



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Evaluación de medios de cultivo para la producción de
astaxantina a partir de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4”**

T E S I S

Que presenta

IAI. CITLALLI PALMA HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la Tesis: Dra. María Teresa Ponce Noyola

El desarrollo de esta tesis de Maestría contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca número 634104 y del proyecto CB 2014/236895

AGRADECIMIENTOS

A la **Doctora María Teresa Ponce Noyola** directora de esta tesis por permitirme formar parte de su grupo de investigación así como su apoyo y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial **Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia y Dr. Carlos Cerda García-Rojas** por sus valiosas aportaciones a lo largo del proyecto.

A la **M en C. Odilia Pérez Ávalos** por el entrenamiento y apoyo en el montaje de técnicas de laboratorio.

A mi familia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio.

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Pigmentos	5
1.2 Carotenoides.....	5
1.3 Astaxantina	6
1.4 Biosíntesis de astaxantina	7
1.5 Microorganismos productores de pigmentos	10
1.6 Producción biotecnológica de astaxantina.....	11
1.7 Sustratos agroindustriales.....	15
1.7.1 Melazas de caña de azúcar.....	16
1.7.2 Suero de leche	17
1.7.3 Hidrolizados de bagazo de caña	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Microorganismo	23
6.2 Preparación del inóculo.....	23
6.3 Sustratos.....	23
6.3.1 Melaza.....	23

6.3.2	Suero de leche	24
6.3.3	Sacarificado de bagazo de caña	24
6.4	Condiciones de crecimiento	25
6.5	Experimentos a nivel matraz.....	26
6.6	Experimentos a nivel de reactor.....	27
6.7	Medición del crecimiento.....	28
6.8	Cuantificación de azúcares reductores (DNS)	28
6.9	Identificación de azúcares en HPLC	28
6.10	Cuantificación de carotenoides totales	29
6.11	Cuantificación de astaxantina.....	29
6.12	Análisis estadístico	30
7.	RESULTADOS	31
7.1	Identificación de los azúcares presentes en los residuos agroindustriales ...	31
7.2	Evaluación del crecimiento y producción de pigmentos a diferentes concentraciones de glucosa por <i>X. dendrorhous</i> R4	33
7.3	Evaluación del crecimiento y consumo de azúcares de <i>X. dendrorhous</i> R4 en los sustratos complejos en medio YM.....	35
7.4	Cinéticas de crecimiento y producción de carotenoides por <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YM a nivel de matraz.....	37
7.5	Evaluación del crecimiento celular y producción de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i> R4 en sustratos puros.....	44
7.6	Cinética de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mineral (MM) a nivel matraz.....	46
7.7	Efecto de la relación carbono:nitrógeno (C:N) sobre el crecimiento y producción de astaxantina de <i>X. dendrorhous</i> R4	48
7.8	Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i> R4	50

7.9	Determinación del perfil de carotenoides producidos por la mutante R4 de <i>X. dendrorhous</i> cuando utiliza como fuente de carbono los residuos agroindustriales	53
7.10	Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mineral en reactor.....	55
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	RECOMENDACIONES.....	60
10.	BIBLIOGRAFÍA	61
11.	ANEXOS	71

Índice de figuras

Figura 1. Ruta biosintética de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	9
Figura 2. Esquema general de un sistema de producción biotecnológica	12
Figura 3. Volumen de producción de melaza de caña en México	17
Figura 4. Estrategia experimental	22
Figura 5. Crecimiento celular y producción de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YM suplementado con 10, 20 y 30 g/L de glucosa como sustrato	35
Figura 6. Crecimiento y consumo de azúcares de <i>X. dendrorhous</i> en los diferentes residuos agroindustriales	37
Figura 7. Crecimiento, consumo de azúcares y producción de carotenoides totales de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YM suplementado con glucosa, melaza de caña y sacarificado de bagazo de caña.....	43
Figura 8. Crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YPD suplementado con glucosa, fructosa, xilosa, celobiosa y sacarosa.....	45
Figura 9. Rendimiento final de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i> R4 creciendo en medio YPD suplementado con diferentes azúcares.....	46
Figura 10. Cinética de crecimiento, consumo de azúcares y producción de carotenoides totales por <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mineral suplementado con glucosa.....	48
Figura 11. Curva de crecimiento, consumo de azúcares, producción de carotenoides totales y pH de <i>X. dendrorhous</i> R4 en MM	52
Figura 12. Curvas de crecimiento, consumo de azúcares, producción de carotenoides totales y control de pH 4.5 y 5.8 de <i>X. dendrorhous</i> R4 en MM.....	52
Figura 13. Crecimiento, consumo de azúcares y producción de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mineral suplementado con melaza o sacarificado de bagazo de caña.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Organismos productores de astaxantina.....	10
Tabla 2. Producción de carotenoides en levaduras a partir de residuos agroindustriales.....	14
Tabla 3. Producción de astaxantina por cepas de <i>X. dendrorhous</i> creciendo en diferentes residuos agroindustriales.....	15
Tabla 4. Parámetros determinados en las cinéticas de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> R4	42
Tabla 5. Crecimiento, carotenoides totales y consumo de azúcares de <i>X. dendrorhous</i> R4 a diferentes relaciones carbono/nitrógeno.....	49
Tabla 6. Contenido de carotenoides producidos por <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YM suplementados con glucosa, melaza y sacarificado de bagazo de caña como sustrato	54
Tabla 7. Concentración de carotenoides totales ($\mu\text{g/L}$) obtenidos de <i>X. dendrorhous</i> R4 en los medios evaluados	58

RESUMEN

Se evaluó la producción de astaxantina por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 al crecer en sacarificado de bagazo de caña (SBC), melaza de caña de azúcar y suero de leche como sustratos en un medio mineral y un medio rico (YM). En los medios evaluados conteniendo melaza y SBC, la levadura fue capaz de crecer obteniendo valores cercanos a los 3.7 g/L de biomasa. Por otro lado, en el suero de leche el crecimiento fue aproximadamente 50% menos que en glucosa. La producción de carotenoides totales aumentó 69 µg/L cuando se usó SBC como sustrato en medio mineral, mientras que en medio YM el valor obtenido es equiparable respecto a la glucosa. Caso contrario a lo obtenido cuando se utilizó melaza ya que en cualquiera de los medios se obtuvo entre un 60 y 70% del total de pigmentos producidos con glucosa. Por otro lado la astaxantina se identificó como el pigmento principal producido por *X. dendrorhous* R4 representado más del 80% del total de los carotenoides en melaza y glucosa, mientras que para en el SBC, la astaxantina representó hasta un 90% de los carotenoides totales producidos, el resto de los pigmentos se identificaron como xantofilas. Los resultados obtenidos confirman el potencial de utilizar residuos agroindustriales como sustrato para la producción de astaxantina mediante el empleo de *X. dendrorhous* R4.

ABSTRACT

The production of astaxanthin by the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 when grown in both a mineral medium and a rich medium (YM) with saccharified sugarcane bagasse (SBC), sugarcane molasses, or whey as substrates was evaluated. In the media containing molasses or SBC, the yeast was able to grow to values close to those obtained in the media with glucose. On the other hand, the growth in whey containing media was approximately 50% less than with glucose. Total carotenoid production increased by 8% when SBC was used as the substrate in mineral medium, while in YM medium the value obtained is comparable to glucose. When molasses was used as substrate in any media, total carotenoid production was only between 60 and 70% of that obtained with glucose. Favorably, astaxanthin was identified as the major pigment produced by *X. dendrorhous* R4, representing more than 80% of total carotenoids in molasses and glucose containing media or up to 90% of total carotenoids produced in SBC media. The remaining pigments were identified as xanthophylls. These results confirm the potential of agro-industrial waste as a substrate for the production of astaxanthin using *X. dendrorhous* R4.

ABREVIATURAS

DMAPP dimetilalil pirofosfato

GGPP pirofosfato de geranilgeranilo

HDCO 3-Hydroxy-3',4'-didehydro- β - ψ -caroten-4-one

IPP pirofosfato de isopentenilo

MM medio mineral

PBS fitoeno sintasa

SBC sacarificado de bagazo de caña

SESol suero esterilizado en solución

SES suero esterilizado en seco

SEBM suero esterilizado en baño María

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la demanda de productos naturales por los consumidores está en aumento, por tanto uno de los principales intereses en el sector biotecnológico es la extracción y caracterización de pigmentos para su uso como ingredientes funcionales. Estos ingredientes biológicamente activos pueden ser utilizados no sólo como conservadores y antioxidantes naturales de los alimentos, sino también se pueden añadir como ingredientes que disminuyen potencialmente el riesgo de padecer enfermedades degenerativas (Niizu, 2003; Mata-Gómez *et al.*, 2014). Los pigmentos son los responsables de los colores naturales en frutas, vegetales, raíces, minerales, plantas, microorganismos, entre otros (Kirti *et al.*, 2014). Son utilizados en diferentes industrias como la farmacéutica, cosmética y de los alimentos principalmente. Se estima que para el año 2018 el mercado global de colorantes para alimentos alcanzará 2,154 millones de dólares con una producción aproximada de 49,600 toneladas (Carmona, 2013). Las principales fuentes de producción de pigmentos son las plantas y la síntesis química, sin embargo el uso de microorganismos como bacterias, microalgas y hongos para la producción de pigmentos presenta ciertas ventajas como: rápido crecimiento, facilidad de adaptación a diferentes ambientes, facilidad de manipulación genética, entre otras (Demain y Adrio, 2012). Actualmente la investigación para la producción de estos aditivos alimentarios de origen natural se centra en obtener mayores rendimientos con menores costos de producción, esto mediante el uso de técnicas de mejoramiento genético y biología molecular para la mejora de cepas, el diseño de

medios de cultivo complejos empleando sustratos de bajo costo y la optimización de las condiciones de fermentación.

1.1 Pigmentos

Los compuestos químicos que producen los microorganismos y plantas en respuesta al estrés ambiental y que absorben luz en el intervalo de longitud de onda de la región visible, se denominan pigmentos. Estos pigmentos son extraídos y utilizados principalmente en la elaboración de productos de diferentes sectores industriales. Pueden ser clasificados tomando en cuenta alguna de sus características como su origen (microbiano o plantas), estructura del cromóforo (débiles o fuertes) y su uso como aditivos alimentarios (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Kirti *et al.*, 2014; Nigam y Luke, 2016). Dentro de los pigmentos naturales hay cuatro grupos de importancia económica. Estos son las porfirinas, piridinas, melaninas y carotenoides (Martínez, 2010). Los pigmentos más utilizados como aditivos alimentarios son β -caroteno, riboflavina y licopeno (Nigam y Luke, 2016).

1.2 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos poliénicos asociados a fracciones lipídicas, sensibles a la luz, oxígeno y calor y están formados por 8 o 10 unidades de isopreno con los que se obtienen compuestos de 40 o 50 carbonos respectivamente. Una serie de dobles enlaces conjugados constituye un grupo cromóforo, cuyo máximo de

absorción varía entre 400 y 500 nm, el cual proporciona los colores característicos entre el amarillo y el rojo (Villa *et al.*, 1999; Kirti *et al.*, 2014).

Los carotenoides con la cadena hidrocarbonada no sustituida (licopeno, β -caroteno, etc.) se denominan carotenos. El término xantofilas cubre un grupo amplio de derivados oxigenados que incluye alcoholes (luteína y zeaxantina), epóxidos (violaxantina), éteres (esferoidenona), cetonas (equinenona, cantaxantina, astaxantina, esferoidenona) y ácidos (torularodina) (Villa *et al.*, 1999).

1.3 Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona) es un oxicarotenoide que pertenece al grupo de las xantofilas (Martínez, 2010), dando coloraciones entre naranja-rojo (McNulty *et al.*, 2008). Está formada por ocho unidades de isopreno que por condensación dan estructuras hidrocarbonadas de cuarenta átomos, llamados tetraterpenos. La fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$ y posee un peso molecular aproximado de 596.86 Daltons, su punto de fusión es de aproximadamente 224 °C. Es insoluble en soluciones acuosas, pero soluble en diclorometano, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido y otros solventes polares. Es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis (Martínez, 2010). Presenta dos carbonos asimétricos en la posición 3 y 3' y pueden existir en tres configuraciones, incluyendo los entantiómeros idénticos ($3S,3'S$; $3R,3'R$) y formas meso ($3R,3'S$) (Müller *et al.*, 1980). La astaxantina es atractiva debido a su poder antioxidante, el cual es diez veces más que otros carotenoides incluyendo zeaxantina, luteína, cantaxantina, β -caroteno y α -tocoferol. Esta propiedad

antioxidante se debe a su particular estructura molecular ya que tiene dos anillos ionona y en cada uno posee un grupo hidroxilo (OH) y un grupo cetona (CO), así como once dobles enlaces conjugados (Lee *et al.*, 2011).

La astaxantina es responsable de la atractiva pigmentación de animales como el salmón, camarón, langosta, trucha y flamings (Shahaidi *et al.*, 1998). Este pigmento protege contra los radicales libres, la peroxidación lipídica, el daño oxidativo, la oxidación de ácidos grasos esenciales y la protección contra los efectos de la luz ultravioleta (Hu *et al.*, 2006). Ya que los animales que son producidos bajo condiciones controladas no pueden sintetizar astaxantina, se debe suplementar cierta cantidad de este pigmento en la dieta. Actualmente la producción de salmón y truchas ha desarrollado un mercado potencial para la producción de astaxantina, puesto que ciertos estudios han demostrado que ésta es efectiva para la pigmentación de la carne en estas especies (Dufossé, 2006).

1.4 Biosíntesis de astaxantina

La síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* comienza a través de la ruta del mevalonato (MVA), el cual es el precursor de los terpenoides en las levaduras y se forma a partir del acetil CoA y del acetoacetil CoA (Barbachano-Torres, 2014). A través de una serie de reacciones se forma el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su posterior isomerización hasta dimetilalil pirofosfato (DMAPP) catalizada por la IPP isomerasa tipo I, la cual está codificada por el gen *idi* (Berthelot *et al.*, 2012). Tres moléculas de IPP son condensadas secuencialmente a una molécula de DMAPP,

donde la enzima GGPP sintasa (gen *crtE*) cataliza la reacción hasta formar pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP). El siguiente paso es la formación de fitoeno a través de la condensación de dos moléculas de GGPP. Esta molécula corresponde al primer carotenoide de la ruta biosintética. Este paso lo lleva a cabo la enzima bifuncional llamada fitoeno sintasa (PBS) codificada por el gen *crtYB* (Alcaíno *et al.*, 2008). Posteriormente la introducción de cuatro dobles enlaces en el fitoeno genera el licopeno, el cual es el producto de la enzima llamada fitoeno desaturasa (gen *crtI*) (Ojima *et al.*, 2006). Subsecuentemente los extremos terminales del fitoeno son ciclados por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS, dando la formación de β -caroteno (Alcaíno *et al.*, 2008). En *X. dendrorhous* una sola enzima llamada astaxantina sintasa (gen *crtS*) cataliza la incorporación de dos grupos ceto (posiciones 4 y 4') así como la de dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 3' del β -caroteno (Alcaíno *et al.*, 2012) (Fig. 1).

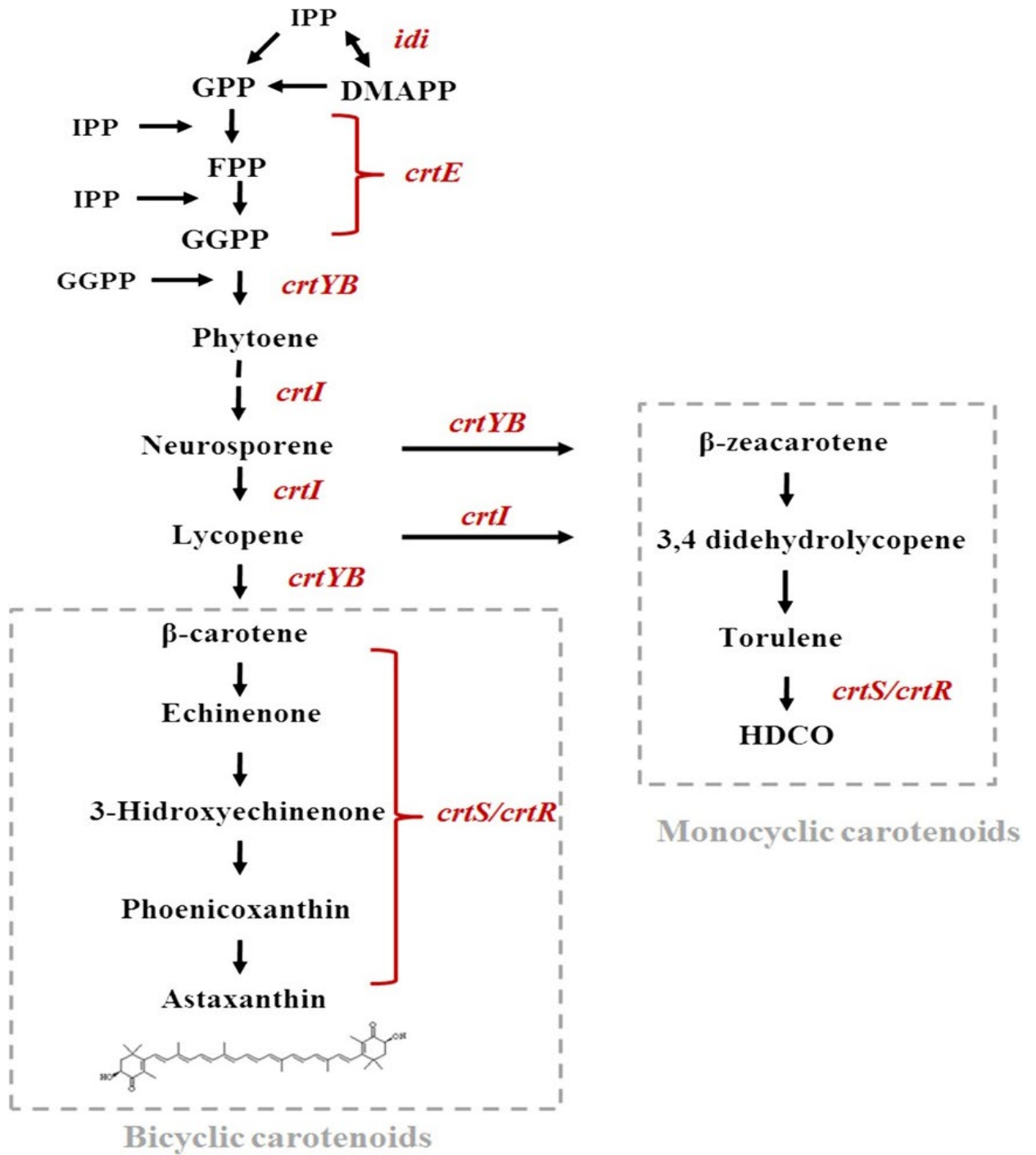


Figura 1. Ruta biosintética de astaxantina en *X. dendrorhous*

Fuente: Contreras et al., (2013)

1.5 Microorganismos productores de pigmentos

Se ha reportado que entre los microorganismos que pueden sintetizar pigmentos de *novo* están las algas, hongos y bacterias. Un microorganismo productor de pigmentos debe tener ciertas características que los hagan ser potenciales para la producción industrial. Por ejemplo, debe ser capaz de asimilar una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, tolerancia a cambios en el pH, temperatura y minerales (Kirti *et al.*, 2014). Entre los hongos destacan *Cantharellus cinnabarinus* y *Blakeslea trispora* por su producción de cantaxantina y licopeno respectivamente. En las microalgas cabe mencionar su alta producción de luteína en *Spongiococcum excentricum* y *Chlorella pyrenoidosa*. Por otra parte, en bacterias no fotosintéticas se ha detectado el licopeno en *Streptomyces chrestomyceticus*, la zeaxantina en *Flavobacterium* sp., y la cantaxantina en *Brevibacterium* (Villa *et al.*, 1999). La astaxantina es producida por pocos microorganismos de los que solamente el alga verde *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* pueden competir con la astaxantina sintética (Tabla 1).

Tabla 1. Organismos productores de astaxantina

Organismo	
Bacterias	<i>Mycobacterium lacticola</i>
	<i>Paracoccus</i> sp. N81106
	<i>Paracoccus haeundaensis</i>
Microalgas	<i>Haematococcus pluvialis</i>
	<i>Chlorella zofingiensis</i>
Levadura	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
Planta	<i>Adonis annua</i>
Insecto	<i>Acyrthosiphon pisum</i>

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomiceta aislada por Herman J. Phaff de las regiones montañosas de Japón y Alaska. Es capaz de asimilar una amplia variedad de azúcares para producir astaxantina como principal pigmento, la cual representa un 85% del total de carotenoides producidos (Phaff *et al.*, 1972; Miller *et al.*, 1976; Andrewes y Starr, 1976; Visser *et al.*, 2003). Las cepas silvestres de *X. dendrorhous* producen bajas cantidades de astaxantina (200-500 µg/g de levadura seca), mientras que las cepas mejoradas que se han desarrollado, producen entre 6000-15000 µg/g de levadura (Johnson y Echavarri-Erasun, 2011). Barbachano-Torres *et al.*, (2014) obtuvieron 8 mutantes superproductoras de astaxantina, de las cuales la cepa llamada R4, destaca por producir 1.764 mg/g de células secas, representando un aumento aproximado de 3 veces más que la cepa silvestre utilizada. Es por esto que la obtención de cepas mutantes que incrementan la producción de astaxantina es un paso crucial para el mejoramiento del proceso.

1.6 Producción biotecnológica de astaxantina

En el diseño de un proceso biotecnológico en general, se deben considerar diferentes factores tales como el biorreactor a utilizar, las materias primas, el microorganismo, tipo de proceso, entre otros (Fig. 2). Estas características juegan un papel importante para lograr los rendimientos deseados del metabolito buscado.

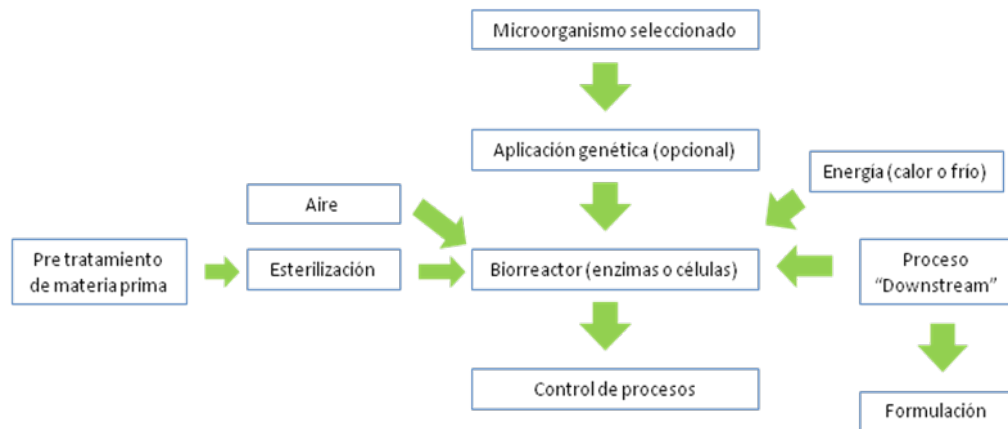


Figura 2. Esquema general de un sistema de producción biotecnológica

Fuente: Mata-Gómez *et al.*, (2014)

Los carotenoides comerciales son obtenidos principalmente por síntesis química (Dufossé *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2015). Sin embargo este método de producción tienen ciertas desventajas como la necesidad de tener tecnologías eficientes a altos costos, poca sostenibilidad a largo plazo debido a la inestabilidad de los precios en las materias primas y/o poca o nula disminución de la huella de carbono. Por otro lado la producción de carotenoides empleando microorganismos, específicamente la producción de astaxantina empleando la levadura *X. dendrorhous* presenta ciertas ventajas como son su rápido crecimiento, se puede cultivar en altas densidades celulares, la astaxantina se acumula como el principal pigmento, produce en su mayoría el isómero 3R y 3'R, el cual es mejor asimilado por quienes la consumen, así como la facilidad de emplear una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, (Johnson y Echavarri-Erasun, 2011; Bhatt *et al.*, 2013; Mata-Gómez *et al.*, 2014).

Se ha observado que las condiciones nutricionales de cultivo, tales como las fuentes de carbono y nitrógeno influyen directamente en el perfil de carotenoides de las levaduras. El metabolismo de las levaduras es dependiente del tipo de fuente de carbono presente en el medio de cultivo. Algunos azúcares como las hexosas, principalmente la glucosa y las pentosas son metabolizados por la ruta glicolítica y la ruta de las pentosas fosfato, respectivamente (Reynders *et al.*, 1997). Por otro lado, las fuentes de carbono no asimilables como el etanol y el succinato deben ser metabolizados por el microorganismo a fin de que se puedan incorporar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Los microorganismos son capaces de sintetizar pigmentos cuando son cultivados en medios sintéticos, conteniendo varias fuentes de carbono refinados como glucosa (An *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2007, Liu y Wu, 2007), xilosa (Parajó *et al.*, 1997), celobiosa (Cruz y Parajó, 1998), glicerol y sorbitol (Wozniak *et al.*, 2011); sin embargo estos medios por su precio representan costos altos. También se ha demostrado que los microorganismos crecen en medios de cultivo complejos, los cuales usan fuentes de carbono naturales (Tabla 2). Algunas de estas fuentes se consideran subproductos de los procesos industriales que son contaminantes al medio ambiente y su tratamiento representa altos costos económicos. Es importante mencionar que si bien la fuente de carbono es uno de los factores principales que afectan la producción de pigmentos también se deben considerar las cantidades de nitrógeno y minerales que contiene el medio y la composición de las fuentes de carbono a utilizar para definir la preparación del medio de cultivo y mejorar la carotenogénesis en los microorganismos (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

Tabla 2. Producción de carotenoides en levaduras a partir de residuos agroindustriales

Sustrato	Levadura	Rendimiento (µg/L)
Suero de leche liofilizado	R. glutinis	46 de β-caroteno
Extracto de papa	R. mucilaginososa	56 de β-caroteno
Glicerol	R. glutinis	135.2 de carotenoides totales
Plumas de pollo	R. glutinis	92 de carotenoides totales
Suero ultrafiltrado	R. acheniorum	262 de β-caroteno
Suero de leche	S. salmonicolor	0.5904 de carotenoides totales
Rábano	R. glutinis	0.019 de β-caroteno
Rábano	R. glutinis	0.201 de β-caroteno
Harina de residuos de frijol y extracto de camote	R. glutinis	3.48 de carotenoides totales
Suero ultrafiltrado	R. glutinis	10.2 de carotenoides totales

Fuente: Mata-Gómez *et al.*, 2014

Xanthophyllomyces dendrorhous puede crecer y producir astaxantina en una gran variedad de fuentes de carbono (Tabla 3). Por lo tanto, la biotecnología tiene un papel esencial para aumentar los niveles de producción de astaxantina y reducir el elevado coste de producción, que limita el uso de *X. dendrorhous* como fuente natural de astaxantina (Guerra, 2012). En general, el uso de sustratos de bajo costo que estén disponibles en cualquier época del año y contengan compuestos asimilables por los microorganismos podrían favorecer un incremento significativo de la producción del pigmento comparado con los resultados obtenidos en un medio estándar (Tinoi *et al.*, 2006).

Tabla 3. Producción de astaxantina por cepas de *X. dendrorhous* creciendo en diferentes residuos agroindustriales

Sustrato	Cepa	Producción ($\mu\text{g/g}$ de células)
Melazas de caña	UCD 67-210	1182
Hidrolizados de turba	NCHU-FS301	1567
Jugo de uvas	N9	1240
Subproductos de la maceración de maíz	NRRL Y-17270	400
Hidrolizados de eucalipto	NRRL Y-17268	448
Xilosa	NRRL Y-17268	571
Jugo de yuca	25-2	1203
Jugo de piña	GM807	493.84
Residuos de mostaza	TISTR 5730	1312
Melaza	UCD 67-210	1182
Leche de coco	NRRL - 10921/R1	850/1850

Fuente: Guerra, 2012

1.7 Sustratos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son materiales que se generan a partir de un proceso de producción y que no son de utilidad para éste, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor agregado. (Saval, 2012).

En México se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos agrícolas, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón (Valdez-Vázquez et al., 2010). El resto, 15.60 millones de toneladas, corresponden a residuos secundarios

obtenidos del procesamiento pos-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café.

Algunos de los criterios a utilizar para la elección de algún residuo para ser aprovechados con fines biotecnológicos son:

- Que el principal componente del residuo pueda ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales, o bien, que el material pueda ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes
- Que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés
- Que no requiera pre-tratamiento, y en caso de requerirlo que éste sea sencillo y económico

1.7.1 Melazas de caña de azúcar

La melaza o miel de caña es un producto líquido espeso derivado de la caña de azúcar. En el mercado internacional, la melaza tiene otros destinos básicos: alimentación animal, producción de alcohol y reprocesamiento industrial. De acuerdo con los datos de la Unión Nacional de Cañeros A.C, la producción de melaza en México para el año 2010 se ubicó en 1.5 millones de toneladas (Fig. 3) (FIRA, 2011). Estas melazas se caracterizan por un alto contenido de azúcar, biotina (vitamina B6) y algunos minerales.

Actualmente las conversiones bioquímicas de los azúcares encontrados en la melaza están orientadas a la producción de materias de la industria química, sustitutivas de los derivados del petróleo, por ejemplo: producción de ácido láctico como materia prima para elaborar bioplásticos. Otros productos emergentes son el propanodiol y ácido succínico (Viniegra, 2001).

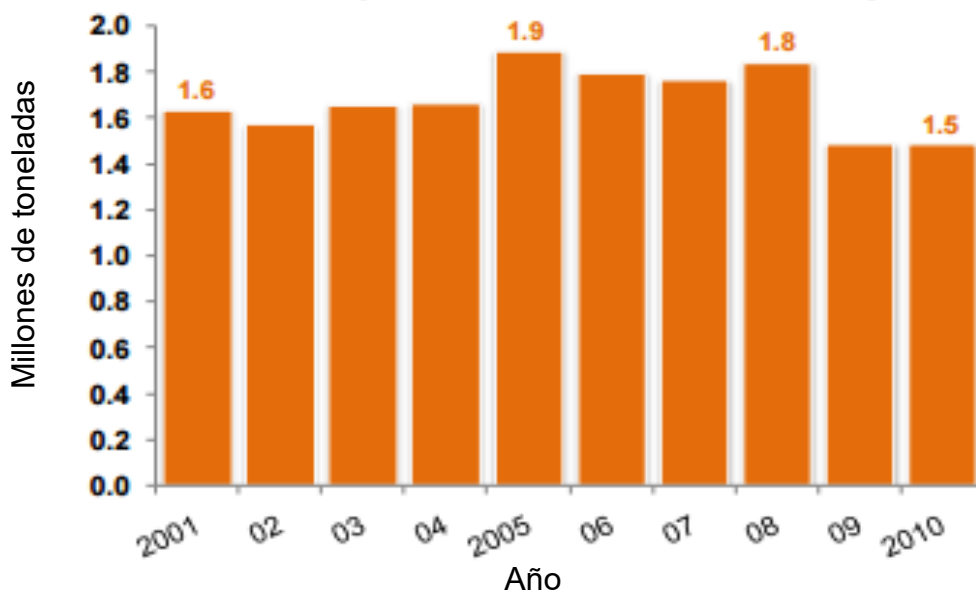


Figura 3. Volumen de producción de melaza de caña en México

Fuente: FIRA, (2011)

1.7.2 Suero de leche

El suero de leche es un sub-producto de la manufactura de alimentos lácteos que representa del 80 al 90% del volumen lácteo transformado. Es un sustrato natural que contiene lactosa, proteínas y minerales, principalmente. La producción mundial anual estimada de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa. El suero producido en México contiene

aproximadamente 50 mil toneladas de lactosa potencialmente transformable y 9 mil toneladas de proteína potencialmente recuperable. A pesar de los usos múltiples del suero, 47% es descargado en suelo, drenajes y cuerpos de agua, tornándose en un serio problema para el ambiente (Carrillo, 2006). Dado que a la mayoría de las empresas productoras de lácteos les aumenta los costos de producción, tratar este residuo se ha convertido en un sustrato atractivo de bajo costo para la producción microbiana de carotenoides. Marova *et al*; (2012) probaron la capacidad de las cepas mutantes de *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26, *Sporidiobolus roseus* CCY 19-4-8 y *Rhodospiridium mucilaginoso* CCY 20-7-3 de producir β -caroteno en suero de leche desproteinizado y liofilizado, encontrando rendimientos superiores a los 1000 $\mu\text{g/g}$ de biomasa seca.

1.7.3 Hidrolizados de bagazo de caña

Los residuos lignocelulósicos derivados de los cultivos agrícolas pueden ser potencialmente utilizados para generar energía así como bioproductos de interés con alto valor agregado (Ghaffar *et al.*, 2015). Para el año 2001 se estimó que la cantidad de residuos agrícolas ascendía a 74 millones de toneladas, de los cuales un porcentaje mínimo fue aprovechado para la obtención de bioetanol (Kim y Dale, 2004).

Los sustratos que se han empleado como modelos de estudio para la generación de biocombustibles y bioproductos son: desechos de la industria maderera, residuos de los cultivos agrícolas como el rastrojo de maíz y arroz, bagazo de caña; así como hierbas y desechos de podas (Cuervo *et al.*, 2009).

El bagazo de caña se obtiene después de extraer el jugo de la caña y ser sometida a una molienda (Lavarack *et al.*, 2002). El comité nacional para el desarrollo sustentable de la caña de azúcar estimó para el año 2014 que por cada hectárea de caña se obtienen 19 toneladas de bagazo, el cual está disponible todo el año (CONADESUCA, 2016). La composición aproximada del bagazo de caña está dado por 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina (Parameswaran, 2009). La celulosa es un homopolímero formado de unidades de celobiosa, la cual se conforma de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace β -1,4 glucosídico; mientras que la hemicelulosa es un heteropolímero ramificado formado por diferentes azúcares como L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-manosa y D-xilosa, principalmente. También puede contener en menor proporción ácido ferúlico, acético y glucorónico (Klemm *et al.*, 1998; Mussatto y Teixeira, 2010). La lignina por su parte es un polímero complejo que está unido a la celulosa y hemicelulosa, la cual confiere rigidez y protección antimicrobiana a las plantas (Ghaffar *et al.*, 2015). Para obtener estos azúcares del bagazo de caña, éste debe ser pre-tratado para eliminar el mayor porcentaje de compuestos fenólicos derivados de la lignina que pueden inhibir el crecimiento microbiano seguido de una hidrólisis hasta tener monosacáridos y disacáridos que puedan ser asimilados como fuente de carbono. Este proceso es comúnmente llamado sacarificación (Yang *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay un gran interés en los procesos biotecnológicos que generan metabolitos secundarios con un alto valor agregado, dentro de los que se encuentran los carotenoides. La astaxantina es un pigmento de interés industrial debido a sus propiedades antioxidantes y como colorante natural. Actualmente *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) es un organismo muy atractivo para la producción de astaxantina debido a que la sintetiza como pigmento principal y se adapta a diferentes condiciones de proceso. Sin embargo la producción de la astaxantina a partir de medios definidos sintéticos tiene elevados costos, por lo que la investigación se ha enfocado a la búsqueda de nuevas fuentes de carbono económicas así como a la optimización de las condiciones de producción. Es por esto que el presente trabajo de investigación se enfoca en la evaluación de diferentes medios complejos para la obtención de rendimientos mayores en la producción de astaxantina respecto al uso de medios sintéticos, con una posible reducción en el costo de producción.

3. HIPÓTESIS

Xanthophyllomyces dendrorhous R4 tendrá un mayor rendimiento en la producción de astaxantina al crecer en residuos agroindustriales y un medio mineral respecto al empleo de un medio sintético definido.

4. OBJETIVO GENERAL

Incrementar los rendimientos de producción de astaxantina con la cepa *X. dendrorhous* R4 creciendo en diferentes residuos agroindustriales como sustratos de bajo costo en un medio de cultivo mineral.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes sustratos y determinar los rendimientos para la producción de astaxantina empleando la mutante R4 de *X. dendrorhous*.
- Establecer las condiciones de fermentación para *X. dendrorhous* R4 donde se obtenga el mayor rendimiento para la producción de carotenoides
- Evaluar el perfil de pigmentos obtenidos en la producción de carotenoides por *X. dendrorhous* R4

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental del proyecto se dividió en tres etapas como se muestra en la Figura 4.

Primera etapa

- Identificación y cuantificación de azúcares en los sustratos a utilizar
- Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina de *X. dendrorhous* R4 en los sustratos complejos en medio YM
- Cinéticas de crecimiento a nivel de matraz en medio YM empleando los sustratos de bajo costo seleccionados
- Evaluación del crecimiento celular y consumo de azúcares de *X. dendrorhous* R4 en sustratos puros (celobiosa, xilosa, fructosa, sacarosa y lactosa)

Segunda etapa

- Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina de *X. dendrorhous* R4 en medio mineral utilizando glucosa como sustrato
- Efecto del pH y la relación carbono-nitrógeno (C:N) en la producción de astaxantina
- Cinéticas de crecimiento a nivel matraz en medio mineral empleando los sustratos de bajo costo

Tercera etapa

- Probar diferentes concentraciones de sustrato en medio mineral
- Determinación del perfil de carotenoides producidos por la mutante R4 de *X. dendrorhous* cuando utiliza como fuente de carbono los residuos agroindustriales
- Montar los sistemas a nivel reactor y determinar parámetros cinéticos

Figura 4. Estrategia experimental

6.1 Microorganismo

La cepa de *Xantophyllomyces dendrorhous* R4 se obtuvo mediante mutagénesis con N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NTG) (Barbachano *et al.*, 2014a). El mantenimiento de la cepa se hizo mediante siembras bimestrales por duplicado en medio sólido YM (3% de extracto de levadura, 3% de extracto de malta, 5% de bactopectona, 1% de glucosa y 1.8% de agar bacteriológico). Las placas se incubaron por siete días a 20 ±2 °C y posteriormente se almacenaron en el refrigerador a 4 °C, hasta su utilización o resiembra.

6.2 Preparación del inóculo

Los inóculos se obtuvieron mediante una asada de la cepa *X. dendrorhous* R4, la cual se depositó en un matraz bafleado de 250 mL que contenía 50 mL de medio YM. Los cultivos se incubaron por 24 h a 20 °C y 200 rpm. Posteriormente una alícuota 10% (v/v) del crecimiento anterior se resembró en otro matraz que contenía medio YM y se incubó durante 36 h a las mismas condiciones antes mencionadas.

6.3 Sustratos

6.3.1 Melaza

Se obtuvo melaza clarificada e hidrolizada de un lote comercial, el cual contenía alrededor de 0.38 g de azúcares reductores/g de melaza, entre los cuales se identificaron sacarosa, glucosa y fructosa.

6.3.2 Suero de leche

El suero de leche se obtuvo de un lote comercial. La composición aproximada de este sustrato fue: 0.85% de grasa total, 12.6% de proteína y 7.58% de cenizas (Muñoz-Páez *et al.*, 2014) y pH de 6.3. Mientras que la cantidad de azúcares reductores que se determinó fue de aproximadamente 0.6 g/g. Este sustrato se esterilizó de tres maneras diferentes: en solución (SESol), en seco (SES) y en baño María (SEBM).

6.3.2.1 Acondicionamiento del suero de leche

Se evaluaron tres métodos para reducir la carga microbiana del suero de leche, los cuales se describen a continuación:

- Esterilización en seco: se adicionaron 0.790 g de suero de leche en tubos de 30 mL (Falcon), se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C.
- Esterilización en solución: se adicionaron 0.880 g de suero de leche y 20 mL de medio YM (sin glucosa) en tubos de 50 mL (Falcon), los cuales se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C
- Tindalización: se adicionaron 0.840 g de suero de leche en tubos de 30 mL (Falcon), éstos se sometieron a tres ciclos de 1 h en baño María y un enfriamiento a 4 °C por 20 min entre cada ciclo

6.3.3 Sacarificado de bagazo de caña

El SBC se obtuvo mediante el proceso secuencial establecido por González-Bautista (2016) el cual consiste en obtener el extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*

PR-22 y en el mismo reactor se lleva a cabo la sacarificación ajustando la concentración de BC y la temperatura.

Cellulomonas flavigena PR-22 se hizo crecer en medio M10 (en g/L): NaCl 5.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5; MgSO_4 , 0.1; CaCl_2 , 0.1; extracto de levadura, 0.2; iones fosfato 3.5 y 1% de bagazo de caña pre-tratado (de la Torre y Casas-Campillo, 1984) durante 24 h en un reactor (Applikon®) con capacidad de 3 L y operado a 2.5 L. Previamente el reactor se inoculó con 250 mL de un crecimiento de 24 h. Las condiciones del proceso fueron 0.5 vvm, 500 rpm y 37 °C. Posteriormente, en el mismo reactor, se llevó a cabo la sacarificación del bagazo de caña incrementando su concentración a 3% (p/v), y la temperatura a 50 °C. La sacarificación se llevó por 24 h. Finalmente la mezcla se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, el cual se concentró por evaporación hasta alcanzar al menos una concentración de 10 g de azúcares reductores/L.

6.4 Condiciones de crecimiento

Los experimentos para la producción de astaxantina y crecimiento celular se llevaron a cabo a 20 °C y se inocularon al 10% (v/v). En los experimentos a nivel matraz se trabajó a 200 rpm mientras que en reactor se utilizaron 500 rpm y 1 vvm para un reactor de 3 L y 0.2 vvm en reactores de 500 mL.

6.5 Experimentos a nivel matraz

- Evaluación de diferentes concentraciones de sustrato: se emplearon matraces bafleados de 250 mL que contenían 50 mL de medio YM, a los cuales se les adicionó glucosa como sustrato a una concentración de 10, 20 o 30 g/L. El proceso duró 100 h y se tomaron muestras iniciales y finales
- Crecimiento y producción de astaxantina: se utilizaron matraces bafleados de 250 mL con un volumen de operación de 50 mL de medio YM suplementado con cada uno de los sustratos a evaluar al 1%
- Cinéticas de crecimiento: se llevaron a cabo en matraces bafleados de 1 L conteniendo 200 mL de medio YM o medio mineral (MM) en (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.96; KH_2PO_4 , 1.33; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 y 5 mL/L de solución mineral. Se adicionaron 20 μL de antiespumante a las 24 h. Se tomaron muestras cada 12 h durante 168 h
- Evaluación de los sustratos puros: se utilizó medio YPD (3% extracto de levadura y 5% bactopectona) suplementado con glucosa, sacarosa, fructosa, celobiosa o xilosa al 1% en matraces bafleados de 25 mL con 10 mL de medio, los cuales se incubaron durante 80 h y se tomaron muestras a las 0, 48, 72 y 80 h

- Evaluación de la relación carbono-nitrógeno (C:N): se evaluaron dos relaciones de C:N para valorar el efecto de este parámetro sobre el crecimiento y producción de carotenoides de la levadura. Se modificó la cantidad de sulfato de amonio que se agregó al medio (1.5 y 2 veces más) de tal manera que las relaciones C:N que se evaluaron fueron 3.176 y 2.382; se utilizó la relación C:N original (4.762) como control. Se utilizaron matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de MM, los cuales se incubaron durante 120 h y se tomaron muestras al inicio y principio del proceso

6.6 Experimentos a nivel de reactor

- Seguimiento y control de pH: se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en MM y glucosa como sustrato al 1% con el fin de seguir y controlar el pH del medio a un valor de 4.5 y 5.8. Se utilizó un reactor (Applikon®) de 3 L con un volumen de operación de 1.5 L, tomándose muestras cada 12 h durante 96 h. El control del pH se hizo utilizando una solución de NaOH 3 M y se tomaron lecturas cada 3 h.
- Cinéticas de crecimiento: se emplearon reactores (Applikon®) de 500 mL con un volumen de operación de 300 mL de MM y melaza o SCB como sustrato ajustando los azúcares al 1%. Se adicionaron 30 µL de antiespumante dosificados durante toda la fermentación y se tomaron muestras cada 12 h durante 96 h. El pH se controló a 5.8 con una solución 3 M de NaOH.

6.7 Medición del crecimiento

La cuantificación del crecimiento de *X. dendrorhous* se realizó indirectamente de acuerdo a una curva patrón que correlaciona valores de densidad óptica con peso seco. Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó 5 min a 5000 rpm, el sobrenadante se recuperó y el botón celular se lavó dos veces con agua destilada, resuspendiendo siempre en el volumen original; se hicieron diluciones 1:20 en tubos de ensayo. Posteriormente cada dilución se leyó en el espectrofotómetro (JENWAY 6320D) a una absorbancia de 660 nm. Las mediciones se hicieron por triplicado. El espectrofotómetro se calibró previamente con agua destilada.

6.8 Cuantificación de azúcares reductores (DNS)

Se recuperó el sobrenadante de las muestras de crecimiento y posteriormente se hizo una dilución 1:10 la cual se utilizó como muestra para la determinación de azúcares reductores. En tubos de ensayo se adicionaron 400 μ L de agua destilada, 100 μ L de la dilución elaborada anteriormente y 1.5 mL del reactivo de DNS. Las muestras se llevaron a ebullición en baño María por 5 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 3 mL de agua destilada y las muestras se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6320D). La determinación se hizo por triplicado. La concentración de azúcares se calculó mediante curvas patrón con un intervalo de 0 a 500 mg de azúcares (Miller, 1959).

6.9 Identificación de azúcares en HPLC

La identificación de azúcares en HPLC se realizó inyectando 20 μ L de sacarificado, melaza o suero de leche previamente centrifugado y filtrado a través de una

membrana acrodisco (ϕ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 μm , PALL). Se utilizó una columna Hi-plex H⁺ (300 mm x 7.7 mm) (Agilent) a 65 °C. El método empleado fue isocrático con un detector de índice de refracción (IR) a 50 °C y como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min.

6.10 Cuantificación de carotenoides totales

Se tomaron 4 mL de muestra, los cuales se depositaron en tubos de vidrio COREX de 30 mL. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se lavó con agua destilada. El paquete celular ya lavado se resuspendió en el volumen original y se volvió a centrifugar desechando el sobrenadante, se agregaron 2 g de perlas de vidrio (ϕ 500 μm) y se adicionaron 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55°C. Se agitó en el vortex durante 2 min y posteriormente se adicionó 1 mL de una solución de NaCl al 20%, 1 mL de acetona y 1 mL de hexanos. Las muestras se agitaron en un vortex durante 2 min, posteriormente se centrifugaron 10 min a 5000 rpm, se recuperó la fase orgánica y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (JENWAY 6320D) a 474 nm en una celda de cuarzo (Sedmak, 1990). Los cálculos para determinar el contenido de carotenoides totales se realizaron empleando el coeficiente de extinción de la astaxantina $E_{1\%} = 2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y la fórmula reportada por An *et al.*, (1989).

6.11 Cuantificación de astaxantina

La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo en HPLC (Agilent Technologies modelo 1260 Infinity) inyectando 20 μL de una muestra previamente extraída (ver cuantificación de carotenoides totales) la cual se secó con nitrógeno gaseoso y se

resuspendió en 200 μ L de hexano. El método utilizado para la cuantificación fue isocrático con un detector de arreglo de diodos (DAD) usando una columna de fase reversa Allsphere ODS-1 5 μ (250 mm x 4.6 mm) (GRACE) empleando un intervalo de longitud de onda de 450 a 490 nm. La fase móvil utilizada fue metanol:metilterbutiléter:agua (81:15:4) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min a temperatura ambiente.

6.12 Análisis estadístico

El diseño de los experimentos fue completamente al azar (DCA) con dos réplicas biológicas y cada muestra tomada se analizó por triplicado. Los datos obtenidos de cada variable evaluada se analizaron utilizando un análisis de variación (ANOVA) con un nivel de significancia de $p= 0.05$. Se realizó una prueba de Dunnett para determinar que medias fueron significativamente diferentes entre los experimentos llevados a cabo teniendo la glucosa como control.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de los azúcares presentes en los residuos agroindustriales

Con el objetivo de determinar qué tipo de azúcares se encuentran en los sustratos evaluados para la producción de astaxantina con *X. dendrorhous* R4, se analizaron muestras mediante HPLC y se identificaron los azúcares predominantes presentes en suero de leche, melaza y sacarificado de bagazo de caña. En suero de leche se obtuvieron 0.60 g de azúcares reductores/g de suero, de los cuales 0.53 g corresponden a lactosa ($T_R= 9.95$ min). En muy pequeña cantidad se detectaron otros azúcares como galactosa y glucosa, los cuales resultan de la degradación de la lactosa (Anexo 1). La composición promedio del suero de leche consta de proteína soluble, cenizas, ácido láctico, lípidos, sales minerales y de 0.45 a 0.60 g de lactosa como azúcar principal por cada gramo de suero. Esta composición está directamente relacionada con la naturaleza del suero, es decir si es ácido ($pH < 5$) o dulce ($pH 6-7$), el cual depende del proceso utilizado para la precipitación de la caseína (González, 1996).

En melaza clarificada se cuantificaron 0.38 g de azúcares reductores/g de melaza y se identificaron 3 azúcares principales, los cuales fueron sacarosa ($T_R= 9.90$ min), fructosa ($T_R= 12.18$ min) y glucosa ($T_R= 11.40$ min) (Anexo 1) en concentraciones de 0.11, 0.14 y 0.14 g/g, respectivamente. Fajardo y Sarmiento, (2007) reportaron que la melaza contiene sustancias nitrogenadas, agua, vitaminas y entre 60-63% (p/v) de sacarosa, 5-10% (p/v) de fructosa y 6-9% (p/v) de glucosa, y dependiendo de la fuente de la melaza también puede contener rafinosa. El contenido de estos

azúcares puede variar de acuerdo a la hidrólisis a la que fue sometida, pH, naturaleza de la melaza y temperaturas utilizadas en el proceso.

Finalmente para el sacarificado de caña se obtuvieron aproximadamente 5 g/L de azúcares reductores y se identificaron algunos de ellos como glucosa ($T_R= 11.13$ min), xilosa ($T_R= 11.90$ min), celobiosa ($T_R= 9.50$ min) y celo- y xilo-oligosacaridos (Anexo 1) en una concentración de 1.0; 2.5; 1.0 y 4.5 g/L, respectivamente. Polisacáridos como el glucano y el xilano son los componentes mayoritarios del bagazo de caña y por tanto los azúcares que predominan son la glucosa y la xilosa. Esta última podría representar hasta un tercio de los azúcares fermentables del bagazo de caña (Parameswaran, 2009), sin embargo la cantidad y tipo de azúcares que se pueden obtener de la hidrólisis del bagazo de caña depende directamente del pre-tratamiento utilizado para remoción de lignina y la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa empleada (Rani *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). La presencia de azúcares intermediarios como la celobiosa, celo y xilo-oligosacáridos se debe principalmente al complejo enzimático utilizado para llevar a cabo la sacarificación. La composición de este complejo enzimático usualmente está dado por endoglucanasas, exoglucanasas (o celobiohidrolasas) y β -glucosidasa para la degradación de la celulosa y xilanasas y xilosidasas para la de hemicelulosa. *Trichoderma reesei* spp es un hongo filamentoso y ampliamente usado para la producción de celulasas (Parajó *et al.*, 1996). Su extracto tiene una proporción de 18, 72 y <1% de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasa, respectivamente (Rani *et al.*, 2014); por lo que la glucosa se presenta como el principal azúcar liberado con estas enzimas. Otro microorganismo que ha dado buenos resultados

para la producción de azúcares fermentables a partir de bagazo de caña es la bacteria *Cellulomonas flavigena* PR-22 (Rojas-Rejón *et al.*, 2016), la cual es hiperproductora de xilanasas y carboximetil celulasas, sin embargo la enzima β -glucosidasa es producida de manera intracelular por tanto los azúcares liberados son en su mayoría celobiosa, xilosa así como celo y xilo-oligosacáridos (Acosta-Quijano, 1993).

7.2 Evaluación del crecimiento y producción de pigmentos a diferentes concentraciones de glucosa por *X. dendrorhous* R4

Se probaron tres concentraciones de glucosa como sustrato con el fin de establecer la concentración de sustrato donde se obtienen los mejores resultados de crecimiento y rendimiento de carotenoides. Se obtuvieron 2.08 ± 0.02 , 3.43 ± 0.16 y 4.36 ± 0.17 g/L de biomasa a las 100 h para la concentración de 10, 20 y 30 g/L respectivamente (Fig. 5A), mientras que los azúcares residuales fueron 0.22 ± 0.01 , 10.09 ± 0.21 y 15.17 ± 0.23 g/L, en las condiciones señaladas (Fig. 5B). No obstante que a las concentraciones de 20 y 30 g/L de glucosa se obtienen mayores crecimientos, éstos no corresponden a los esperados ya que la cantidad de glucosa residual en el medio es cerca del 50% del valor inicial. Se ha reportado que en cepas mutantes de *X. dendrorhous* a grandes concentraciones de glucosa disminuye el crecimiento (Visser *et al.*, 2003) debido a que la velocidad de reacción de las enzimas para asimilar el sustrato disminuye debido a una posible represión por sustrato y en procesos llevados a cabo en lote se induce la formación de etanol y ácidos orgánicos a través de un efecto llamado Crabtree (Reynders *et al.*, 1997). Así

mismo se ha reportado que *X. dendrorhous* es la única levadura carotenogénica que puede fermentar glucosa (Miller *et al.*, 1976).

Por otro lado los rendimientos de pigmentos no mostraron diferencias significativas entre las tres condiciones probadas obteniendo valores sobre los 500 µg/g de células. Al tener concentraciones altas de sustrato, la síntesis de astaxantina puede disminuir debido a que se presentan limitaciones de oxígeno, generando una posible desviación de la ruta de asimilación de glucosa hacia la ruta fermentativa y por tanto la acumulación de NADH debido a que la eficiencia de la fosforilación oxidativa decrece; por tanto para mantener el balance de NADH en la célula es necesario que el NADH sea oxidado nuevamente. Por otro lado en la síntesis de astaxantina se producen 48 moléculas de NADH, las cuales en presencia de condiciones no limitantes de oxígeno este NADH se oxida indicando que la síntesis de ésta se reprime cuando hay limitaciones de oxígeno que pueden ser producidas por altas concentraciones de sustrato (Yamane *et al.*, 1997). Estudios sobre el efecto de la concentración de sustrato en la cepa NRRL-2502 de *Rhodotorula mucilaginosa* reportaron que un incremento de la concentración de glucosa de 10 a 20 g/L no tiene un efecto significativo en el crecimiento celular y producción de carotenoides, obteniendo valores de biomasa de 4.2 y 5.2 g/L, así como 52 y 72 mg/L de carotenoides, respectivamente (Aksu y Eren, 2005). Debido al poco aumento que presenta el poner el doble o triple de sustrato sobre el crecimiento y producción de carotenoides, se optó por la utilización de una concentración de glucosa de 10 g/L.

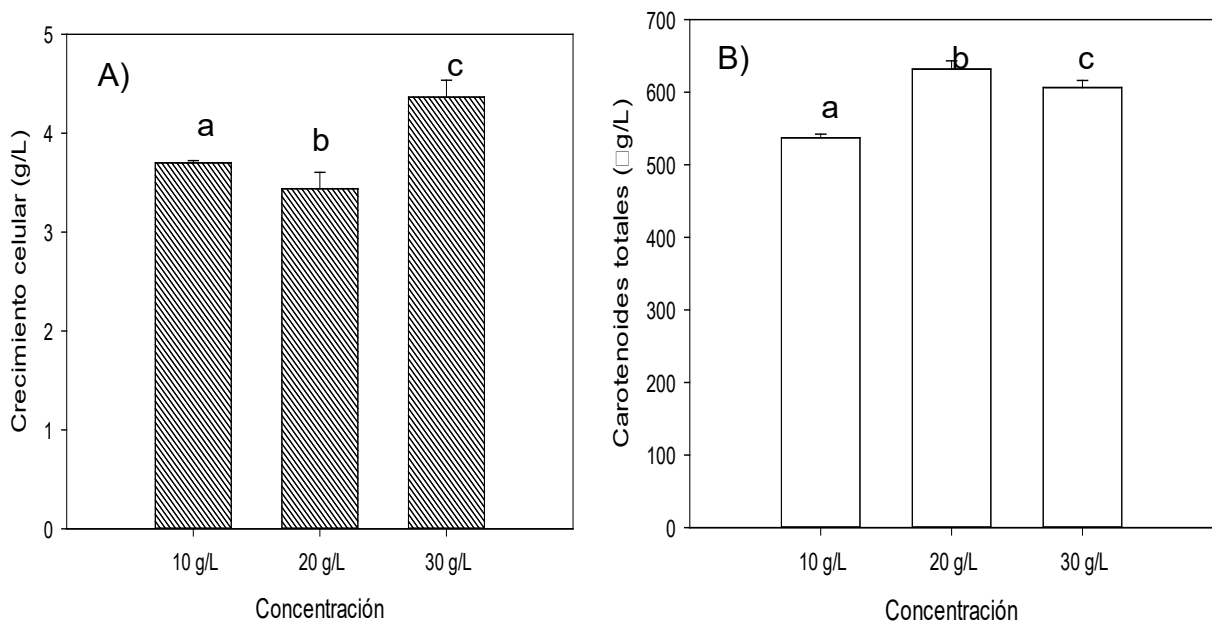


Figura 5. A) Crecimiento celular y B) producción de carotenoides de *X. dendrorhous* R4 a las 100 h de fermentación en medio YM suplementado con 10, 20 y 30 g/L de glucosa como sustrato

7.3 Evaluación del crecimiento y consumo de azúcares de *X. dendrorhous* R4 en los sustratos complejos en medio YM

Se evaluó el crecimiento y consumo de azúcares presentes en los diferentes sustratos a nivel de matraz, con el fin de observar la capacidad de *X. dendrorhous* R4 de crecer en medios complejos. El crecimiento celular en sacarificado de bagazo de caña, melaza y suero de leche fue de 1.96 ± 0.04 ; 2.59 ± 0.04 y 1.87 ± 0.11 g/L, respectivamente, mientras que el consumo de azúcares a las 120 h fue de 9.80 ± 0.20 g/L en SBC y 7.57 ± 0.34 g/L en melaza (Fig. 6). En suero de leche no se pudo

cuantificar el consumo de azúcares debido a interferencias de los componentes del suero de leche. Los rendimientos celulares se encontraron entre 0.2 y 0.3 g de células/g de sustrato consumido tanto en los sacarificados como en la melaza, los cuales están dentro de los valores reportados para esta cepa en dichos sustratos.

De los tres sustratos empleados, la melaza fue en la que mejor crecimiento de *X. dendrorhous* se obtuvo seguido del SBC. Mientras que con el suero de leche se presentaron dificultades para su trabajo por lo que se decidió no considerarlo para los experimentos posteriores. El bajo crecimiento celular en el suero de leche pudo deberse a que las proteínas contenidas en este residuo tales como α -lactoalbúmina, lactoglobulina y β -albúmina (Kosikowski, 1979) se precipitan por calor en el medio, impidiendo la disponibilidad de la lactosa. Por otro lado, la melaza contiene al menos tres azúcares principales (sacarosa, fructosa y glucosa) de los cuales si alguno no es utilizado por *X. dendrorhous*, la presión osmótica cambia y se puede inhibir el crecimiento celular (An *et al.*, 2001). Así mismo el sacarificado de bagazo de caña contiene una gran variedad de azúcares, sin embargo la presencia de otros compuestos como los fenoles y sales puede inhibir el crecimiento de la levadura. Se ha reportado que fuentes de carbono de asimilación lenta podrían promover una mayor pigmentación de las células, pero a expensas de un menor crecimiento (Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Aunque *X. dendrorhous* tiene la capacidad de asimilar y metabolizar una amplia variedad de mono, di y polisacáridos (Bhatt *et al.*, 2013), el menor consumo de azúcares en los sustratos evaluados se puede deber a que éstos son asimilados más lentamente que la glucosa (An *et al.*, 2001).

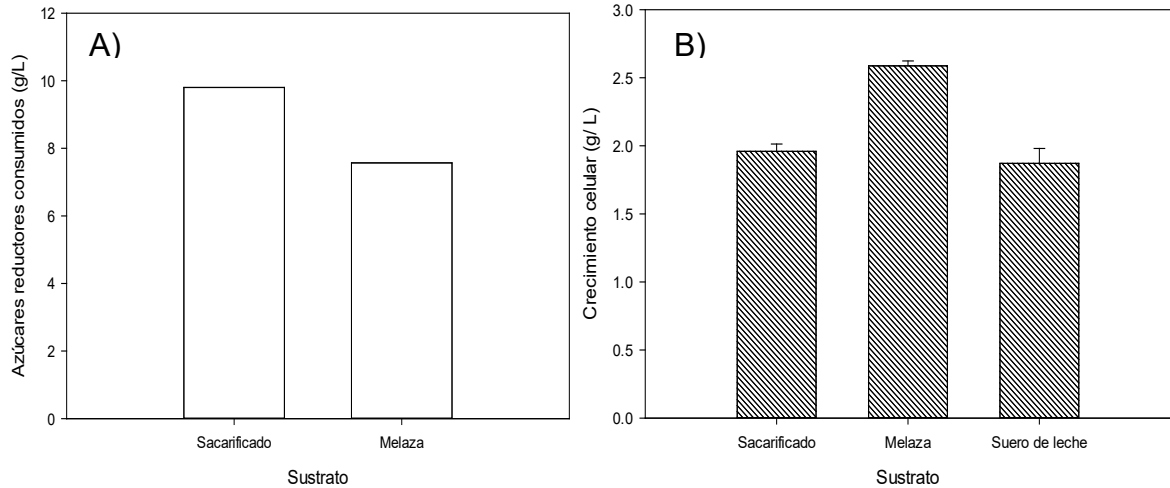


Figura 6. A) Crecimiento y B) consumo de azúcares de *X. dendrorhous* en los diferentes residuos agroindustriales

7.4 Cinéticas de crecimiento y producción de carotenoides por *X. dendrorhous* R4 en medio YM a nivel de matraz

Una vez comprobada la capacidad de *X. dendrorhous* R4 de crecer en los sustratos evaluados, se prosigió a realizar cinéticas de crecimiento con el objetivo de evaluar el comportamiento del crecimiento celular, asimilación del sustrato y producción de carotenoides de *X. dendrorhous* en medio YM, el cual es tradicionalmente utilizado para la producción de astaxantina.

Las cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 se llevaron a cabo durante 108 h. En la Figura 7A se observa que en los tres sustratos utilizados, glucosa, melaza y sacarificado de bagazo de caña, la fase lag dura aproximadamente 12 h. Posteriormente inicia la fase exponencial que dura 48, 36 y 36 h para la glucosa, melaza y sacarificado, respectivamente. En la Figura 7A se observa un ligero

comportamiento diaúxico, que dura aproximadamente de las 48 a las 72 h y de las 36 a las 60 h, respectivamente, éste puede ser causado por los azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa presentes en la melaza, así como xilosa, celobiosa, glucosa y oligosacáridos del sacarificado de bagazo de caña. Este tipo de comportamiento usualmente se presenta en bacterias y levaduras cuando crecen en dos o más sustratos diferentes (Stainer, 1951), y se caracteriza por presentar dos ciclos de crecimiento separados por una fase lag corta (Monod, 1949) ya que primero consumen aquellos azúcares más fácilmente metabolizables y posteriormente hay un cambio en la maquinaria enzimática que permite asimilar otra fuente de carbono. Cuando los microorganismos se encuentran bajo ciertas condiciones presentan respuestas metabólicas con el fin de mantener la tasa de crecimiento, esas respuestas son definidas como adaptación enzimática y es inducida por la presencia de una sustancia, principalmente el sustrato (Stainer, 1951; Solopova *et al.*, 2013).

Respecto al consumo de sustrato, se observó que en las cinéticas llevadas a cabo, el 50% aproximadamente se consume a la mitad de la fase exponencial y más del 90% tanto de glucosa como melaza se consumieron a las 24 h del cultivo, mientras que para el sacarificado de bagazo de caña sólo hubo un 66% de consumo total de azúcares (Fig. 7B). Sin embargo se puede observar en la Figura 7A que el crecimiento sigue aumentando, esto se puede deber a que la levadura almacena ciertos nutrientes que posteriormente son utilizados para el crecimiento. Se ha reportado que *X. dendrorhous* necesita cerca del 50% de sustrato en fase exponencial para mantener su crecimiento (Castelblanco-Matiz *et al.*, 2015). Por otro lado, el crecimiento fue aproximadamente un 35% menor cuando se utiliza como

sustrato melaza en comparación con la glucosa, mientras que el SBC no mostró diferencias significativas (Tabla 4). El rendimiento de biomasa está determinado por dos factores: la energía requerida para la formación de biomasa y la eficiencia con que se utiliza la energía generada en el catabolismo (Verduyn, 1991). Específicamente cuando se determina el ATP requerido para la formación de biomasa y el rendimiento de ATP para la asimilación de sustrato, los transportadores de azúcares juegan un papel importante. Se ha reportado que en *Saccharomyces cerevisiae* spp, la utilización de una molécula de maltosa a través de un transportador activo tiene un rendimiento de 3 moléculas de ATP, mientras que para dos moléculas de glucosa, utilizando un transportador pasivo resulta en 4 moléculas de ATP (Verduyn, 1991), lo cual resulta en una mayor energía que es utilizada para la generación de biomasa. Aunque en *X. dendrorhous* no se han elucidado totalmente los mecanismos para asimilar los diferentes tipos de fuente de carbono, se puede asumir que los disacáridos como la sacarosa y la celobiosa y las pentosas como xilosa y arabinosa contenidas en los residuos agroindustriales tienen un menor rendimiento energético que está directamente relacionado con el menor crecimiento celular obtenido.

Los rendimientos celulares ($Y_{x/s}$) se encontraron entre 0.3 y 0.4 (Tabla 4), siendo menores cuando los sustratos utilizados fueron melaza y SBC. Castelblanco-Matíz, (2015a) reportó para la mutante R4 de *X. dendrorhous* un rendimiento celular de 0.42 cuando la levadura crece en reactor empleando glucosa como sustrato, mientras que en las cepas mutantes ZJUT46 y ENM5 de *X. dendrorhous* obtuvieron rendimientos de de 0.23 y 0.31 g de células/g de sustrato (Hu *et al.*, 2007; Liu y Wu,

2007), estas diferencias pueden deberse principalmente a la diferencia de parámetros utilizados en las fermentaciones llevadas a cabo y las mutantes empleadas.

Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas en las condiciones descritas anteriormente (Tabla 1) fueron cercanas a los valores reportados por Yamane *et al.*, (1997) y Castelblanco-Matiz (2015) donde obtienen velocidades específicas de crecimiento para las cepas silvestres de *X. dendrorhous* ATCC 24202 y R4 de 0.19 h⁻¹ y 0.15 h⁻¹ cuando crecen en medio YM suplementado con glucosa. Johnson y Lewis, (1979) obtuvieron valores de μ de 0.10 h⁻¹, 0.19 h⁻¹ y 0.04 h⁻¹ cuando se utilizan sustratos como, sacarosa, celobiosa y xilosa respectivamente en medio YM. Las velocidades específicas de crecimiento menores en comparación a las obtenidas con la glucosa se deben a la velocidad con la que se metabolizan las diferentes fuentes de carbono, ya que por ejemplo la sacarosa y celobiosa al ser disacáridos deben ser hidrolizados primeramente para poder ser asimilados (Kilian *et al.*, 1996). Por otro lado las pentosas como xilosa, tienen que ser metabolizadas por la ruta de las pentosas fosfatos para posteriormente entrar a la glicólisis, con lo cual al emplear rutas más largas de asimilación de sustratos las velocidades de crecimiento de *X. dendrorhous* se ven disminuidas.

Finalmente la producción de carotenoides en las condiciones descritas anteriormente comienza a las 36 h (Fig. 7C), tiempo en el que podría haber un estrés por falta de fuente de carbono, por lo que el microorganismo comienza a desviar algunos metabolitos acumulados hacia la ruta de carotenogénesis (Lodato *et al.*, 2007). Por

tanto y como se observa en la Figura 7A estos metabolitos están parcialmente asociados al crecimiento.

En cepas mutantes de *X. dendrorhous* se ha observado un comportamiento similar en donde el mayor consumo del sustrato coincide con la inducción de la biosíntesis de pigmentos (Lodato *et al.*, 2007). La producción de carotenoides totales presentó un rendimiento entre 0.1 y 0.3 veces menor cuando *X. dendrorhous* R4 creció en la melaza o SBC como sustrato respecto al obtenido en glucosa, sin embargo hubo un aumento en la producción de carotenoides totales de 0.3 veces cuando *X. dendrorhous* R4 utiliza SBC en comparación con la melaza. (Tabla 4). Haard (1988) utilizó melazas como única fuente de carbono para la producción de astaxantina en la cepa UDC 67-210 de *X. dendrorhous* encontrando que se producían 3.3 veces más que cuando utiliza glucosa, ya que se ha demostrado que la sacarosa promueve una mayor pigmentación (Fang y Cheng, 1993). Sin embargo la deficiencia de nutrientes, principalmente sodio y fósforo pueden ser limitantes en la síntesis de pigmentos cuando se utiliza melaza como sustrato (An *et al.*, 2001). En estudios realizados en la cepa de *X. dendrorhous* ATCC 24228 se demostró que el crecimiento en hidrolizados de pino se puede favorecer debido a los extractos enzimáticos de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* sp. remanentes ya que pueden servir como nutrientes adicionales de *X. dendrorhous* (Parajó *et al.*, 1997).

Tabla 4. Parámetros determinados en las cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4

Sustrato	Glucosa	Melaza	Sacarificado de bagazo de caña
Parámetro			
Crecimiento (g/L)	3.70 ^a ±0.03	2.40 ^b ±0.02	3.78 ^a ±0.07
Consumo de azúcares (g/L)	8.78 ±0.30	9.78 ±0.97	8.89 ±0.01
Rendimiento de carotenoides totales (µg/g de células)	390 ^a ±3.00	357 ^b ±22.00	285 ^c ±15.00
Concentración de carotenoides totales (µg/L)	1522 ±12.00	904 ±55.00	1065 ±70.00
Y _{x/s} (g de células/g de sustrato)	0.42 ±0.01	0.24 ±0.02	0.42 ±0.01
Productividad (µg/L·h)	4.10 ±0.17	3.5 ±0.06	3.3 ±0.04
µ (h ⁻¹)	0.11	0.08	0.07

*Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (p= 0.05)

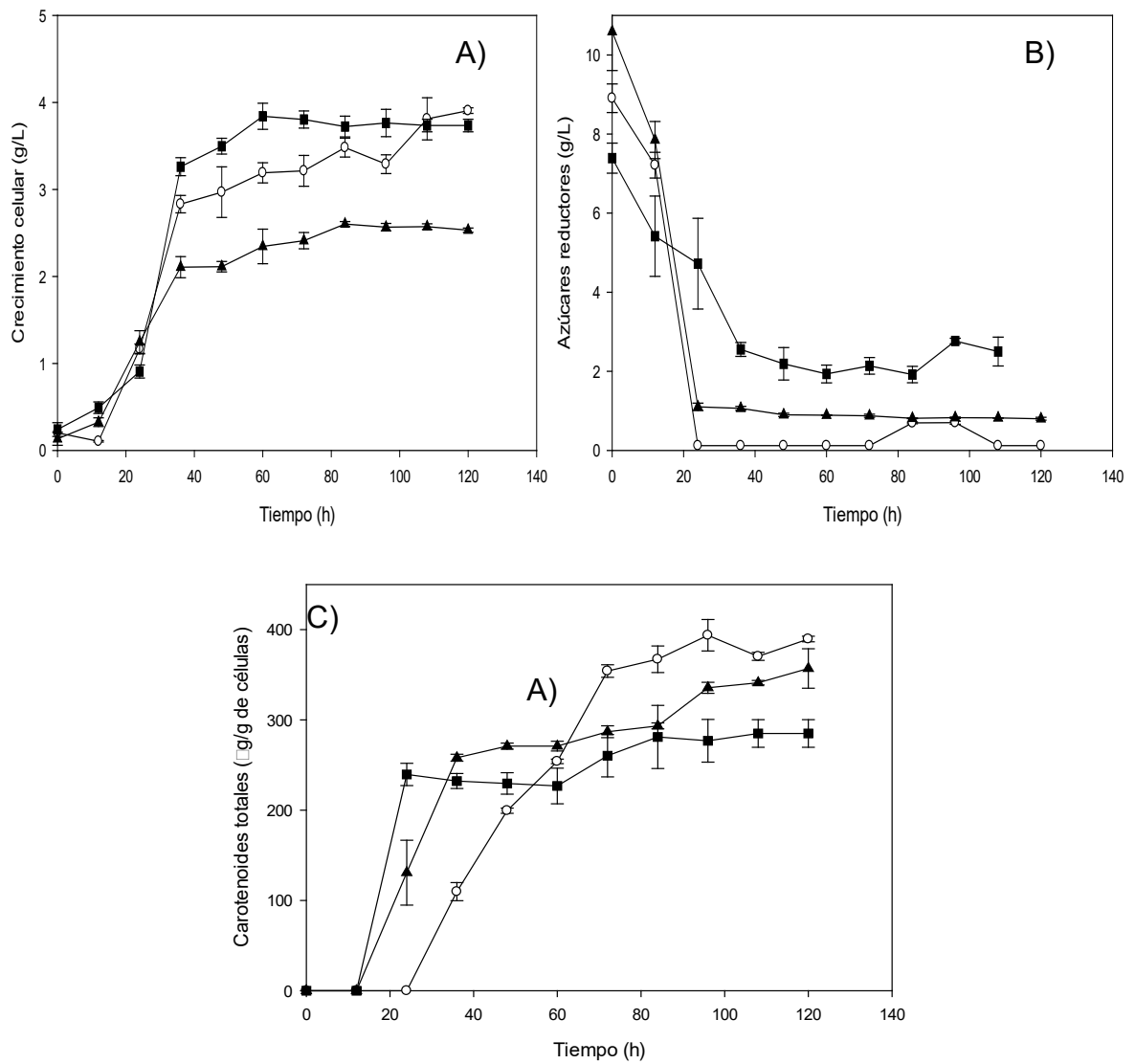


Figura 7. A) Crecimiento B), consumo de azúcares y C) producción de carotenoides totales durante 120 h de *X. dendrorhous* R4 en medio YM suplementado con glucosa (○), melaza de caña (■) y sacarificado de bagazo de caña (▲)

7.5 Evaluación del crecimiento celular y producción de carotenoides de *X. dendrorhous* R4 en sustratos puros

Se probaron cinco azúcares puros con el fin de comprobar que *X. dendrorhous* asimila diferentes fuentes de carbono, específicamente los que se encuentran en los residuos agroindustriales evaluados. Se observó que *X. dendrorhous* fue capaz de crecer en cualquiera de los azúcares probados y que después de la glucosa, los mejores crecimientos se obtuvieron en fructosa, celobiosa y sacarosa, siendo la xilosa en la que más bajo crecimiento se presentó (Fig. 8). Estos resultados coinciden con los reportados por Johnson y Lewis, (1979) en donde la cepa UCD 67-210 de *X. dendrorhous* presentó valores bajos de crecimiento celular cuando utilizaron pentosas como xilosa y arabinosa, mientras que sacarosa y glucosa promueven un mejor crecimiento.

Por otro lado el rendimiento de carotenoides más alto, se obtuvo cuando se utilizó celobiosa como fuente de carbono, siendo 18% mayor en comparación con la glucosa, mientras que en la xilosa fue 35% menor al de este último azúcar. La fructosa y sacarosa mostraron un aumento en el rendimiento de carotenoides totales del 1 y 10% comparados con glucosa, respectivamente (Fig. 9). Fang y Cheng, (1993) utilizaron la cepa mutante NCHU-FS301 de *X. dendrorhous* para evaluar el crecimiento y producción de pigmentos con diferentes sustratos en medio YM y reportaron que con celobiosa se obtiene el mayor rendimiento de astaxantina respecto a glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, lactosa, arabinosa, xilosa, manitol y sorbitol. Lo anterior se puede deber a que la celobiosa sólo puede ser asimilada de manera aerobia en comparación con la glucosa, de tal manera que el metabolismo

no se desvía estimulando la síntesis de astaxantina. Cruz y Parajó, (1998) encontraron que hidrolizados sintéticos que contenían 4 g/L de celobiosa inducía la síntesis de astaxantina en la cepa de *X. dendrorhous* ATCC 24228 aumentando de 61.7 a 68.5% de astaxantina en comparación con los hidrolizados que no contenían celobiosa. Prevatt (1991) sugiere que los niveles de carotenoides se incrementan cuando hay una limitación de fuente de carbono, la cual está directamente relacionada con la rapidez con la que se pueden asimilar azúcares como pentosas o la hidrólisis de los disacáridos usados como fuente de carbono.

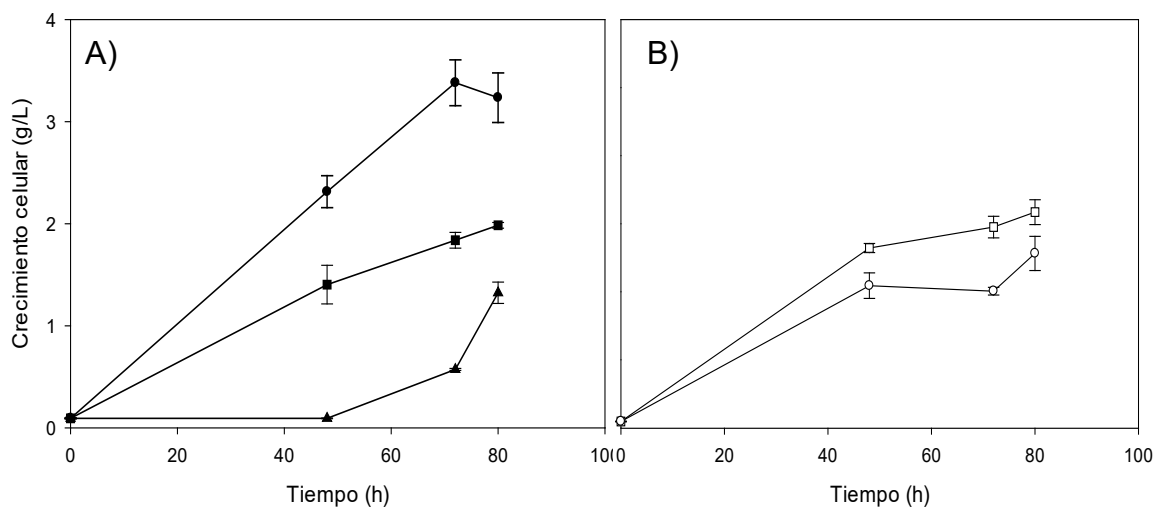


Figura 8. Crecimiento de *X. dendrorhous* R4 en medio YPD suplementado con A) glucosa (●); fructosa (■); xilosa (▲); B) celobiosa (□) y sacarosa (○)

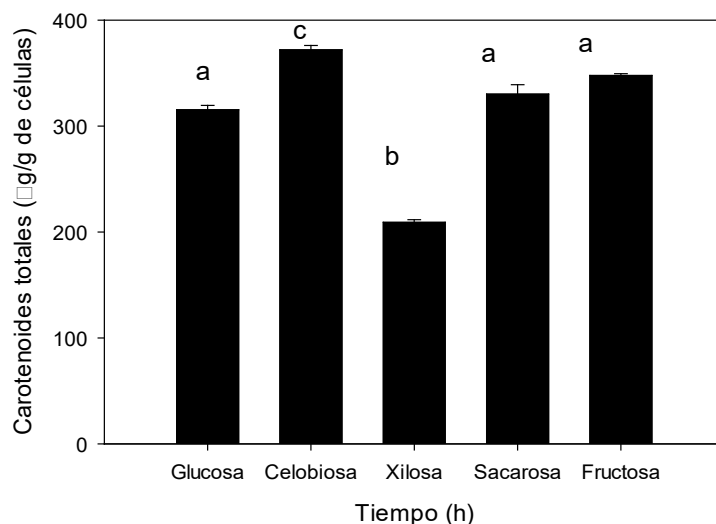


Figura 9. Rendimiento final de carotenoides de *X. dendrorhous* R4 creciendo en medio YPD suplementado con diferentes azúcares

7.6 Cinética de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 en medio mineral (MM) a nivel matraz

Se probó un medio mineral químicamente definido suplementado con glucosa (Cerdá-Olmedo *et al.*, 1987) con el fin de evaluar el crecimiento y producción de astaxantina de *X. dendrorhous* R4; evitando la interferencia de otros componentes contenidos en el medio YM (Fig. 10). El cultivo se siguió durante 168 h obteniéndose un crecimiento máximo de 1.92 ± 0.005 g de células/L, el cual es un valor 48 % menor respecto al obtenido en el medio YM y glucosa como sustrato. Lo anterior podría deberse a que fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio y otros nutrientes inorgánicos son asimilados por las levaduras más lentamente que las fuentes orgánicas como el extracto de levadura, el cual tiene una composición rica de aminoácidos (Zabriskie, 1980) y la bactopectona, la cual está comúnmente compuesta por una mezcla de tirosina (Y), triptófano (W) y cisteína (C) en una

proporción de 5:1:1 (Fontana *et al.*, 1996). Liu y Wu, (2007), demostraron que la mutante ENM5 de *X. dendrorhous* es capaz de asimilar diferentes fuentes de nitrógeno como urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y peptona, esta última es la que favorece más el crecimiento de *X. dendrorhous*.

Respecto al consumo de glucosa, de los 7.2 ± 0.10 g/L iniciales, 5.8 ± 0.05 g/L se consumieron a las 48 h sin cambio significativo a lo largo del proceso. El 20% de la glucosa que no se consumió puede ser resultado de la deficiencia de algún nutriente que compone el medio de cultivo como el nitrógeno. Se han reportado cepas mutantes de *X. dendrorhous* que muestran diferencias nutricionales respecto a sus cepas silvestres, por ejemplo que requieren mayor cantidad de amonio (NH_4), el cual si no es suministrado en las concentraciones requeridas, el rendimiento de biomasa es menor (An *et al.*, 1996).

El rendimiento de carotenoides totales fue de 356 ± 01.0 $\mu\text{g/g}$ de células obteniéndose aproximadamente el 90% del valor obtenido cuando crece en medio YM. El nitrógeno afecta la síntesis de pigmentos al igual que en el crecimiento y se ha observado que algunas fuentes de nitrógeno promueven la producción de una mayor cantidad de pigmentos debido a que la síntesis de astaxantina está sujeta a una regulación de la asimilación de nitrógeno (An *et al.*, 1989). En estudios llevados por Johnson y Lewis, (1979) se demostró que los contenidos mayores de astaxantina se alcanzan cuando hay un consumo total del sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Otros factores que pueden afectar directamente la síntesis de astaxantina son la relación carbono/nitrógeno y el pH (Liu y Wu, 2007).

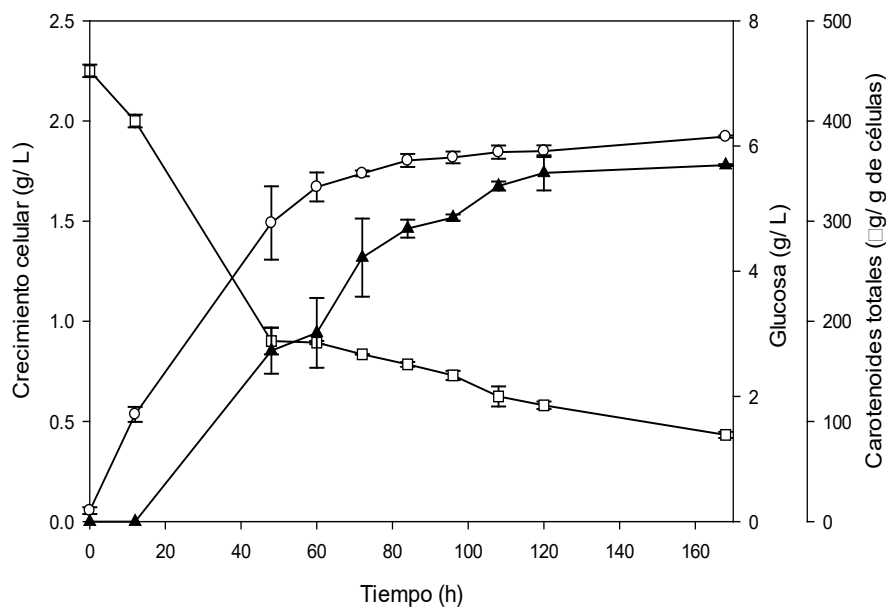


Figura 10. Cinética de crecimiento (○), consumo de azúcares (□) y producción de carotenoides totales (▲) durante 120 h por *X. dendrorhous* R4 en medio mineral suplementado con glucosa

7.7 Efecto de la relación carbono:nitrógeno (C:N) sobre el crecimiento y producción de astaxantina de *X. dendrorhous* R4

Debido a que en la cinética de *X. dendrorhous* R4 llevada a cabo con medio mineral y glucosa se tuvo un 20% de sustrato residual, se probaron diferentes relaciones carbono/nitrógeno para evaluar si el crecimiento y producción de astaxantina por esta levadura se veían afectados por una deficiencia de nitrógeno en el medio mineral. Se adicionaron al medio de cultivo dos y 1.5 veces más sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Anexo 3). El crecimiento y síntesis de carotenoides de *X. dendrorhous* no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se modificó la

cantidad de sulfato de amonio adicionado al medio (Tabla 5). El crecimiento para cada relación C/N evaluada fue de 2.5 g/L aproximadamente. En cuanto al rendimiento obtenido de carotenoides también los valores fueron muy semejantes fluctuando entre, 272 µg de carotenoides totales/g de células en todas las relaciones C/N evaluadas. Este comportamiento se puede deber a que en relaciones C/N bajas (<5) la producción de pigmentos de *X. dendrorhous* se ve afectada de manera negativa, mientras que a altas relaciones de C/N puede disminuir el consumo de NADPH para el metabolismo primario tal como la síntesis de proteínas, a fin de dejar más NADPH disponible para la biosíntesis de astaxantina (Yamane *et al.*, 1997; Vustin *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2008). Se ha encontrado que los valores óptimos de relación C/N para el crecimiento de *X. dendrorhous* es de 22 mientras que para la síntesis de astaxantina es de 44 (Liu y Wu, 2007).

Tabla 5. Crecimiento, carotenoides totales y consumo de azúcares de *X. dendrorhous* R4 a diferentes relaciones carbono/nitrógeno

Relación C:N	Crecimiento (g/L)	Carotenoides totales (µg/g de células)
4.762	1.62 ±0.05 ^a	364 ±10 ^a
3.176	1.63 ±0.01 ^a	400 ±12 ^b
2.382	1.57 ±0.02 ^a	397 ±10 ^b

*Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (p= 0.05)

7.8 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de carotenoides en *X. dendrorhous* R4

Debido a que las relaciones carbono/nitrógeno probadas no mostraron un efecto significativo en la producción de astaxantina ni el crecimiento, se prosiguió a evaluar el efecto del pH sobre el crecimiento y producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4 en medio mineral y glucosa a nivel reactor. Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento independientes con control de pH a valores de 4.5 y 5.8 así como una cinética sin control de pH. Cuando no hubo control de pH, éste disminuyó de 4.3 que se registró antes de inocular, hasta un valor de 2.6 a las 96 h (Fig. 11). Estos valores bajos pueden deberse a la producción de ácidos orgánicos que acidifican el medio (Verduyn, 1991; Vustin *et al.*, 2004).

El crecimiento celular fue de 1.6 ± 0.04 g/L cuando no se controló el pH, mientras que cuando el pH se mantuvo en 4.5 y 5.8, hubo un aumento 0.6 y 1.3 veces en el crecimiento, registrando unos valores de 2.6 ± 0.13 y 3.7 ± 0.12 g/L respectivamente. Estudios realizados en las cepas ENM5, ZJUT46 y 46 de *X. dendrorhous* mostraron que el pH óptimo para crecimiento celular cuando se emplea medio YM suplementado con glucosa es de 6.0 (Hu *et al.*, 2006, 2007; Liu y Wu, 2007). El pH del medio es un factor que afecta directamente en el crecimiento ya que tener variaciones o bajos valores de pH pueden afectar la actividad de las enzimas, estabilización de la membrana y la ionización de las moléculas.

La producción de carotenoides totales al final del proceso sin control de pH fue de 587 ± 9 µg/L, mientras que a pH 5.8 se observó un incremento del 30%, obteniéndose 773 ± 18 µg/L. Caso contrario cuando el pH se controló a 4.5, donde se obtuvieron

431 ±9 µg/L lo cual representa una disminución del 27% respecto a la cinética sin control de pH (Fig. 12). En las mutantes de *X. dendrorhous* ENM5, ZJUT46 y 46 se demostró que la acumulación de astaxantina mejora a un valor de pH de 5.0, ya que a valores por debajo de 3.5 pueden aumentar la acumulación de β-zeacaroteno lo cual se encuentra relacionado con la estabilidad de los pigmentos producidos (Hu *et al.*, 2006; 2007; Liu y Wu, 2007). Aunque el valor óptimo de pH para el crecimiento y producción de carotenoides depende directamente de la composición del medio y la cepa utilizada, se ha demostrado que para la cepa 46 de *X. dendrorhous* tener un control de pH entre 4 y 6 unidades en la fermentación incrementa la velocidad específica de crecimiento, disminuye tiempos de fermentación, puede haber un mayor crecimiento celular y hasta un 13% de incremento en la formación de pigmentos (Hu *et al.*, 2006; Liu y Wu, 2007).

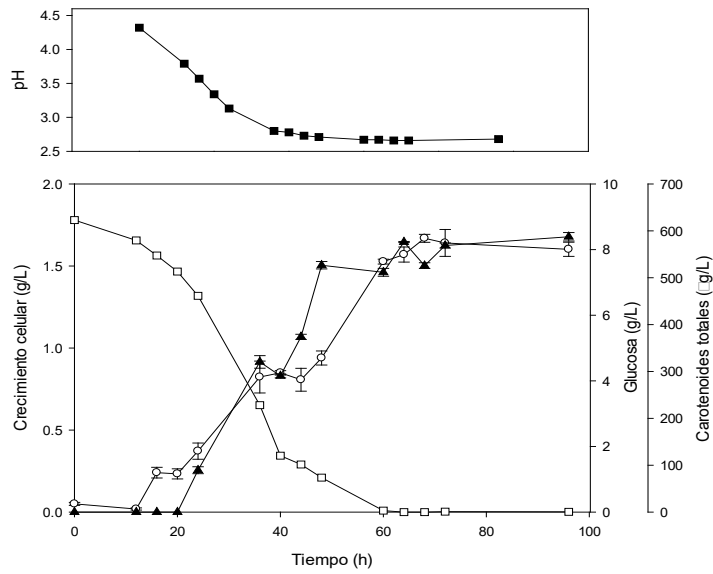


Figura 11. Curva de crecimiento (○), consumo de azúcares (□), producción de carotenoides totales (▲) y pH (■) de *X. dendrorhous* R4 en MM

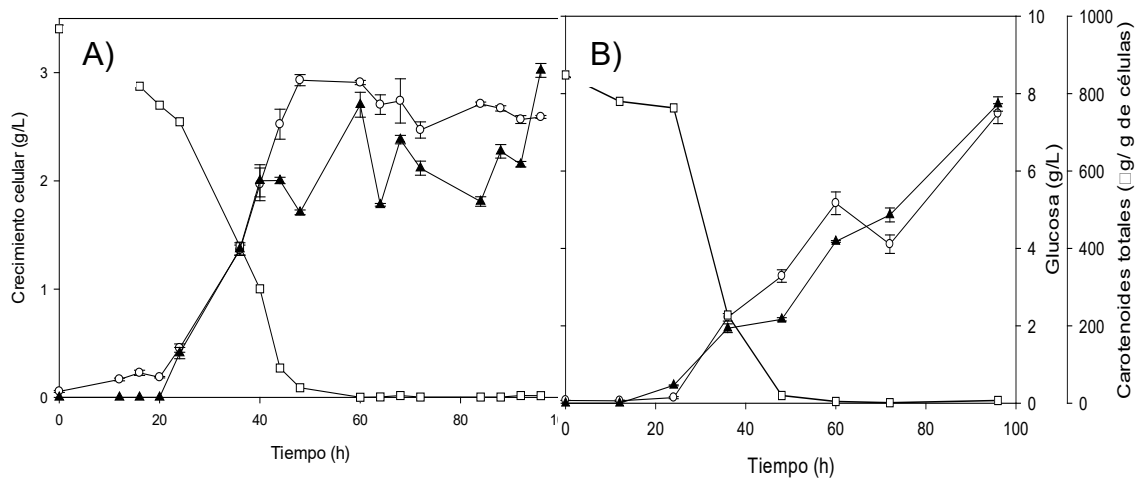


Figura 12. Curvas de crecimiento (○), consumo de azúcares (□), producción de carotenoides totales (▲) y control de pH A) 4.5 y B) 5.8 de *X. dendrorhous* R4 en MM

7.9 Determinación del perfil de carotenoides producidos por la mutante R4 de *X. dendrorhous* cuando utiliza como fuente de carbono los residuos agroindustriales

Se realizó el perfil carotenogénico con el objetivo de conocer el contenido de astaxantina y otros pigmentos producidos por *X. dendrorhous* cuando utiliza como sustrato los residuos agroindustriales. Se analizaron las muestras de cultivo en la fase estacionaria de la fermentación y el tipo de pigmento se identificó con base en el tiempo de retención, espectros y máximos de absorción (Britton *et al.*, 2008).

La astaxantina se presentó como el principal pigmento producido por *X. dendrorhous* R4 al crecer en cualquiera de los tres sustratos evaluados correspondiendo a más del 80% de los carotenoides totales. Cabe destacar que un hubo un aumento del 6% de astaxantina cuando se utilizó SBC y 2% al emplear melaza como sustrato en comparación con la glucosa (Tabla 6). Los pigmentos que se detectaron en menor proporción utilizando glucosa fueron hidroxietotoruleno, β -caroteno y ceto- γ -caroteno. En melaza se encontraron pigmentos como cantaxantina ($T_R= 6.8$ min), foenicoxantina ($T_R= 8.5$ min) y 3-hidroxi equinenona ($T_R= 8.9$ min), mientras que en SBC sólo se identificaron cantaxantina y HDCO ($T_R= 13.3$ min), los pigmentos que se identificaron en menor cantidad pertenecen al grupo de las xantofilas y algunos de ellos corresponden a precursores de la síntesis de astaxantina.

Se ha detectado que cuando esta levadura crece en glucosa, las xantofilas son los pigmentos mayormente producidos, destacando la astaxantina con un 83-97%, hidroxiequinenona (3-4%), equinenona (2-4%) y β -caroteno (2-2.5%). Sin embargo

estas proporciones varían dependiendo de la cepa y el tiempo de fermentación (Andrewes y Starr, 1976; Parajó *et al.*, 1996). La cantaxantina se ha identificado hasta en un 15% cuando se utiliza como sustrato sacarosa. En *Haematococcus lacustris* se ha identificado cantaxantina debido a que sintetiza astaxantina a partir del β -caroteno utilizando como intermediario este pigmento; la foenicoxantina se ha detectado hasta en un 6% y únicamente en cepas que crecen en sacarosa y la 3-hidroxiéquinenona la cual se considera como intermediaria en la ruta de biosíntesis de astaxantina reportándose contenidos de hasta un 21% cuando los sustratos son glucosa o sacarosa (Andrewes y Starr, 1976; Donkin, 1976; Vázquez *et al.*, 1997). El HDCO se ha reportado como un carotenoide mínimo en el perfil de mutantes, representando hasta el 7% de carotenoides totales (Vázquez y Santos, 1998).

Al calcular los rendimientos de producto por gramo de células ($Y_{p/x}$) se encontró que el SBC y la melaza no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a la glucosa obteniendo 271 y 306 μg de astaxantina/g de células, respectivamente, lo cual indica que tanto la melaza como el SBC sustratos potenciales para la producción de astaxantina.

Tabla 6. Contenido de carotenoides producidos por *X. dendrorhous* R4 en medio YM suplementados con glucosa, melaza y sacarificado de bagazo de caña como sustrato

Sustrato	Carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ de células)	Astaxantina		Otros pigmentos	
		($\mu\text{g/g}$ de células)	(%)	($\mu\text{g/g}$ de células)	(%)
Glucosa	390	328 ^a	84	62	16
SBC	285	271 ^a	90	24	10
Melaza	357	306 ^a	86	51	14

*Valores con diferente letra son estadísticamente significativos ($p= 0.05$)

7.10 Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina de *X. dendrorhous* R4 en medio mineral en reactor

Se realizaron cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de carotenoides en medio mineral suplementados con melaza o sacarificado de bagazo de caña con el fin de integrar todos los parámetros evaluados en los experimentos anteriores.

El crecimiento celular obtenido fue de 1.8 ± 0.01 y 2.7 ± 0.04 g/L cuando se utilizó melaza y SBC como sustrato, respectivamente (Fig. 13A). El mayor crecimiento en los hidrolizados se puede deber a la presencia de celobiosa, ya que como se ha demostrado anteriormente, promueve un mayor crecimiento respecto a la sacarosa y fructosa que están presentes en la melaza. Sin embargo los valores obtenidos de biomasa son 0.6 y 0.3 veces menores que cuando crece en medio YM suplementado con los mismos sustratos respectivamente. Lo anterior sugiere que las fuentes de nitrógeno orgánicas como el extracto de levadura y la bactopectona promueven un mayor crecimiento al ser asimiladas más fácilmente en comparación con las sales inorgánicas del medio mineral. En 1993, Fan y Cheng estudiaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento de la cepa NCHU-FS301 de *X. dendrorhous* en medio YM suplementado con glucosa encontrando que la peptona, extracto de carne, hidrolizado de caseína y extracto de levadura promovieron un mejor crecimiento en comparación con la urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio y nitrato de potasio. Sin embargo cabe destacar que el crecimiento obtenido es equiparable a los obtenidos en medio YM, lo cual puede deberse a que las

condiciones de agitación y aireación en el reactor favorecen los fenómenos de transferencia, promoviendo el crecimiento de la levadura.

Por otro lado el consumo de azúcares para melaza y SBC fue del 60% aproximadamente a las 24 y 48 h, respectivamente, sin embargo al utilizar melaza como sustrato se observa que los azúcares contenidos se asimilan más rápidamente en comparación con los del SBC (Fig. 13C). En las cinéticas llevadas a cabo con medio YM y melaza o SBC, el mayor consumo para ambos sustratos se dio a las 24 h, manteniéndose este comportamiento para MM suplementado con melaza mientras que para MM y SBC se dio hasta las 48 h. Respecto a la producción de carotenoides totales se obtuvo una producción de $586 \pm 14 \mu\text{g/L}$ para el medio suplementado con melaza y $842 \pm 8 \mu\text{g/L}$ en SBC (Fig. 13C), encontrando un aumento del 30% en la concentración de carotenoides totales en SBC respecto a la melaza. Este mismo comportamiento se encontró en las cinéticas con medio YM suplementado con SBC al obtener un 15 % más de carotenoides totales en comparación con lo obtenido en melaza de caña. Por otro lado la producción de carotenoides totales cuando se utiliza SBC fue 8% mayor respecto a lo obtenido con glucosa, mientras que para la melaza hubo una disminución del 25%, lo cual sugiere que la composición del sacarificado de bagazo de caña puede promover una mayor pigmentación.

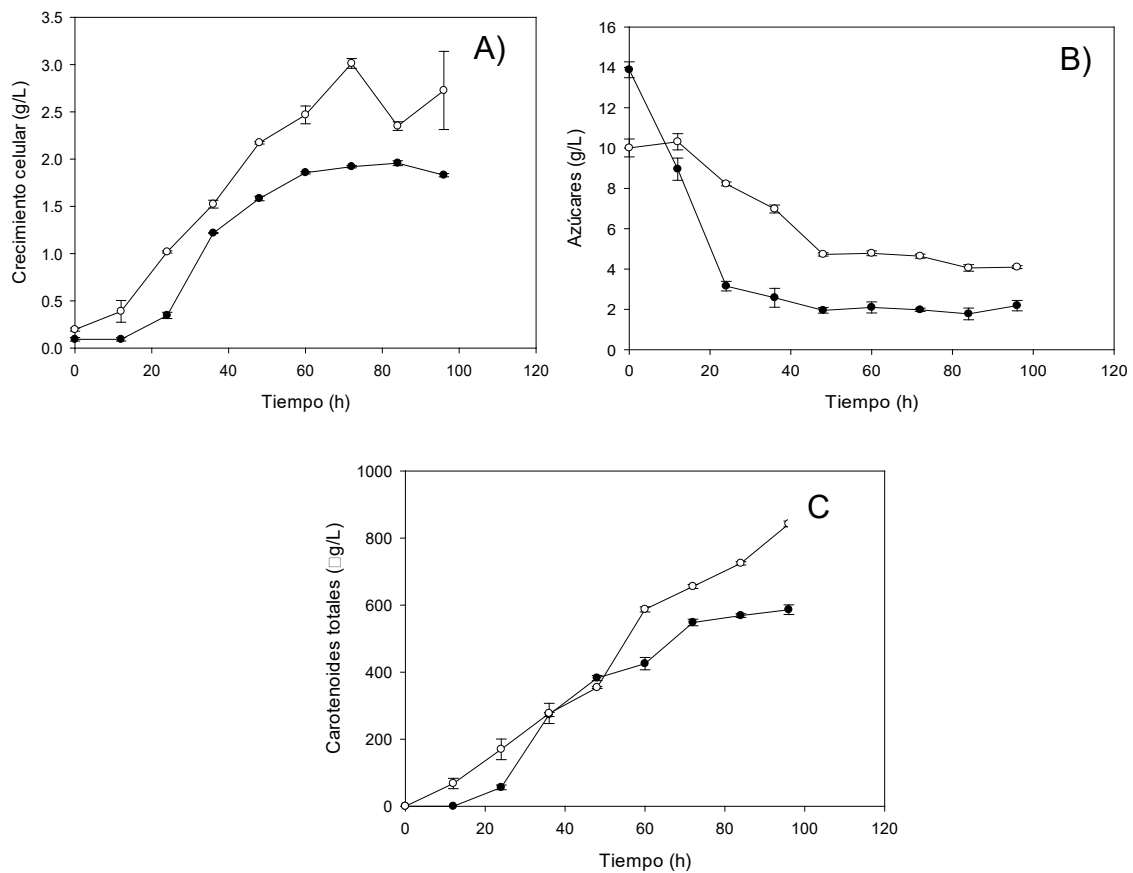


Figura 13. A) Crecimiento, B) consumo de azúcares y C) producción de carotenoides de *X. dendrorhous* R4 en medio mineral suplementado con melaza (●) o sacarificado de bagazo de caña (○) durante 96 h

Finalmente, la concentración de pigmentos obtenidos en el medio mineral suplementado con SBC y melaza es equiparable a lo obtenido en medio YM con los mismos sustratos, ya que la producción en medio mineral con SCB y melaza representa el 80% y 65%, comparado con el medio YM (Tabla 7). Lo cual resulta atractivo en términos de posibles reducciones de costos de producción puesto que el medio mineral es formulado a base de sales grado industrial en comparación del extracto de levadura y bactopectona que conforman el medio YM.

Por otro lado, al emplear los residuos agroindustriales como sustrato para la producción de astaxantina, se obtuvo una concentración de carotenoides totales que representó entre un 60 y 75% a lo obtenido con glucosa en los medios evaluados. Particularmente en medio mineral suplementado con SBC se obtuvo un 8% más de carotenoides totales en comparación que cuando se utiliza glucosa como sustrato en medio mineral (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de carotenoides totales ($\mu\text{g/L}$) obtenidos de *X. dendrorhous* R4 en los medios evaluados

Medio	YM ^a	MM ^b
Sustrato		
Glucosa	1522 \pm 12	773 \pm 18
SBC	1065 \pm 70	842 \pm 08
Melaza	904 \pm 55	586 \pm 14

^a Valores obtenidos a nivel matraz

^b Valores obtenidos a nivel reactor

8. CONCLUSIONES

Xanthophyllomyces dendrorhous R4 es capaz de crecer y producir pigmentos en los medios YM y mineral suplementados con melaza o sacarificado de bagazo de caña como fuentes de carbono.

La producción de carotenoides totales en medio mineral por *X. dendrorhous* R4 es comparable respecto a lo obtenido en un medio sintético definido.

El mejor rendimiento de astaxantina producido por *X. dendrorhous* R4 se obtuvo al emplear sacarificado de bagazo de caña como sustrato, es por esto que puede ser un residuo agroindustrial con potencial para la producción de astaxantina.

El suero de leche no es una buena opción como fuente de carbono ya que la lactosa que contiene no es asimilada completamente por *X. dendrorhous* R4 y genera muchas interferencias en las mediciones de azúcares, biomasa y carotenoides.

La relación carbono/nitrógeno, el pH y la fuente de nitrógeno son factores que influyen directamente sobre la producción de astaxantina y el crecimiento celular.

9. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio técnico-económico para determinar si hay una reducción de costos en el proceso de producción de astaxantina empleando *X. dendrorhous* R4.

Hacer una segunda ronda de mutagénesis de la cepa R4 de *X. dendrorhous* para obtener mutantes con mejores características en cuanto a crecimiento y producción de astaxantina.

Abordar desde el punto de vista bioquímico como se llevan a cabo los consumos de sustrato de *X. dendrorhous* R4 y su relación con la producción de astaxantina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Q.M.N. (1993) Purificación y caracterización parcial de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena*, cepa silvestre y PN-120. Tesis de Maestría, Dpto. de Biotecnología CINVESTAV-IPN, México, D.F.
- Aksu Z., Eren A.T. (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*. **40**: 2985-2991.
- Alcaíno J., Barahona S., Carmona M., Lozano C., Marcoleta A., Niklitschek M., Sepúlveda D., Baeza M., Cifuentes V. (2008) Cloning of the cytochrome P450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *X. dendrorhous*. *BMC Microbiology*. **8**: 169.
- Alcaíno J., Fuentealba M., Cabrera R., Baeza M., Cifuentes V. (2012) Modeling the interfacial interactions between CrtS and CrtR from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a P450 system involved in astaxanthin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**: 8640-8647.
- An G.H., Jang B.G., Cho M.H. (2001) Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **92**: 121-125.
- An G. H., Kim C. H., Choi E.S., Rhee S.K. (1996) Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FO1C. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **82**: 515-518.
- An G.H., Schuman D.B., Johnson E.A. (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 116-124.
- Andrewes A. G., Starr M. P. (1976) (3R, 3'R)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry*. **15**: 1009-1011.

- Barbachano-Torres A. (2014) Estudio genético, proteómico y metabólico de mutantes carotenogénicas de *Phaffia rhodozyma*. Tesis doctoral, Dpto. de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México, D.F.
- Barbachano-Torres A., Castelblanco-Matiz L.M., Ramos-Valdivia A.C., Cerda-García-Rojas C.M., Salgado L.M., Flores-Ortíz C., Ponce-Noyola T. (2014) Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Archives of Microbiology. **196**: 411-421.
- Berthelot K., Estevez Y., Deffieux A., Peruch F. (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. Biochimie. **94**: 1621-1634.
- Bhatt C.P., Ahmad M., Panda P.B. (2013) Enhanced bioaccumulation of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by utilising low-cost agro products as fermentation substrate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. **2**: 58-63.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (2008) Carotenoids Handbook. 2nd ed. Birkhäuser Verlag, Suiza, pp 1-270.
- Carmona I. (2013) De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Agrimundo: inteligencia competitiva para el sector agroalimentario. **5**: 1-6.
- Carrillo A. J.L. (2006) Tratamiento y reutilización del suero de leche. Revista Conversus. **10**: 27-30.
- Castelblanco-Matiz L.M. (2015) Caracterización metabólica y genética de la carotenogénesis en cepas mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Tesis doctoral, Dpto. de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México, D.F.
- Castelblanco-Matiz L.M., Barbachano-Torres A., Ponce-Noyola T., Ramos-Valdivia A.C., Cerda-García-Rojas C.M., Flores-Ortíz C.M., Barahona-Crisóstomo S.K., Baeza-Cancino M.E., Alcaíno-Gorman J., Cifuentes-Guzmán V.H. (2015) Carotenoid production and gene expression in astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain. Archives of Microbiology. **197**: 1129-1139.

- Cerdá-Olmedo E., Lipson E.D. (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 337.
- Chávez-Cabrera C., Flores-Bustamante Z.R., Flores-Cotera L.B. (2010) Una vista integral de la síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. *BioTecnología*. **14**: 24-38.
- Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA). (2016) Informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar: Zafras 2007/08-2013/14. Sagarpa. pp 1-20.
- Contreras G., Barahona S., Rojas M., Baeza M., Cifuentes V., Alcaíno J. (2013) Increase in the astaxanthin synthase gene (*crtS*) dose by in vivo DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnology*. **13**: 84-94.
- Cruz J.M., Parajó J.C. (1998) Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chemistry*. **63**: 479-484.
- de la Torre M., Casas-Campillo C. (1984) Isolation and characterization of a symbiotic cellulolytic mixed bacterial culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **19**: 430-434.
- Cuervo L., Folch J.L., Quiroz R.E. (2009) Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*. **13**: 11-25.
- Delgado-Vargas F., Jiménez A.R., Paredes-López O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **40**: 173-289.
- Demain A.L., Adrio J.L. (2012) Essential role of genetics in the advancement of biotechnology. In: Barredo J.L. (ed) *Microbial carotenoids from Fungi: methods and protocols, methods in molecular biology*, vol 1, 1st ed. Humana Press, pp 1-40.
- Donkin P. (1976) Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus lacustris*. *Phytochemistry*. **15**: 711-715.

- Dufossé L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food Technonology Biotechnology*. **44**: 313-321.
- Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad M.S., Blanc P., Murthy C.N.K., Ravishankar A.G. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or industrial reality. *Trends in Food Science and Technology*. **16**: 389-406.
- Fajardo C.E.E., Sarmiento F.S.C. (2007) Evaluación de la melaza de caña como susutrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Fang T. J., Cheng Y.S. (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **75**: 466-469.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2011) Monografía de la melaza de caña de Azúcar. Financiera Rural, pp 1-3.
- Fontana J.D., Czczuga B., Bonfim T.M.B., Chociai M.B., Oliveira B.H., Guimarães M.F., Baron M. (1996) Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresource Technology*. **58**: 121-125.
- Ghaffar H.S., Fan M., McVicar B. (2015) Bioengineering for utilisation and bioconversion of straw biomass into bio-products. *Industrial Crops and Products*. **77**: 262-274.
- González-Bautista E. (2015) Implementación de un proceso secuencial para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña con *Cellulomonas flavigena* PR22 y *Cryptococcus humicola* OJ-31. Tesis de Maestría, Dpto de Biotecnología CINVESTAV-IPN, México, D.F.
- González S. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. **57**: 1-11.

- Guerra G.A. (2012) Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de maestría, Depto de Biología Molecular INBIOTEC, México, D.F.
- Haard N.F. (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnology Letters*. **10**: 609-614.
- Hu Z.C., Zheng Y.G., Wang Z., Shen Y.C. (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**: 586-590.
- Hu Z.C., Zheng Y.G., Wang Z. y Shen Y.C. (2007) Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with fed-batch fermentation in 2.0 m³ fermentor. *Food Technology Biotechnology*. **45**: 209-212.
- Johnson A.E., Echavarri-Erasun C. (2011). Yeast Biotechnology. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T (eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, vol 1, 5th ed. Elsevier, pp 21-44.
- Johnson E.A., Lewis M.J. (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*. **115**: 173-183.
- Kilian S.G., Sutherland F.C.W., Meyer P.S., du Preez J.C. (1996) Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters*. **18**: 975-980.
- Kim S., Dale B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*. **26**: 361 - 375
- Kirti K., Amita S., Priti S., Kumar M.A., Jyoty S. (2014) Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Advances in Biology*. **2014**: 1-13.
- Klemm D., Philipp B., Heinze T., Heinze U., Wagenknecht W. (1998) *Comprehensive cellulose chemistry*. In Wiley-VCH, vol 1, pp 9-155.

- Kosikowski F.U. (1979) Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*. **62**: 1149-1160.
- Lavarack B.P, Griffin G.J, Rodman D. (2002) The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass Bioenergy*. **23**: 367–380.
- Lee J-S., Park S-A., Chung D., Lee G.H. (2011) Encapsulation of astaxanthin-rich *Xanthophyllomyces dendrorhous* for antioxidant delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. **49**: 268-273.
- Liu Y.S., Wu Y.J. (2007) Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment desing. *Biochemical Engineering Journal*. **36**: 182-189.
- Lodato P., Alcaíno J., Barahona S., Niklitschek M., Carmona M., Wozniak A., Baeza M., Retamales P., Jimenez A., Cifuentes V. (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*. **40**: 73-84.
- Marova I., Carnecka M., Halienova A., Certik M., Dvorakova T., Haronikova A. (2012) Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*. **95**: 338-342.
- Martínez S. A.S. (2010) Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta:Volvocales) cultivada en diferentes medios. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, México, D.F.
- Mata-Gómez L.C., Montañez J.C., Méndez-Zavala A., Aguilar C.N. (2014) Biotechnological production of carotenoids by yeast: an overview. *Microbial Cell Factories*. **13**: 1-12.
- McNulty H, Jacob R.F., Mason P. (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *American Journal of Cardiology*. **101**:S20-S29.

- Miller G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. **31**: 426-428.
- Miller M.W., Yoneyama M., Soneda M. (1976) *Phaffia*, a new yeast in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **26**: 286-291.
- Monod J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews Microbiology*. **3**: 371–394.
- Müller R.K., Bernhard K., Mayer H., Ruttimann A. Vecchi M. (1980) Beitrag zur analytische und synthese von 3-hydroxy-4-oxocarotinoiden. *Helvetica Chimica Acta*. **63**: 1654-1664.
- Muñoz-Páez K.M., Poggi-Varaldo H.M., García-Mena J., Ponce-Noyola T., Ramos-Valdivia A.C., Barrera-Cortés J., Robles-González I.V., Ruiz-Ordáz N., Tanaca L.V., Rinderknecht-Seijas N. (2014) Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: effect of temperature and addition of buffer. *Waste Management and Research*. **32**: 434-440.
- Mussato S.I., Teixeira J.A. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: Mendez-Vilas A (ed) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol 2, 2nd ed. FORMATEX, pp 897-907.
- Nigam S.P., Luke S.J. (2016) Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*. **7**: 93-100.
- Niizu P.Y. (2003) Fontes de carotenóides importantes para saúde humana. Tesis de maestría, Depto de ciencia de los alimentos UNICAMP, Brasil, Campinas.
- Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T., Berg J., Sandmann G. (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*. **275**: 148-158.

- Parajó J.C., Santos V., Vázquez M., Cruz J.M. (1996) Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. *Food Chemistry*. **40**: 347-255.
- Parajó J.C., Santos V., Vázquez M. (1997) Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnology Letters*. **19**: 139-141.
- Parameswaran B. (2009) Sugarcane bagasse. In: Nigam, P. y Pandey A. (eds) *Biotechnology for Agroindustrial Residues Utilization*, 2nd ed. Netherlands, pp 13-33.
- Phaff H.J., Miller M.W., Yoneyama M., Soneda M. (1972). A comparative study of the yeast floras associated with trees on the Japanese Islands and on the west coast of North America. In: Gyozo Terui (ed), *Fourth International Fermentation Symposium Proceedings: Fermentation Technology Today*, Society of Fermentation Technology, pp 759-774.
- Prevatt W.D., Dickson T.D., Harris R.L. (1991) Novel Strain of *Phaffia rhodozyma* Containing High Levels of Astaxanthin. World Patent, no. 8712855.
- Ramírez M.J.R., Martínez A.V., Rocha F.O.L., Chiu V.J.F., Cárdenas C.M.E., López M.D.N. (2015) Colorantes y pigmentos microbianos en la belleza cosmética. *Revista digital Universitaria UNAM*.**16**:1-17.
- Rani V., Mohanram S., Tiwari R., Nain L., Arora A. (2014) Beta-glucosidase: key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*. **5**: 197.
- Reynders M.B., Rawlings D.E., Harrison S.T.L. (1997) Demostracion of the Crabtree efecto in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnology Letters*. **19**: 549-552.
- Rojas-Rejón O.A., Poggi-Varaldo H.M., Ramos-Valdivia A.C., Ponce-Noyola T. (2016). Enzymatic saccharification of sugar cane bagasse by continuous xylanase and

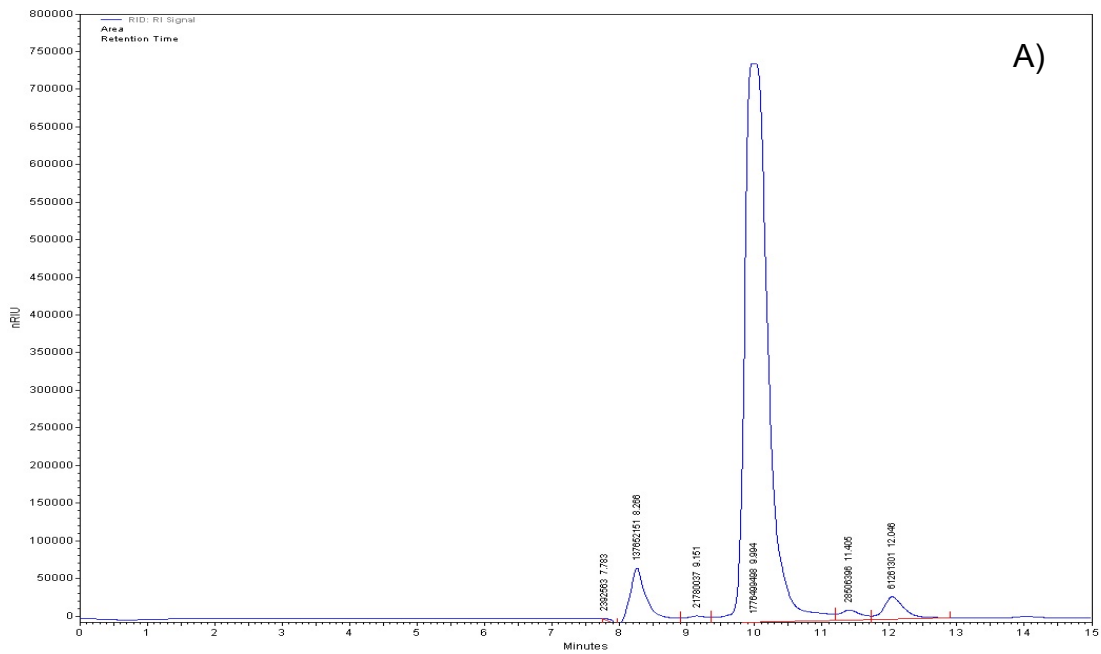
- cellulase production from *Cellulomonas flavigena* PR-22. *Biotechnology Progress*. **32**: 321-326.
- Roy S., Chatterjee S., Sen S.K. (2008) Biotechnological potential of *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Applied Biosciences*. **5**: 115-122.
- Saval S. (2012) Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*. **16**: 14-46.
- Sedmak J.J., Weerasinghe D.K., Jolly S.O. (1990). Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*. **4**: 107-112.
- Shahaidi F., Metusalach S., Brown J.A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **38**: 1-67.
- Stanier R.Y. (1951) Enzymatic adaptation in bacteria. *Annual Reviews Microbiology*. **5**: 35–56.
- Solopova A., van Gestel J., Weissing F.J., Bachmann H., Teusink B., Kok J., Kuipers O.P. (2013) Bet-hedging during bacterial diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111**: 7427-7432.
- Verduyn C. (1991) Physiology of yeast in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek*. **60**: 325-353.
- Tinoi J., Rakariyatham N., Deming, R.L. (2006) Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **33**: 309-314.
- Valdez-Vázquez I., Acevedo-Benitez A., Hernández-Santiago C. (2010) Distribution and potential bioenergy resources from agricultural activities in México. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. **14**: 2147-2153.
- Vázquez M., Santos V. (1998) 3-Hydroxy-3', 4'-didehydro- β - ψ -caroten-4-one (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. *Biotechnology Letters*. **20**: 181-182.

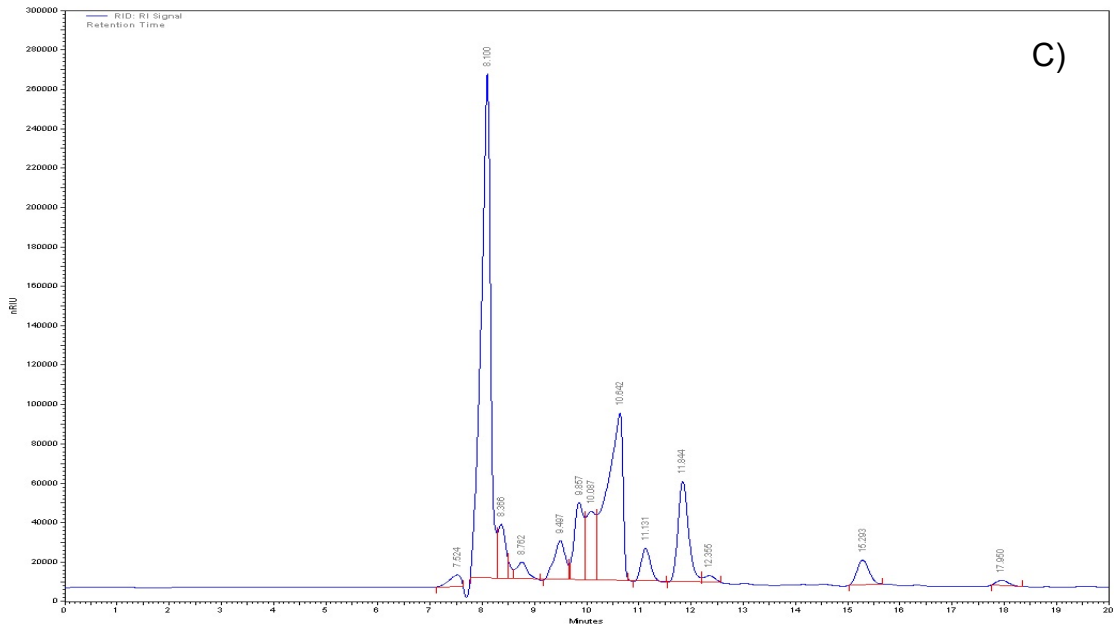
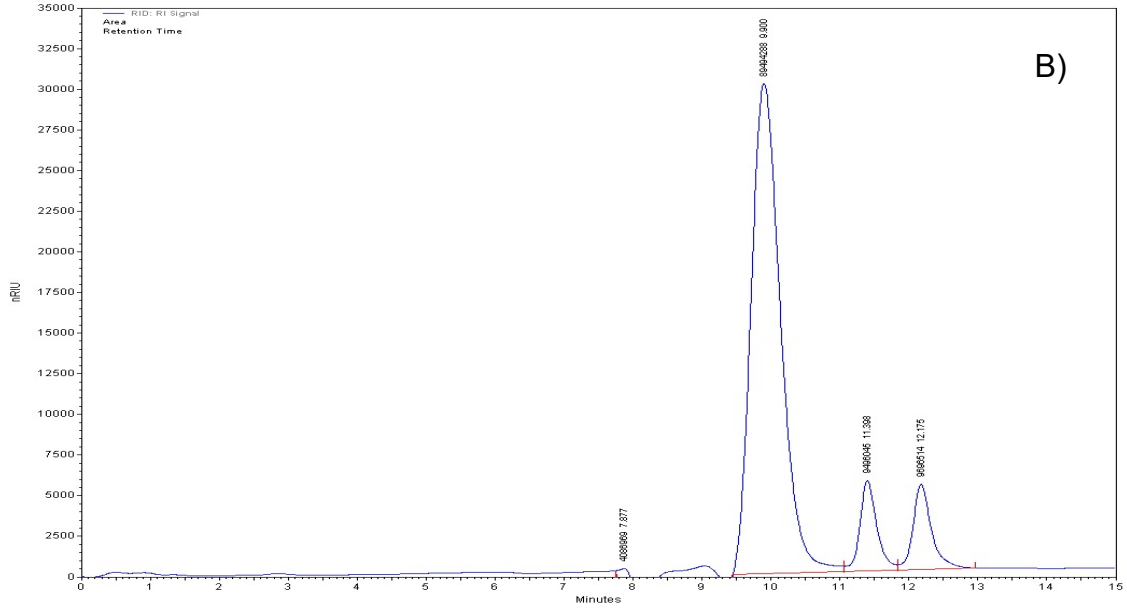
- Vázquez M., Santos V., Parajó J.C. (1997) Effect of the carbón source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **19**: 263-268.
- Villa T.G., Calo P., Blanco P., Sieiro C. (1999) *Phaffia rhodozyma*: primer microorganismo explotado para la producción de astaxantina. In: *Biología y aplicaciones de microorganismos pigmentados: IV Simposio científico en biología celular y molecular*, pp 11-39.
- Viniegra G. G. (2001) Diversificarse o morir, el dilema de la industria azucarera. *La Jornada*, Lunes de Ciencia. 1-26.
- Visser H., van Ooyen J.J.A., Verdoes C.J. (2003) Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS yeast research*. **4**: 221-231.
- Vustin M.M., Belykh E.N., Kishilova S.A. (2004) Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology*. **73**: 643-649.
- Wozniak A., Lozano C., Barahona S., Niklitschek M., Alcaíno J., Sepúlveda D., Baeza M., Cifuentes V. (2011) Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *Yeast research*. **11**: 252-262.
- Yamane Y.I., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4471-4478.
- Yang T.C., Kumaran J., Amartey S., Maki M., Li X., Lu F., Qin W. (2014) Biofuels and bioproducts produced through microbial conversion of biomass. In: *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp 71-93.

Zabriskie D.W., Arminger W.B., Phillips D.H., Albano P.A. (1980) Traders' guide to fermentation media formulation. Traders Protein, Memphis Tennessee, pp 85.

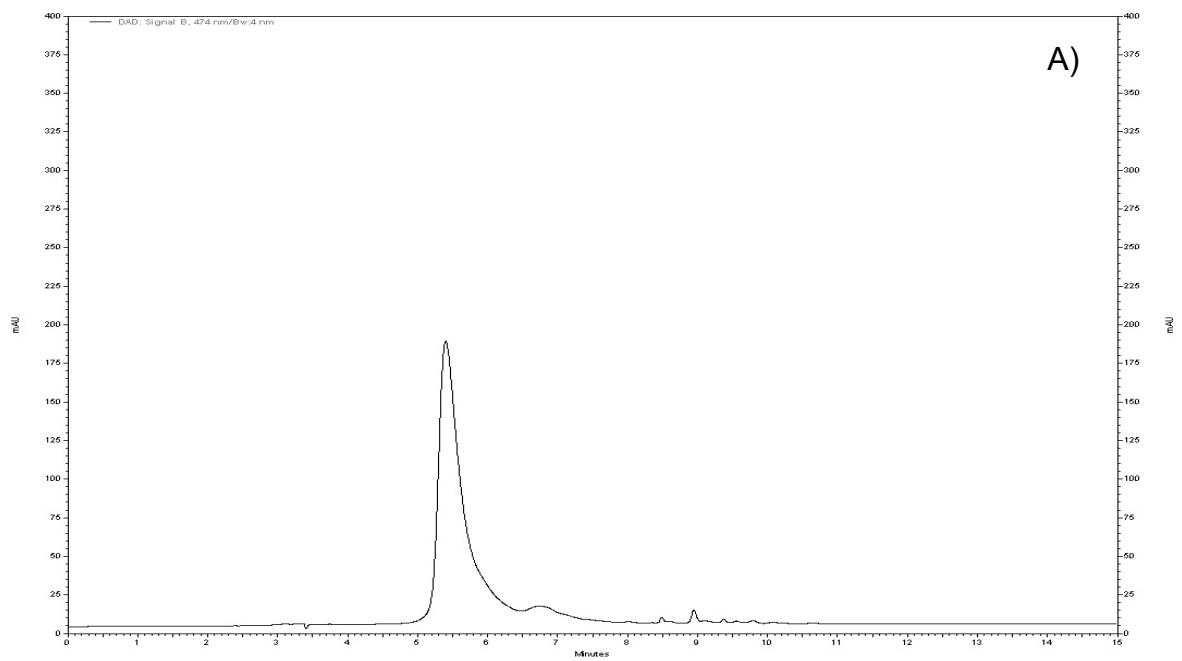
11. ANEXOS

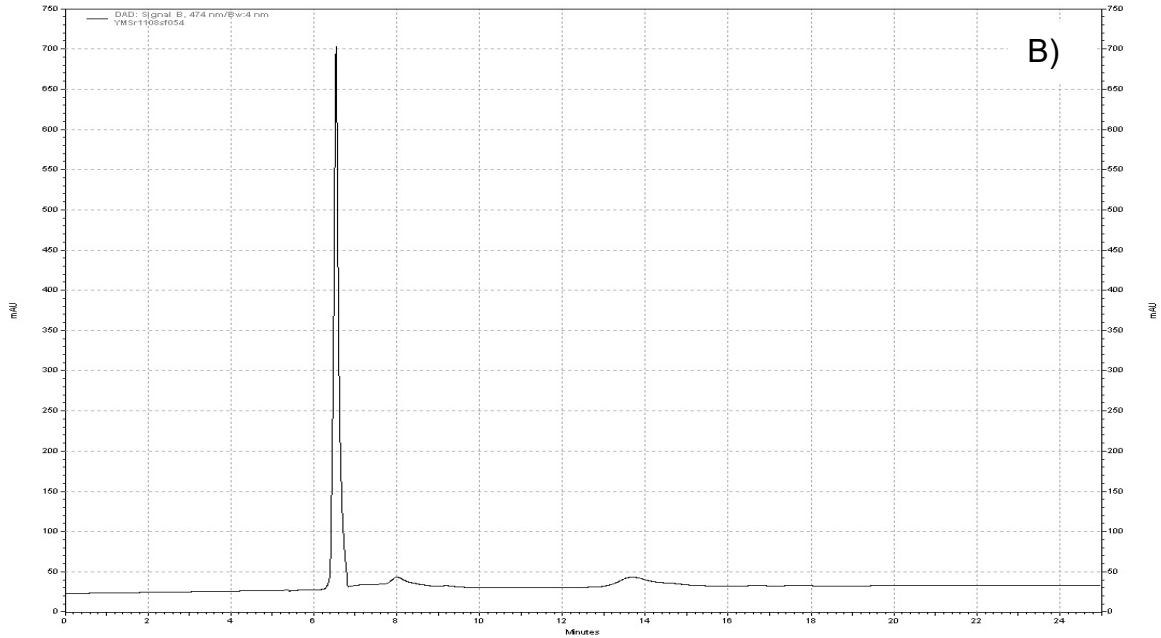
Anexo 1. Cromatogramas de los azúcares identificados en A) suero de leche, B) melaza e C) hidrolizados de bagazo de caña





Anexo 2. Perfil de carotenoides obtenidos en A) melaza y B) sacarificado de bagazo de caña





Anexo 3. Cálculos de la relación carbono: nitrógeno (C:N)

La relación carbono nitrógeno se calcula en relación a 10 g/L de glucosa como sustrato y la cantidad de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) como fuente de nitrógeno a utilizar (3.96, 5.94 ó 7.92 g/L).

1. Cálculo de la cantidad de nitrógeno que hay en cada una de las cantidades de sulfato de amonio a utilizar

Datos:

- Peso molecular del sulfato de amonio: 132.14 g/mol
- Peso molecular del nitrógeno: 14 g/mol

Con base en la fórmula del sulfato de amonio se sabe que hay dos moléculas de nitrógeno por cada molécula de sulfato de amonio, por tanto hay 28 g/mol de N en el amonio, por tanto sacamos el porcentaje correspondiente del peso molecular del sulfato de amonio:

$$\begin{array}{r} 132.14 \text{ g/mol} \text{ ----- } 100 \% \\ 28 \text{ g/mol} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X = 21.1896 \%$$

Calcular a cuántos gramos del sulfato de amonio a utilizar corresponde ese porcentaje, haciendo la siguiente operación:

$$\begin{array}{r} 3.96 \text{ g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ ----- } 100 \% \\ X \text{ ----- } 21.1896 \% \end{array}$$

$$X = 0.8391 \text{ g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

Nota: Se hacen los mismos cálculos para 5.94 y 7.92 g/L

2. Cálculo de de la cantidad de carbono que hay en los 10 g/L de glucosa que se utilizan como fuente de carbono

Datos:

- Peso molecular de la glucosa: 180 g/mol
- Peso molecular del carbono: 14 g/mol

Dado que la molécula de la glucosa contiene seis moléculas de carbono se tiene un peso de 72 g/L y se calcula el porcentaje de carbono que representa en una molécula de glucosa

$$\begin{array}{r} 180 \text{ g/mol} \text{ ----- } 100 \% \\ 72 \text{ g/mol} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X = 40 \%$$

Y por tanto la cantidad de carbono que hay en los 10 g/L de glucosa se calcula de la siguiente manera

$$\begin{array}{r} 10 \text{ g de } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \text{ ----- } 100 \% \\ X \text{ ----- } 40 \% \end{array}$$

$$X = 4 \text{ g de } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$$

Finalmente la relación carbono: nitrógeno se calcula con el cociente de los gramos de glucosa entre los gramos de sulfato de amonio calculados

$$\text{C/N} = 4 \text{ g} / 0.831\text{g} = 4.7670$$

Nota: Se hace el mismo cociente con el cálculo correspondiente a cada cantidad de sulfato de amonio a utilizar