3.1. Curva de crecimiento y cinética celular. La curva mostró detalladamente los valores obtenidos en la fermentación a 60 horas, 120 RPM y 37 ± 2 °C, se observó un aumento de dos exponentes respecto a la concentración inicial en el medio convencional. La curva de *Brachy bacterium sp.* L5 (Figura 8) inició con 5,22 Log UFC/mL, manifiesta un crecimiento hasta las 53 horas con un valor de 193,11 Log UFC/mL, continuando con el descenso en las 56 y 58 horas hasta lograr una fase estacionaria a partir de 60 horas donde permanece constante la concentración celular.

En primera instancia, se ejecutó la linealización de la curva de crecimiento utilizando el método de mínimos cuadrados para conseguir la recta de regresión desde 20 hasta 58 horas (Figura 8), puesto que, en este período de tiempo culmina la fase exponencial y genera el mayor valor del estadístico R^2 .

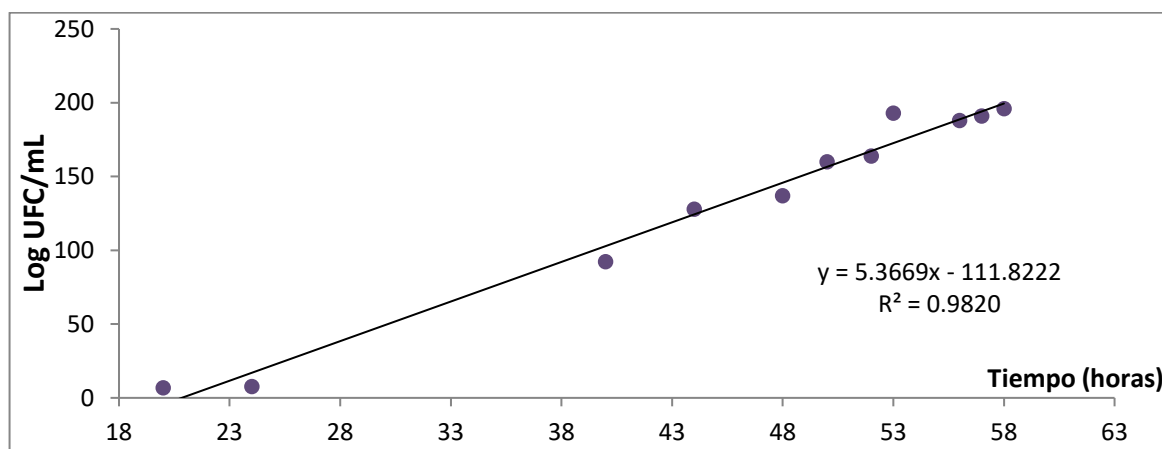


Figura 8. Linealización de la curva de crecimiento de *Brachy bacterium sp.*

L5

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 5,3669x - 111,8222$$

$$R^2 = 0,9820$$

Los resultados muestran una relación significativa de forma estadística entre las variables, totalizando en $p < 0,05$. El valor de coeficiente R^2 , manifiesta el 98,20% de variabilidad con respecto a la variable dependiente del estudio. Además, se muestra una cinética de orden 1, ya que el microorganismo muestra una cinética exponencial, presenta a través de la siguiente ecuación:

Velocidad volumétrica de producción de biomasa: $r_x = \mu x$

$$r_x = dx/dt \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Integrando la ecuación se obtiene la expresión:

$$X = X_0 e^{\mu t} \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$

X: Concentración de células viables.

X_0 : Concentración de células en un tiempo cero.

μ : Velocidad específica.

t: Tiempo.

Tomando logaritmos neperianos:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

Es así, como se calculó la velocidad de crecimiento (μx) y el tiempo de duplicación para la fase exponencial, transformándose en la siguiente ecuación:

$$t_d = \ln 2 / \mu x \dots \dots \dots \text{Ecuación 4}$$

La velocidad específica de crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5 fue de $\mu x = 0,059 \text{ h}^{-1}$, para alcanzar una concentración máxima de células de 204,029 Log UFC/mL al final del proceso de multiplicación y el tiempo necesario para que la población de *Brachy bacterium sp.* L5 se duplique fue de 3,28 horas.

3.2. Extracción del pigmento. El pigmento se logró extraer con metanol por medio de centrifugaciones, observándose en la figura 6 la curva de absorbancias obtenidos por espectrofotometría entre 380 a 460 nm. El pigmento purificado en metanol presentó la longitud de onda máxima a 403 nm (Figura 9).

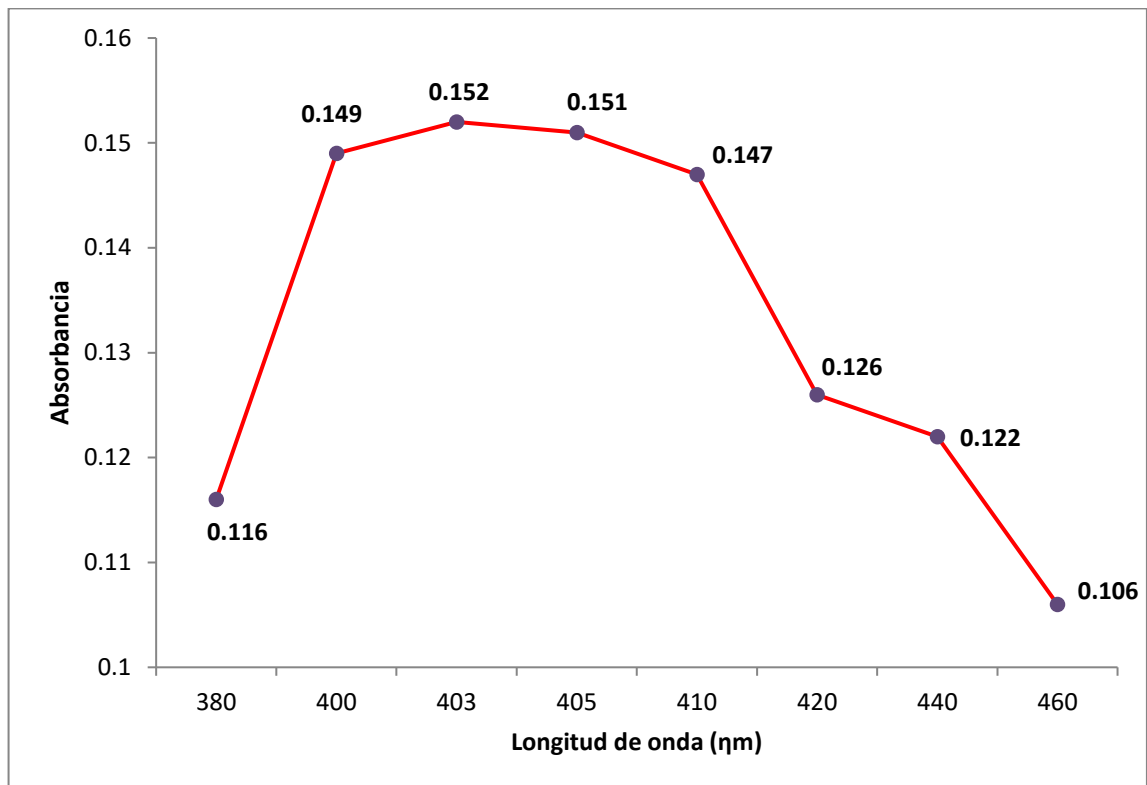


Figura 9. Curva de longitud de onda del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 vs absorbancia

3.3. Producción de pigmentos. El espectro de absorción del extracto metanólico del pigmento mostró una absorción máxima a 403 nm diferenciándose del pico de absorción máximo del β -caroteno estándar (450 nm) según Indra Arulselvi P. y col., 2014⁽⁴⁰⁾.

Brachybacterium sp. L5 alcanzó la fase estacionaria de crecimiento después de las 60 horas. La producción del pigmento amarillo aparece después de las 24 horas de incubación, el cual se

incrementa hasta las 53 horas, coincidiendo con el término de la fase exponencial (Figura 10).

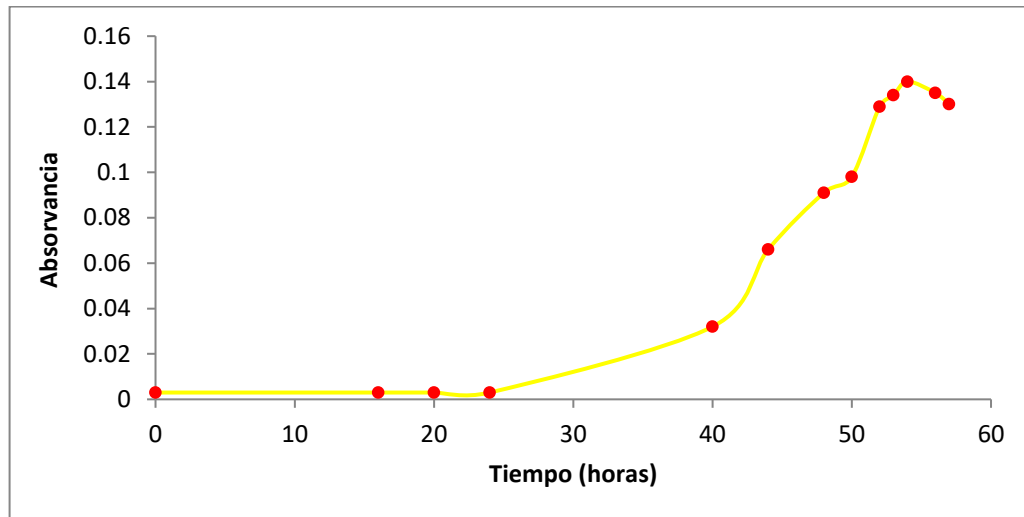


Figura 10. Curva de producción de pigmento de *Brachy bacterium sp. L5*

4. Optimización de factores fisicoquímicos

4.1. pH. Se evaluó la producción del pigmento de *Brachy bacterium sp. L5* en medio líquido con extracto de levadura 0,5%, evidenciando el incremento del crecimiento celular y la producción de pigmentos hasta un pH 8. Al someterse a valores superiores de pH se produjo la disminución de ambas respuestas (Figura 11).

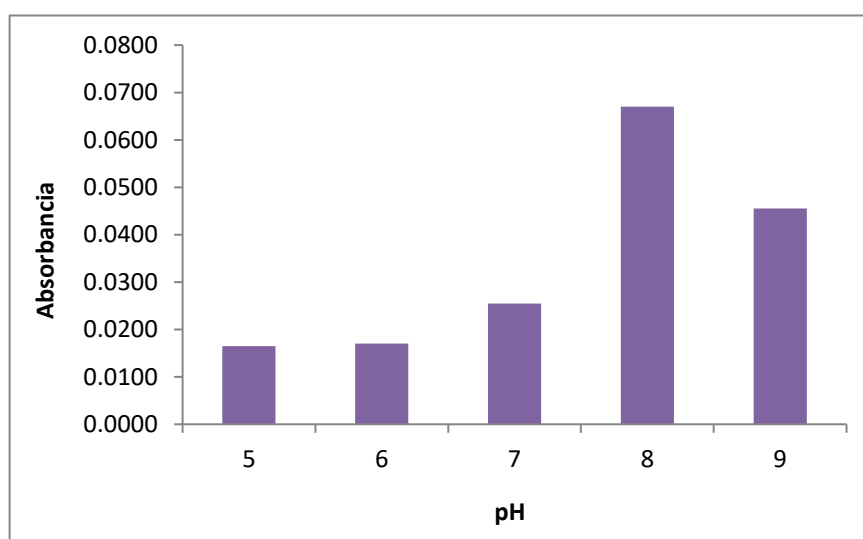


Figura 11. Efecto del pH en la producción de pigmentos de *Brachy bacterium sp. L5*

4.2. Temperatura. Se evaluó la producción del pigmento en medio TSB arrojando un máximo crecimiento celular a 37 °C, donde a partir de los 28°C se manifestó un incremento en la producción del pigmento. La mayor producción se obtuvo a 37°C. Por el contrario, el crecimiento fue escaso a una temperatura de 42 °C y no se observó crecimiento a 10 °C (Figura 12).

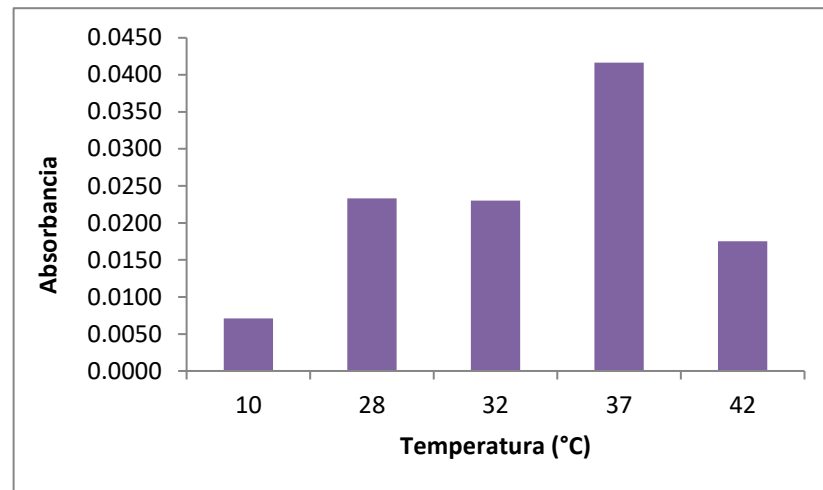


Figura 12. Efecto de la temperatura en la producción de pigmentos de *Brachybacterium sp. L5*

4.3. Porcentaje de NaCl. El máximo crecimiento celular se obtuvo en caldo de extracto de levadura 0,5%, el cual poseía 0.9 %. A partir de este primer punto se observó un descenso en el crecimiento celular a mayores concentraciones de NaCl (Figura 13).

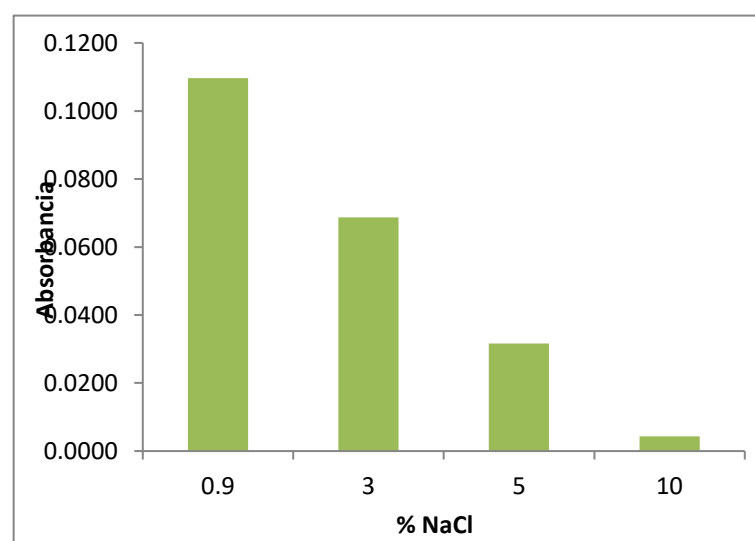


Figura 13. Efecto del porcentaje de NaCl en la producción de pigmentos de *Brachybacterium sp. L5*

5. Aplicación de un modelo estadístico en la producción del pigmento de *Brachy bacterium sp. L5*. Los mejores experimentos fueron 7, 8 y 10, los cuales mostraron absorbancias de 0,100; 0,071 y 0,085. Los tratamientos 2 y 6 presentaron los menores valores de absorbancia entre 0,022 y 0,039; respectivamente; esto puede ser atribuido a los elevados parámetros (temperatura, pH y NaCl), que no permitieron que el microorganismo pueda producir adecuadamente el pigmento (Tabla 4).

Tabla 4. Producción del pigmento aplicando el diseño factorial fraccionado por *Brachy bacterium sp. L5*

Orden de experimentos	Pt Central	T (°C)	pH	NaCl (%)	Absorbancia
1	0	37	8,25	1	0,048
2	1	39	9,00	2	0,022
3	0	37	8,25	1	0,043
4	1	39	7,50	0	0,066
5	0	37	8,25	1	0,047
6	1	39	9,00	2	0,039
7	1	35	7,50	2	0,100
8	1	39	7,50	0	0,071
9	1	35	9,00	0	0,053
10	1	35	7,50	2	0,085
11	1	35	9,00	0	0,053

Tomando en cuenta los datos, se ejecutó un análisis de varianza (Anova), dispuesto en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en la producción de pigmento por *Brachy bacterium sp. L5*

FACTOR	ESTIMACIÓN	P- VALOR
pH	-0,03875	0,000
NaCl (%)	0,00075	0,882

FACTOR	ESTIMACIÓN	P- VALOR
T (°C)	-0,022325	0,003

Se determinaron los valores de p, con un porcentaje de confianza del 95% del diseño experimental factorial fraccionado. Los datos para pH y temperatura presentaron significancia estadística sobre la variable respuesta ($p < 0,05$). La variable NaCl posee un $p > 0,05$ por lo que no presenta efectos significativos en la producción de pigmentos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se ejecutó un análisis estadístico sustituyendo los coeficientes de regresión en la ecuación 1, estableciendo el modelo de regresión (Y) para la producción de pigmentos de *Brachy bacterium sp.* L5.

$$\text{Abs}_{\text{pigm}} = 0,0570 - 0,0116 T^{\circ}\text{C} - 0,0194 \text{pH} + 0,00038 \text{SW}$$

Donde Y es la variable de respuesta, T°, es temperatura y SW es NaCl.

Según el diagrama de Pareto (Figura 14), se evidenció que el pH fue el factor que manifestó más relevancia sobre la producción de pigmentos, seguido por la temperatura de incubación y la concentración de NaCl, la cual no presenta efectos significativos en la producción del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5.

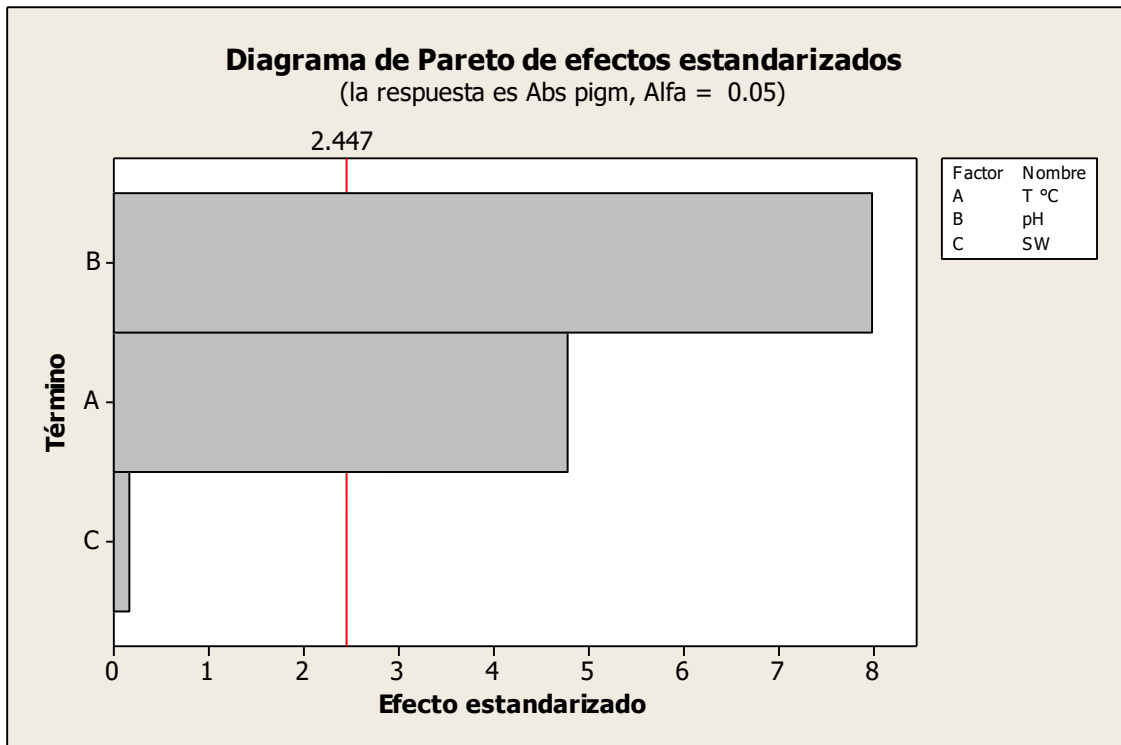


Figura 14. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura, pH y NaCl

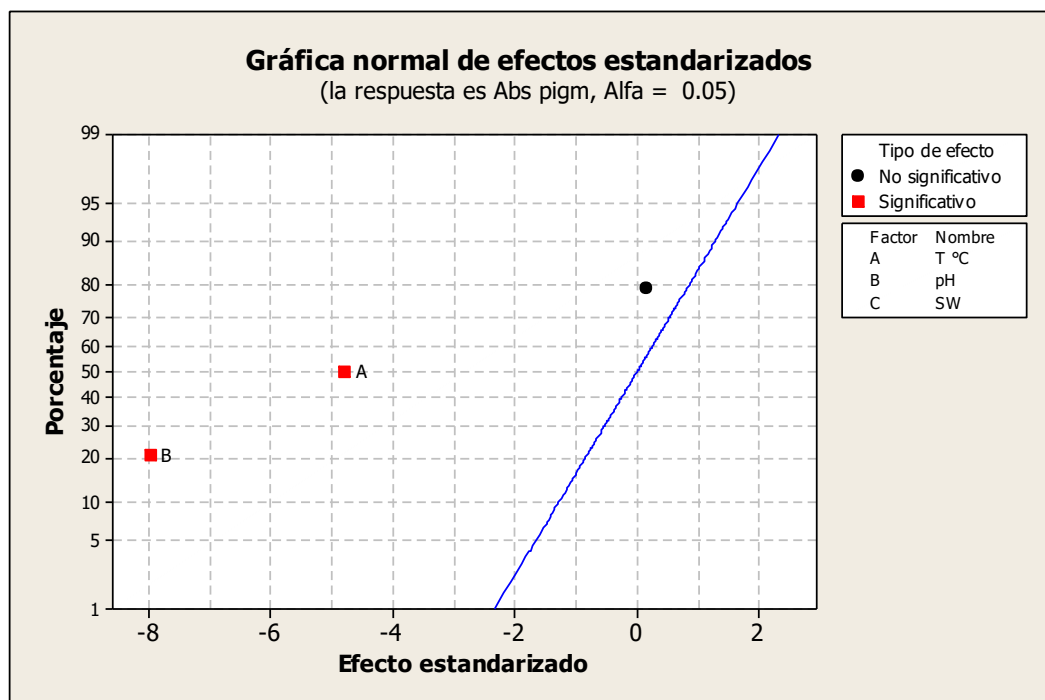


Figura 15. Gráfica normal de los efectos estandarizados

A partir del análisis estadístico del diseño factorial fraccionado se seleccionaron el pH y la temperatura como los factores más influyentes

sobre la producción de pigmentos de *Brachy bacterium sp.* L5 (Figura 15).

Se escogió el experimento N° 7, por presentar la mayor formación de pigmentos comparando los 11 restantes. Este experimento se realizó a 35 °C, pH 7,5 y NaCl 2%, de acuerdo con el análisis de varianza mostrado anteriormente (Tabla 5), razón por la cual, los parámetros fisicoquímicos seleccionados para un posterior proceso de optimización fueron con base a este ensayo (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos óptimos

FACTOR	NIVEL
pH	7,5
NaCl (%)	2,0
T (°C)	35,0

6. Caracterización cualitativa preliminar del pigmento

Tabla 7. Screening fitoquímico del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5

Reactivo	Metabolitos secundarios	Extracto
FeCl ₃	Taninos	-
Liebermann–Burchard	Núcleo esteroideal	+
Shinoda	Flavonoide	-
Índice de espuma	Saponinas	-
Dragendorff	alcaloides	-
Mayer	alcaloides	-
Gelatina	Taninos	-
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Fehling	Carbohidratos	+
Molish	Carbohidratos	+

Negativo (-)

Reacción positiva moderada (+)

El screening fitoquímico realizado con el extracto metanólico del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5, determinó la presencia de núcleos esteroidales (Tabla 7).

VI. DISCUSIÓN.

De los resultados obtenidos en la investigación se aceptó la hipótesis general (HG), concluyendo que las condiciones óptimas de producción del pigmento de *Brachy bacterium sp.* L5 son determinadas. Asimismo, la relación que existe entre las variables de pH y temperatura son estadísticamente significativas ($p < 0,05$), mientras que, la variable correspondiente a concentración salina no presenta efectos significativos sobre la producción de pigmentos ($p > 0,05$). Tras la revisión de los resultados se adjudica un 98,20% de variabilidad de la variable dependiente, lo cual aumenta la confiabilidad del análisis.

Entre los productos adquiridos se evidenció en la figura 4 que las colonias de *Brachy bacterium sp.* L5 en medio TSA manifestaban una forma circular de coloración amarillenta, siendo bacilos Gram positivos en fase logarítmica, fermentadoras de carbohidratos (dextrosa, lactosa y/o sucrosa), catalasa positiva, cuyo aislado hidrolizó la gelatina y el Tween 80. Lo anteriormente expuesto se alinea con los resultados obtenidos según Buczolits S. y col.⁽²⁶⁾, siendo la cepa *B. muris* C3H-21 (ver Tabla 3) la que comparte mayores semejanzas.

Tomando en cuenta la variable 1 correspondiente al pH, se expuso la cepa para determinar el mayor crecimiento celular donde se obtuvo que el mismo se produjo a pH 8, disminuyendo de forma notoria a un pH 5. Asimismo, no se observó diferencia significativa tras la exposición a un pH 6 y 7, tal como se muestra en la figura 5, coincidiendo con el estudio de autoría Hoang V. y col.⁽⁶³⁾.

En la figura 6 se mostró el efecto de la temperatura en el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5, donde el menor crecimiento se obtuvo a 10 °C aumentando considerablemente hasta lograr el pico de mayor crecimiento a los 37 °C.

Posteriormente, se evaluó la variable 2 que refiere a la concentración salina y su efecto en el crecimiento de *Brachy bacterium sp.* L5. La concentración de NaCl al 0,9% permitió un mayor crecimiento celular. Tras la gráfica mostrada en

la figura 7, se concluyó que la disminución del crecimiento es proporcional al incremento de las sales, lo cual coincide en gran parte con lo expuesto por Gontia I. y col.⁽⁶⁴⁾, cuyo estudio refiere que el crecimiento es estimulado con tan sólo un 4% de NaCl.

La presente investigación analizó la cinética del crecimiento celular y la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 para obtener el tiempo de incubación requerido que logra la acumulación máxima de biomasa y pigmentos. Es así como la figura 8 muestra la linealización de la curva de crecimiento del microorganismo en estudio desde las 20 hasta las 58 horas, iniciando con 5,22 Log UFC/mL y presentando un crecimiento exponencial hasta las 53 horas con un valor de 193,11 Log UFC/mL. Esto determinó que la cinética es de orden 1 y que la velocidad de crecimiento de *Brachybacterium sp.* L5 fue de 0,059 h.

En cuanto al pigmento, se extrajo y analizó según la metodología de Goswami G. y col.⁽⁴²⁾, quienes utilizaron metanol y obtuvieron un pico máximo a 437 nm después de realizar un análisis a diferentes longitudes onda en UV-Vis. Esto coincide con los resultados obtenidos y mostrados en la figura 9, donde la longitud de onda máxima se logró a 403 nm. Además, se evidenció en la figura 10 la curva de producción del pigmento teniendo una absorción máxima a 403 nm, lo cual permite inferir que el pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 se trata de un carotenoide. Esto concuerda con lo reportado ya que, los pigmentos amarillos que pertenecen a los carotenoides muestran picos distintivos dentro del rango de absorción de 400 a 500 nm⁽⁵⁴⁾.

La producción de pigmentos a partir de *Brachybacterium sp.* L5 es rápida y menos costosa ya que se emplean una menor cantidad de procesos unitarios. Además, la ruptura celular es más fácil que en el caso de las plantas, algas, hongos o levaduras. Por ello, se optimizaron los factores fisicoquímicos que afectan la producción del pigmento en *Brachybacterium sp.* L5. De este modo, se muestra en la figura 11 que el crecimiento celular y la producción de pigmentos incrementan hasta un pH 8 y, posterior a este valor, disminuyen. Así,

Brachybacterium sp. L5 fue capaz de crecer en un rango de pH entre 7 y 9, demostrando la preferencia de este microorganismo por ambientes alcalinos, al igual que *Brachybacterium alimentarium sp. nov* y *Brachybacterium tyrofermentans sp. nov* descrito según Schubert, K. y col.⁽⁴¹⁾. Por el contrario, cepas como *B. rhamnosum* LMG 19848T; *B. sacelli* LMG 20345T; *B. fresconis* LMG muestran un crecimiento óptimo a pH 5⁽²⁰⁾.

En la figura 12, se muestra el efecto de la temperatura en la producción de pigmentos, donde la mayor producción se logró a 37 °C al igual que el máximo crecimiento celular, semejante a lo reportado por Hoang V. y col.⁽⁶³⁾. También, se determinó que el porcentaje de NaCl requerido en un caldo de extracto de levadura 0,5% corresponde al 0,9%, tal como se grafica en la figura 13, demostrando un descenso al incrementar la concentración salina.

Sintetizando lo previamente expuesto, se tiene que los parámetros de 37 °C, pH 8 y NaCl 0,9% con agitación a 120 RPM durante 3 días fueron los que estimularon la mayor producción de pigmento.

El diseño factorial se utilizó para establecer los factores que influyen en la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5, para lo cual se analizaron la temperatura, el pH y la concentración de NaCl. Es así, como se plantea en la tabla 4, que los mejores experimentos corresponden al N° 7, N° 8 y N° 10; mostrando valores de absorbancias de 0,100; 0,071 y 0,085; respectivamente. Por otro lado, se evidencian tratamientos de menores valores de absorbancia que no lograron la obtención del pigmento de forma adecuada por parámetros elevados, correspondientes a las variables del presente estudio.

A partir de allí, se aplicó un análisis de varianza para justificar los resultados obtenidos. De acuerdo con la tabla 5, se comprueba que la temperatura y el pH influyen en la producción del pigmento ($p = 0,003$ y $p = 0,000$; respectivamente) a diferencia de la concentración de NaCl, la cual presenta un $p > 0,05$, es decir, no manifiesta efectos significativos sobre la producción de pigmento de *Brachybacterium sp.* L5. Los valores se alinean con el estudio de autoría Joshi

V. y col.⁽⁵⁾, quienes afirman que el pH juega un rol importante en la producción del pigmento.

Lo anteriormente expuesto es confirmado a través del diagrama de Pareto mostrado en la figura 14, que arrojó que el pH es el factor con mayor significancia en la producción de pigmentos de *Brachybacterium sp.* L5. Este es seguido por la temperatura, uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento de microorganismos y causa cambios en muchas rutas biosintéticas⁽⁴²⁾. Y, por último, la concentración de NaCl que no interviene de forma significativa.

En la figura 15, se presenta la gráfica normal de los efectos estandarizados corroborando que el pH y la temperatura son los factores más influyentes, lo cual manifiesta que el microorganismo estudiado crece en ambientes alcalinos y que a 37 °C se obtiene mayor biomasa y pigmento carotenoides.

Posterior a la valoración de los efectos del pH, temperatura y concentración de NaCl sobre la obtención del pigmento, se tomó como estudio de referencia el experimento N° 7 por lograr la mayor formación de pigmentos en comparación con los restantes expuestos en la tabla 4. Es así como en la tabla 6 se determinan los parámetros fisicoquímicos para un posterior proceso de optimización.

Con respecto a la caracterización cualitativa preliminar del pigmento, se tiene la tabla 7 que refleja la presencia de núcleos esteroidales en el screening fitoquímico con extracto metanólico del pigmento de *Brachybacterium sp.* L5.

Finalmente, las condiciones resultantes en el estudio constituyen el primer eslabón para la producción del pigmento y posterior análisis químico estructural para determinar su potencial biotecnológico y escalamiento.

VII. CONCLUSIONES

- El tiempo de duplicación celular fue de 3,28 horas y la máxima concentración de pigmento se obtuvo a las 53 horas.
- Los factores fisicoquímicos para la producción pigmento de *Brachybacterium sp.* L5 mostraron que los parámetros de 37 °C, pH 8 y NaCl 0,9%; con agitación a 120 RPM durante 3 días, fueron los que generaron mayor concentración de pigmento.
- Los parámetros de Temperatura 35 °C y pH 7,5 son factores determinantes en la producción de pigmentos de *Brachybacterium sp.* L5. Por el contrario, la concentración de NaCl no influye en la producción ($p > 0,05$).
- La caracterización del pigmento por medio de la marcha fitoquímica dio la presencia de carbohidratos, proteínas y núcleos esteroidales.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar otros métodos, tales como, Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o Espectroscopía infrarroja (IR) para identificar de manera específica el pigmento. La determinación de la estructura química del pigmento ayudará a elucidar su potencial biológico e industrial.
- Se debe hacer una detallada caracterización fenotípica y genotípica para demostrar que la especie corresponde a *Brachybacterium*.
- Asimismo, sería recomendable estudiar la producción del pigmento de *Brachybacterium sp.* frente a en otros parámetros, diferentes a los ya estudiados en esta tesis, a fin de aumentar el rendimiento de la producción.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tibor, C. Liquid Chromatography of Natural pigments and synthetic dyes. J. Chromatography Library, 2007, 71: 11-19.
2. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R and Paredes-López, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocianins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, v. 40 (3), p. 173-289.
3. Martinez Silva, A. S. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios, 2011
4. Venil, C. K., & Lakshmana perumalsamy, P. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. Electronic Journal of Biology, 2009, 5(3), 49-61.
5. Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., & Bhushan, S. Microbial pigments. Indian journal of biotechnology, 2003, 2(3), 362-369.
6. Nagpal, N., Munjal, N. and Chatterjee, S. Microbial Pigments with Health Benefits - A Mini Review. Trends Biosci, 2011, 4: 157-160
7. Mohankumari, H.P., Naidu, A., Vishwanatha, S., Narasimhamurthy, K. and Vijayalakshmi, G. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. Food Chem. Toxicol., 2009, 47: 1739- 1746
8. Golubev, W.I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Yeast, 1995, 11: 101-110. 6.
9. Sardaryan, H., Zihlova, R., Strnad, Z. and Cermakoya, C. Arpink Red– Meet a new natural red food colorant of microbial origin. In: Pigments in Food, More than Colours. L. Dufossé (ed) Université de Bretagne Occidentale, Quimper France, 2004, pp 207-208.
10. Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., & Seulberger, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(5), 509-516.
11. European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food on betacarotene from *Blakeslea trispora* (SCF/CS/ADD/COL), 2000, 158.

12. Browning, D. F., Whitworth, D. E., & Hodgson, D. A. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Molecular microbiology*, 2003, 48(1), 237-251.
13. Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., & Ueda, K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *Journal of bacteriology*, 2005, 187(5), 1825-1832.
14. Yokoyama, A., Izumida, H., & Miki, W. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1994, 58(10), 1842-1844.
15. Kull, D. R., & Pfander, H. Isolation and structure elucidation of carotenoid glycosides from the thermoacidophilic archaea *Sulfolobus shibatae*. *Journal of Natural Products*, 1997, 60(4), 371-374.
16. Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 2006, 6(1), 1-13.
17. Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. Microbial pigments: a review. *Int. J. Microbial. Resour. Technol*, 2012, 1, 361-365.
18. Lapidus, A., Pukall, R., LaButt, K., Copeland, A., Del Rio, T. G., Nolan, M. & Klenk, H. P. Complete genome sequence of *Brachybacterium faecium* type strain (Schefferle 6-10T). *Standards in genomic sciences*, 2009, 1(1), 3.
19. Park, S. K., Kim, M. S., Jung, M. J., Nam, Y. D., Park, E. J., Roh, S. W., & Bae, J. W. *Brachybacterium squillarum* sp. nov., isolated from salt-fermented seafood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2011, 61(5), 1118-1122.
20. Zhang, G., Zeng, G., Cai, X., Deng, S., Luo, H., & Sun, G. *Brachybacterium zhongshanense* sp. nov., a cellulose-decomposing bacterium from sediment along the Qijiang River, Zhongshan City, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57(11), 2519-2524.

21. Gvozdyak, O. R., Nogina, T. M., & Schumann, P. Taxonomic Study of the Genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium nesterenkovi* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 1992, 42(1), 74-78.
22. Collins, M. D., Brown, J., & Jones, D. *Brachybacterium faecium* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium from poultry deep litter. *International journal of systematic bacteriology*, 1988, 38(1), 45-48.
23. Chou, J. H., Lin, K. Y., Lin, M. C., Sheu, S. Y., Wei, Y. H., Arun, A. B., ... & Chen, W. M. *Brachybacterium phenoliresistens* sp. nov., isolated from oil-contaminated coastal sand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57(11), 2674-2679.
24. Orsod, M., Mugambwa, J., Huyopf, M. Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. isolated from asian sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Malaysian Journal of Microbiology*, 2012, 8: 170-174.
25. Schubert, K., Ludwig, W., Springer, N., Kroppenstedt, R. M., Accolas, J. P., & Fiedler, F. Two Coryneform Bacteria Isolated from the Surface of French Gruyere and Beaufort Cheeses Are New Species of the Genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 1996, 46(1), 81-87.
26. Buczolits, S., Schumann, P., Weidler, G., Radax, C., & Busse, H. J. *Brachybacterium muris* sp. nov., isolated from the liver of a laboratory mouse strain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2003, 53(6), 1955-1960.
27. Takeuchi, M., Fang, C. X., & Yokota, A. Taxonomic Study of the Genus *Brachybacterium*: Proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp. nov., nom. rev., *Brachybacterium paraconglomeratum* sp. nov., and *Brachybacterium rhamnosum* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 1995, 45(1), 160-168.
28. Schumann, P., Kämpfer, P., Busse, H. J., & Evtushenko, L. I. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder Micrococccineae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2009, 59(7), 1823-1849.

29. Dufossé, L., Mabon, P., & Binet, A. Assessment of the coloring strength of *Brevibacterium linens* strains: spectrophotometry versus total carotenoid extraction/quantification. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(2), 354-360.
30. Krubasik, P., & Sandmann, G. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Molecular and General Genetics MGG*, 2000, 263(3), 423-432.
31. Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Srinivas, R., Matsumoto, G. I., & Shivaji, S. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2003, 53(4), 977-984.
32. Trutko, S. M., Dorofeeva, L. V., Evtushenko, L. I., Ostrovskii, D. N., Hintz, M., Wiesner, J. & Akimenko, V. K. Isoprenoid pigments in representatives of the family Microbacteriaceae. *Microbiology*, 2005, 74(3), 284-289.
33. Mendiburo, F. *Experimento con factorials*, 2007.
34. Ferré, J., & Rius, F. X. *Introducción al diseño estadístico de experimentos. Técnicas de laboratorio-Barcelona-*, 2002, 648-653.
35. Perez, R. G., Peris, V. *Microbiología*. Editorial Paraninfo, 1997, 34-36
36. MacFaddin, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. 2003
37. Singhal R S & Kulkarni P R. *Production of Food Additives by Fermentation in Biotechnology: Food Fermentation (Microbiology, Biochemistry and Technology)*. Vol II, edited by V K Joshi & Ashok Pandey. Educational Publishers. New Delhi. 1999, 1145-1200.
38. Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. W., Zakaria, Z. A., & Yusof, N. Z. Isolation of Pigment-Producing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments. In *Application of Bacterial Pigments as Colorant*, 2012, 25-44. Springer Berlin Heidelberg.
39. Asker, D., & Ohta, Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 1999, 88(6), 617-621.
40. Koneman, E. W., & Allen, S. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2008, 245.

41. Indra Arulselvi, P., Umamaheswari, S., Ranandkumar Sharma, G., Karthik, C., & Jayakrishna, C. Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *J Food Process Technol*, 2014, 5(292), 2.
42. Goswami, G., Chaudhuri, S., & Dutta, D. Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium. *Chemical Engineering*, 2010, 20.
43. Schubert, K., Ludwig, W., Springer, N., Kroppenstedt, R. M., Accolas, J. P., & Fiedler, F. Two Coryneform Bacteria Isolated from the Surface of French Gruyere and Beaufort Cheeses Are New Species of the Genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *r. International journal of systematic bacteriology*, 1996, 46(1), 81-87.
44. Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 63: 351-361.
45. Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., & Nakamura, S. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in microbiology*. 2014, 5.
46. Arulselvi, I., & Gurumayum, R. S. Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. *Journal of Biochemical Technology*. 2013, 4(4), 632-635.
47. Sutthiwong, N., & Dufossé, L. (2014). Production of carotenoids by *Arthrobacter arilaitensis* strains isolated from smear-ripened cheeses. *FEMS microbiology letters*, 360(2), 174-181.
48. Navarro Vásquez, A. P. *Los Carotenoides y su aplicación en la Biotecnología Ambiental*. 2015.
49. Noriyuki D., Wataru Y., Hirokazu K., Hiroyasu O. (2008) A Maltooligosaccharide-Forming amylase gene from *Brachybacterium* sp strain LB25: Cloning and expresión in *Escherichia coli*. 72 (9) 2444-2447.
50. Chatoopadhyay, P., S. Chatterjee and S. K. Sen. (2008). Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology*. 7: 2972-2985.

51. Moss, M. O. (2002) Bacterial pigments. *Microbiologist*. 10-12.
52. Cardona V., Arroyo D., Scellekens J., Rios C. (2006) Characterization of blue pigmented bacteria isolated from Puerto Rico. *5(1)* 79-82.
53. Starr, M. P. (1958). The blue pigment of *Corynebacterium insidiosum*. *Archives of Microbiology*. 30: 325-334.
54. Llansola-Portoles, M. J., Pascal, A. A., & Robert, B. (2017). Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo. *Journal of The Royal Society Interface*, 14(135), 20170504.
55. Ramesh, Chatragadda, et al. "Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications." *Microorganisms* 7.7 (2019): 186.
56. Jurić, Slaven, et al. "Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods." *Food Reviews International* (2020): 1-56.
57. Sánchez-Muñoz, Salvador, et al. "Production of fungal and bacterial pigments and their applications." *Biotechnological production of bioactive compounds*. Elsevier, 2020. 327-361.
58. Mishra, Bishwambhar, Sunita Varjani, and G. Karthikeya Srinivasa Varma. "Agro-industrial by-products in the synthesis of food grade microbial pigments: An eco-friendly alternative." *Green Bio-processes*. Springer, Singapore, 2019. 245-265.
59. Rengifo-Penadillos, Roger. "Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos." *Pharmaciencia* 1.2 (2013): 51-56.
60. Martínez, Miguel, et al. "Screening fitoquímico preliminar de *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & JM Grimes." *Steviana* 2 (2010): 52.
61. Sotomayor, Rosa. "Extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de *Zea mays* L. (maíz morado)." *Ciencia y Desarrollo* 16.1 (2013): 69-74.
62. Flores, Diana Esmeralda Andamayo, et al. "Determinación de la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* (kion) en la selva central del Perú." *Visionarios en ciencia y tecnología* 5.1 (2020): 17-21.
63. Hoang V, Kim Y, Nguyen N, Yang D. "Brachybacterium ginsengisoli sp. nov., isolated from soil of a ginseng field." (2014) 64;Pt 9.

64. Gontia I, Kavita K, Schmid M, Hartmann A. "Brachybacterium saurashtrense sp. nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential" International Union of Microbiological Societies (2015). 2799 – 2804.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Caldo Tripticasa Soya (TSB)

Composición:

Tripteína.....	17,0 g/mL
Peptona de soya.....	3,0 g/mL
Cloruro de sodio	5,0 g/mL
Fosfato dipotásico.....	2,5 g/mL
Glucosa.....	2.5 g/mL
Agua purificada.....	1000 mL

ANEXO 2: Agar Tripticasa Soya (TSA)

Composición:

Tripteína.....	15.0 g/mL
Peptona de soya.....	5.0 g/mL
Cloruro de sodio	5.0 g/mL
Agar	15.0 g/mL
Agua purificada.....	1000 mL

ANEXO 3: Medio Agua de Sales

Composición para solución Stock al 30% (p/v) de sales:

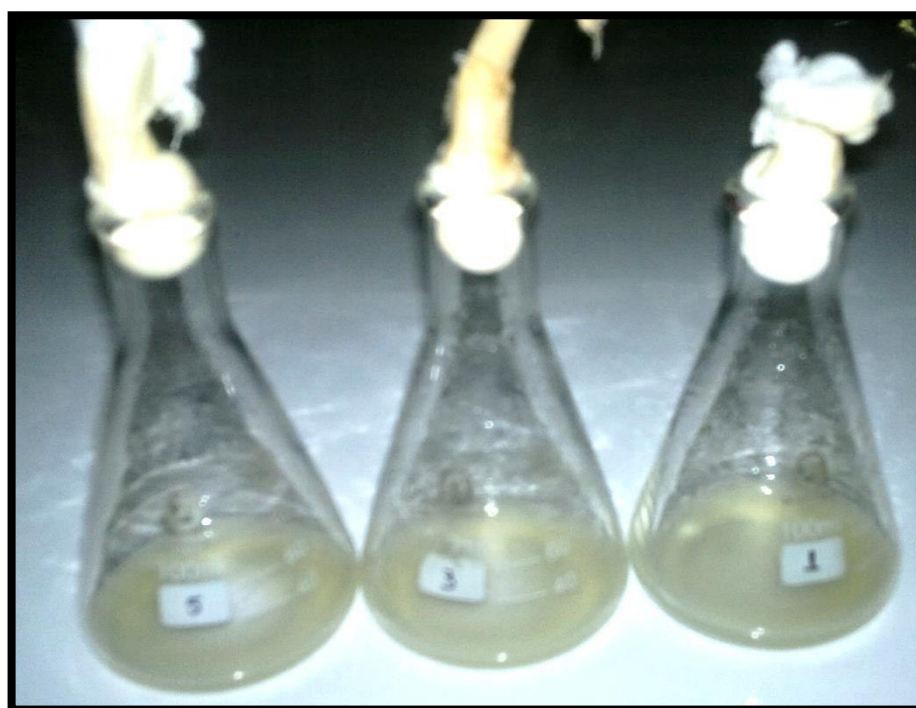
NaCl.....	234,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	39,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	61,0 g
KCl.....	6,0 g
NaBr.....	0,7 g
NaHCO ₃	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,0 g

ANEXO 4: Reactivo gelatina / NaCl:

Composición:

Gelatina	1 mg
Agua destilada	1 mL
Cloruro de sodio	100 mg

ANEXO 4: Producción de pigmento por *Brachybacterium sp.*



ANEXO 5: Pellets obtenidos antes de la extracción



Pellets obtenidos antes de la extracción

