

Nombre del semillero de investigación

SEMILLERO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA Y QUIMICA EN PRODUCTOS (BIOQUIP)

Nombre del proyecto

BIOPROSPECCION DE INGREDIENTES NATURALES EN LA AGROBIODIVERSIDAD COLOMBIANA PARA APLICACION EN LA INDUSTRIA COSMETICA.

Año

2020

Marco del Proceso de ASC: Fortalecimiento o solución de asuntos de interés social.

Este semillero de investigación forma parte de la estrategia de Investigación Formativa de la Universidad EAFIT que ratifica su compromiso con el desarrollo de la Ciencia, la Tecnología, la Innovación y la Creación y lo establece como uno de sus ejes misionales. Con el desarrollo de iniciativas como estas, aportamos a los procesos científico-tecnológicos y creativos que se desarrollan en el seno de su comunidad universitaria y cómo estos permean las experiencias de aprendizaje de los estudiantes.

En el propósito de cultivar talentos y vocaciones científicas y creativas el rol del profesor es vital, ya que es quien desde su pasión, experiencia y conocimiento acerca a los estudiantes a las técnicas propias del saber científico y diseña experiencias de aprendizaje que aporten a la construcción de procesos investigativos.

En consonancia con los [Lineamientos de Investigación Formativa de la Universidad](#), se describe a continuación los principios que rigieron la ejecución del componente con sus resultados, en términos del fortalecimiento de asuntos de interés social, del presente proyecto:

Objetivos del semillero en clave de fortalecimiento de la práctica educativa

Generar herramientas y enseñar técnicas de búsqueda de productos e ingredientes útiles para el ser humano en la biomasa residual y en la biodiversidad

Metodología**Medellín**

NIT 890901389
Carrera 49 # 7 sur-50
(57) 604 261 95 00

Pereira

Carrera 19 # 12-70
Megacentro Pinares
(57) 606 321 41 15

Bogotá

Carrera 15 # 88-64
oficina 401
(57) 601 611 46 18

Llanogrande

Km 3.5 vía Don Diego –
Rionegro
(57) 322 529 4323

A través de seminarios de discusión, de actividades prácticas en el laboratorio, de reuniones con aliados productores y generadores de subproductos.

Resultados obtenidos

Colección de cepas registradas en la universidad EAFIT para seguir explorando a través de fermentaciones dirigidas

Descripción del fortalecimiento, la solución o el mejoramiento de la práctica educativa

Formación de competencias y habilidades en biotecnología, bioquímica, desarrollo de productos, aplicadas a la economía circular. Mentalidad innovadora.

A partir de estas consideraciones, a continuación, se encuentra la sistematización del proceso.

INFORME FINAL DE PROYECTOS DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN 2020
VICERRECTORÍA DE DESCUBRIMIENTO Y CREACIÓN
OFICINA DE PLANEACIÓN Y DESCUBRIMIENTO FORMATIVO
UNIVERSIDAD EAFIT

Nombre del semillero de investigación	Semillero de Investigación en Biología y Química Aplicada (BIOQUIP)
Nombre del proyecto de investigación	Bioprospección de ingredientes naturales de la agrobiodiversidad colombiana para la industria cosmética
Nombre del investigador principal	Laura Sierra Zapata
Estudiantes que participaron en la investigación	Manuel Ospina Mejía, Natalia Betancurt Botero, Juan Manuel Lozano, Juan José Picón, Juan Pablo Tobón Vélez, Jhon Alexander Vélez Zapata, Andrea Mazo Naranjo, Leidy Juliana Flores López, Franklin Pastrana Arteaga, Óscar Fernando Echeverri Muñoz, Sebastián Martínez

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Obtener ingredientes funcionales mediante bioprospección en la agrobiodiversidad colombiana con potencial de aplicación en la industria cosmética exterior. Nivel de cumplimiento: 75%

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar y caracterizar parcialmente cepas de levadura propias del mucílago, biomasa residual de la industria del café. 100%
2. Identificar, a nivel molecular, las levaduras del cepario EA-ED 226 del Instituto Humboldt perteneciente a la Universidad EAFIT para establecer su potencial metabólico para cosmética. 50%

METODOLOGÍA

Obtención de microorganismos a evaluar

Se obtuvo una muestra de mucílago de café de la empresa Natucafé S.A.S. de la cual se obtuvieron 15mL, generando 2 soluciones madre las cuales fueron depositadas en tubos falcon de 15mL. Para cada muestra madre, se generaron 8 diluciones con una relación buffer-fosfato y mucílago de 1:10. De las 8 diluciones de las muestras madre, se realizaron duplicados de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} y se sembraron 100uL en placas petri con medio semi-selectivo para levaduras YMA por triplicado. Se incubaron durante 5 días a una temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Conteo de colonias e identificación de levaduras

Una vez crecieron las colonias de microorganismos en las cajas Petri, se comenzó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) en donde en cada caja Petri se dividía en forma de plano cartesiano y se contaban las colonias ubicadas en un cuadrante elegido arbitrariamente y dicho número se multiplicaba por 4. Luego, se seleccionaban las colonias a identificar, las cuáles se enumeraban aquellas que eran de interés y se clasificaban según sus diferencias en tamaño, margen, altura, color y forma con un estereoscopio. Finalmente, se realizaba tinción de Gram para las colonias enumeradas y cada una fue evaluada al microscopio donde aquellas que se identificaron como levaduras por su morfología característica, se llevaban para conservación.

Generación de crioviales y creación de nuevo cepario para la Universidad EAFIT

Se llevó a cabo la purificación de las colonias de levaduras previamente seleccionadas, sembrando por triplicado en cajas Petri y se incubaron a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. por 5 días. Una vez se obtenían las cepas purificadas, se preparó medio de semi-selectivo para levaduras YMB en erlenmeyers de 50 o 100ml, se inocularon las colonias purificadas a los erlenmeyers y se dejaron incubando a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12 horas a 100rpm. Una vez crecieron las colonias en los erlenmeyers, se trasladó 1ml de cada erlenmeyer con colonias a eppendorfs de 1.5ml. Posteriormente, se centrifugaron los eppendorfs de 1.5ml con las colonias a 14000 rpm en una centrífuga Alfa-Laval ® a 4°C por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se preparó medio YMB + 20% de glicerol y se agregó 1 ml de dicho medio con glicerol a cada eppendorf centrifugado, se resuspendió la biomasa y se conservaron a -80°C .

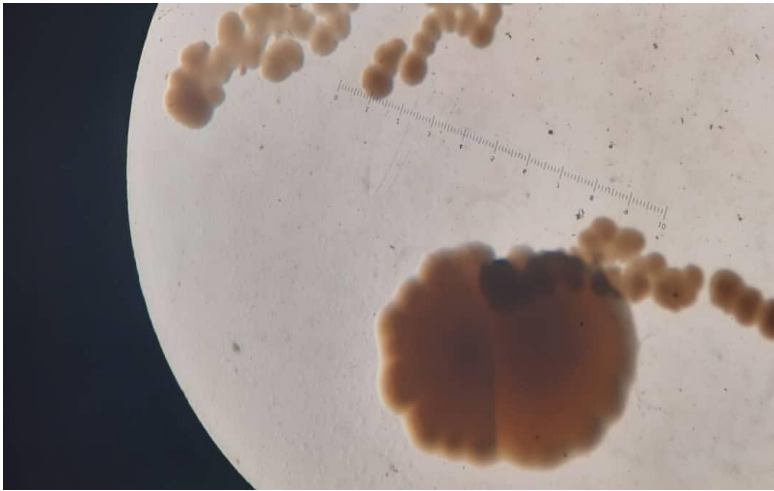
Extracción de ADN de levaduras

Se tomaron 2 ml de muestra líquida de levaduras crecidas en medio YMB, con un periodo de incubación de 12 horas a 100rpm a 29°C en un eppendorf. Luego, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se maceró en nitrógeno líquido hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Después, se resuspendieron las muestras en eppendorfs con 1 ml de buffer de lisis STES y también se agregaron 10 μL de Proteinasa K a una concentración de 10 mg/ μL . Luego, las muestras se incubaron a 37°C durante 15 minutos, homogeneizando suavemente y posteriormente, se centrifugaron a 12 rpm a 4°C por 15 minutos. Luego, el precipitado obtenido se diluyó en 300 μl de agua libre de nucleasas. Después, se añadió el mismo volumen (600 μl) de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24: 1), y la mezcla se agitó cuidadosamente hasta que se homogenizó por completo. La mezcla resultante se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recogió en un tubo nuevo y se precipitó con 600 μl de isopropanol a -80°C por 20 minutos. Luego, se llevó a cabo la centrifugación de dichos eppendorfs a 12.000 rpm durante 15 min y 4°C y se lavaron con 500 μl etanol al 70%. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos y el precipitado se secó a temperatura ambiente y finalmente, se guardaron los pellets y se resuspendieron en 50 μl de buffer TE o agua libre de nucleasas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Resultados parciales.

Figura 1. Identificación morfológica de levaduras



En la figura 1 se ilustra una cepa de levadura a través del uso de un estereoscopio luego del procedimiento de conteo de UFC's y pre-selección de colonias para ser identificadas con tinción de gram.

Figura 2. Identificación de cepas de levaduras con microscopía

Figura 2 a

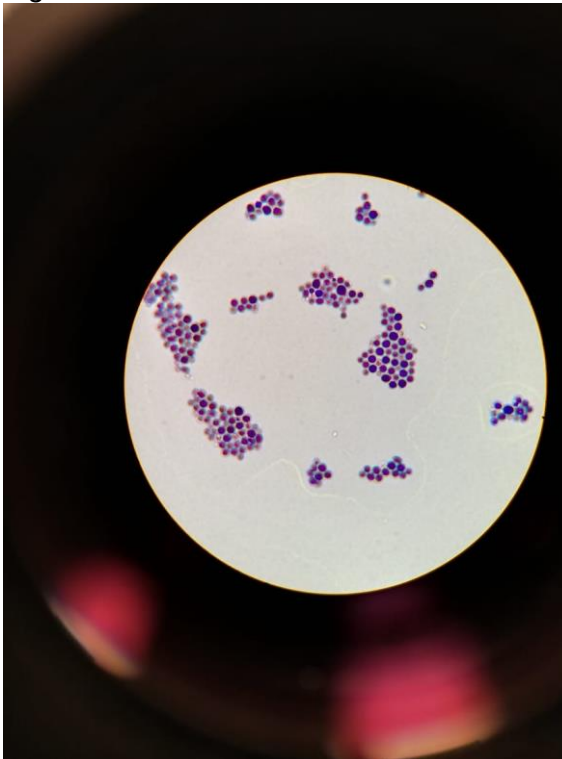
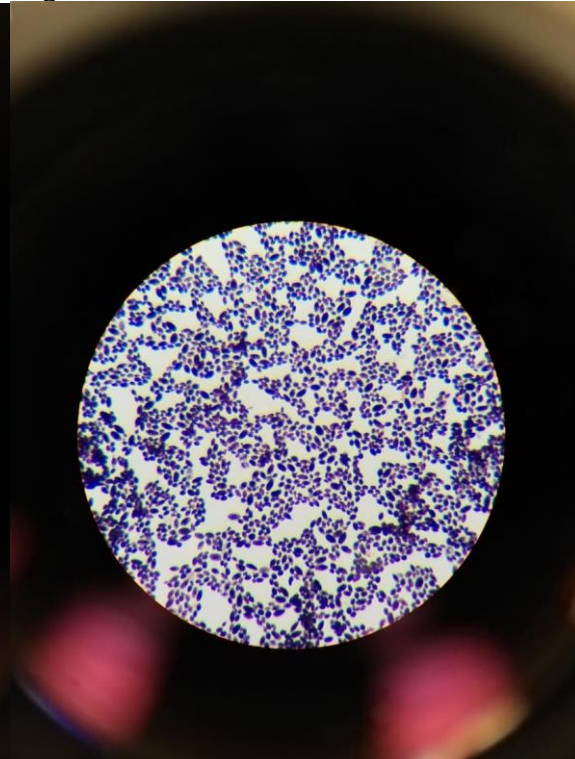


Figura 2 b



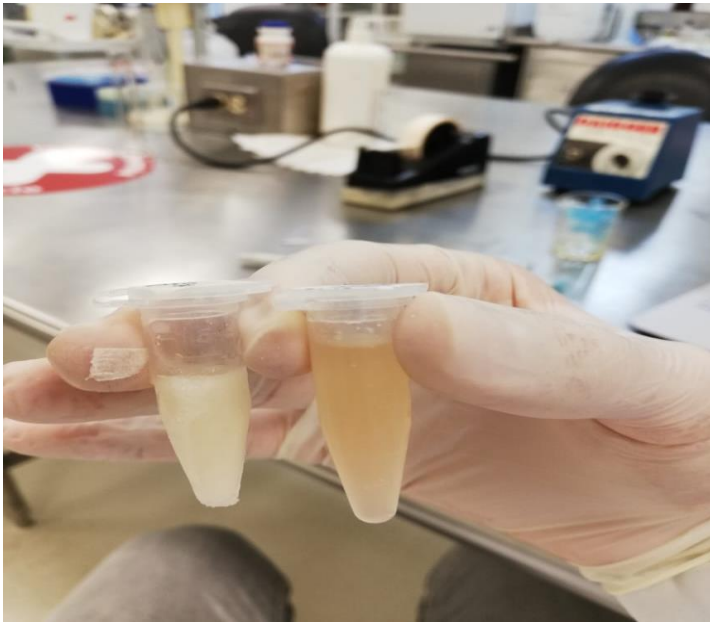
En las figuras 2 a y b se logró reconocer mediante tinción de gram, levaduras que pueden ser de interés para ser identificadas molecularmente y ser empleadas en la industria cosmética

Figura 3. Aislamiento y purificación de cepas



En la figura 3 se ilustran las cepas purificadas y aisladas identificadas como levaduras con sus réplicas luego del proceso de selección a través del método de tinción de gram.

Figura 4. Generación de crioviales para el nuevo cepario de la Universidad EAFIT



En la figura 4 se ilustran algunos crioviales generados a partir de colonias de cajas Petris puras de las cepas identificadas como levaduras mediante su morfología y con tinción de gram.

Figura 5. Extracción de ADN

Figura 5 a



Figura 5 b



En las figuras 5 a y b se ilustran los tubos eppendorf de 1.5mL que contienen las muestras de ADN extraídas de los crioviales generados para el cepario de la Universidad EAFIT.

Análisis parcial.

Si bien se lograron seleccionar algunas levaduras con base a las técnicas de estereoscopia y microscopia, aún falta conocer con precisión qué especies son para poder desarrollar un plan de producción de ingredientes naturales a partir de estos microorganismos y medir su capacidad de producción de los mismos, como lo es, por ejemplo, las pruebas DPPH y ABS para cuantificar la producción de antioxidantes de los microorganismos. **Por otro lado, la generación del cepario nuevo en este proyecto para la Universidad EAFIT, crea un recurso de alto potencial bioquímico y genético para estudiantes y profesores que requieran trabajar con cepas de levaduras para sus proyectos en materias, trabajos de grado, proyectos de investigación y grupos de investigación de la universidad, por lo que este resultado es de gran aporte a nuestra institución, sus investigadores y estudiantes en formación.** (Lau, estaba pensando en poner esto como una conclusión, aunque el informe originalmente no lo pide por lo que lo puse aquí; me cuentas qué piensas)

Es importante anotar que en algunos de los aislamientos se lograron observar la presencia de lo que pareciesen ser esporas de hongos filamentosos. No obstante, algunas levaduras del género *Candida sp.* y *Clavispora sp.* Tienen la tendencia de tener una morfología muy similar a la de las esporas provenientes de dichos hongos.

En el año 2021-1 se propone darle continuidad al proyecto para proceder con la identificación molecular de las cepas de levaduras aisladas en este semestre mediante el proceso de secuenciación, para dar paso a la identificación de especies aisladas y así conocer qué ingredientes pueden ser empleados en la industria cosmética a partir de dichas especies. Asimismo, se espera evaluar la capacidad de dichas cepas del nuevo cepario de levaduras EAFIT, para fermentar el mucílago de café y generar un extracto rico en nutrientes y antioxidantes para ser usado en biocosmética.

PRODUCCIÓN ACADÉMICA, CIENTÍFICA O ARTÍSTICA

- Ponencia en el Medellín Microbial Meeting (MeMM) en modalidad de póster.
- Ponencia en la Feria de Semilleros: Sembrando Interacciones en modalidad de ponentes
- Ponencia en el encuentro departamental REDCOLSI 2020 en modalidad de ponentes.

EJECUCIÓN PRESUPUESTAL

	VALOR TOTAL	VALOR TOTAL + IVA
Palillos siembra	\$ 495.520,00	\$ 495.520,00
Cajas Petri	-	\$ 620.000,00
Cajas Petri Plásticas	\$ 274.000,00	\$ 274.000,00
Bactoagar	\$ 375.000,00	\$ 750.000,00
Primers P1-2 ITS1 200 nmol	\$ 229.670	\$ 229.670
Primers P1-2 ITS2 200 nmol	\$ 229.670	\$ 241.808
Primers P1-2 515F 200 nmol	\$ 229.670	\$ 265.965

Primers P1-2 805R 200 nmol	\$ 229.670	\$ 314.279
TOTAL	\$	3.191.242,00

LECCIONES APRENDIDAS

- Se reforzó la capacidad de trabajo en equipo de los estudiantes y la disciplina para la ejecución de cada actividad del proyecto.
- Se adquirieron conocimientos teóricos y prácticos en técnicas de aislamiento de microorganismos, conteo de unidades formadoras de colonia, purificación de cepas, entre otras técnicas microbiológicas.
- Se adquirió destreza para una rápida identificación morfológica de colonias de microorganismos mediante las prácticas de estereoscopía y microscopía.
- Se reforzaron conocimientos tanto teóricos como prácticos en biología molecular a través del empleo de diversos protocolos de extracción de ADN y análisis de integridad genómica con la técnica de electroforesis.

OBSERVACIONES

En términos generales, el proyecto logró completarse casi al 100%. Lo anterior no se logró debido a la emergencia sanitaria por el CoVid-19 y la limitación y reserva de equipos de laboratorios, los cuales en algunos momentos generaban atrasos considerables en el cronograma de ejecución de actividades por lo que se trabajó contra todo pronóstico. Sin embargo, desde el semillero BIOQUIP, se quiere hacer un reconocimiento a la labor de la universidad para permitir la reactivación de actividades en laboratorios y demás espacios para lograr cumplir a cabalidad con los objetivos de los proyectos de semilleros. Decisión la cual fue vital para seguir aportando al crecimiento de la universidad y al conocimiento en las diversas áreas del conocimiento.