

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Evaluación de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces
dendrorhous* a partir de sacarificados de bagazo de caña**

T E S I S

Que presenta

Yeily Adriana Rangel Basto

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis

Dra. María Teresa Ponce Noyola

COMITÉ TUTORIAL

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería- CINVESTAV

Asesores:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería - CINVESTAV

Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

Departamento de Química - CINVESTAV

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 943737.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminar mi camino y permitirme cumplir mis sueños.

A mi directora de tesis:

La Doctora Ma. Teresa Ponce Noyola, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente proyecto, así como sus valiosas enseñanzas que me permitieron crecer tanto profesional como personalmente. A ella mi gratitud y admiración.

A mis asesores:

La Doctora Ana Carmela Ramos Valdivia y el Doctor Carlos Martín Cerda García Rojas por sus valiosos aportes y apoyo que permitieron concluir con éxito el presente proyecto.

Al personal del laboratorio de Genética Microbiana:

La M. en C. Odilia Pérez Ávalos, por la capacitación, apoyo e importante acompañamiento en las técnicas de laboratorio utilizadas para la ejecución del presente trabajo.

A Verónica Soto Bellosa, por su constante apoyo y compromiso que facilita el trabajo investigativo.

A la central analítica del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.

A la Q.F.B Elvira Ríos y los técnicos Gustavo Medina y Óscar Rojas por su apoyo en técnicas de cromatografía líquida de alta resolución.

A mis amigos y compañeros en el laboratorio:

Yasmín Rodríguez, Erika Ochoa, Óscar García, Alejandro Lara, Ricardo Castillo, y Diego García por su amistad, risas y cariño que me hicieron sentir como en casa, mil gracias.

A mis amigos y tesisistas Rodrigo Martínez y Natalia Martínez cuyo trabajo fue un gran apoyo en la estructura del presente proyecto.

A mi familia

Rosa Basto, Juan Rangel, Mylena Carvajal, Santiago Canedo, y Martín Canedo por dar impulso a mis alas, por estar siempre ahí, por su inmenso amor y apoyo. Son mi mayor inspiración.

A la Coordinación Académica y Jefatura del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, al personal de planta piloto, y a todas aquellas personas que me apoyaron e hicieron parte de este sueño.

¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

A mi madre

Carmen Rosa Basto Rojas

A mi padre

Juan Alberto Rangel Peñaloza

A mi hermana

Judith Mylena Carvajal Basto

A mi sobrino

Martín Santiago Canedo Carvajal

Les debo todo lo que he sido, soy y seré en mi vida, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por creer en mí.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Carotenoides.....	1
1.1.1 Astaxantina.....	3
1.2 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	6
1.3 Biomasa lignocelulósica.....	12
1.4 Bagazo de caña	15
1.5 Pretratamiento de residuos lignocelulósicos	15
1.6 Sacarificación de biomasa lignocelulósica	17
1.7 β -glucosidasa.....	19
1.7.1 Clasificación de las β -glucosidasas	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 General	23
4.2 Específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Etapa 1: Estandarización del proceso de sacarificación de BC	25
5.1.1 Pretratamiento del bagazo de caña.....	25

5.1.2	Determinación del efecto de la temperatura y unidades de enzima en el proceso de sacarificación de BC	25
5.1.3	Optimización del proceso de sacarificación de bagazo de caña	26
5.2	Etapa 2: Cinéticas de <i>X. dendrorhous</i> R4 en sustratos puros, mezcla de sustratos y SBC.	27
5.2.1	Microorganismo	27
5.2.2	Condiciones de cultivo.....	27
5.2.3	Determinación de crecimiento	28
5.2.4	Cuantificación de azúcares mediante HPLC	28
5.2.5	Cuantificación de carotenoides totales	28
5.2.6	Cuantificación de astaxantina por HPLC	29
5.2.7	Determinación de actividad β -glucosidasa en <i>X. dendrorhous</i> R4	29
5.3	Etapa 3: Mutagénesis.....	31
5.3.1	Mutagénesis aleatoria	31
5.3.2	Cinéticas de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> cepa nativa; XR4 y doble mutante en glucosa; celobiosa; xilosa y SBC.	32
5.3.3	Comparación de cinéticas de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> R4 y doble mutante en SBC	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1	Etapa 1: Estandarización del proceso de sacarificación de BC.....	34
6.1.1	Optimización del proceso de sacarificación de bagazo de caña	38
6.2	Etapa 2: Cinéticas de <i>X. dendrorhous</i> R4 en sustratos puros, mezcla de sustratos y SBC.	42
6.2.1	Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> R4.....	42
6.2.2	Consumo de sustratos por <i>X. dendrorhous</i> R4	44

6.2.3	Efecto de la fuente de carbono en la producción de carotenoides y astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4	51
6.2.4	Efecto del uso de SBC como sustrato en la producción de astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4	56
6.2.5	Estandarización de las condiciones del ensayo de la actividad de la β -glucosidasa en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> R4	61
6.2.6	Evaluación de la actividad β -glucosidasa en cinéticas de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> R4	69
6.2.7	Metabolismo de <i>X. dendrorhous</i> R4 en la producción de astaxantina a partir de sacarificados de bagazo de caña	77
6.3	Etapa 3. Mutagénesis aleatoria en <i>X. dendrorhous</i> R4	83
6.3.1	Cinéticas de crecimiento de cepas de <i>X. dendrorhous</i> nativa, y mutantes en medio mínimo con diferentes sustratos	85
6.3.2	Determinación de la estabilidad de la mutante R4-X18.....	94
6.3.3	Comparación de cinéticas de crecimiento en biorreactor de la mutante R4 y R4-X18 de <i>X. dendrorhous</i> en SBC como sustrato	96
7.	CONCLUSIÓN	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de carotenos y xantofilas .	1
Figura 2. Estereoisómeros de la astaxantina.	4
Figura 3. a). Observación macroscópica y b) microscópica de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> en medio YM.	7
Figura 4. Producción de carotenoides en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .	10
Figura 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica.	13
Figura 6. Esquema de biomasa lignocelulósica antes y después del pretratamiento	16
Figura 7. Representación esquemática de la acción de endoglucanasas, exoglucanasas y β glucosidasas.	18
Figura 8. Estrategia experimental del proyecto	24
Figura 9. (a). Superficie de respuesta y (b) superficie de contorno del análisis del diseño estadístico. (c) Composición de azúcares en SBC.	37
Figura 10. (a). Azúcares totales obtenidos y (b) perfil de azúcares en sacarificados con diferentes unidades de enzima (Celluclast®).	39
Figura 11. Estandarización del tiempo de sacarificación, con 2000 EGU/g sustrato, pH 4.8, y 55 °C.	40
Figura 12. Estandarización del pH en el proceso de sacarificación con 2000 EGU/g sustrato 55 °C, 12 h de reacción.	41
Figura 13. Crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> R4 en diferentes fuentes de carbono.	44
Figura 14. Consumo de a) glucosa, b) celobiosa c) xilosa y d) mezcla de sustratos (GCX) por <i>X. dendrorhous</i> R4.	48
Figura 15. Efecto de la fuente de carbono (glucosa, xilosa, celobiosa, GCX) en la a) producción de carotenoides totales y b) producción de astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4.	53
Figura 16. a) Producción de biomasa, consumo glucosa y xilosa, b) producción de carotenoides y astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4 usando SBC ricos en xilosa y glucosa.	59
Figura 17. Localización de la β -glucosidasa de <i>X. dendrorhous</i> R4.	63

Figura 18. Estandarización de la concentración de proteína para la determinación de actividad β -glucosidasa en <i>X. dendrorhous</i> R4.....	64
Figura 19. Estandarización de la localización celular de la enzima β -glucosidasa de <i>X. dendrorhous</i> R4	65
Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad de la β -glucosidasa en <i>X. dendrorhous</i> R4	66
Figura 21. Efecto del tiempo de incubación en la actividad β -glucosidasa en <i>X. dendrorhous</i> R4.	67
Figura 22. Efecto del regulador y pH en la actividad β -glucosidasa de <i>X. dendrorhous</i> R4.	68
Figura 23. Consumo de sustrato y crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mínimo con glucosa.	70
Figura 24. Consumo de sustrato y crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mínimo con celobiosa.	71
Figura 25. Consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de astaxantina por de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio YP con celobiosa.....	73
Figura 26. a) Proteína asociada a la membrana, b) determinación de actividad volumétrica y c) específica de la β -glucosidasa de <i>X. dendrorhous</i> R4 en cultivos a escala de matraz con MMG y MMC, y cultivo a escala reactor con medio rico con celobiosa (YPC)..	77
Figura 27. Producción de astaxantina a partir de sacarificados de bagazo de caña por <i>X. dendrorhous</i>	80
Figura 28. Mutantes de <i>X. dendrorhous</i> R4 que asimilan xilosa. a). Selección de mutantes en MMX. b). Mutantes R4-X18 y R4-X34 seleccionadas de la dilución 10^{-2} . c). Mutantes seleccionadas de la dilución 10^{-3} . d). Comparación del crecimiento de las mutantes R4-X18 (izquierda) y R4 (derecha) en MMX y YPX.	85
Figura 29. Crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> : a) cepa nativa, b) mutante R4, c) mutante R4-X18 d) Comparación en la producción global de biomasa de las tres cepas evaluadas.....	88
Figura 30. Crecimiento en placa de la cepa nativa, R4 y R4-X18 de <i>X. dendrorhous</i> en medio mínimo con xilosa al 1 %.....	89

Figura 31. Consumo de sustratos por: a). cepa nativa, b), mutante R4, c) mutante R4-X18, de <i>X. dendrorhous</i> ..	91
Figura 32. Producción de astaxantina por las cepas nativa, R4 y R-X18 de <i>X. dendrorhous</i> en diferentes sustratos.....	93
Figura 33. Crecimiento celular y consumo de xilosa por las cepas R4-X18G y R4-X18X.	96
Figura 34 Crecimiento celular de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 en SBC10 como sustrato.	97
Figura 35. Consumo de azúcares totales del SBC10 por <i>X. dendrorhous</i>	98
Figura 36. (a) Producción de carotenoides totales y (b) astaxantina por las mutantes R4-X18 y R4 de <i>X. dendrorhous</i> en SBC10 como sustrato.	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos productores de astaxantina	5
Tabla 2. Composición del bagazo de caña crudo y tratado con NaOH 2%.	17
Tabla 3. Diseño central compuesto no factorial para el proceso de sacarificación....	26
Tabla 4. Conversión enzimática de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables mediante procesos de sacarificación a diferentes condiciones	36
Tabla 5. Parámetros cinéticos de cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 en diferentes sustratos	59
Tabla 6. Producción de astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> y <i>P. rhodozyma</i> utilizado diversos sustratos.	60
Tabla 7. Temperatura y pH óptimos de actividad β -glucosidasa de diferentes microorganismos.....	69
Tabla 8. Parámetros cinéticos de <i>X. dendrorhous</i> R4 en medio mínimo Breus con glucosa y celobiosa y medio rico (YP) con celobiosa.....	73
Tabla 9. Comparación entre concentraciones de NTG y tiempo de exposición en mutagénesis de <i>X. dendrorhous</i>	84
Tabla 10. Composición de sacarificados SBC2.5 y SBC10.....	86
Tabla 11. Parámetros cinéticos de cepas de <i>X. dendrorhous</i> con diferentes fuentes de carbono	94
Tabla 12. Parámetros cinéticos de las mutantes R4-X18 y R4 de <i>X. dendrorhous</i> en cultivos de biorreactor con SBC10 como sustrato.....	101

ABREVIATURAS

μ	Velocidad específica de crecimiento
ACL	ATP-Citrato liasa
A-KG	Alfa-cetoglutarato
ATP	Adenosín trifosfato
C	Celobiosa
CoA	Coenzima A
<i>crtI</i>	Fitoeno desaturasa
<i>crtS</i>	Astaxantina sintasa
<i>crtYB</i>	Fitoeno- β caroteno sintasa
CT	Carotenoides totales
DO	Densidad óptica
DMAP	Dimetilalil pirofosfato
EGU	Unidades endoglucanasa
EMS	Metanosulfonato de etilo
FAD	Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)
FPP	Farnesil pirofosfato
G	Glucosa
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
HMG-coA	Hidroximetilglutaril-coA
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Índice de refracción
LCC	Complejo de lignina-carbohidrato
MMX	Medio mínimo con xilosa como fuente de carbono
MVA	Ácido mevalónico

NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (Forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (Forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
OAA	Oxaloacetato
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosido
Q _A	Productividad de astaxantina
Q _x	Productividad de biomasa
SBC	Sacarificado de bagazo de caña
SOD	Superóxidos dismutasas
T	Temperatura (°C)
td	Tiempo de duplicación
X	Xilosa
XDH	Xilosa deshidrogenasa
XK	Xilulosa quinasa
X _{max}	Biomasa máxima
XR	Xilosa reductasa
Y _{p/s}	Rendimiento de producto con respecto a sustrato
Y _{p/x}	Rendimiento de producto con respecto a biomasa
YPC	Medio de cultivo, del inglés "Yeast Extract-Peptone-Cellobiose"
YPD	Medio de cultivo, del inglés "Yeast Extract-Peptone-Dextrose"
YPX	Medio de cultivo, del inglés "Yeast Extract-Peptone-Xylose"

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el uso de sacarificados de bagazo de caña (SBC) como sustrato en la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. El bagazo de caña (BC) después de ser pretratado con NaOH al 2 % se sometió a un proceso de sacarificación enzimática empleando el coctel de celulasas comercial Celluclast® 700 EGU/g. Las condiciones óptimas para la obtención de 10.7 g/L de azúcares reductores fueron: 2 % de BC, 2000 EGU/g de BC, 55 °C, y 12 h de reacción en matraces con 30 mL de regulador de citratos a pH 4.8, y 150 rpm. *X. dendrorhous* R4, se hizo crecer en biorreactores con diferentes sustratos (glucosa, celobiosa, xilosa al 1% y SBC) en medio YP. La mayor producción de astaxantina se obtuvo en cultivos con celobiosa y SBC (5.8 µg/mL) seguido de xilosa (4.5 µg/mL). Así mismo, Los cultivos con SBC aumentaron 1.3 y 1.4 veces el crecimiento celular y rendimiento de producto con respecto a sustrato respectivamente, en comparación con cultivos con celobiosa. Con el fin de mejorar la asimilación de la xilosa, la cual representa un 30 % de los SBC, se obtuvo mediante mutagénesis con NTG la mutante R4-X18. Esta mutante mejoró su crecimiento y producción de astaxantina 2.13 y 1.73 veces respectivamente, en comparación con su cepa parental R4 en cultivos con xilosa. De igual forma la mutante R4-X18 aumentó 45.3 % la producción de astaxantina en cultivos con SBC con respecto a R4. Los resultados obtenidos confirman que es posible mejorar los rendimientos de producción de astaxantina cultivando una mutante de *X. dendrorhous* con mejor asimilación de xilosa en SBC como sustrato.

ABSTRACT

In this work the use of sugarcane bagasse saccharifies (SBC) as substrate in the production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* was evaluated. The cane bagasse (BC) after being pretreated with 2% NaOH was subjected to an enzymatic saccharification process using the commercial cellulase cocktail Celluclast® 700 EGU/g. The optimal conditions for obtaining 10.7 g/L of reducing sugars were: 2 % BC, 2000 EGU/g BC, 55 °C, and 12 h of reaction in flasks with 30 mL of citrate buffer at pH 4.8, and 150 rpm. *X. dendrorhous* R4, was grown in bioreactors with different substrates (glucose, cellobiose, xylose 1% and SBC) in YP medium. The highest astaxanthin production was obtained in cultures with cellobiose and SBC (5.8 µg/mL) followed by xylose (4.5 µg/mL). Likewise, SBC cultures increased 1.3 and 1.4 times cell growth and product yield with respect to substrate respectively, compared to cellobiose cultures. In order to improve the assimilation of xylose, which represents 30% of SBCs, the mutant R4-X18 was obtained by mutagenesis with NTG. This mutant improved its growth and production of astaxanthin 2.13 and 1.73 times respectively, compared to its parental strain R4 in xylose cultures. Similarly, the R4-X18 mutant increased 45.3 % the production of astaxanthin in cultures with SBC with respect to R4. The results obtained confirm that it is possible to improve the production yields of astaxanthin by cultivating a mutant of *X. dendrorhous* with better assimilation of xylose in SBC as substrate.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Carotenoides

Los carotenoides son un tipo de pigmentos orgánicos, compuestos en su mayoría de ocho unidades de isopreno con un esqueleto de 40 carbonos (Barredo *et al.*, 2017). Debido a su naturaleza lipofílica, son insolubles en agua y funcionan como cromóforos absorbiendo las longitudes de onda de 400 – 500 nm del espectro electromagnético. Son responsables de los colores amarillo, naranja y rojizo de diversos organismos, y actúan como fotoprotectores y antioxidantes al secuestrar especies reactivas de oxígeno (Palma, 2016; Barredo *et al.*, 2017). La función antioxidante es atribuida a su estructura, la cual en algunos casos como ocurre en la astaxantina, se debe a los dos anillos terminales unidos por una cadena doble conjugada (Córdova *et al.*, 2018). Los carotenoides se clasifican en carotenos (β -caroteno, α -caroteno o licopeno) y xantofilas (luteína, zeaxantina, cantaxantina, o astaxantina) de acuerdo con la ausencia o presencia de oxígeno en su estructura carbonada respectivamente (García *et al.*, 2018) (Figura 1).

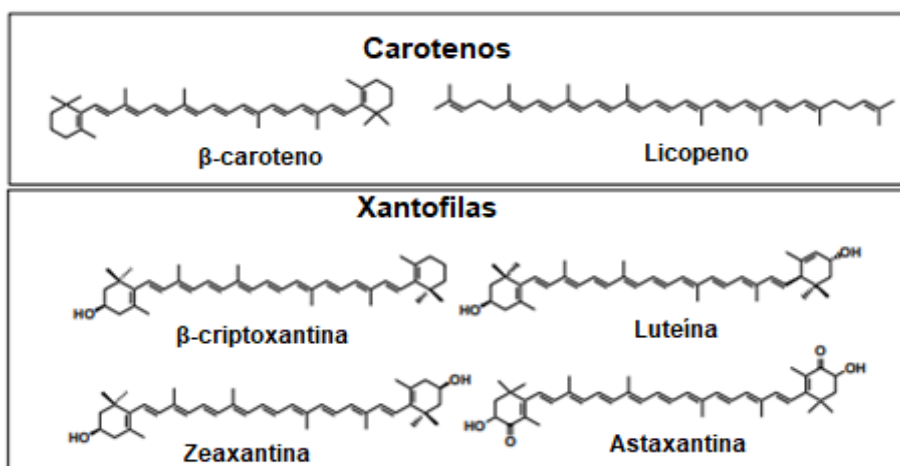


Figura 1. Estructura de carotenos y xantofilas (Maoka, 2020).

Los animales no pueden producir carotenoides por lo cual, éstos deben ser adquiridos mediante su dieta o por suplementos alimenticios, y son almacenados en el tejido adiposo. Cerca de 50 – 60 carotenoides son precursores de vitamina A, necesaria para la visión y mantener sana la piel y tejidos superficiales (Meléndez *et al.*, 2004). La conversión de carotenoides a vitamina A, se debe a la capacidad de los animales para transformarlos en retinol y a la estructura del compuesto, el cual debe contener como mínimo un anillo β -ionona. De esta forma, el carotenoide más importante es el β -caroteno el cual contiene dos anillos en su estructura. En el caso de la yema de huevo, debe su color a la presencia de luteína, zeaxantina y trazas de β -caroteno, mientras que algunos organismos como el salmón o flamencos deben su color a la astaxantina (Meléndez *et al.*, 2004).

Aproximadamente 600 carotenoides han sido reportados en diferentes formas de vida. De forma natural, estos pigmentos son producidos en plantas, algas y algunas bacterias y hongos, cumpliendo funciones como pigmentos accesorios fotosintéticos, antioxidantes, precursores de vitamina A o atracción visual de animales polinizadores (Córdova *et al.*, 2018). A nivel industrial, los carotenoides son usados en alimentos, nutraceúticos, fármacos y cosméticos debido a las propiedades anteriormente mencionadas y su uso en la prevención de cáncer, cataratas y degeneración macular (Mata *et al.*, 2014). El mercado global de carotenoides se reportó en \$ 1.5 mil millones para el 2017 y se estima que podría alcanzar los \$ 2.0 mil millones para 2022 (McWilliams, 2018). Lo anterior indica que la demanda de carotenoides ha ido aumentando con el tiempo. La producción comercial de carotenoides es obtenida por síntesis química o extracción a partir de plantas, sin embargo, la producción de estos compuestos mediante el uso de microorganismos es una alternativa con gran interés científico que aún se encuentra en proceso de optimización. Dentro de estos microorganismos se han reportado microalgas, bacterias y levaduras en la producción de β -caroteno, 4-decanoprenoxantina, licopeno y astaxantina (Saini & Keum, 2017).

1.1.1 Astaxantina

La astaxantina ($C_{40}H_{52}O_4$, 3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione), es una forma oxidada del β -caroteno cuya capacidad antioxidante es 10 veces más efectiva que el caroteno y la luteína y 100 veces mayor al α -tocoferol (Alcaíno *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019). La función antioxidante y la coloración roja de la astaxantina se debe a su estructura, la cual es compuesta de dos anillos terminales unidos por una cadena doble conjugada o sistema de polieno. Al ser una xantofila, la astaxantina es altamente lipofílica y presenta una polaridad y actividad antioxidante más alta que otros carotenoides debido a sus grupos funcionales 3-hidroxilo y 4-ceto en los anillos terminales (Córdova *et al.*, 2018).

Esta xantofila es de gran interés comercial en la industria alimentaria, cosmética y farmacológica, destacando sus propiedades antiinflamatorias, antienvjecimiento, refuerzo del sistema inmunológico, anticáncer, actividad antidiabética, y prevención de enfermedades relacionadas con la degeneración neuronal como el Parkinson y el Alzheimer (Panis & Carreon, 2016; Barredo *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2017). Existen estereoisómeros de astaxantina caracterizados por la variación en la configuración de los dos grupos hidroxilo en la molécula. De los tres isómeros, dos son enantiómeros ($3R,3'R$ y $3S,3'S$) y una forma meso ($3R,3'S$), siendo los estereoisómeros ($3S,3'S$) y ($3R,3'R$) los más abundantes en la naturaleza (Figura 2). La microalga *Haematococcus pluvialis* sintetiza el isómero ($3S,3'S$), la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* el isómero ($3R,3'R$), mientras que la astaxantina sintética comprende isómeros ($3S,3'S$), ($3R,3'S$) y ($3R,3'R$) (Córdova *et al.*, 2018).

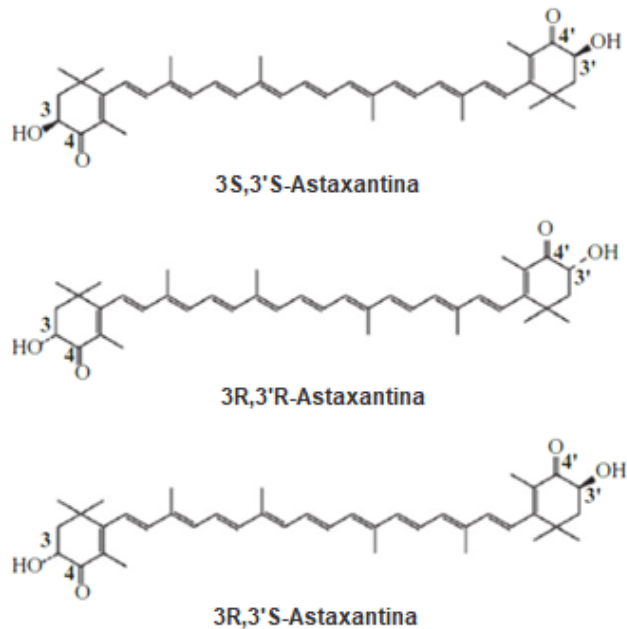


Figura 2. Estereoisómeros de la astaxantina. Fuente: (Lim *et al.*, 2017).

Según el Research & Markets (2015), el mercado mundial de astaxantina se estimó en 280 toneladas métricas valoradas en US \$ 447 millones en 2014, y se proyecta que alcanzará las 670 toneladas métricas valoradas en US \$ 1.1 mil millones para 2020. La mayor parte de esta xantofila es implementada como aditivo alimenticio en la industria acuícola (Gassel *et al.*, 2012). Se reporta, que la astaxantina producida por la levadura *Phaffia rhodozyma* (*X. dendrorhous*) y la bacteria *Paracoccus* son predominantemente usadas en el sector de acuicultura (Research & Markets, 2015). Esta xantofila fue aprobada como segura en el 2009 por la Food and Drug Administration (FDA), como color aditivo para uso específico en alimentación animal como el salmón, la trucha y el camarón en granjas de cultivo (Rodríguez *et al.*, 2010).

La mayor parte de la astaxantina comercial es obtenida por síntesis química, sin embargo, esta fuente de obtención puede presentar riesgo de toxicidad en el producto, y residuos peligrosos que afectan el medio ambiente (Panis & Carreon, 2016; Córdova *et al.*, 2018). Por tal motivo, la biotecnología ha hecho posible el estudio de algunos microorganismos que representan fuentes naturales para su obtención (Tabla 1),

destacando las microalgas *Haematococcus pluvialis* (Panis & Carreon, 2016; Córdova et al., 2018), y *Dunaliella salina* (López et al., 2017); la bacteria *Methylobacterium extorquens* (Tlustý et al., 2017), y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gervasi et al., 2017).

Haematococcus pluvialis ha sido el microorganismo ampliamente estudiado para la obtención de astaxantina presentando concentraciones entre 1.5 a 5.0 % p/p con relación a la biomasa seca. Sin embargo, presenta desventajas frente a otras microalgas como *Dunaliella spp*, debido a tasas de crecimiento lento, ciclo de vida y cultivo complejos, además de requerir altos costos de producción y dos fases para la obtención exitosa de astaxantina, una de crecimiento y otra de inducción de carotenogénesis (Cifuentes et al., 2003; Granda., 2015). La obtención de astaxantina por *H. pluvialis* requiere condiciones y cambios específicos en el cultivo debido a su ciclo de vida complejo. La astaxantina obtenida por esta microalga puede resultar de menor calidad debido al alto porcentaje de esterificación (70% monoésteres y 25 % diésteres) en contraste con la producida por *X. dendrorhous* (97 % libre, no esterificada) (Rodríguez, et al., 2010; Lim et al., 2017). Además de esto, *X. dendrorhous* no requiere de luz para su crecimiento y puede utilizar varias fuentes de carbono para la producción de astaxantina (Córdova et al., 2018).

Tabla 1. Microorganismos productores de astaxantina

Fuente	(%) Astaxantina en peso seco de biomasa
Microalgas	
<i>Chlorococcum sp.</i>	0.2
<i>Botryococcus braunii</i>	0.01
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0.1
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.3

Fuente	(%) Astaxantina en peso seco de biomasa
Bacterias	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0.01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	2.2
Levadura	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	0.5

Adaptado de: Lim *et al.*, (2017)

1.2 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Xanthophyllomyces dendrorhous (*Phaffia rhodozyma* en estado sexual) es una levadura basidiomiceta (Sharma *et al.*, 2015), aislada de exudados de plantas en Japón y Alaska (García *et al.*, 2018), y ampliamente conocida como una excelente productora de astaxantina (Pan *et al.*, 2017) (Figura 3). Esta cualidad se debe a que *X. dendrorhous* es particularmente susceptible a algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) (superóxidos, radicales libres y peróxidos), por sus bajos niveles de actividad catalasa. Así mismo, aunque *X. dendrorhous* posee Mn-superóxido dismutasa no posee otros superóxidos dismutasas (SOD) que están presentes en muchas levaduras (Marcoleta *et al.*, 2011). Estas SOD, son responsables de catalizar la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Schroeder & Johnson, 1993) y posteriormente la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Los bajos niveles de actividad de estas enzimas, no permiten *X. dendrorhous* tenga una respuesta eficiente sobre las ROS. De este modo, la acumulación de ROS induce la producción de astaxantina como método de defensa celular. Así mismo, se ha descrito a *X. dendrorhous* como una levadura facultativa que

puede producir etanol por fermentación de azúcares a diferencia de otras levaduras carotenogénicas como *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Chávez *et al.*, 2010).

La clasificación de *X. dendrorhous* fue bastante compleja en un inicio, debido a que la diferencia con *Phaffia rhodozyma* consistía en el desarrollo de un estado sexual, sin embargo, para lograr este estado es necesario condiciones de cultivo y temperaturas específicas, tales como el uso de medio mínimo con glucosa, depleción de fuente de nitrógeno, presencia de polioles o polialcoholes, temperaturas de 9 °C y tiempos de incubación superiores a 20 días (García, 2012). Si bien aún existe discrepancia con respecto a si son dos especies diferentes, en condiciones normales de cultivo es común encontrar a *X. dendrorhous* en estado asexual con células elipsoidales individuales, en pareja o formando cadenas. Así mismo, se observa frecuentemente división por gemación e incluso se pueden observar células con múltiples yemas en condiciones de estrés hídrico o depleción de nitrógeno. Con respecto a la estructura celular de *X. dendrorhous*, ésta cuenta con una pared celular compuesta principalmente por $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow6)$ glucano y también $\alpha(1\rightarrow3)$ glucano y pequeñas cantidades o ausencia de quitina, además las células pueden estar rodeadas por una cápsula de polisacáridos ácidos con D-xilosa (García, 2012).

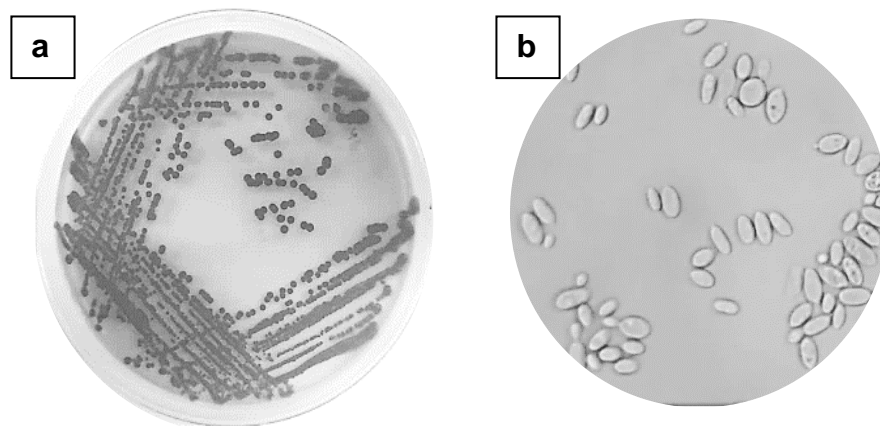


Figura 3. a). Observación macroscópica y b) microscópica de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en medio YM. Fuente: Autor

A pesar del gran potencial de *X. dendrorhous* en la producción de astaxantina, la cepa silvestre tiene rendimientos muy bajos para ser una fuente competitiva comercialmente (Córdova *et al.*, 2018). Por tal motivo, se han establecido estrategias de modificación genética con el fin de potenciar la producción de astaxantina. Se ha estudiado la modificación genética de rutas metabólicas en *X. dendrorhous* (Córdova *et al.*, 2017; Pollmann *et al.*, 2017a) y el uso de agentes mutágenos como la luz ultravioleta (Kothari *et al.*, 2019), nitrosoguanidina (NTG) (Barbachano *et al.*, 2014) y metanosulfonato de etilo (EMS) (Hasan *et al.*, 2016), los cuales son los más usados para obtener mutantes hiper productoras de astaxantina mediante mutagénesis aleatoria. En general, el aumento de la producción de astaxantina en las mutantes puede ser causado por un alza global en la regulación de la vía de síntesis de astaxantina o por sobreexpresión de enzimas limitantes en la ruta específica (Gassel *et al.*, 2012). No obstante, uno de los inconvenientes de estas técnicas es la generación de mutaciones secundarias que puede afectar la fisiología, viabilidad, metabolismo celular, y crecimiento de la levadura, además de reportarse inestabilidad genética (Barredo *et al.*, 2017). Este último aspecto ha sido motivo de debate científico en *X. dendrorhous*, ya que su nivel de ploidía aún no es totalmente definido. Estudios reportan un contenido de ADN ligeramente superior de *X. dendrorhous* en comparación a una cepa diploide de *Saccharomyces cerevisiae* lo cual sugiere que *X. dendrorhous* podría ser poliploide o que la complejidad de ADN por cada célula es superior a la de *Saccharomyces* (García, 2012). Así mismo, en la reproducción sexual de *X. dendrorhous*, las células vegetativas son diploides y pueden formar cigotos tetraploides por conjugación los cuales al ingresar en división meiótica regresan a su estado de diploidía. Por otro lado, otros autores reportan la obtención con éxito de varias mutantes que aumentan la producción de carotenoides mediante tratamientos de mutagénesis aleatoria lo cual puede teorizar también un estado haploide, ya que si existiera una condición de poliploidía las probabilidades de obtener una mutación puntual y estable en el mismo sitio de dos cromosomas homólogos es muy baja (García, 2012). Si bien, aún no está claro este nivel de ploidía, es importante en estrategias de selección y obtención de mutantes estables genéticamente que aumenten la producción de carotenoides (García, 2012). Así mismo, se reporta un elevado polimorfismo en la longitud y número

de cromosomas en las diversas cepas de *X. dendrorhous*, variando de 8 a 13 cromosomas y de 15.4 y 23.2 Mb el tamaño del genoma. No obstante, este fenómeno ha sido reportado en otros géneros de levaduras (García 2012).

En *X. dendrorhous*, la síntesis de astaxantina empieza con la ruta del mevalonato (Figura 4). Esta ruta inicia con la condensación de tres moléculas de acetil-CoA para producir el primer precursor de la ruta de biosíntesis de terpenoides, el ácido mevalónico (MVA). Este último mediante dos fosforilaciones y una descarboxilación se convierte en isopentenil pirofosfato (IPP C₅). El IPP es convertido en su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), al cual posteriormente se le añaden tres moléculas de IPP para formar geranyl geranyl pirofosfato (GGPP C₂₀). Seguido de esto, la condensación de dos moléculas de GGPP produce fitoeno (el primer caroteno C₄₀ de la ruta que carece de color), el cual es subsecuentemente desaturado para producir licopeno (carotenoide de color rojo). El licopeno es convertido a β-caroteno por la enzima licopeno ciclasa. Finalmente, el β-caroteno es oxidado por la incorporación de un grupo hidroxil en la posición 3 y un grupo ceto en la posición 4 de ambos anillos β-ionona de su molécula para dar origen a la astaxantina (Chávez *et al.*, 2010; Córdova *et al.*, 2018). A diferencia de otros organismos que producen astaxantina, en *X. dendrorhous* una sola enzima cataliza estos últimos pasos oxidantes desde β-caroteno a astaxantina llamada astaxantina sintasa (CrtS, codificada por el gen *crtS*), el cual es un citocromo P450 monooxigenasa. La astaxantina sintasa requiere de un citocromo P450 reductasa que actúa como una pareja redox, codificada por el gen *crtR* en *X. dendrorhous* la cual proporciona los electrones necesarios para la catálisis enzimática. En esta levadura, la astaxantina representa entre el 83-87% del total de carotenoides (Córdova *et al.*, 2018). Es importante destacar, que parte del éxito en la producción de astaxantina radica en dirigir el flujo de carbono hacia la carotenogénesis, ya que precursores de esta ruta pueden ser usados en la síntesis de otros compuestos como el ergosterol o carotenoides monocíclicos.

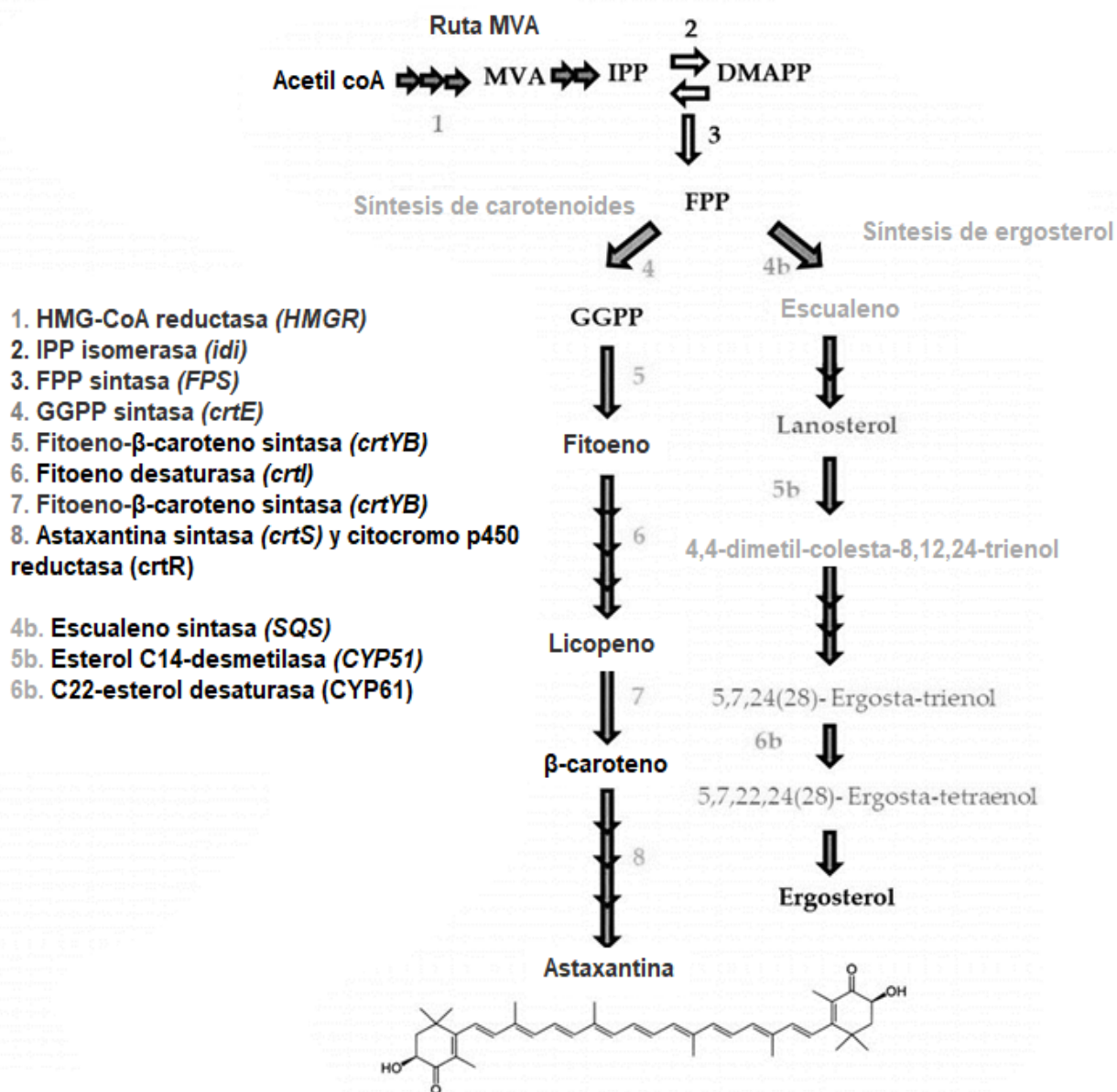


Figura 4. Producción de carotenoides en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Fuente: Córdova *et al.*, (2018).

La regulación positiva de carotenoides en *X. dendrorhous* ha sido asociada con la presencia de especies reactivas de oxígeno, ausencia de luz e incluso el tipo de fuente de carbono la cual tendrá un efecto tanto en la cantidad de carotenoides totales como en su composición (Córdova *et al.*, 2018). Así mismo, esta levadura es capaz de realizar dos tipos de metabolismo, el fermentativo y el aerobio, e incluso hacer fermentación aerobia debido al efecto Crabtree. Se ha demostrado que el uso de sustratos no fermentables como el etanol y el succinato aumentan la producción de

carotenoides de forma proporcional a la producción de biomasa, no obstante, cuando se utiliza glucosa (azúcar fermentable) como única fuente de carbono, la producción de carotenoides sólo inicia una vez se ha agotado por completo este azúcar. Por tal motivo es importante estudiar el efecto de las fuentes de carbono en la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* (Córdova *et al.*, 2018).

Se ha reportado la capacidad de *X. dendrorhous* para crecer en diversos residuos agrícolas como medio de cultivo debido a su habilidad de metabolizar diversas fuentes de carbono destacando glucosa, sacarosa, maltosa, almidón, succinato, glicerol, celobiosa y xilosa (Gervasi *et al.*, 2017). No obstante, esta última pentosa genera un crecimiento débil de la levadura, el cual se ha buscado optimizar, no solo en *X. dendrorhous* sino en otras levaduras de interés industrial. Así mismo, estudios reportan que esta pentosa puede inducir la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* (Golubev, 1995; Vázquez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2010). La xilosa es uno de los componentes mayoritarios de los sacarificados de los residuos lignocelulósicos, los cuales han sido usados como fuente de carbono para la producción de metabolitos debido a su disponibilidad, cantidad y necesidad de aprovechamiento (Reider *et al.*, 2016; Stoklosa *et al.*, 2018). Si bien no ha sido estudiado de forma clara el metabolismo de la xilosa en *X. dendrorhous*, se ha reportado la acumulación de xilitol en esta levadura (Parajó, *et al.*, 1997; Vázquez, 2001), lo cual indica que la ruta de asimilación de esta pentosa es por oxido reducción. La ruta oxido reductiva de la xilosa es común en levaduras y algunos hongos filamentosos y consiste básicamente en dos reacciones enzimáticas. En primera instancia la xilosa es reducida a D-xilitol por la xilosa reductasa (XR) usando NADH o NADPH como cofactor, posteriormente el D-xilitol es oxidado a D-xilulosa por la xilitol deshidrogenasa (XDH) dependiente de NAD⁺. Posteriormente la xilulosa es fosforilada a D-xilulosa-5-fosfato por la xiluloquinasa (XK). Este último compuesto es un metabolito intermediario en la ruta no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, y en levaduras puede ser metabolizado a varios azúcares fosforilados como fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, los cuales entran en la ruta de la glucólisis. No obstante, la diferencia en la preferencia de cofactores en las dos primeras reacciones puede generar acumulación de xilitol por desbalance redox

(Jagtap & Rao, 2018). La acumulación de este compuesto ha sido reportada en otras levaduras de los géneros *Candida*, *Clavispora*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, y *Pichia* durante el crecimiento aerobio en medios compuestos por xilosa (Jagtap & Rao, 2018). El uso de pentosas para la producción de metabolitos como etanol y carotenoides ha sido uno de los principales obstáculos en el aprovechamiento de residuos agrícolas como sustrato, por tal motivo el estudio del metabolismo y la búsqueda de un mejoramiento en la asimilación de la xilosa en microorganismos con interés industrial ha sido motivo de estudio hasta la actualidad (Jagtap & Rao, 2018).

Generalmente las materias primas usadas como sustrato en la producción de metabolitos microbianos representan entre el 30 y 70 % de los costos del proceso productivo (Villegas *et al.*, 2019). Por tal motivo, con el fin de contribuir al desarrollo sostenible en la industria de la astaxantina, se ha planteado el uso de residuos lignocelulósicos como fuente de carbono cuya composición es en gran parte celulosa y hemicelulosa (Jeffries, 1983). Particularmente con *X. dendrorhous* se ha investigado el uso de residuos de yuca, maíz, coco, mejillón, arroz, y sorgo dulce, obteniéndose resultados positivos en los rendimientos de producción (Stoklosa, *et al.*, 2019, Villegas, *et al.*, 2019).

1.3 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es la materia orgánica más abundante del planeta, producto del proceso de fotosíntesis de las plantas. Los residuos aprovechables de biomasa lignocelulósica pueden obtenerse de bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y residuos industriales cuya materia prima es biomasa vegetal, como la industria del papel, caña, madera entre otros (Abril & Navarro, 2012). La composición de la biomasa lignocelulósica radica principalmente en fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 5), de las cuales, mediante un tratamiento, las dos primeras permiten liberar azúcares que son usados en la producción de productos biológicos. Estos productos componen el pilar del concepto de biorrefinería, donde se

busca un procesamiento sostenible de la biomasa lignocelulósica en la obtención de diversos productos de base biológica (Kim *et al.*, 2016). Los biocombustibles han sido la principal directriz del aprovechamiento de estos recursos, sin embargo, la búsqueda de nuevas aplicaciones para la obtención de productos de valor agregado ha aumentado (Villegas *et al.*, 2019).

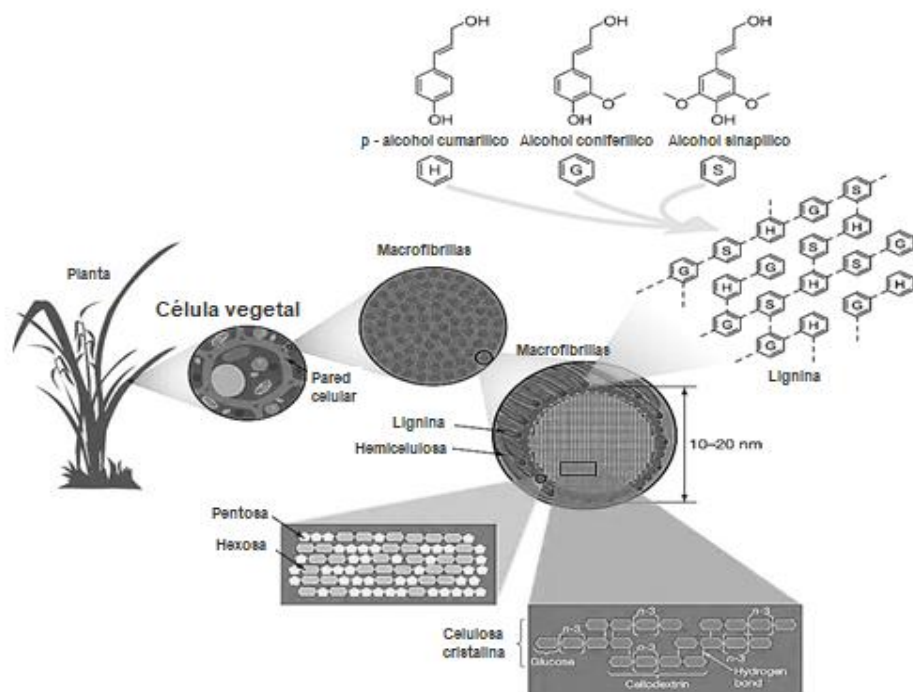


Figura 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Rubin, (2008)

La celulosa representa entre el 40 y el 50% de la composición de la biomasa vegetal, al ser el mayor componente estructural de la pared celular de las plantas. La celulosa es un homopolisacárido altamente estable, compuesto de cadenas lineales (microfibrillas) que está constituido por moléculas de D-glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4 dando origen a moléculas de celobiosa. Estas microfibrillas están unidas mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. En el caso de las moléculas de celobiosa, estas pueden permanecer unidas por enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, lo cual le confiere alta rigidez, resistencia a la celulosa formando una estructura cristalina insoluble en agua muy

difícil de hidrolizar, sin embargo, existe un porcentaje entre 5-10% de fibrillas no organizadas que constituyen regiones amorfas, las cuales presentan mayor susceptibilidad a hidrólisis enzimática (Anwar *et al.*, 2014; Castro, 2018; Ríos, 2017).

La hemicelulosa es el segundo heteropolisacárido más abundante comprendiendo entre el 25 y 35 % de la biomasa lignocelulósica y posee un peso molecular más bajo que la celulosa. Está constituido principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-galactosa, D-glucosa) que forman cadenas ramificadas y ácidos urónicos como 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. La ramificación de la cadena lateral de estos compuestos consiste en polímeros hidrolizables. Los azúcares que componen la hemicelulosa están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente β -1,3. Residuos de xilosa unidos por los enlaces β -1,4 conforman un polisacárido complejo llamado xilano el cual es el mayor componente de la hemicelulosa. La hemicelulosa se une fuertemente por atracciones no covalentes a las microfibrillas de la celulosa (Brodeur, *et al.*, 2011; Aguilón, 2018; Ramírez, 2016).

La lignina es la fracción más compleja representando sólo entre un 10 – 25 % de la biomasa lignocelulósica. Es un polímero aromático compuesto de ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) que tienen como base el fenol y están unidos por enlaces éter y carbono-carbono. Así mismo, actúa como pegamento al rellenar con sus polímeros el espacio entre y alrededor de la celulosa y hemicelulosa. Este complejo es insoluble en agua y se caracteriza por tener una estructura amorfa tridimensional altamente resistente a la degradación química y biológica. La lignina hace parte de las paredes secundarias de las plantas y juega un papel importante en la conducción de agua en plantas vasculares y en proporcionar un soporte estructural, impermeabilidad, rigidez y protección a la celulosa y hemicelulosa (Anwar, 2014; Castro, 2018; González, 2016; Sindhu, *et al.*, 2016; Ríos, 2017).

1.4 Bagazo de caña

El bagazo de caña es el residuo obtenido del procesamiento de la caña de azúcar, presenta una composición aproximada de 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina. Mediante sacarificación de estos residuos se puede obtener D-glucosa y D-xilosa entre otros azúcares que pueden ser utilizados como fuente de carbono por *X. dendrorhous* (Palma, 2016).

México cuenta con 51 ingenios azucareros y supera una producción de 55 millones de toneladas de caña en el 2018 (Servicio de información agroalimentaria y pesquera, 2018). Se estima que, por cada 100 toneladas de caña procesada, se obtiene de 25 a 30 toneladas de bagazo de caña (Conadesuca, 2016). Si bien se ha usado este residuo en la generación de energía en las plantas de producción, y biocombustibles es indispensable aprovechar la totalidad de estos residuos ricos en azúcares y evaluar la producción de compuestos de valor agregado como los carotenoides.

1.5 Pretratamiento de residuos lignocelulósicos

La obtención de productos biológicos a partir del proceso de biorrefinería de biomasa lignocelulósica requiere de diversos pasos. Primero se debe disminuir el tamaño de partícula de los residuos (molido mecánico), posteriormente un pretratamiento que permita disminuir la fracción de lignina y hacer más accesible la celulosa y hemicelulosa a la hidrólisis enzimática (Figura 6). Seguido a esto, una sacarificación enzimática que comprende la acción de un grupo de enzimas hidrolíticas que actúan sobre la celulosa y hemicelulosa principalmente para la liberación de pentosas y hexosas. Finalmente, una conversión microbiana de estos azúcares en compuestos de interés biotecnológicos como biocombustibles y carotenoides (Kim *et al.*, 2016). El proceso de pretratamiento es clave, ya que los rendimientos de la sacarificación y posterior fermentación dependen de la eficiencia de este proceso.

El pretratamiento alcalino es el más utilizado, debido a que usa productos químicos no corrosivos como el hidróxido de sodio, carbonato de sodio o el amonio, requiere

condiciones más suaves que el pretratamiento ácido y no produce compuestos como furfural e hidroximetilfurfural los cuales actúan como inhibidores durante a fermentación de hidrolizados (López, *et al.*, 2013; Kim, *et al.*, 2016). Así mismo, los productos alcalinos interactúan directamente con la lignina siendo más eficientes en el proceso de deslignificación y retención de carbohidratos, generando un hinchamiento de la biomasa lo que conduce a un aumento del área superficial interna, disminución de la cristalinidad y rotura de la ligninia. El hidróxido de sodio ataca efectivamente el enlace entre la lignina y la hemicelulosa en los complejos de lignina-carbohidrato (LCC); eliminando los enlaces éter y éster. Así mismo, escinde el éster y enlaces carbono-carbono (C – C) en moléculas de lignina (ácido ferúlico) (López, *et al.*, 2013; Kim, *et al.*, 2016).

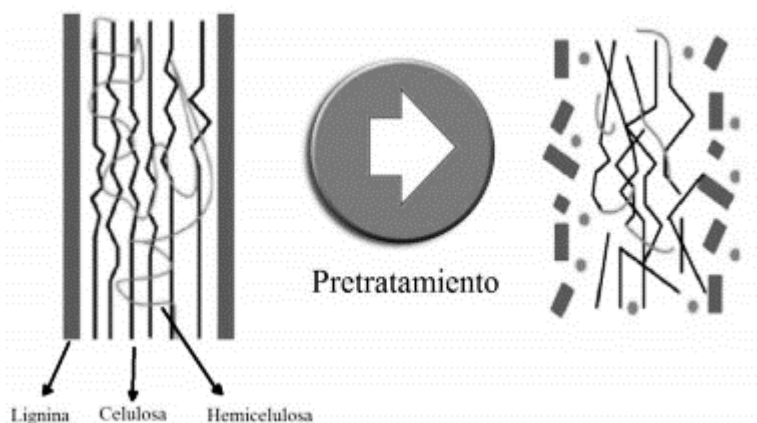


Figura 6. Esquema de biomasa lignocelulósica antes y después del pretratamiento

Fuente: Cortés, (2013)

En la tabla 2 se puede observar la comparación de la composición de bagazo de caña antes y después del pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio al 2%. Este método permite disminuir la fracción de lignina en un 34 %, y aumentar la fracción de celulosa en un 28 %. Esta última fracción representa la composición mayoritaria del bagazo de

caña y es indispensable para la obtención de azúcares fermentables. La fracción de hemicelulosa disminuyó levemente a 12.52 % (Castro, 2018).

Tabla 2. Composición del bagazo de caña crudo y tratado con NaOH 2%.

Tratamiento	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Total (%)
Crudo	23.27±0.39	47.4±1.54	17.98±1.27	2.58±0.43	2.75±0.26	94±3.89
NaOH 2%	15.37±0.66	65.83±3.64	12.52±1.52	2.37±0.27	1.85±0.19	98.17±3.4

Fuente: Castro, (2018)

1.6 Sacarificación de biomasa lignocelulósica

La sacarificación enzimática ha sido la opción más prometedora en la obtención de azúcares a partir de residuos lignocelulósicos. Es altamente específica, presenta baja toxicidad, baja corrosión y no forma subproductos que inhiban el crecimiento del microorganismo en la fermentación como ocurre en la hidrólisis alcalina y básica. En este proceso actúan celulasas y hemicelulasas. El primer grupo está compuesto por tres actividades: endoglucanasas, exoglucanasas, y β -glucosidasas. La sacarificación es iniciada por las endoglucanasas que escinden aleatoriamente los enlaces internos en las regiones amorfas de la fibra de celulosa y crean nuevos extremos reductores y no reductores que son susceptibles a la acción de las exoglucanasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis sucesiva de los residuos de la celulosa (extremos reductores o no reductores), liberando celobiosa como producto principal, la cual es posteriormente hidrolizada por las β -glucosidasas (Figura 7) (Akhtar *et al.*, 2016; Castro, 2018).

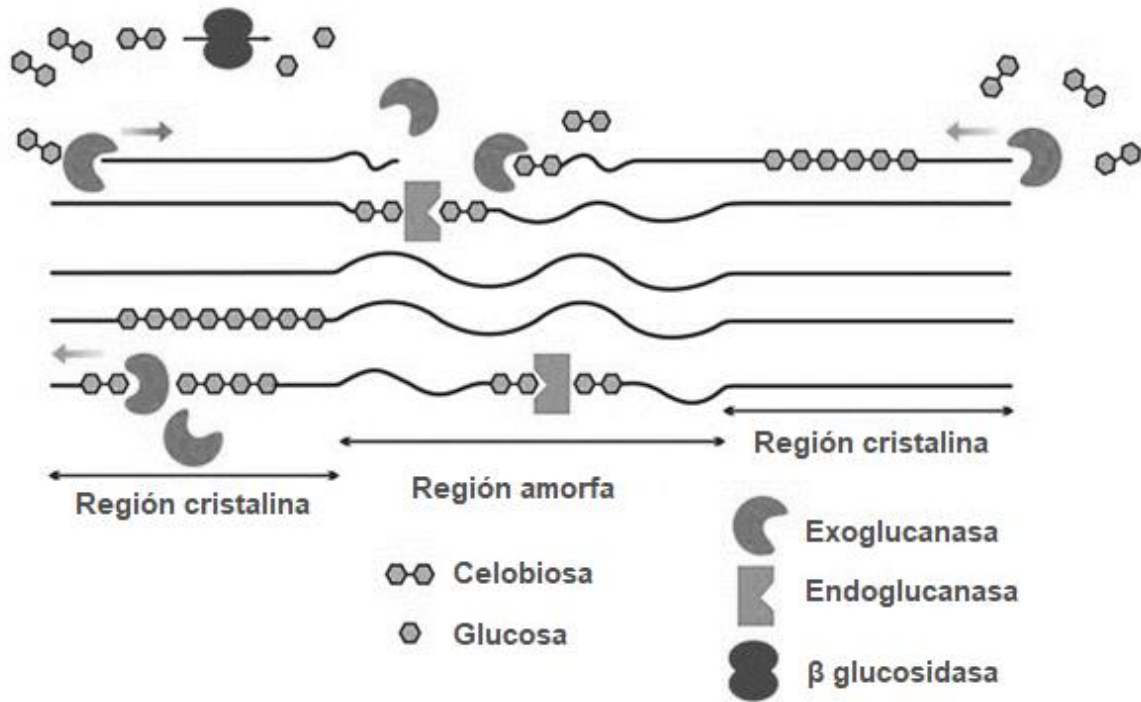


Figura 7. Representación esquemática de la acción de endoglucanasas, exoglucanasas y β glucosidasas Fuente: Akhtar *et al.*, (2016)

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa. Este grupo de enzimas trabajan sinérgicamente, y se clasifican en dos grandes grupos: las endo-1,4- β -xilanasas, (EC 3.2.1.8), y las exoxilanasas. Las primeras rompen al azar enlaces glicosídicos de la cadena principal de xilano y las segundas sólo se adhieren al azúcar reductor al final de la cadena (Vázquez, 2013). Las xilanasas pueden ser producidas por diversos organismos, destacando la bacteria gran positiva *Cellulomonas flavigena*, productora de un complejo enzimático compuesto por xilanasas y celulasas, el cual es inducido con el uso de residuos agrícolas como sustrato siendo el mejor inductor el bagazo de caña. (Ponce & Pérez, 2002).

1.7 β -glucosidasa

Las β -glucosidasas o celobiasas (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) hidrolizan el producto de las exocelulasas (exoglucanasas) a monómeros de glucosa actuando sobre los enlaces glucosídicos β (1-4) de oligosacáridos (Casablanca *et al.*, 2011). Este proceso, completa la degradación de la celulosa y evita la acumulación de inhibidores de las endoglucanasas y exoglucanasas. Así mismo, las β -glucosidasas pueden inhibirse por su producto de hidrólisis (Gil, 2015).

Las β -glucosidasas han sido reportadas en los tres reinos: bacteria, archaea y eucariota desempeñando diversas funciones. En el caso de hongos y levaduras son mayoritariamente usadas en la transformación de biomasa lignocelulósica mediante hidrólisis de oligosacáridos de cadena corta, actuando como paso final en la sinergia entre endoglucanasas y exoglucanasas (Bhatia *et al.*, 2002). Las principales aplicaciones de las β -glucosidasas comprenden la biodegradación de desechos agrícolas, También son usadas en la industria de zumos, frutas y derivados participando en la hidrólisis de compuestos glicosilados, y de manera muy importante en la industria vinícola en la hidrólisis de terpenoles glicosilados permitiendo así potenciar el aroma (Huerta *et al.*, 2005; Casablanca *et al.*, 2011).

Se estima que las β -glucosidasas bacterianas y de levadura son principalmente intracelulares. Por su parte, los hongos filamentosos generalmente secretan sus enzimas extracelularmente, aunque existen excepciones como el caso de *Trichoderma reesei* el cual se ha reportado que presenta actividad β -glucosidasa asociada a membrana en cultivos sumergidos y extracelular en fermentaciones sólidas. Lo anterior permite teorizar que, de acuerdo con el medio de cultivo y la presencia de sustratos de celulosa natural, la β -glucosidasa asociada a membrana puede desprenderse y liberarse al medio extracelular en este organismo (Krisch *et al.*, 2010). Así mismo, las β -glucosidasas intracelulares son generalmente sintetizadas después de proporcionar una fuente de carbono al medio de cultivo, es decir, son inducibles mientras que las β -glucosidasas unidas a membrana son más comunes en levaduras y suele ser constitutivas o inducibles (Ochoa, 2018).

1.7.1 Clasificación de las β -glucosidasas

Las β -glucosidasas se clasifican con base a la especificidad de sustrato y la identidad de su secuencia de aminoácidos. Basado en la especificidad de sustrato, las β -glucosidasas están agrupadas en 3 clases: Clase 1: tienen una fuerte afinidad por los aril- β -D-glucósidos y son llamadas Aril β -glucosidasas. Clase 2: sólo hidrolizan celobiosa (Celobiasas verdaderas). Y Clase 3: Glucosidasas de amplia especificidad, son las más comunes y pueden actuar en muchos tipos de sustratos realizando escisión de varios enlaces glucosídicos β 1,4; β 1,6; β 1,2; α 1,3; α 1,4; y α 1,6 (Nakkharat & Haltrich, 2006; Krisch *et al.*, 2010, Ochoa, 2018).

La clasificación basada en la identidad de secuencia de nucleótidos refleja características estructurales similares, hidrofobicidad y mecanismos de reacción. Las β -glucosidasas se encuentran principalmente en la familia 1 y 3 de las 88 familias de glicosil hidrolasas. Este sistema de clasificación a menudo agrupa enzimas con especificidad de sustrato diferentes en una misma familia. Un ejemplo de ello es la familia 1, en la cual se puede encontrar β -glucosidasas de arqueobacterias, plantas y mamíferos y usualmente exhiben también actividad de β -galactosidasa. La familia 3 incluye β -glucosidasas de bacterias, hongos y plantas (Nakkharat & Haltrich, 2006; Krisch *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Las grandes cantidades de residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña, generados en la industria agrícola en México, y la necesidad de fuentes naturales para la obtención de astaxantina, han despertado el interés científico en la búsqueda de una adecuada solución. Debido a esto, la biotecnología ha permitido la implementación de microorganismos tal como la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* que aprovecha la composición de residuos lignocelulósicos como sustrato para el crecimiento y la obtención de productos con gran valor industrial como la astaxantina. Sin embargo, es importante evaluar el efecto de cada uno de los azúcares que componen este sustrato en la obtención del carotenoide, con el fin de mejorar la asimilación del carbohidrato que represente una de las mayores proporciones en el SBC e induzca la producción de astaxantina. Como ejemplo de ello, la xilosa uno de los componentes mayoritarios de estos residuos, no es fácilmente asimilada como sustrato por esta levadura.

En este contexto, debido al potencial de *X. dendrorhous*, se desea obtener una mutante con mejor asimilación de xilosa que permita potenciar el aprovechamiento integral de los sacarificados de bagazo de caña como fuente de carbono para la producción de astaxantina. Esto podría incrementar los rendimientos de producción, dirigiendo el proceso hacia un desarrollo sostenible en la industria de los pigmentos.

3. HIPÓTESIS

La mutante obtenida de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 tendrá mejor capacidad de asimilar la xilosa de los sacarificados de bagazo de caña que su cepa parental para la producción de astaxantina.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Mejorar la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* a partir de sacarificados de bagazo de caña.

4.2 Específicos

Evaluar el crecimiento y producción de astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 en sustratos puros que hagan parte de la composición de SBC.

Obtener una mutante de *X. dendrorhous* R4 con mejor asimilación de xilosa como fuente de carbono para la producción de astaxantina.

Evaluar la producción de astaxantina a partir de SBC por la mutante de *X. dendrorhous* seleccionada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental del proyecto se dividió en tres etapas tal como se presenta en la figura 8.

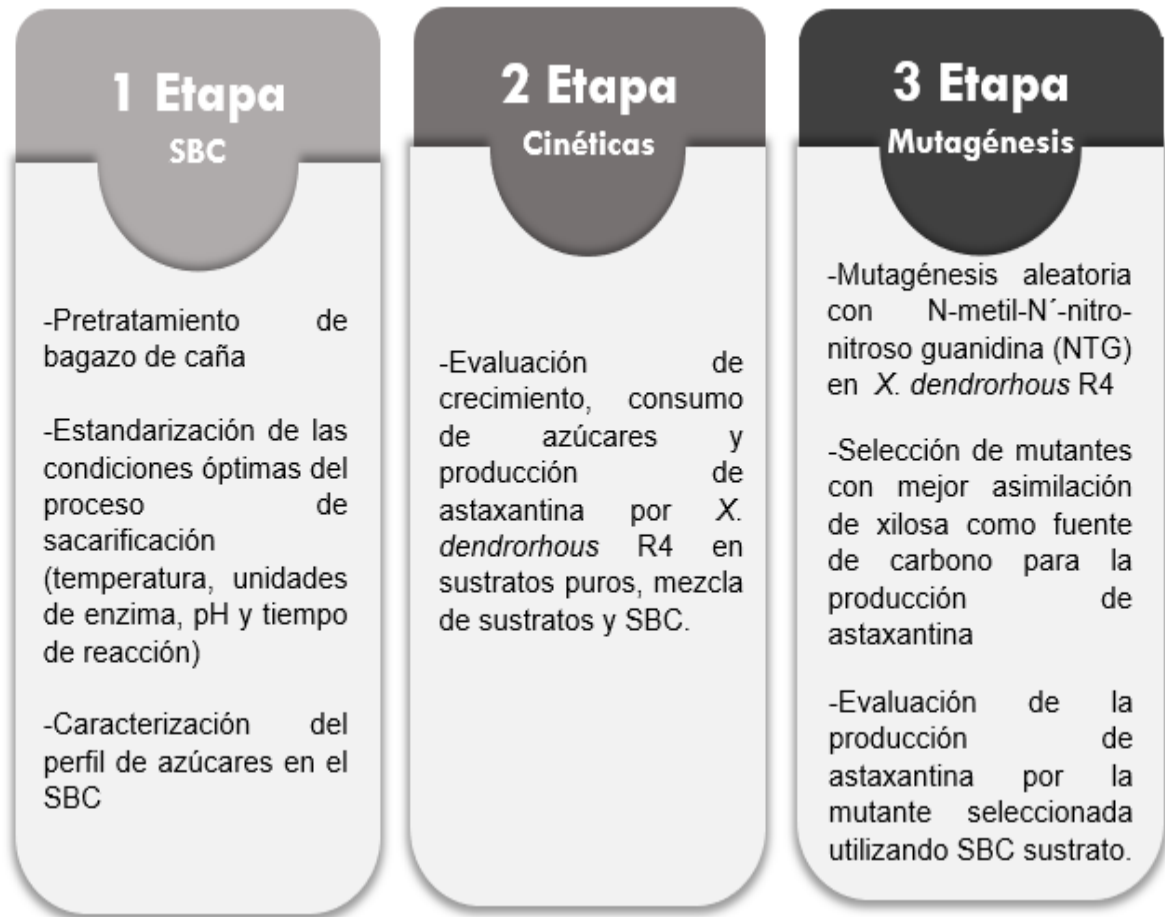


Figura 8. Estrategia experimental del proyecto

5.1 Etapa 1: Estandarización del proceso de sacarificación de bagazo de caña

5.1.1 Pretratamiento del bagazo de caña

Al bagazo de caña (BC) se le realizó un pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) al 2 %, a una relación de 100 g de BC seco y molido por cada litro de solución de NaOH. El tratamiento se llevó a cabo en un recipiente de peltre dentro del autoclave por 15 min, 121 °C y 15 psi. El bagazo pretratado se lavó con agua potable hasta alcanzar un pH cercano al neutro, se secó a temperatura ambiente y se molió mecánicamente para disminuir el tamaño de partícula y favorecer su sacarificación.

5.1.2 Determinación del efecto de la temperatura y unidades de enzima en el proceso de sacarificación de BC

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de sacarificación del bagazo de caña pretratado, se llevó a cabo un diseño central compuesto no factorial analizado por superficie de respuesta empleando el software STATISTICA 7 (Tabla 3). Se empleó Celluclast® (Novozymes) con una actividad de 700 EGU/g correspondiente a unidades de endoglucanasa por gramo de enzima, definida por Novozymes como la cantidad de enzima, que en condiciones estándar (40 °C, pH 4.8, 20 min) degrada la carboximetilcelulosa (CMC) a glucosa con un poder reductor de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Se evaluaron tres concentraciones de la enzima comercial 50, 100, y 150 EGU/g (Unidades de endoglucanasa por gramo de sustrato) y tres temperaturas de reacción: 50, 55 y 60 °C. Los valores de temperatura evaluados corresponden al intervalo óptimo de actividad de la enzima. La concentración de bagazo de caña pretratado se mantuvo fija en 2%, en un volumen final de 30 mL de regulador citratos 25 mM pH 4.8 y 150 rpm. El tiempo de reacción fue de 12 h. Al finalizar el proceso, se tomó una muestra que fue centrifugada y filtrada para su posterior análisis de azúcares mediante HPLC. La variable de respuesta fue la suma de hexosas y pentosas que pueden ser asimiladas por la levadura.

Tabla 3. Diseño central compuesto no factorial para el proceso de sacarificación

Experimento	Código	EGU/g	T (°C)
1	E1-50:50	50	50
2	E2-50:60	50	60
3	E3-150:50	150	50
4	E4-150:60	150	60
5 (c)	E5-100:55	100	55
6	E6-29:55	29.28	55
7	E7-170:55	170.71	55
8	E8-100-47	100	47.9
9	E9-100:62	100	62
10 (c)	E10-100:55	100	55

*Los puntos centrales son representados por (c)

5.1.3 Optimización del proceso de sacarificación de bagazo de caña

Seleccionadas las condiciones óptimas de temperatura y unidades de enzima para la sacarificación, se evaluaron concentraciones más altas de unidades de enzima (200, 400, 600, 800, 1000, 2000 y 3000, EGU), con el fin de determinar si existía un aumento en la concentración de azúcares, manteniendo fija la temperatura en el valor óptimo obtenido por la superficie de respuesta. Las condiciones de sustrato, pH y tiempo se mantuvieron constantes en los valores señalados anteriormente.

Una vez obtenida la temperatura y unidades de enzima que produjeron la mayor concentración de azúcares, se procedió a estandarizar el tiempo de reacción evaluando la producción de azúcares en el proceso de sacarificación a los tiempos 6, 9, 12, 18, 24 y 30 h. Para la influencia del pH en el proceso, se evaluaron los valores de 4, 4.4, 4.8, 5.2, 5.5, 6 con regulador citratos 25 mM y 6.5 con regulador citratos-fosfatos 25 mM. Al finalizar el proceso, se tomó una muestra para su posterior análisis de concentración de azúcares mediante HPLC.

5.2 Etapa 2: Cinéticas de *X. dendrorhous* R4 en sustratos puros, mezcla de sustratos y SBC.

5.2.1 Microorganismo

Xantophyllomyces dendrorhous R4 (Barbachano *et al.*, 2014) se usó en el presente trabajo. El mantenimiento de la cepa se hizo mediante siembras mensuales por duplicado en medio sólido YM (3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta, 5 g/L de bactopectona, 10 g/L 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.

5.2.2 Condiciones de cultivo

Xantophyllomyces dendrorhous R4 se hizo crecer en medio YP con la siguiente composición en (g/L): bactopectona 20; extracto de levadura 10; glucosa (D), celobiosa (C) o xilosa (X) 10, como fuente de carbono. Cuando se usó la mezcla de los tres sustratos fue en relación 1:1:1 (15 g/L), en sacarificados de bagazo de caña la concentración de azúcares reductores totales fue de 6.6 g/L.

Los cultivos se realizaron en biorreactores con un volumen de operación de 400 mL. El 10 % (v/v) correspondió al inóculo previamente cultivado en medio YPD por 48 h y posteriormente lavado para retirar el sustrato residual. Los cultivos tuvieron una duración de 96 h cuando se usó azúcares puros como sustrato y 108 h para cultivos con mezcla de sustratos y SBC. Las condiciones de crecimiento fueron 20 °C, 0.5 vvm, y 500 rpm con un incremento a 600 rpm después de las 36 h. Se tomaron muestras cada 12 h para el seguimiento de biomasa, sustrato y producto. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Las cinéticas que emplearon SBC como sustrato se suplementaron con medio mínimo Breus con la composición en (g/L): extracto de levadura 0.5, sulfato de amonio 1,

sulfato de magnesio 0.05 y se cultivaron bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

5.2.3 Determinación de crecimiento

La cuantificación del crecimiento en cultivos de *X. dendrorhous* se determinó de forma indirecta por medición de densidad óptica. Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó 5 min a 5000 rpm. El botón celular se lavó dos veces con agua destilada, se re suspendió en el volumen original. Se hicieron diluciones 1:10 en tubos de ensayo. Posteriormente cada dilución se leyó a una absorbancia de 660 nm.

5.2.4 Cuantificación de azúcares mediante HPLC

La identificación de azúcares se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sobrenadante obtenido de la centrifugación de las muestras en la determinación de biomasa se filtró a través de una membrana acrodisco (ϕ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 μ m, PALL). Los análisis se realizaron inyectando 20 μ L de sobrenadante filtrado. 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.

5.2.5 Cuantificación de carotenoides totales

Los carotenoides totales se determinaron tomando 3 mL de muestra, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se lavó con agua destilada dos veces. El paquete celular ya lavado se re suspendió en el volumen original y se volvió a centrifugar desechando el sobrenadante. Se agregaron 2 g de perlas de vidrio (ϕ 500 μ m) y se adicionaron 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55 °C. Se agitó en el vórtex 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 (mezcla de isómeros) como solvente de extracción. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 2 min, posteriormente se centrifugaron 10 min a 5000 rpm, se recuperó la fase orgánica y se midió la absorbancia a 474 nm (Sedmak, 1990) usando una celda de cuarzo. Los cálculos para determinar el contenido de carotenoides totales por gramo de biomasa seca se realizaron empleando el coeficiente de extinción de la astaxantina $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y la ecuación 1 (An *et al.*, 1989).

$$CT \text{ } \mu\text{g/g biomasa} = \frac{A_{474} * \text{mL de hexano} * 100}{21 * \text{Biomasa seca} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} \quad (\text{Ec 1})$$

5.2.6 Cuantificación de astaxantina por HPLC

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 5.2.5). Se secaron 400 μL de la extracción de carotenoides totales con nitrógeno gaseoso y se re suspendió en 100 μL de metanol. El método utilizado 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 una longitud de onda de 480 nm. La fase móvil utilizada fue metanol:metilterbutiléter:agua (81:15:4) a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min a temperatura ambiente. Los resultados se determinaron con estándares previamente analizados en HPLC a una longitud de onda de 480 nm.

5.2.7 Determinación de actividad β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

Se establecieron protocolos para obtener extractos de β -glucosidasa extracelular, intracelular y asociada a la superficie celular.

Se tomó 1 mL de muestras procedentes de cultivos en medio YPC se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante el cual se usó como extracto enzimático extracelular.

La pastilla obtenida de la centrifugación se lavó dos veces con 500 µL de regulador de fosfatos de sodio 25 mM pH 7.2, posteriormente se resuspendió en 1 mL del mismo regulador. Este extracto estuvo compuesto de células completas y fue usado para el análisis de actividad enzimática asociada a la superficie celular.

Para el extracto enzimático intracelular, una vez aplicados los lavados al paquete celular, se resuspendió la pastilla en 500 µL de regulador de fosfato de sodio 25 mM pH 7.2. Se adicionó 0.3 g de arena de vidrio y 150 µL de β-mercaptoetanol 0.1 M, se llevó al vórtex por 15 min y se recuperó el sobrenadante el cual fue usado para la determinación de actividad.

5.2.7.1 Determinación de actividad β-glucosidasa

La actividad β-glucosidasa fue estimada espectrofotométricamente midiendo la liberación de *p*-nitrofenol (pNP) mediante la hidrólisis de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNPG) (Kim & Pack, 1989). Se mezclaron 100 µL de extracto enzimático, más 1 mL de pNPG 1mM disuelto en regulador citratos fosfatos 50 mM pH 5, seguido de incubación a 60 °C durante 15 min y utilizando 1 mL de Na₂CO₃ 1 M para detener la reacción (modificado de Kim & Pack, 1989). Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la concentración de pNP liberado con ayuda de una curva estándar. Una unidad de actividad de β-glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de pNP por minuto en las condiciones estándar de ensayo.

5.2.7.2 Determinación de proteína por Folin-Ciocalteu

Se tomaron 50 µL de muestra a la cual se le adicionó 500 µL de NaOH 1N más 500 µL de agua. Se llevó a baño María por 5 min y posteriormente se enfrió en baño de

agua. A la mezcla se le adicionó 2.5 mL del reactivo C [1 mL de tartrato de Na y K (2%), 1 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1%), por cada 50 mL de Na_2CO_3 (5%)], se dejó reposar 10 min y después se adicionaron 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N). Se agitó vigorosamente dejando reposar 30 min, finalmente se leyó en espectrofotómetro a 750 nm, se usó agua como blanco de la reacción. Se estimó la proteína contra una curva realizada con albúmina de suero de bovino (Lowry et al., 1951).

5.2.7.3 Seguimiento de la actividad β -glucosidasa en cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4

Se evaluó la actividad β -glucosidasa de la levadura en cinéticas de crecimiento en medio mínimo Breus con glucosa y celobiosa como sustratos puros al 1%, en matraces de 250 mL con volumen de trabajo de 50 mL. Las condiciones de cultivo fueron 20 °C y 200 rpm. Así mismo, se evaluó el comportamiento de la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* en un cultivo con medio rico YPC (Bactopectona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, celobiosa 10 g/L) en biorreactores con volumen de operación de 400 mL a 20 °C, 600 rpm y 0.5 vvm con el fin de comparar la actividad enzimática en medio rico. Para todas las cinéticas se realizó seguimiento de sustrato residual, producción de biomasa y producto (astaxantina), proteína y actividad β -glucosidasa. Se tomaron muestras cada 12 h.

5.3 Etapa 3: Mutagénesis

5.3.1 Mutagénesis aleatoria

Se preparó un cultivo de 24 h de *X. dendrorhous* R4 en medio YPD. El cultivo celular en fase exponencial de crecimiento fue cosechado, estandarizado a 2.04×10^7 cel/mL y tratado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NTG. La suspensión celular con el mutágeno fue incubada en oscuridad a 20 °C, 150 rpm por 15 min en tubos Eppendorf con volumen de trabajo de 1 mL. Las células fueron lavadas una vez con tiosulfato de sodio al 2 % para inactivar la NTG, seguido de dos lavados con agua destilada estéril. El botón celular

fue re suspendido en medio mínimo con xilosa al 1 % (MMX) y se realizaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3} . Se plaquearon 100 μ L de cada una de las diluciones en MMX. Las mutantes fueron seleccionadas por examinación visual de colonias aisladas con mayor crecimiento y coloración después de 8 días de incubación a 20 °C.

5.3.2 Cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* cepa nativa; XR4 y doble mutante en glucosa; celobiosa; xilosa y SBC.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en medio mínimo Breus evaluando las distintas fuentes de carbono (xilosa, glucosa, celobiosa) al 1 %. Los cultivos se realizaron en matraces de 25 mL con volumen de trabajo de 10 mL. El 10 % (v/v) correspondió al inóculo de *X. dendrorhous* previamente cultivado en medio YPD por 48 h para la cepa nativa y mutante R4, y en medio YPX para la doble mutante R4-X18. El inóculo fue lavado para eliminar el sustrato residual y se estandarizó a 1 unidad de densidad óptica a 660nm. Los cultivos tuvieron una duración de 96 h, a 20 °C, 200 rpm. Se hizo seguimiento de biomasa y sustrato residual cada 24 h y de producto al final del cultivo. Se evaluaron dos sacarificados de bagazo de caña obtenidos con diferentes condiciones en el proceso de sacarificación con el fin de determinar el mejor para la producción de biomasa y carotenoides. El sacarificado 1 (SBC2.5) posee menor cantidad de azúcares totales (2.5 g/L) encontrándose celobiosa dentro de su composición. El sacarificado 2 (SBC10) posee 2.4 veces más de azúcares totales (10 g/L), sin embargo, no posee celobiosa en su composición.

5.3.3 Comparación de cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 y doble mutante en SBC

La doble mutante obtenida con mejor asimilación de xilosa y su cepa parental R4 de *X. dendrorhous* fueron cultivadas en SBC10, con el fin de comparar su crecimiento y producción de astaxantina. Los sacarificados obtenidos fueron centrifugados a 9000 rpm / 20 min 4 veces con el fin de retirar sólidos y restos de bagazo, posteriormente

fueron usados como sustrato en las cinéticas de crecimiento. Los SBC se suplementaron con medio mínimo enriquecido con extracto de levadura. La composición del medio por litro consistió en: extracto de levadura 1 g, sulfato de amonio 1 g y sulfato de magnesio heptahidratado 0.05 g. El inóculo correspondió al 10 % de un cultivo de 48 h previamente lavado y resuspendido en agua al volumen original. Los cultivos se llevaron a cabo en biorreactores con volumen de trabajo de 400 mL, 0.5 vvm, 20 °C y 600 rpm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa 1: Estandarización del proceso de sacarificación de bagazo de caña

Con el fin de determinar las condiciones óptimas del proceso de sacarificación enzimática de bagazo de caña que permita la mayor liberación de azúcares reductores, se evaluaron diferentes temperaturas y unidades de enzima (Celluclast®). Se empleó para los experimentos correspondientes bagazo de caña pretratado y seco. Así mismo se utilizó un diseño estadístico central compuesto no factorial, obtenido por el programa STATISTICA 7 (Tabla 3). Las temperaturas evaluadas fueron 50, 55 y 60 °C, y las unidades de enzima (Celluclast®) 50, 100 y 150 EGU/g. Los puntos máximos y mínimos fueron 170.7 EGU/g, 62 °C y 29.28 EGU/g, 47.9 °C para unidades de enzima y temperatura respectivamente.

En la figura 9 a,b, se observa la gráfica de superficie y de contorno como resultado del análisis del diseño central compuesto no factorial. Se utilizó el modelo “términos lineales y cuadráticos de los efectos principales”, el cual mostró efectos significativos ($p < 0.05$) para la variable “unidades de enzima” lineal y cuadrática, y para la variable “temperatura” cuadrática. El coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.88.

Se pudo determinar que la temperatura óptima para obtener la máxima cantidad de azúcares bajo las condiciones evaluadas se encuentra dentro de intervalo de 50 a 58 °C y las unidades de enzima entre 70 y 160 EGU/g. El intervalo de temperatura óptima según la superficie de respuesta concuerda con el reportado por la ficha técnica de Celluclast® (Novozymes). Por tal motivo, se decidió seleccionar 55 °C como punto óptimo debido a que fue el punto evaluado más central dentro de la región óptima, lo que permite tener mayor estabilidad (la concentración de azúcares se mantiene) en los experimentos posteriores, si se presenta una variación de ± 3 °C.

Con respecto a las unidades de enzima, se había seleccionado el intervalo entre 50 y 150 EGU/g por ser los más reportados en literatura (Koo *et al.*, 2011; Keris *et al.*, 2017,

Kaushal *et al.*, 2019), sin embargo, la mayor producción de azúcares fue de sólo 4.8 g/L \pm 0.2. Por tal motivo, en el proceso de optimización, se evaluaron unidades más altas de enzima manteniendo la temperatura constante (55 °C) con el fin de determinar si aumentaba la concentración de azúcares.

En la figura 9c, se puede observar la composición y cantidad total de azúcares de los SBC obtenidos en los experimentos. El azúcar mayoritario en todos los experimentos fue la glucosa, seguido de la xilosa, celobiosa y arabinosa. Con respecto a la concentración total de azúcares, se observa un claro efecto negativo en la liberación de éstos a temperaturas superiores a 55 °C e inferiores a 50 °C. Así mismo, se observa la influencia de las unidades de enzima en el proceso, siendo el experimento E6-29:55 uno de los que menor liberación de azúcares tuvo debido al uso de la menor concentración de enzima. La mayor liberación de azúcares totales (4.8 g/L \pm 0.19) se obtuvo en los experimentos E5-100:55 y E10-100:55 que corresponden a los puntos centrales. En estos experimentos el 42 % del SBC estuvo compuesto por glucosa, 31% xilosa, 17% arabinosa y 10% celobiosa, esta combinación de pentosas y hexosas puede ser adecuada para el crecimiento de la levadura, no obstante, fue necesario aumentar la concentración de azúcares obtenidos con el fin de hidrolizar la mayor cantidad posible del sustrato y mejorar así los rendimientos de sacarificación.

Las condiciones de sacarificación estandarizadas en el diseño de experimentos del presente trabajo permitieron obtener un 30.9 % de conversión de la fracción de holocelulosa (celulosa + hemicelulosa) a azúcares totales fermentables. Este porcentaje de conversión fue 1.1 y 1.7 veces superior al reportado en procesos de sacarificación de paja de sorgo (Mehmood *et al.*, 2009), y caña de azúcar respectivamente (Hernández *et al.*, 2009). En el proceso de sacarificación de residuos de troncos utilizados en el cultivo de setas (Lee, *et al.*, 2008) y de *Liriodendron tulipifera* (Koo, *et al.*, 2011) se obtuvieron porcentajes de conversión superiores al del presente trabajo, sin embargo, los autores emplearon tiempos de reacción más largos de 48 y 72 h respectivamente en comparación con las 12 h usadas en el presente trabajo. Además de esto, los autores trabajaron con dos enzimas comerciales, lo cual puede representar aumentos en los costos de producción. La tabla 4, presenta la recopilación

de diversos estudios en la obtención de sacarificados con diferentes condiciones del proceso de sacarificación y el uso de diferentes sustratos.

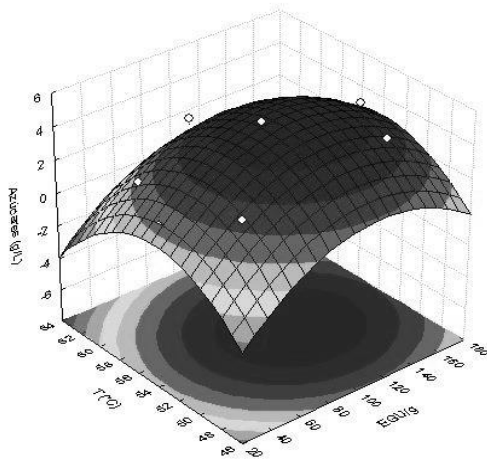
Tabla 4. Conversión enzimática de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables mediante procesos de sacarificación a diferentes condiciones

% de Sustrato	Enzima	T (°C)	Tiempo (h)	Unidades de enzima/g sustrato	% conversión enzimática	Fuente
1 % <i>Liriodendron tulipifera</i>	Celluclast 1.5L [®] Novozym 188 [®]	50	72 h	45 30	65.6 ^a	Koo, <i>et al.</i> , (2011)
6.6 % Caña de azúcar	Celluclast 1.5L [®]	55	4	280 ^a	18 ^a	Hernández <i>et al.</i> , (2009)
1% Residuos de troncos usados en el cultivo de setas	Celluclast 1.5 L [®] Novozym 188 [®]	50	48	350 376	32 ^a	Lee, <i>et al.</i> , (2008)
5 % Paja de sorgo	Celluclast 1.5 L [®] Novozym 188 [®]	50	48	117 ^a 38 ^a	28 ^a (glucosa)	Mehmood <i>et al.</i> , (2009)
2 % Bagazo de caña	Celluclast 1.5 L [®]	55	12	100	30.9%*	Presente trabajo

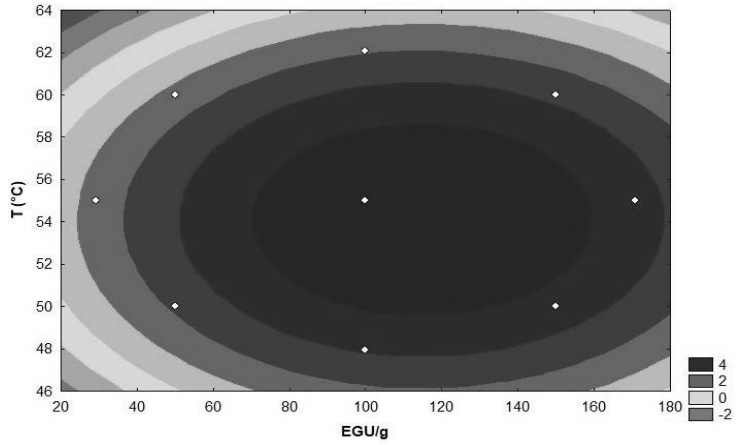
*% de conversión enzimática de holocelulosa inicial (78 % de celulosa + hemicelulosa de bagazo de caña con pretratamiento alcalino) en azúcares totales finales (4.83 g/L).

^a Valores calculados con base a información reportada en la referencia

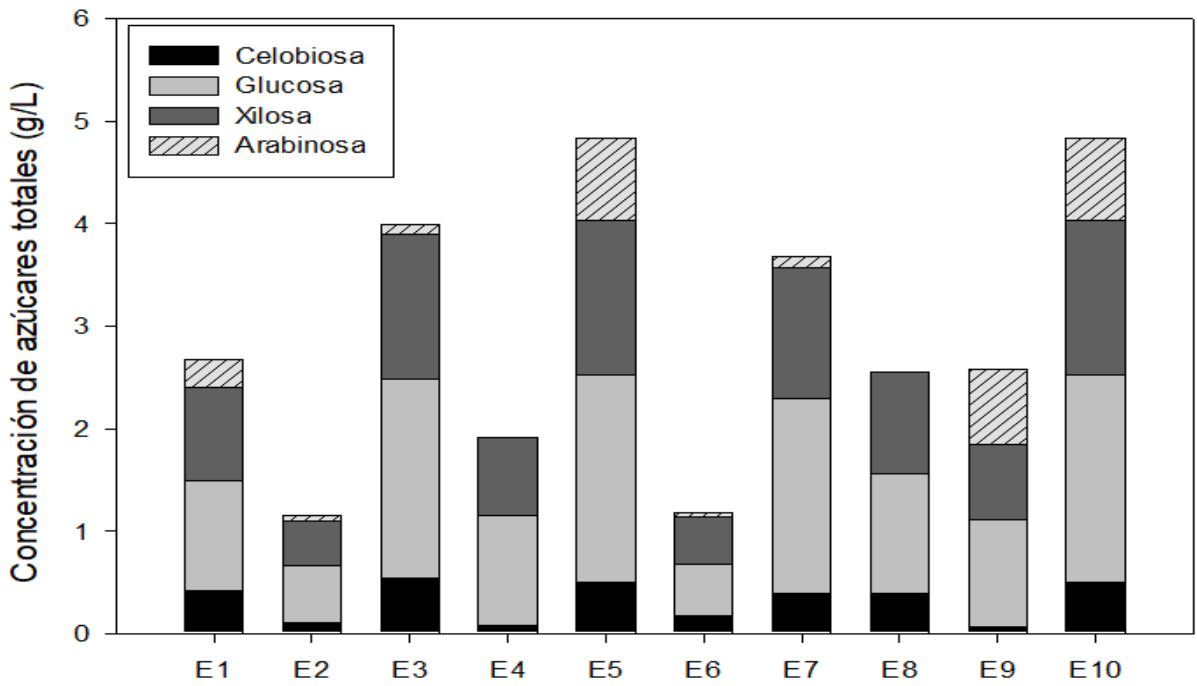
a



b



c



EGU/g:	50	50	150	150	100	29.3	170.7	100	100	100
T (°C):	50	60	50	60	55	55	55	47.9	62	55

Figura 9. (a). Superficie de respuesta y (b) superficie de contorno del análisis del diseño estadístico. Puntos blancos corresponden a los experimentos, región negro oscuro corresponde a intervalo óptimo. (c) Composición de azúcares en SBC. Los experimentos 5 y 10 correspondientes a los puntos centrales.

6.1.1 Optimización del proceso de sacarificación de bagazo de caña

6.1.1.1 Efecto de las unidades de enzima en el proceso de sacarificación de BC

Con el fin de determinar el efecto de la enzima a concentraciones mayores, se evaluó un aumento de las unidades de enzima desde 200 hasta 5000 EGU/g y se mantuvo el tiempo de reacción (12 h), pH (4.8 regulador de citratos 25 mM), temperatura (55 °C) y sustrato (2%). En la figura 10 b, se representa la composición de cada uno de los SBC obtenidos de los experimentos. La mayor proporción de estos azúcares está compuesta por glucosa y xilosa, en menor proporción se encuentra la arabinosa y la celobiosa. En el experimento con 2000 EGU/g se obtuvo la mayor producción de azúcares totales con 10.6 g/L \pm 0.4 (Figura 10 a). La fracción de glucosa aumentó a 62 %, la fracción de xilosa disminuyó a 28% al igual que la arabinosa a 10 %, así mismo, la concentración de azúcares totales aumentó 2.6 veces con respecto los experimentos iniciales E5-100:55 y E10-100:55 con 100 EGU/g. Sin embargo, un aumento de unidades de enzima a 3000 EGU/g disminuyó la liberación de azúcares totales en un 12.5 %, y se mantuvo en valores constantes cuando la concentración de enzima siguió aumentando hasta 5000 EGU/g. Por tal motivo, se seleccionó 2000 EGU/g sustrato como la concentración óptima de enzima. En estas condiciones, (2000 EGU/ g de bagazo de caña, 2 % sustrato (20 g/L de BC) a 55 °C, pH 4.8 y 12 horas de reacción) el presente trabajo obtuvo así un 53 % de conversión total (68 % conversión de holocelulosa). En contraste con estos resultados, el trabajo reportado por Rodrigues *et al.*, (2015), utilizó Celluclast® a una concentración de 10 PFU/g celulosa (158 EGU/g paja de trigo) y un 12 % de paja de trigo (120 g/L). Después de 96 horas de reacción a 50 °C y pH 4.8, obtuvieron 22 g/L de azúcares totales equivalente a un 18.3 % de conversión global, valor 1.68 veces inferior al obtenido en el presente estudio. Si bien diversas investigaciones con cóctel de enzimas (celulasas) comerciales reportan rendimientos superiores al 90 % (Rodrigues *et al.*, 2015), el presente trabajo, al hacer uso de sólo una actividad enzimática comercial disminuye costos y se obtiene un rendimiento superior al 50 % en menos tiempo (12 h).

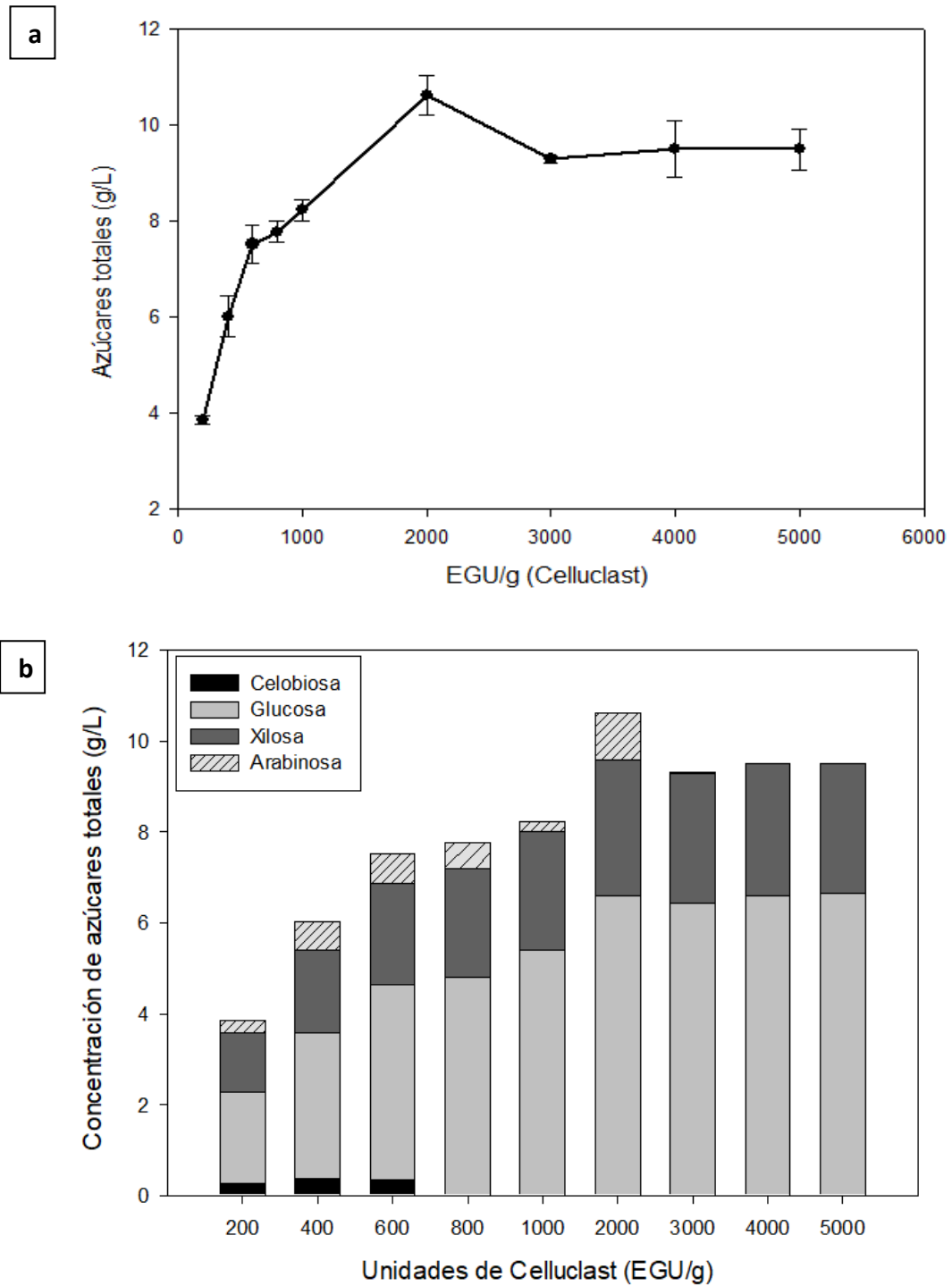


Figura 10. (a). Azúcares totales obtenidos y (b) perfil de azúcares en sacarificados con diferentes unidades de enzima (Celluclast®). Experimentos realizados a 55 °C, pH 4.8 regulador citratos 25 mM y 12 horas de reacción.

6.1.1.2 Efecto del tiempo de reacción en el proceso de sacarificación de BC

Una vez estandarizadas las unidades de enzima a utilizar, se procedió a evaluar distintos tiempos de reacción de 6 a 30 h (Figura 11). A las 6 y 9 h hubo una producción similar cercana a 9 g/L \pm 0.12, sin embargo, a las 12 h de reacción aumentó a una concentración de azúcares de 10.7 g/L \pm 0.47 similar a la obtenida en experimentos anteriores, y se mantuvo constante hasta las 24 h de reacción. A este tiempo (12 h), se obtuvo un 64.8 % de glucosa, 30.2 % de xilosa, y 4.8 % de arabinosa. A las 30 h, se observó un aumento de azúcares totales hasta 11.8 g/L \pm 1, sin embargo, no es un aumento representativo que justifique 18 horas extra de reacción. Lo anterior, equivale a un aumento del consumo energético y por tanto un aumento en los costos de producción. Por tal motivo, se seleccionó 12 h como tiempo adecuado para el proceso de sacarificación.

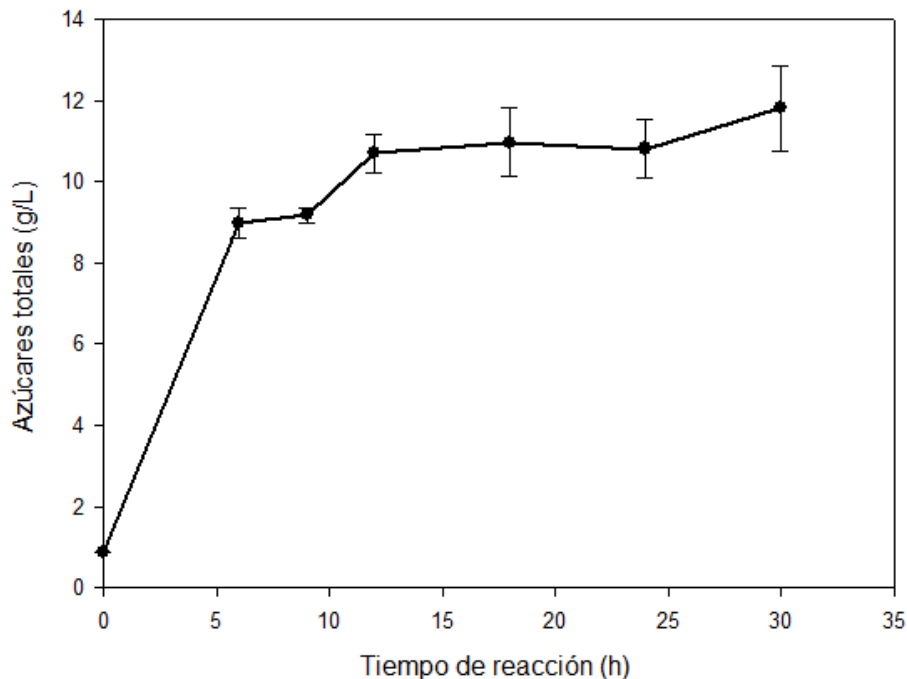


Figura 11. Estandarización del tiempo de sacarificación, con 2000 EGU/g sustrato, pH 4.8, y 55 °C.

6.1.1.3 Efecto del pH en el proceso de sacarificación de BC

Finalmente, se evaluaron diferentes pH para determinar el óptimo del proceso de sacarificación, analizando los valores 4, 4.4, 4.8, 5.2, 5.5, 6 con regulador citratos 25 mM y 6.5 con regulador citratos-fosfatos 25 mM. La figura 12, presenta la mayor producción de azúcares (10.1 g/L \pm 0.08) a pH 4.8, correspondiente al que se trabajó en las estandarizaciones anteriores. Así mismo, este pH es el reportado como óptimo en la ficha técnica de Celluclast[®] (Novozymes). El porcentaje de azúcares finales en las condiciones óptimas del proceso (2000 EGU/g, 55 °C, pH 4.8, 12 h) fue de 67 % glucosa, 30 % xilosa y 3 % arabinosa. Teniendo en cuenta que la fracción de holocelulosa en el BC pretratado con hidróxido de sodio es de 78.35 %, la conversión de esta fracción en azúcares fermentables (glucosa, xilosa y arabinosa) fue de 64.8 % bajo las condiciones estandarizadas. Este porcentaje es superior al obtenido por Bussamra, *et al.*, (2015), quienes obtuvieron un 49.1 % de conversión de la celulosa de bagazo de caña, usando 10 mg de enzima (64.8 EGU/g de Celluclast[®] aproximadamente) por gramo de bagazo de caña seco, a 55 °C, pH 4.8 (regulador de citrato 50 mM) y 48 h de reacción, que es 36 h más que el presente trabajo.

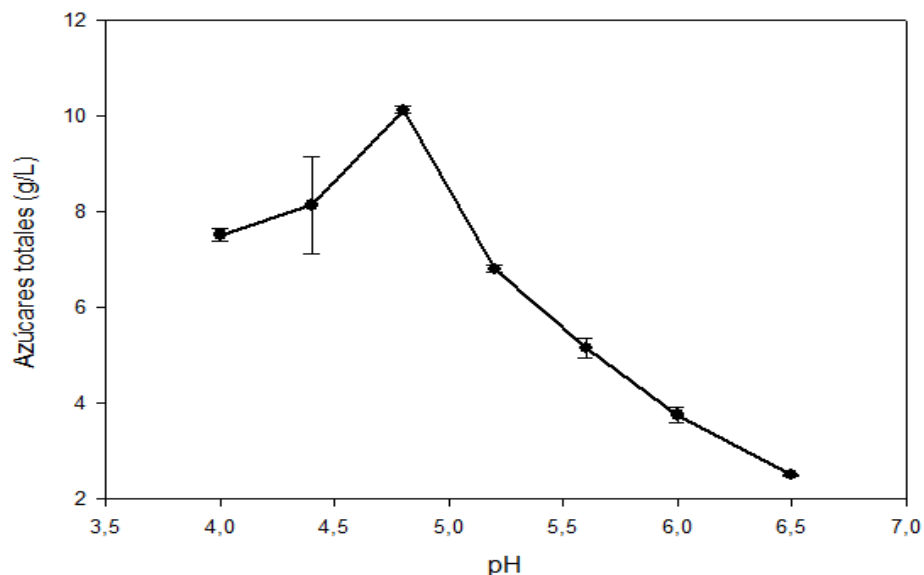


Figura 12. Estandarización del pH en el proceso de sacarificación con 2000 EGU/g sustrato 55 °C, 12 h de reacción.

6.2 Etapa 2: Cinéticas de *X. dendrorhous* R4 en sustratos puros, mezcla de sustratos y SBC.

Con el fin de determinar el efecto de la fuente de carbono en la producción de astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 fue cultivada en biorreactores a escala de 400 mL, en medio YP. Se seleccionaron como fuente de carbono los azúcares, glucosa, xilosa y celobiosa al 1 %, por ser parte de la composición principal de SBC. Estos fueron evaluados de forma individual y en una mezcla cuya fracción de cada azúcar corresponde a la relación 1:1:1 (15 g/L). Así mismo, se evaluó una cinética con SBC como sustrato suplementado con medio mínimo Breus. Se realizó seguimiento de producción de biomasa, astaxantina, y consumo de sustrato cada 12 h.

6.2.1 Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento celular de *X. dendrorhous* R4

Se ha reportado que *X. dendrorhous* tiene la capacidad de crecer en diversas fuentes de carbono incluyendo glucosa, celobiosa y xilosa, sin embargo, la eficiencia de asimilación del último azúcar es contradictoria entre diferentes autores (Golubev, 1995; Vázquez, 2001; Libkind, *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010). En el presente trabajo se confirmó la capacidad de *X. dendrorhous* R4 para crecer en estos azúcares. La mayor densidad óptica (11.62 ± 0.06) a las 96 h, se obtuvo con celobiosa como fuente de carbono, seguido por 11.56 ± 0.14 en la mezcla de azúcares GCX, 9.12 ± 0.8 en xilosa, y 2.48 ± 0.21 en glucosa (Figura 13). Los cultivos con glucosa y celobiosa presentaron una fase de adaptación de 12 horas, sin embargo, en cultivos con xilosa y mezcla de azúcares la fase de crecimiento exponencial inició a partir de las 24 h (Figura 13). La velocidad específica de crecimiento (μ) fue menor para cultivos con xilosa ($0.020 \text{ h}^{-1} \pm 0.001$) seguido por mezcla de sustratos, celobiosa y glucosa con valores de $0.03 \text{ h}^{-1} \pm 0.005$; $0.04 \text{ h}^{-1} \pm 0.002$ y $0.053 \text{ h}^{-1} \pm 0.007$ respectivamente. Así mismo, el tiempo de duplicación fue menor en glucosa con 13 h, seguido de celobiosa (15.57 h), mezcla de azúcares GCX (20.5 h), y xilosa (34 h) (Tabla 5). La glucosa presentó el tiempo de

duplicación más corto debido a que su máxima producción de biomasa se obtuvo de forma más temprana (36 h) en comparación con los otros sustratos, así mismo la fase estacionaria inició a las 36 h. El aumento en la producción de biomasa en cultivos con mezcla de azúcares GCX en comparación con cultivos que contenían glucosa como sustrato puro, indica que la mezcla de sustratos favorece el crecimiento de *X. dendrorhous* R4. Es importante destacar que, aunque la glucosa es el azúcar con mejor asimilación en la mayoría de los microorganismos, *X. dendrorhous* R4 presenta un menor crecimiento en esta hexosa en comparación con otros sustratos puros. Este comportamiento también fue observado por Park *et al.*, (2008) quien obtuvo una disminución de biomasa del 24 % en cultivos de *X. dendrorhous* con glucosa como única fuente de carbono, en comparación con cultivos con mezcla (1:1) de glucosa, fructosa, y cultivos con sacarosa. Esto último afirma, que la combinación de azúcares, o el uso de disacáridos como la celobiosa y la sacarosa son favorables para la producción de biomasa en *X. dendrorhous*. Así mismo, Cruz & Parajó, (1998), establecieron que la celobiosa mejora la producción de biomasa y carotenoides en *X. dendrorhous* con respecto a otros azúcares como la glucosa. En cinéticas realizadas con hidrolizados de madera de *Eucalyptus gloubulus* compuestos por glucosa y celobiosa (11 g/L glucosa; 4 g/L celobiosa) se obtuvo un aumento de 53.5 % (aproximadamente) de biomasa, con respecto a hidrolizados que solo contenían glucosa. Por otro lado, Hartih, (2019), reporta un comportamiento similar de *X. dendrorhous* en diferentes fuentes de carbono con una concentración inicial de 30 g/L. Al igual que el presente trabajo, Hartih, (2019) obtuvo la mayor producción de biomasa con celobiosa (13.3 g/L a 120 h) como fuente de carbono, seguido de xilosa (12.8 g/L a 112 h) y por último glucosa (9.13 g/L a 117 h). Esto confirma que la xilosa también es una fuente de carbono asimilable por la levadura, sin embargo, su crecimiento en esta pentosa es lento.

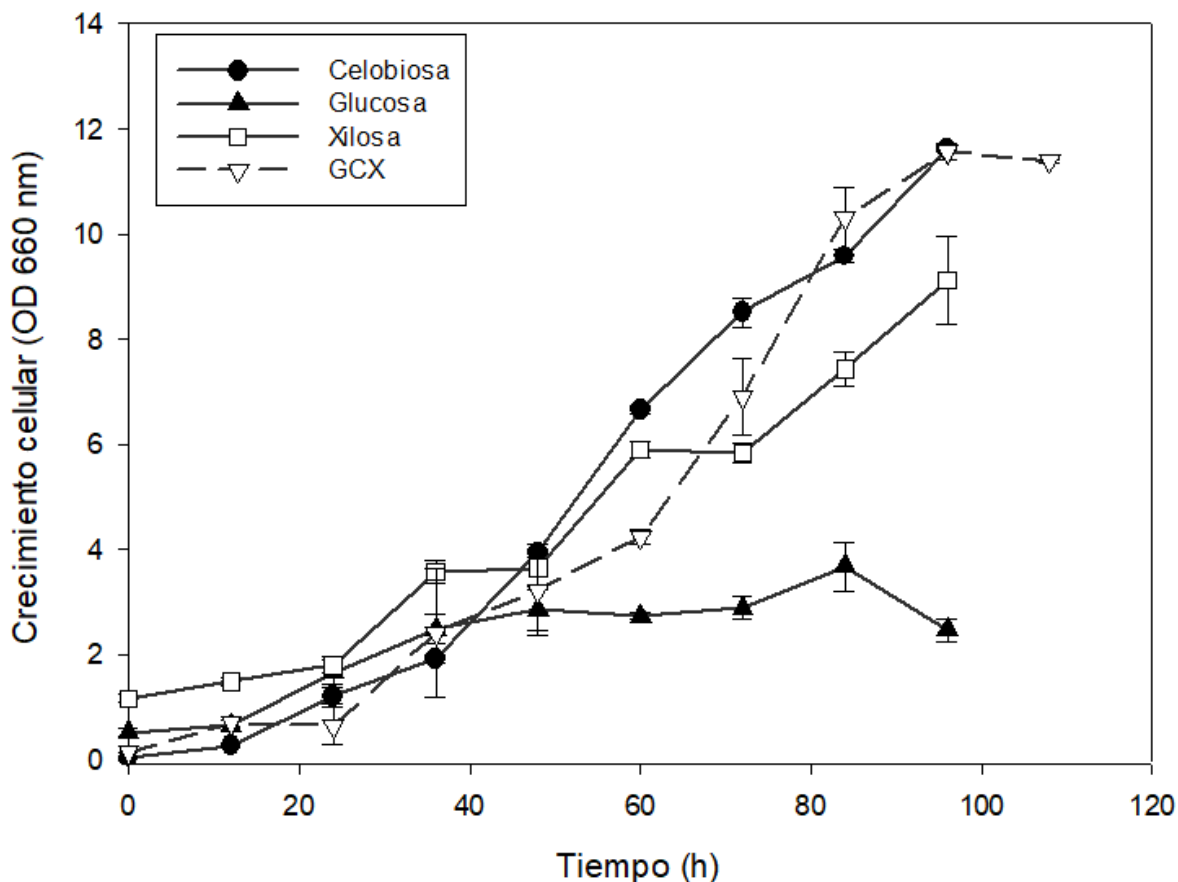


Figura 13. Crecimiento celular de *X. dendrorhous* R4 en diferentes fuentes de carbono. Cinéticas en reactor, 20 °C, 600 rpm, 0.5 vvm. (●) celobiosa 10 g/L; (▲) glucosa 10 g/L; (□) xilosa 10 g/L; (▽) mezcla de sustratos (GCX) 15 g/L.

6.2.2 Consumo de sustratos por *X. dendrorhous* R4

Xanthophyllomyces dendrorhous R4 presentó la capacidad de consumir las tres fuentes de carbono de manera independiente y en mezcla. La glucosa fue el azúcar que se consumió más rápido llegando a concentraciones cercanas a cero a las 48 h, seguido por la xilosa a las 60 h y la celobiosa a las 96 h (Figura 14 a,b,c). En las cinéticas con mezcla de sustratos, la glucosa fue consumida en las primeras 36 h. Una vez agotada esta fuente de carbono, se observó una coasimilación de celobiosa y xilosa, siendo más rápido el consumo de xilosa la cual se agotó a las 72 h, en

comparación con la celobiosa cuyo consumo total fue a las 108 h (Figura 14d). Este hecho representa una ventaja del bioproceso, ya que Young *et al.*, (2010), reportan que la co-fermentación de hexosas y pentosas es uno de los principales obstáculos en la conversión económica de biomasa lignocelulósica a bioproductos como los biocombustibles o como ocurre en este trabajo, a carotenoides.

Se ha reportado que la glucosa es la fuente de carbono más común y favorable para el crecimiento de diversos organismos incluyendo algunas cepas de *X. dendrorhous* o *P. rhodozyma*. El catabolismo aerobio de este azúcar procede a través de tres fases: conversión de glucosa a piruvato por la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) que convierte el piruvato en CO₂ generando NADH durante el proceso, y la cadena transportadora de electrones para la producción de ATP (Liu & Wu, 2008). Con base en esto, es posible que la baja producción de biomasa cuando *X. dendrorhous* R4 está consumiendo glucosa sea debido a una variación en la regulación de metabolismo, o el desvío del flujo de carbono hacía la producción de otros metabolitos en lugar de dirigirse a crecimiento celular.

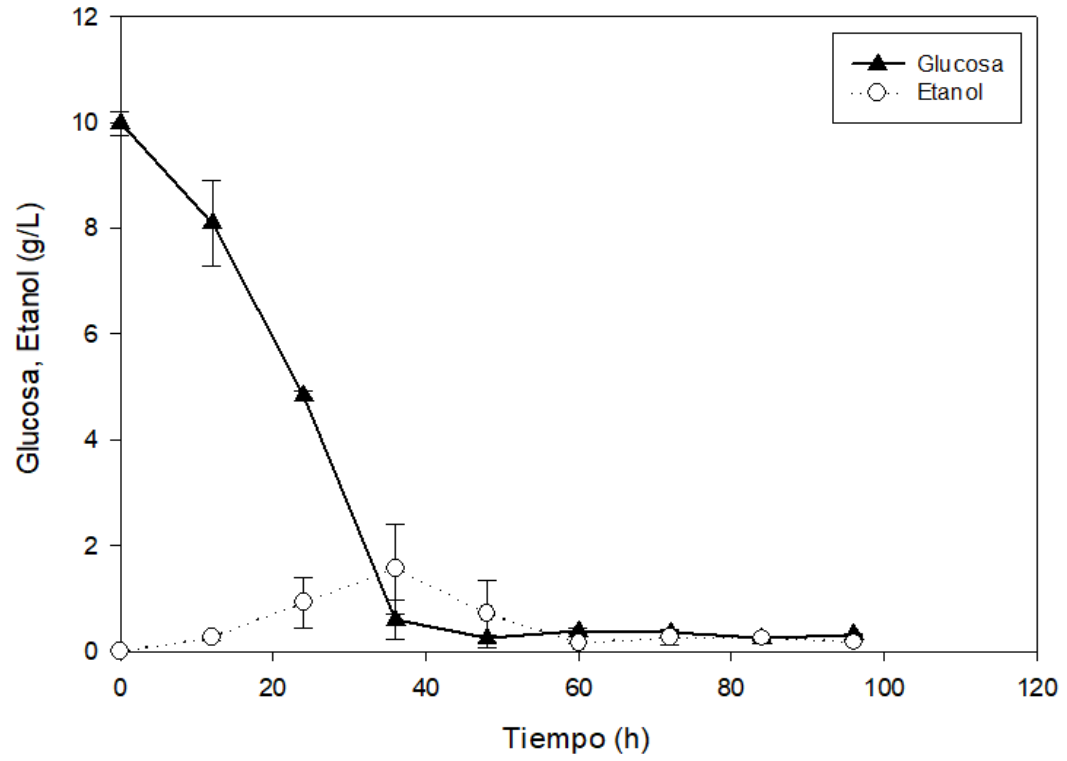
Por otro lado, se ha estudiado el uso de diversas fuentes de sustrato por *X. dendrorhous* donde se ha encontrado que puede asimilar disacáridos como la celobiosa (Libkind, *et al.*, 2007). Este azúcar es hidrolizado a unidades de glucosa mediante la enzima β glucosidasa, la cual, si bien no hay información suficiente acerca de esta enzima en *X. dendrorhous*, si hay evidencia de que la levadura es capaz de asimilar la celobiosa. Así mismo, al igual que el presente estudio, Cruz & Parajó (1998) reportaron un consumo más lento de celobiosa en comparación con la glucosa, siendo necesarias 70 h para el consumo completo de 4 g/L de este disacárido.

Cabe señalar que, durante la cuantificación de azúcares por HPLC, se detectó la presencia de etanol y xilitol. La producción de etanol fue evidenciada en todos los cultivos. En sustratos individuales su producción inicia desde las 12 h para cultivos con glucosa, y 36h para cultivos con xilosa y celobiosa, hecho que coincide con el orden de la velocidad de consumo del azúcar. Así mismo, en xilosa y glucosa, la concentración de etanol aumenta en la hora de cultivo que se consume por completo el sustrato (Figura 14 a,b,c). La mayor producción de etanol en celobiosa y xilosa

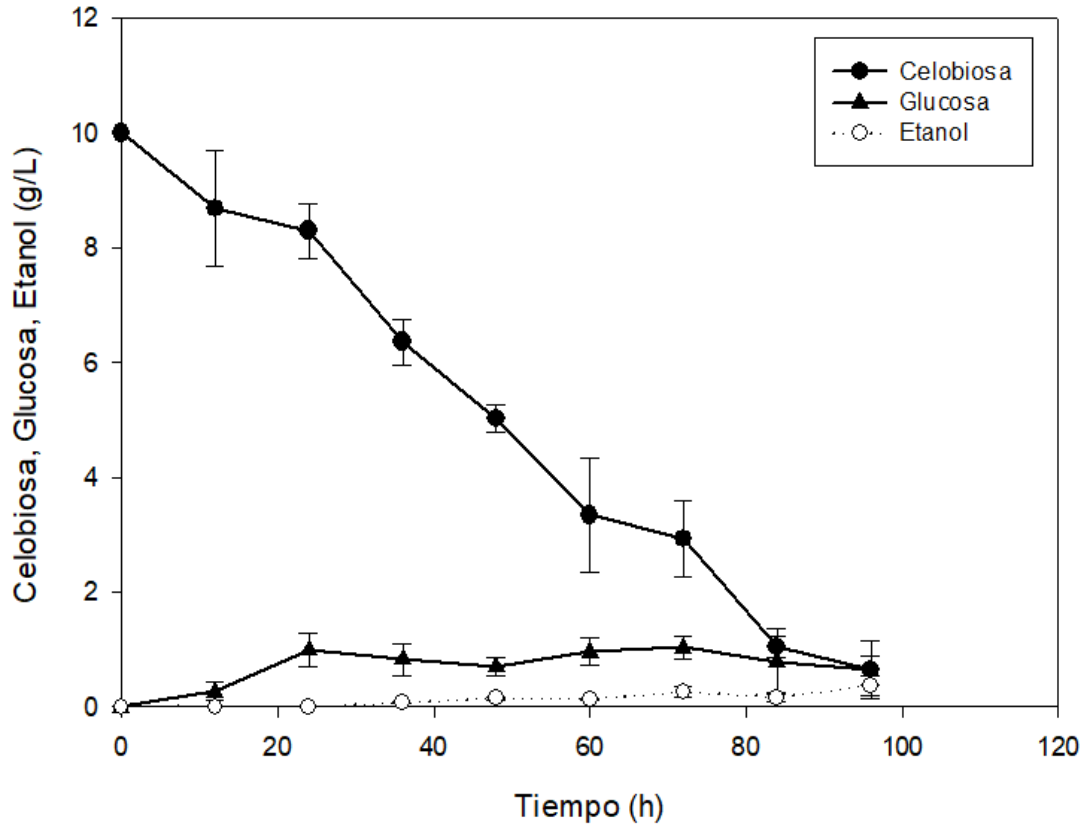
estuvo cercana a $0.4 \text{ g/L} \pm 0.01$, mientras que en glucosa alcanzó $1.6 \text{ g/L} \pm 0.8$ a las 36 h, con una disminución progresiva con el tiempo. De este modo se puede confirmar que, aunque la levadura consume rápidamente la glucosa, el flujo de carbono se está desviando hacia la producción de metabolitos como el etanol o acumulándose en intermediarios que no permiten un adecuado crecimiento. Este fenómeno ha sido reportado en gran medida en *X. dendrorhous* y *Phaffia rhodozyma*, las cuales tienden a producir etanol incluso en condiciones aerobias, en comparación con otras levaduras carotenogénicas (Chávez *et al.*, 2010).

En cultivos con mezcla de sustratos la mayor producción de etanol fue de 0.95 g/L a las 48 h donde la glucosa ya se había consumido. Sin embargo, la hidrólisis de celobiosa a glucosa mantenía concentraciones de este azúcar cercanas a 0.5 g/L durante la cinética, lo cual generó que luego de las 72 h la concentración de etanol se mantuviera casi constante en el medio (figura 14d). Otros autores como Park *et al.*, (2008), también reportan producción de etanol con valores de 1 g/L a las 36 h en cultivos de *X. dendrorhous* con 25 g/L de glucosa como fuente de carbono. Así mismo, Park *et al.*, (2008), y Martínez *et al.*, (2018), coinciden con una mayor producción de etanol por *X. dendrorhous* a las 36 h de cultivo al igual que el presente trabajo (Figura 14 a, d), debido posiblemente por una disminución de oxígeno que activa la fermentación alcohólica (Martínez *et al.*, 2018). En el trabajo reportado por Miao *et al.*, (2019), se cultivó *X. dendrorhous* en 40 y 110 g/L de glucosa. En cultivos con la menor concentración se obtuvo una producción de etanol de 0.14 g/L a las 48 h, valores inferiores a los obtenidos en el presente trabajo a la misma hora. Con concentraciones de 110 g/L , la producción de etanol fue mayor a 9 g/L acompañada de una disminución en el rendimiento de biomasa, resultado que atribuyen a una reducción de oxígeno en el matraz y posiblemente al efecto Crabtree.

a



b



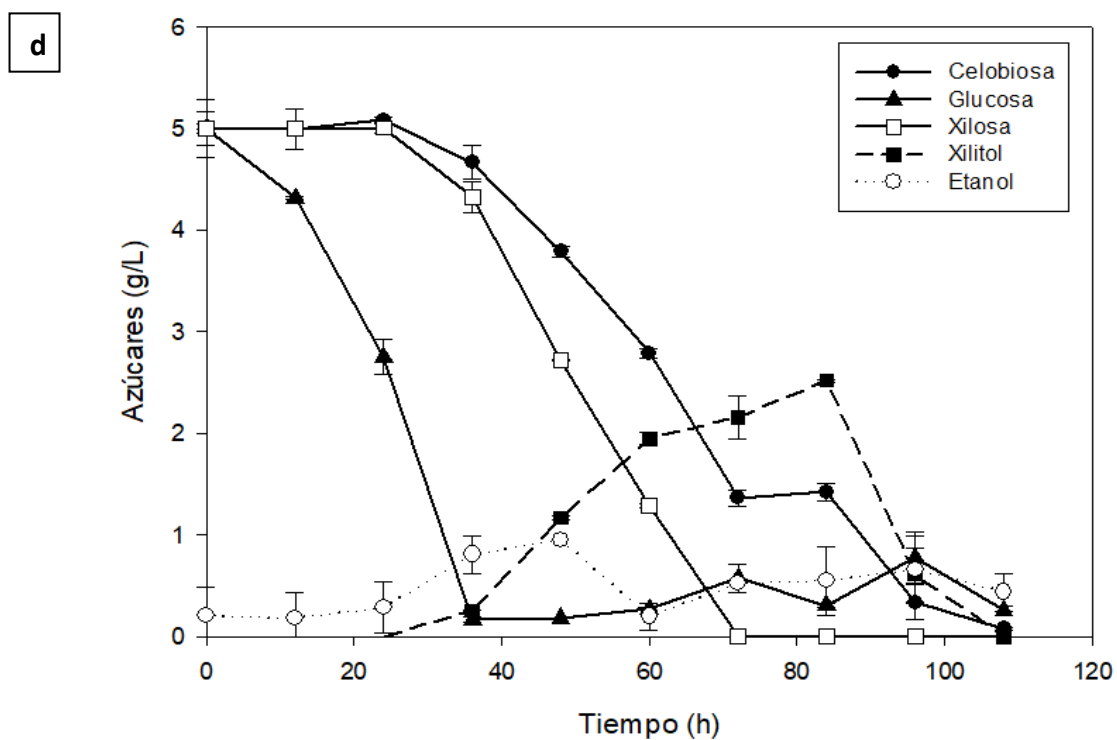
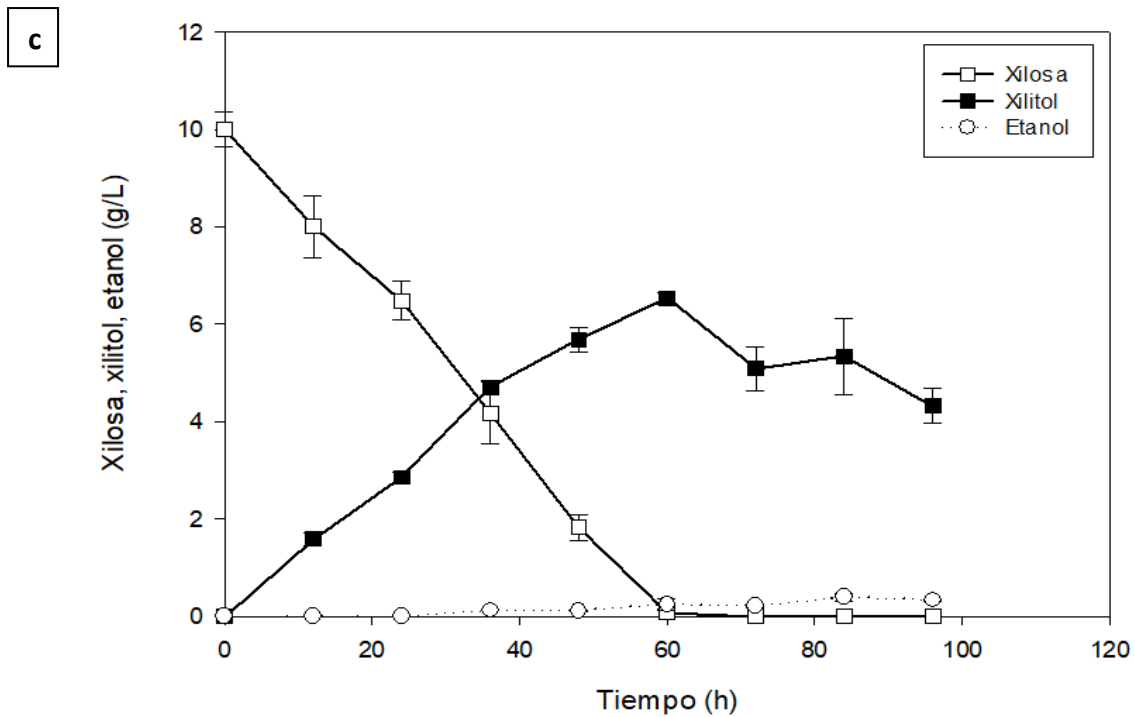


Figura 14. Consumo de a) glucosa, b) celobiosa c) xilosa y d) mezcla de sustratos (GCX) por *X. dendrorhous* R4. Cinéticas en reactor, 20 °C, 600 rpm, 0.5 vvm. (●) celobiosa 10 g/L; (▲) glucosa 10 g/L; (□) xilosa 10 g/L; (■) xilitol, (○) etanol.

El etanol es producido debido a la acción del piruvato descarboxilasa sobre el piruvato obtenido de la glucólisis, generando como producto acetaldehído que posteriormente se convierte a etanol por el alcohol deshidrogenasa. Este desvío en el flujo de carbono hacia la fermentación alcohólica ha sido reportado en diferentes estudios en *X. dendrorhous* incluso en condiciones aerobias, y es importante destacar que esta levadura puede asimilar el etanol como fuente de carbono (Libkind, *et al.*, 2007; Marcoleta *et al.*, 2011). Incluso, se ha reportado que el etanol actúa como inductor en la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis, la cual coincide con el agotamiento de la fuente de carbono y el inicio del consumo del etanol producido por la fermentación del carbohidrato (Marcoleta *et al.*, 2011).

Así mismo, cuando existen altas cantidades de glucosa se genera el efecto Crabtree, que consiste en una aceleración de la glucólisis dando lugar a la producción de grandes cantidades de ATP, reduciendo la necesidad del ciclo de Krebs y convirtiendo el piruvato producto de la glucólisis en etanol (Escalante *et al.*, 2011). Sin embargo, en el presente estudio se observó una producción de etanol tanto en cultivos con concentraciones de 10 g/L de glucosa (individual), como cultivos con 5 g/L de glucosa correspondientes a la mezcla de sustratos GXC. Aunque en este último cultivo hubo variaciones en la concentración de glucosa debido a la hidrólisis de la celobiosa, nunca se superó los 5 g/L de este azúcar. Lo anterior indica que, aunque no existan altas concentraciones de glucosa pudo haber producción de etanol. Esto podría ser debido a que el promotor del alcohol deshidrogenasa responsable de la producción de etanol, es el promotor más fuerte reportado en literatura para *X. dendrorhous* (Hara *et al.*, 2014). Así mismo, se observó la producción de etanol con el uso de pentosas (xilosa) y disacáridos (celobiosa) lo que sugiere que esto también puede deberse a una disminución de la transferencia de oxígeno en el reactor que lleva a un estado incompleto de oxidación de la glucosa por respiración aeróbica (Miao *et al.*, 2019). De esta manera, cuando existe producción de etanol por fermentación aeróbica (Crabtree) o anaeróbica, se genera una disminución del consumo de oxígeno que desencadena un desequilibrio redox en la célula. Como resultado de este desbalance, la célula activa la oxidasa alternativa (OAX) en la respiración mitocondrial, fermentación alcohólica y

la producción de astaxantina como método de defensa para preservar la homeostasis redox, y prevenir el estrés oxidativo (Martínez *et al.*, 2018).

Por otro lado, en cultivos con xilosa como única fuente de carbono, se observó una producción máxima de xilitol de 6.5 g/L \pm 0.12 a las 60 h, que concuerda con el consumo total de xilosa (Figura 14 c). A partir de esa hora, el xilitol disminuye posiblemente por su consumo como fuente de carbono por parte de la levadura. Esta producción de xilitol corresponde a un 65% de la concentración de xilosa inicial en el medio. En cultivos con mezcla de sustratos (glucosa, xilosa y celobiosa) también se observó acumulación de xilitol, el cual alcanzó a un máximo de 2.52 g/L \pm 0.01 a las 84 h, siendo una conversión del 50.4% de xilosa inicial a xilitol. Así mismo, se puede observar que el xilitol producido por *X. dendrorhous* es consumido entre las 84 y 108 h cuando queda poca concentración de otros azúcares en el medio (Figura 14 c). Similar a lo reportado en el presente trabajo, Parajó *et al.*, (1997), reporta un 56 % de acumulación de xilitol con una cepa de *X. dendrorhous*. Así mismo, Libkind, *et al.*, (2007), reporta que este compuesto puede ser asimilado como fuente de carbono por *X. dendrorhous*.

La acumulación de xilitol es un evento que se ha observado en otras levaduras como *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, y *Pichia guilliermondii* (Manjarres *et al.*, 2016). Este fenómeno se debe a un desbalance de cofactores que impide que las enzimas continúen la degradación de este compuesto y se incorpore en las rutas metabólicas. La xilosa reductasa (XR) puede usar el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH+) o nicotinamida adenina dinucleótido NADH y cataliza la conversión de xilosa a xilitol. Posteriormente el xilitol deshidrogenasa (XDH) dependiente de NAD⁺ convierte el xilitol en xilulosa que se incorpora a la ruta de las pentosas. Sin embargo, La disponibilidad del cofactor en esta última reacción es el factor limitante para la conversión completa de xilosa a xilulosa. (Núñez, 2017; Manjarres *et al.*, 2016). Por tal motivo, la acumulación de xilitol en *X. dendrorhous* es un indicador que el metabolismo de esta pentosa es llevado a cabo por la ruta de oxido reducción de la xilosa. Si bien, no hay información suficiente de este proceso en *X.*

dendrorhous, como se indicó anteriormente, el desbalance redox en esta ruta representa el principal obstáculo en la asimilación de este azúcar.

6.2.3 Efecto de la fuente de carbono en la producción de carotenoides y astaxantina por *X. dendrorhous* R4

A las cinéticas de reactor a escala de 400 mL con diferentes sustratos (Glucosa, celobiosa, xilosa y mezcla de azúcares) se les determinó carotenoides totales y astaxantina. La producción de carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ de biomasa seca) en los cultivos para cada uno de los azúcares evaluados mostró un comportamiento asociado al crecimiento (Figura 15 a). El valor más alto a las 96 h fue obtenido en los cultivos con glucosa ($487 \mu\text{g/g}$ de biomasa seca ± 58.2), seguido de celobiosa ($423 \mu\text{g/g}$ de biomasa seca ± 7.03), mezcla de azúcares ($275 \mu\text{g/g}$ de biomasa seca ± 8.7) y xilosa ($160 \mu\text{g/g}$ de biomasa seca ± 33.5). La producción de carotenoides totales se presenta alto en el cultivo con glucosa, debido a su baja biomasa seca, ya que este parámetro relaciona de manera inversa la concentración de carotenoides con la biomasa celular.

La mayor producción de astaxantina al finalizar las cinéticas (96 h) se obtuvo en cultivos con celobiosa ($5.8 \mu\text{g/mL}$), 1.28, 2.94, y 3.54 veces superior a cultivos con xilosa, mezcla de azúcares y glucosa (Figura 15 b). Es importante destacar que al relacionar las figuras 14 y 15 b, se observó un incremento en la producción de astaxantina cuando los sustratos se estaban agotando.

Con respecto a cultivos con glucosa se observó un incremento de astaxantina cuando se consumió el sustrato e inició el consumo de etanol, lo cual concuerda con lo reportado por Marcoleta *et al.*, (2011) (Figura 14a y 15 b). La glucosa fue el azúcar que se consumió más rápido en comparación a los demás, llegando a concentraciones cercanas a cero a las 48 h (Figura 14 a). A esta misma hora se consumió el 55 % de la máxima concentración de etanol producido a las 36 h y a las 60 h se observó un aumento en la producción de astaxantina de 1.32 ± 0.4 a $1.79 \mu\text{g/mL} \pm 0.04$ (Figura 15

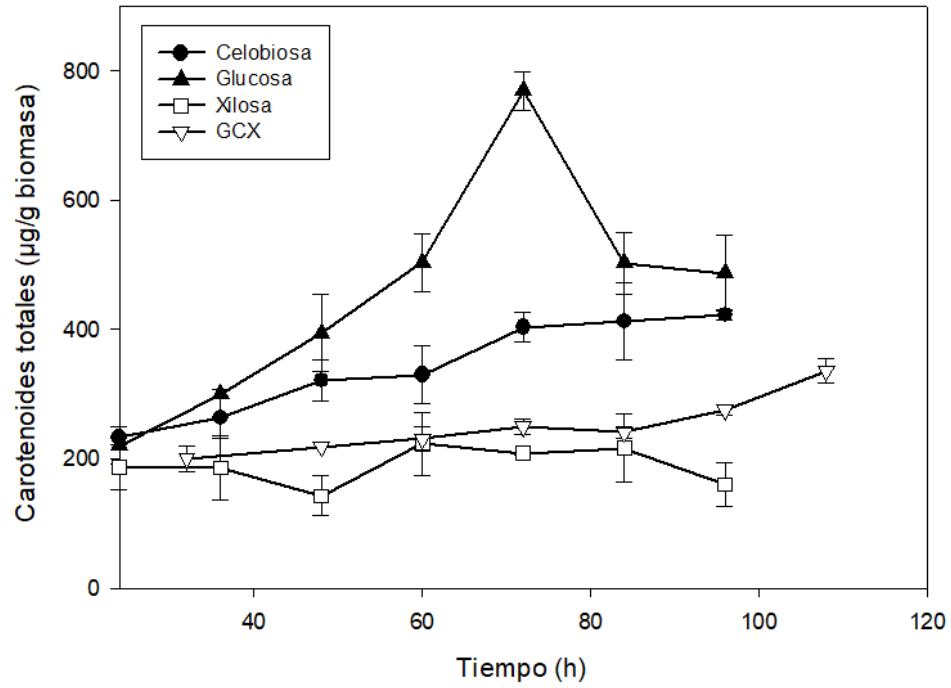
b) y consumo total de etanol, seguido de una producción constante de astaxantina hasta las 96 h.

La producción de astaxantina con celobiosa como fuente de carbono mostró una tendencia creciente durante la cinética (Figura 15 b), obteniendo su máxima producción a las 96 h donde se había agotado el 94 % del sustrato (Figura 14 b, 15 b). sin embargo, a esta hora había $0.37 \text{ g/L} \pm 0.16$ de etanol, el cual como se mencionó anteriormente, según Marcoleta *et al.*, (2011) pudo haber inducido aún más la producción de carotenoides en las próximas horas de cultivo.

En relación con la xilosa, como se observa en la figura 15 b, fue el segundo carbohidrato que indujo una alta producción de astaxantina. El incremento en la producción de astaxantina a las 60 h coincide con el consumo total de xilosa, sin embargo, a esta misma hora se acumuló la mayor concentración de xilitol, el cual fue consumido en las próximas horas (Figura 14 c). No obstante, a las 96 h, aún quedaba un remanente de 2.2 g/L de xilitol lo que sugiere que la producción de astaxantina podría haber seguido aumentando después de las 96 h en que fue evaluado. La inducción de la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* por el uso de pentosas como fuente de carbono también ha sido reportado por Vázquez, (2001) y Rodríguez *et al.*, (2010).

En cinéticas donde se evaluó el efecto de la mezcla de sustratos GCX, se observó un incremento en la producción de astaxantina (Figura 15 b) que coincidió con el consumo total de glucosa y etanol a las 60 h, y continuó en aumento hasta obtener $1.97 \mu\text{g/mL} \pm 0.07$ a las 96h (2.94 veces menor que en celobiosa) y $3.73 \mu\text{g/mL} \pm 0.33$ a las 108 h. Debido a que la concentración inicial de sustrato total en cinéticas GCX fue mayor (15 g/L) en comparación con las de glucosa, xilosa y celobiosa, se decidió determinar la producción de astaxantina hasta las 144 h (datos no graficados) donde se obtuvo un máximo de $5.77 \mu\text{g/mL} \pm 0.12$ de astaxantina. Este valor fue similar al obtenido en cultivos con celobiosa como fuente de carbono a las 96 h (Figura 15 b), sin embargo, requirió de 48 h más que este disacárido para obtener igual concentración de astaxantina.

a



b

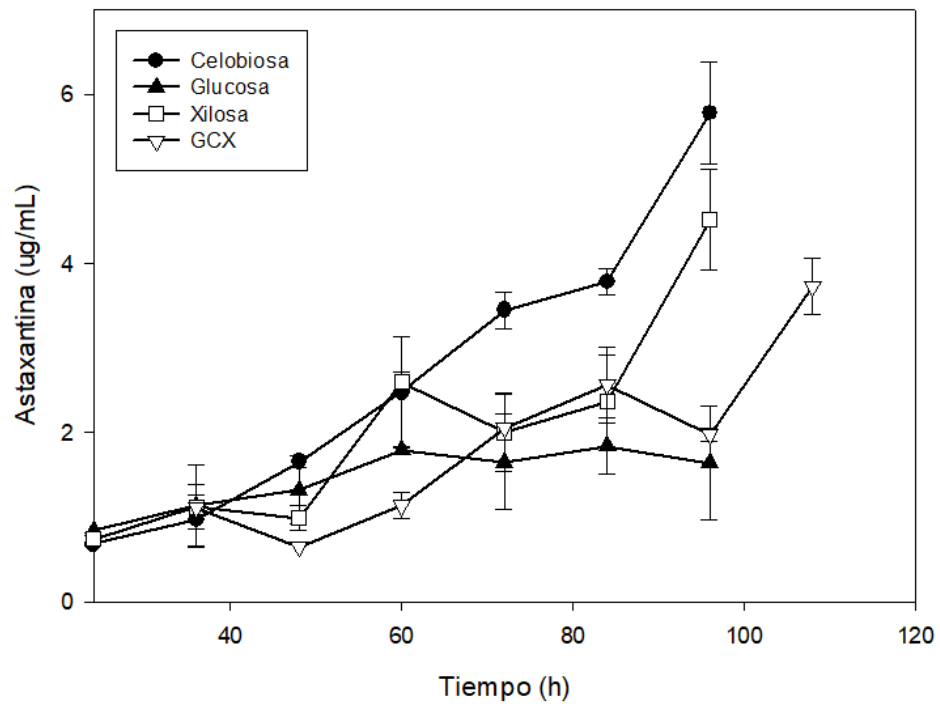


Figura 15. Efecto de la fuente de carbono (glucosa, xilosa, celobiosa, GCX) en la a) producción de carotenoides totales y b) producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4. Cinéticas en reactor, 20 °C, 600 rpm, 0.5 vvm. (●) celobiosa 10 g/L; (▲) glucosa 10 g/L; (□) xilosa 10 g/L; (▽) mezcla de sustratos (GCX) 15 g/L.

Los mayores rendimientos de producto con respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) se obtuvieron en cultivos con xilosa (1.23 mg/g) seguido de celobiosa (1.06 mg/g). Por otro lado, el rendimiento de producto con respecto a sustrato ($Y_{p/s}$) fue superior en cultivos con celobiosa (0.61 mg/g) siendo 3.58, 1.27 y 2.44 veces mayor con respecto a glucosa, xilosa y GCX respectivamente. De igual forma, la productividad de astaxantina fue mayor en cultivos con celobiosa con valores de $0.06 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$, seguido por cultivos con xilosa con $0.048 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tabla 5). Los valores de $Y_{p/x}$ obtenidos en el presente trabajo fueron 3.32, 4.2 y 3 veces superiores a los reportados por Hartih, (2019) en celobiosa, xilosa y glucosa respectivamente, en cultivos con *X. dendrorhous* con sustratos individuales al 3%. Así mismo, Hartih, (2019), reporta valores de carotenoides totales por biomasa seca y astaxantina de $255 \text{ }\mu\text{g/g}$, y $1.52 \text{ }\mu\text{g/mL}$ en cultivos con glucosa, $294.67 \text{ }\mu\text{g/g}$, y $3.76 \text{ }\mu\text{g/mL}$ en cultivos con xilosa y $319.60 \text{ }\mu\text{g/g}$, y $4.24 \text{ }\mu\text{g/mL}$ en cultivos con celobiosa respectivamente, con una concentración inicial de 30 g/L de cada azúcar y con la cepa de *X. dendrorhous* DSMZ 5626 (Tabla 6). Este comportamiento fue similar al del presente trabajo, obteniendo mayor producción de astaxantina con celobiosa como fuente de carbono, seguido de xilosa y por último glucosa, confirmando el efecto positivo de disacáridos y pentosas en la producción de astaxantina (Figura 15 a,b). Así mismo, Cruz & Parajó (1998), también reportaron mayor producción de biomasa y carotenoides en hidrolizados conteniendo glucosa y celobiosa en comparación con aquellos que sólo contenían glucosa.

Por otro lado, se ha reportado que existe una gran correlación entre la fuente de carbono y la síntesis de carotenoides. Altas concentraciones de glucosa disminuyen la producción de pigmentos, de este modo, cuando *X. dendrorhous* es cultivada en glucosa como única fuente de carbono, la inducción de la carotenogénesis coincide con el agotamiento del azúcar y el inicio del consumo de etanol (Marcoleta *et al.*, 2011). Lo anterior puede deberse a que *X. dendrorhous* tiene sitios potenciales de unión a MIG1 en las regiones promotoras de varios genes carotenogénicos (Marcoleta *et al.*, 2011). MIG1 es una proteína dedo de zinc involucrada en la represión por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, es la clave en la no asimilación de otras fuentes de carbono cuando la glucosa está presente (Ostling *et al.*, 1996). La presencia de MIG1 permitió determinar su efecto en la expresión de los genes carotenogénicos

crtYB (fitoeno- β -caroteno sintasa), *crtI* (fitoeno desaturasa) y *crtS* (astaxantina sintasa), encontrándose que los niveles de mRNA de estos tres genes disminuyen considerablemente con la presencia o adición de glucosa en el medio (Marcoleta *et al.*, 2011). Así mismo, se reportó que no había cambios en la expresión de los genes variando las concentraciones de glucosa, salvo con valores cercanos a 1 g/L, donde este azúcar ya no reprimía la ruta de producción de carotenoides. Esto permite comprender por qué una vez consumida toda la glucosa, se inicia la producción de carotenoides. Lo anterior sugiere que el lento consumo de la celobiosa por parte de *X. dendrorhous* es una estrategia adoptada por la levadura con el fin de no acumular grandes concentraciones de glucosa que pueden inhibir la carotenogénesis (menores a 1 g/L). De este modo, se estima que las β -glucosidasas presentes en *X. dendrorhous* posean bajas actividades o se sinteticen en bajas proporciones con el fin de hidrolizar de forma controlada la celobiosa.

Se ha reportado que la producción de carotenoides aumenta cuando se usa celobiosa, etanol y otras fuentes de carbono como sustrato en comparación con la glucosa (Lodato, *et al.*, 2007). En el caso particular del etanol (observado en el presente trabajo), se ha reportado que promueve la carotenogénesis en esta levadura. Para comprobarlo, Marcoleta *et al.*, (2011) realizaron un experimento donde se agregó 2 g/L de etanol al medio cuando se estaba agotando la glucosa, y observaron un aumento en la expresión de *crtYB* (fitoeno- β -caroteno sintasa) y *crtS* (astaxantina sintasa), enzimas importantes en la ruta del mevalonato, lo que confirma el efecto positivo del etanol en la producción de astaxantina. Así mismo demostraron que el etanol causa un incremento en la cantidad de carotenoides totales por promover la síntesis de novo. Esto indica, que, aunque parte del flujo de carbono se dirija a la producción de etanol, la presencia de este compuesto es favorable en la inducción de carotenogénesis. De igual forma, Marcoleta *et al.*, (2011) proponen dos mecanismos por los cuales el etanol induce la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*: la primera hace referencia a la conversión de etanol en acetato el cual puede generar radicales superóxidos que generan la inducción de la síntesis de carotenoides. El segundo mecanismo se refiere a que el acetato puede continuar su ruta metabólica hasta la generación de acetil CoA, precursor importante de la ruta de mevalonato para la producción de astaxantina.

6.2.4 Efecto del uso de SBC como sustrato en la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4

Una vez conocido el efecto de sustratos puros y mezcla de éstos, se evaluó el efecto de sacarificados de bagazo de caña en la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4. Para el proceso de sacarificación se emplearon las condiciones estandarizadas en la etapa 1. La composición de los sacarificados obtenidos comprendió de 4.16 g/L \pm 0.003 de glucosa y 2.44 g/L \pm 0.006 de xilosa. La cinética fue realizada en las mismas condiciones de los cultivos anteriores, en biorreactores con volumen de trabajo de 400 mL. Los sacarificados fueron suplementados con medio mínimo Breus. Se realizó seguimiento de biomasa, sustrato y astaxantina cada 12 h.

El crecimiento celular fue favorecido por el uso de SBC como sustrato con respecto a los otros azúcares evaluados, obteniendo 15.25 \pm 0.49 unidades de densidad óptica a las 96 h (Figura 16 a), valor superior a todas las fuentes de carbono evaluadas anteriormente, siendo 24.1 % mayor que la biomasa obtenida en cultivos con celobiosa (Tabla 5). Sin embargo, es importante destacar que, aunque la concentración total de azúcares iniciales fue de 6.6 g/L en comparación con 10 g/L en cinéticas anteriores con sustratos puros, se obtuvo una mayor producción de biomasa, lo cual indica que la composición de SBC mejora el crecimiento en *X. dendrorhous* R4. Esto se puede observar en una productividad de biomasa (Q_x) 1.3, 1.95, y 1.54 veces mayor en comparación con cultivos con celobiosa, xilosa y GCX respectivamente (Tabla 5).

La xilosa y glucosa que hacían parte de la composición del SBC fueron consumidas de forma simultánea hasta agotarse por completo cerca a las 60 h (Figura 16 a). La coasimilación de hexosas y pentosas no se había observado en *X. dendrorhous* R4 cuando se realizó un cultivo con mezcla de hexosa (glucosa), pentosa (xilosa) y disacáridos (celobiosa), sin embargo, ya se había confirmado la coasimilación de celobiosa y xilosa. Este hecho supone que es posible que la composición del SBC tanto en azúcares reductores como otros compuestos no especificados puedan favorecer la coasimilación de hexosas y pentosas en *X. dendrorhous* R4. Sin embargo, otros autores como Stoklosa *et al.*, (2019), reportan en sus cinéticas de *P. rhodozyma*

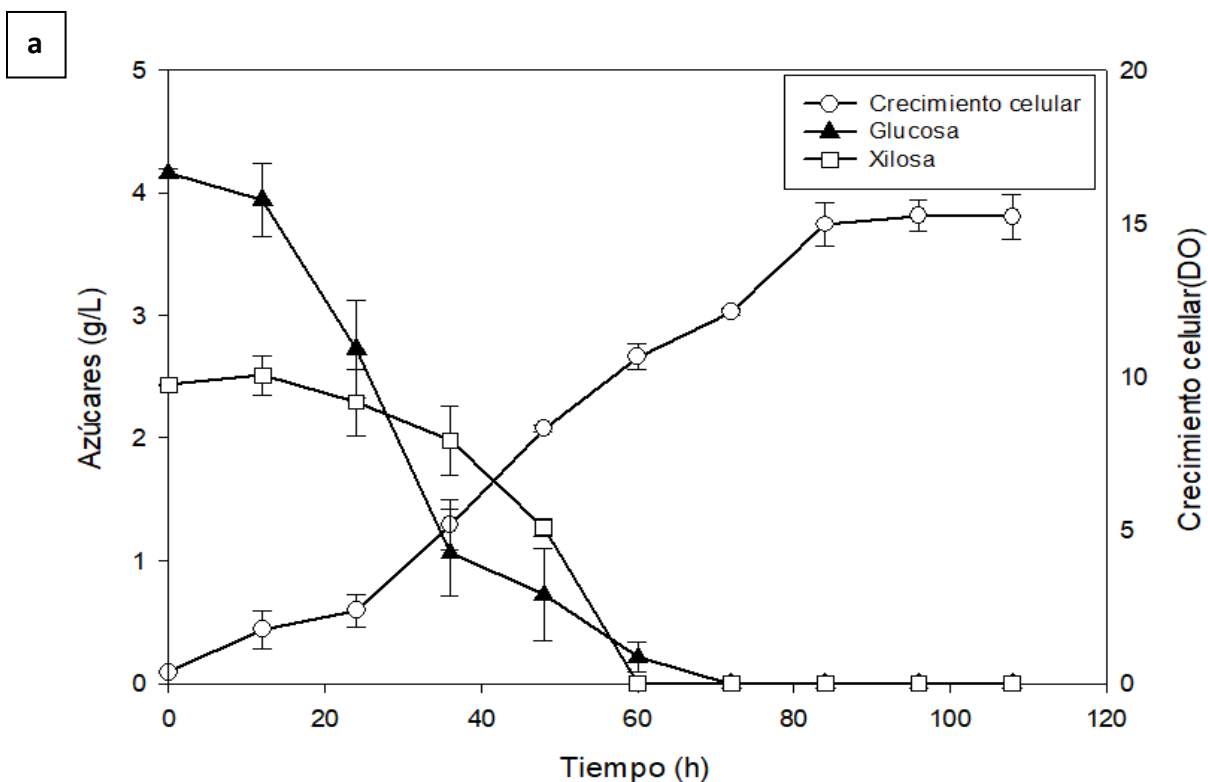
con mezcla de azúcares en diversas proporciones, que pentosas como xilosa o arabinosa en cultivos sintéticos son consumidas sólo cuando la glucosa se ha agotado.

Los carotenoides totales en cultivos con SBC como sustrato a las 108 h fue de 361 $\mu\text{g/g}$ biomasa seca, 2.25 veces mayor que en cultivos con xilosa, y 1.3 veces más que en GCX a las 96 h. La producción de astaxantina fue de 5.76 $\mu\text{g/mL}$ a las 108 h, siendo superior a la producida con todas las fuentes de carbono a excepción de la celobiosa cuyo valor fue similar (5.8 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 15 b y 16 b). No obstante, como se mencionó anteriormente la cinética con SBC inició sólo con 6.6 g/L, por lo cual es posible que con concentraciones iniciales de 10 g/L puedan obtenerse concentraciones de astaxantina igual o superiores a las obtenidas en cultivos con celobiosa. Lo anterior se puede comprobar con los valores de rendimiento de producto con respecto a sustrato ($Y_{p/s}$) los cuales fueron 5.1, 1.4, 1.81 y 3.48 veces superior en cultivos con SBC en comparación con el uso de glucosa, celobiosa, xilosa y mezcla de sustratos respectivamente (Tabla 5).

Por otro lado, autores como Park *et al.*, (2008), utilizaron 28 g/L de melaza de caña de azúcar compuesta principalmente por glucosa y sacarosa, obteniendo 16.94 % y 18.64 % más de biomasa en comparación con cultivos con glucosa y fructosa como sustratos puros respectivamente. No obstante, la melaza de caña implementada por Park *et al.*, (2008), no mejoró la producción de biomasa en comparación con el uso de disacáridos (sacarosa) o mezcla de sustratos (glucosa y fructosa), incluso las cinéticas con estos sustratos puros presentaron un 1.67 % más de biomasa en comparación con el uso de melaza de caña (aproximadamente). En contraste con esto, el uso de SBC como sustrato en el presente trabajo si mejoró el crecimiento en comparación con todos sustratos puros evaluados incluyendo disacáridos (celobiosa), pentosas (xilosa) y mezcla de sustratos (GCX) Esto sugiere que los SCB tienen un mejor potencial en la producción de biomasa por *X. dendrorhous* R4.

Cruz & Parajó, (1998) reportan concentraciones de astaxantina de 1.7 $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente) por *X. dendrorhous*, en cultivos que contenían hidrolizados de madera de eucalipto compuestos por 11 g/L de glucosa y 4 g/L de celobiosa inicial. En contraste con esto, en el presente trabajo se obtuvo 3.38 veces más astaxantina con

tan solo 6.6 g/L de azúcares iniciales compuestos por xilosa y glucosa, lo cual confirma que el uso de pentosas induce la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Por otro lado, Harith, (2019) reporta producciones cercanas a 3.2 µg/mL por *X. dendrorhous* a partir de hidrolizados de harina de colza ricos en glucosa y xilosa, valor 1.8 veces inferior a lo obtenido con SBC a las 108 h en el presente trabajo. En la tabla 6, se presenta una comparación de la producción de astaxantina a partir de diferentes fuentes de carbono.



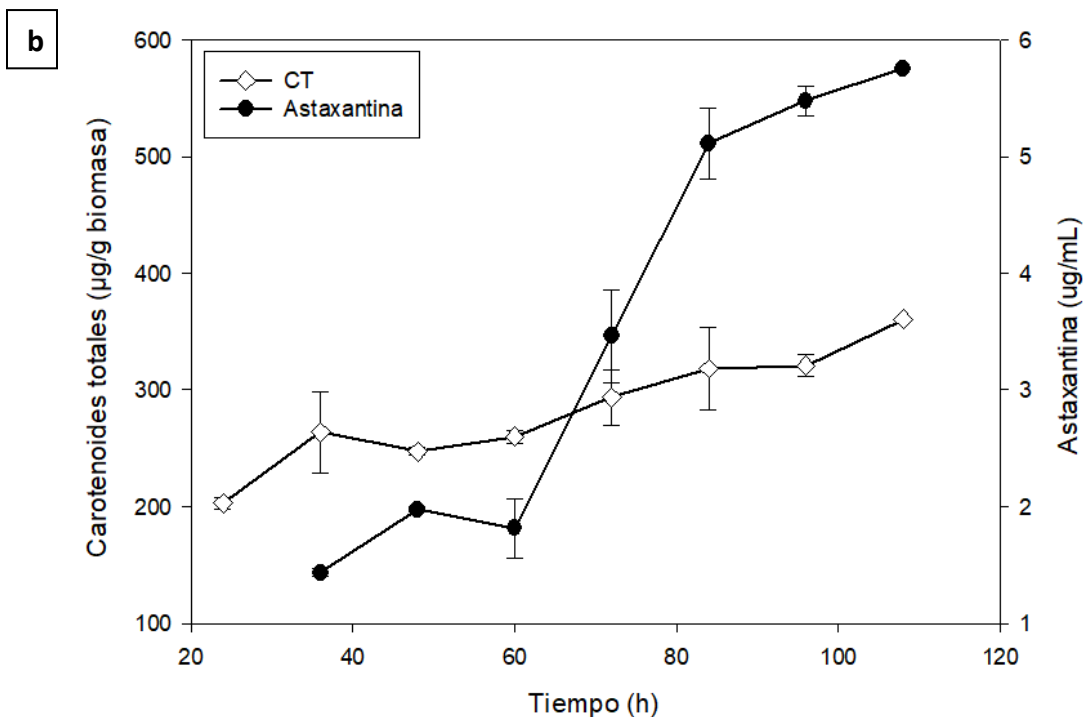


Figura 16. a) Producción de biomasa, consumo glucosa y xilosa, b) producción de carotenoides y astaxantina por *X. dendrorhous* R4 usando SBC ricos en xilosa y glucosa. Cinéticas en reactor, 20 °C, 600 rpm, 0.5 vvm. (○) crecimiento celular; (▲) glucosa; (□) xilosa; (◇) carotenoides totales, (●) astaxantina.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de cultivos de *X. dendrorhous* R4 en diferentes sustratos

Sustrato	X max 96 h (DO)	μ (h ⁻¹)	td (h)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{p/s}$ (mg/g)	Q_X (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Q_A (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
Glucosa	2.48	0.053	13	0.77 ^a	0.17 ^a	0.017 ^a	0.017 ^a
Celobiosa	11.62	0.044	15.57	1.06 ^a	0.61 ^a	0.057 ^a	0.06 ^a
xilosa	9.12	0.020	33.98	1.23 ^a	0.48 ^a	0.038 ^a	0.048 ^a
GCX	11.56	0.034	20.5	0.7 ^b	0.25 ^b	0.048 ^b	0.034 ^b
SBC	15.25	0.046	14.94	0.81 ^b	0.87 ^b	0.074 ^b	0.053 ^b

*X_{max}: Biomasa máxima (DO), μ : Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹), td: Tiempo de duplicación (h), X: Biomasa, S: sustrato, Q_X: productividad de biomasa (gL⁻¹h⁻¹), Q_A: productividad de astaxantina(producto) (gL⁻¹h⁻¹). ^a Rendimientos determinados de forma global a las 96 h. ^b Rendimientos determinados de forma global a las 108h.

Tabla 6. Producción de astaxantina por *X. dendrorhous* y *P. rhodozyma* utilizando diversos sustratos.

Cepa	Sustrato (g/L)-Tipo de sustrato	Tiempo (h)	CT (µg/g biomasa)	Astaxantina (µg/mL)	Fuente
<i>X. dendrorhous</i> SKKU 0107 (mutante)	25-Glucosa	72	870	4.4 ^{ab}	Park <i>et al.</i> , (2008)
	25-Sacarosa	80	900 ^a	5.5 ^{ab}	
	28-Melasa de caña de azúcar	72	800 ^a	4.4 ^{ab}	
<i>X. dendrorhous</i> ATCC 24228	15-Madera de eucalipto (GC)	185		1.75 ^a	Cruz & Parajó (1998)
<i>P. rhodozyma</i> NRRL Y-10922	Medio sintético + citrato	156	230 ^a	2 ^a	Flores <i>et al.</i> , (2001)
<i>X. dendrorhous</i> W618 (Mutante)	50-Residuos cítricos	144	860	8.17	Wu, <i>et al.</i> , (2010)
<i>X. dendrorhous</i> DSMZ 5626	30-Glucosa	120	255	2.32	Harith, (2019)
	30-Celobiosa	120	319.7	4.24	
	30-Xilosa	112	294.67	3.76	
	30-Arabinosa	115	174.75	1.87	
	15.7-Hidrolizados de harina de colza (Pectinasa)	120	258	6.7	
<i>P. rhodozyma</i> ATCC 74219 (UBV-AX2)	20-Glucosa	168	2470	17.5	Stoklosa, <i>et al.</i> , (2019)
	20-Xilosa	168	4190	14.3	
	20-Arabinosa	168	2660	19.1	
<i>X. dendrorhous</i> ATCC 24202	10-CHH+CSL	120	467.33	0.65 ^b	Villegas <i>et al.</i> , (2019)
	RBY	120	132.38	0.57 ^b	
	10-MPE+CSL	120	259.56	1.07 ^b	
	RBY	120	171.48	1.13 ^b	
	10-CCH +CSL	120	309.7	0.84 ^b	
<i>X. dendrorhous</i> 46	RBY	120	196.53	0.93 ^b	Hu <i>et al.</i> , (2006)
	80-Glucosa-pH4	132	1520	17.7	
	80-Glucosa-pH5	120	1350	21.8	
	80-Glucosa-pH6	120	1100	18.89	

Cepa	Sustrato (g/L)-Tipo de sustrato	Tiempo (h)	CT (µg/g biomasa)	Astaxantina (µg/mL)	Fuente
<i>X. dendrorhous</i> CBS 6938	20.86-Glucosa	96	140.28	-	Liu <i>et al.</i> , (2018)
<i>X. dendrorhous</i> SK984	10-Batata	120 ^a	780	5.7	Kothari <i>et al.</i> , (2019)
	10-Zanahoria	120 ^a	1340	6.7	
	10-Brócoli	120 ^a	1390	4.4	
	10-Mandarina	120 ^a	680	5.8	
	10-Hoja de arce	120 ^a	1650	7.3	
	10-Hoja de roble	120 ^a	1750	11.3	
<i>P. rhodozyma</i> JTM 185	33- SBC	300	360	2.56	Montani <i>et al.</i> , (2011)
<i>X. dendrorhous</i> Cs	11-Glucosa	144	293.45	0.021	Castelblanco, (2015)
<i>X. dendrorhous</i> XR	11-Glucosa	144	509.0	0.05	
<i>X. dendrorhous</i> XP	11-Glucosa	144	114.09	0.003	Presente estudio
<i>X. dendrorhous</i> R4 (Mutante)	10-Glucosa	96	487.5	1.64	
	10-Celobiosa	96	422.9	5.78	
	10-xilosa	96	159.9	4.52	
	15-GCX	108	335.3	3.73	
	6.6-SBC	108	360.5	5.76	

^a Datos estimados de gráficas, ^b Datos reportados para carotenoides totales

*CCH: Hidrolizados de mazorca de maíz; CHH: Hidrolizado de cáscara de algodón; MPE: Extracto de vainas de mezquite; CSL: Licor fuerte de maíz; RBY: Levadura residual de cervecería.

6.2.5 Estandarización de las condiciones del ensayo de la actividad de la β-glucosidasa en *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4

6.2.5.1 Localización de la β-glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

Con el fin de determinar si *X. dendrorhous* R4 posee β-glucosidasa para la hidrólisis de celobiosa, se llevó a cabo la cuantificación de esta actividad enzimática en diversos extractos proteicos celulares. Los resultados obtenidos previamente en este trabajo señalan que la celobiosa induce en mayor medida la producción de astaxantina, siendo el estudio de este sustrato de gran interés. La asimilación de celobiosa supone que la levadura posee la enzima capaz de hidrolizar este disacárido en unidades de glucosa. Sin embargo, aún no se conoce la localización de la β-glucosidasa en *X. dendrorhous*,

y los reportes de esta actividad sobre la levadura son limitados. Por lo tanto, se evaluó la actividad β -glucosidasa en tres extractos proteicos celulares (intracelular, extracelular y asociado a la superficie celular), con el fin de conocer su ubicación. *X. dendrorhous* presentó actividad β -glucosidasa en los tres extractos enzimáticos evaluados, No obstante, la mayor actividad específica se presentó en el extracto enzimático asociado a la superficie celular (64.4 %) seguido por el intracelular (35 %) y extracelular (0.55 %) con valores de 160.4, 87.22 y 1.38 mU/mg respectivamente (Figura 17). La baja actividad extracelular indica que posiblemente ésta sea producto de algunas enzimas asociadas a la superficie celular que se exportan debido a la inducción por presencia de celobiosa, como lo reporta Krisch *et al.*, (2010), quienes presumen que las β -glucosidasas en los mohos son inducibles y podrían liberarse de los enlaces sueltos de la pared celular y secretarse al medio exterior en presencia de sustratos de celulosa natural. Esto coincide con Saloheimo *et al.*, (2002) quienes reportan que en *Trichoderma reesei* las actividades extracelulares y una parte importante de las actividades ligadas a la pared celular podrían deberse a la misma enzima.

No obstante, se decidió estandarizar una concentración de proteína para determinar actividad enzimática de los tres extractos a una concentración de proteína constante, ya que los valores de proteína obtenidos en los ensayos fueron discrepantes. La presencia de actividad en las tres fracciones indica que *X. dendrorhous* puede hidrolizar la celobiosa antes de incorporarla a la célula o bien ingresarla como disacárido e hidrolizarla por la actividad β -glucosidasa intracelular. Esto sugiere que *X. dendrorhous* posee transportadores que permiten el paso de celobiosa. Así mismo, los valores de actividad obtenidos son bastante bajos con respecto a la actividad β -glucosidasa de otras levaduras. Un ejemplo de ello, Ochoa, (2018) determinó la actividad de la β -glucosidasa intracelular de *Clavispora lusitaniae* obteniendo valores de 800 U/mg en medio mínimo con celobiosa como fuente de carbono.

Algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* no pueden fermentar pentosas y celodextrinas como la celobiosa (Ha *et al.*, 2013). Esto representa una desventaja en su uso para la producción de metabolitos como el etanol a partir de biomasa

lignocelulósica. En contraste con esto, *X. dendrorhous* posee una ventaja con respecto a otras levaduras de interés industrial en el uso de sacarificados de biomasa lignocelulósica como sustrato al tener la capacidad de hidrolizar la celobiosa tanto extracelular como intracelularmente.

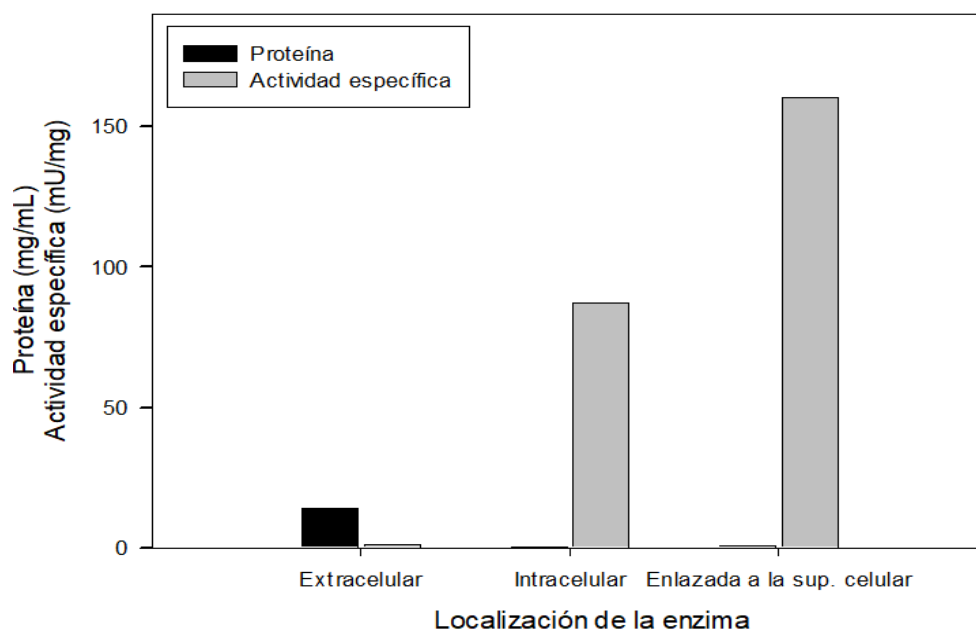


Figura 17. Localización de la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4

6.2.5.2 Estandarización de la concentración de proteína

Se determinó proteína al extracto enzimático asociado a la superficie celular y se prepararon concentraciones de 0 a 1.5 mg/mL. A cada concentración se le determinó actividad β -glucosidasa y se graficó con el fin de seleccionar una concentración de proteína en la cual la actividad enzimática se comporta de manera lineal. Se obtuvo una relación lineal entre 0.05 y 0.5 mg/mL de proteína, por lo cual se decidió usar una concentración de 0.2 mg/mL para los ensayos posteriores (Figura 18). Esto con el fin de comparar los diferentes extractos enzimáticos con igual concentración de proteína permitiendo determinar de forma más certera cuál de estos extractos presenta mayor actividad β -glucosidasa.

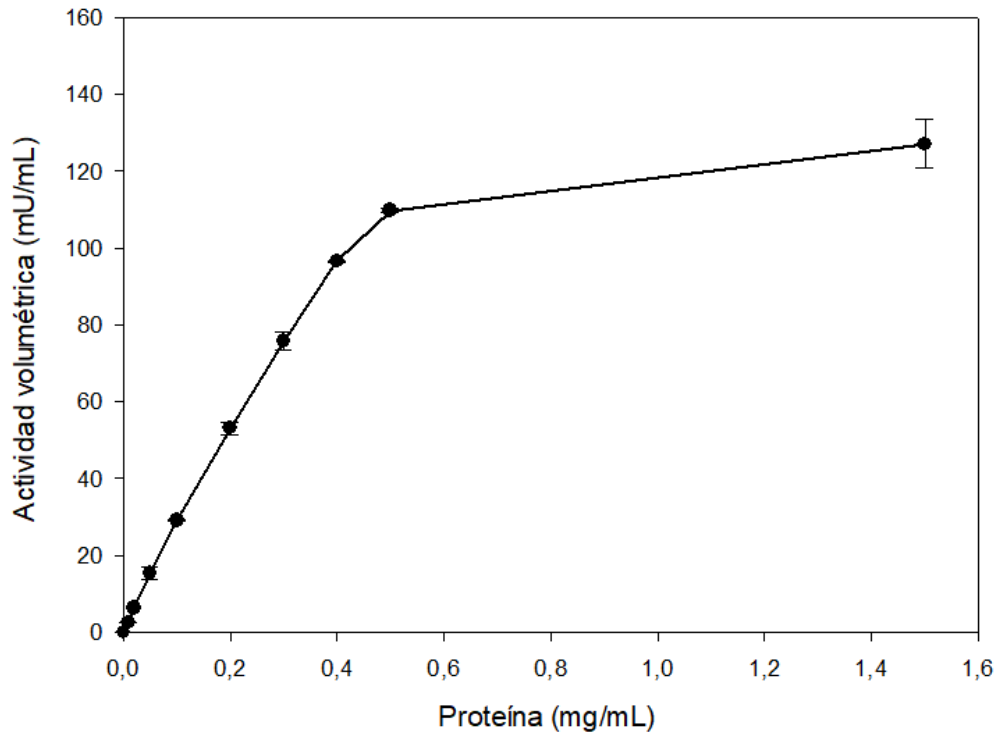


Figura 18. Estandarización de la concentración de proteína para la determinación de actividad β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

Una vez estandarizada la concentración de proteína, se evaluaron nuevamente las tres fracciones (extracelular, intracelular y asociada a la superficie celular), para definir aquella con la mayor actividad β -glucosidasa. Se obtuvo 153.732 mU/mg de actividad β -glucosidasa en el extracto enzimático enlazado a la superficie celular, 4.2 veces más que el obtenido en la fracción intracelular (36.488 mU/mg). En la concentración de proteína estandarizada no se observó actividad de β -glucosidasa en la fracción extracelular (Figura 19). Por tal motivo, se determinó que la mayor actividad de β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4 se encuentra ubicada y enlazada en la superficie celular. Por tanto, se eligió al extracto enzimático de células completas correspondiente a las enzimas enlazadas a la superficie celular para estudios posteriores.

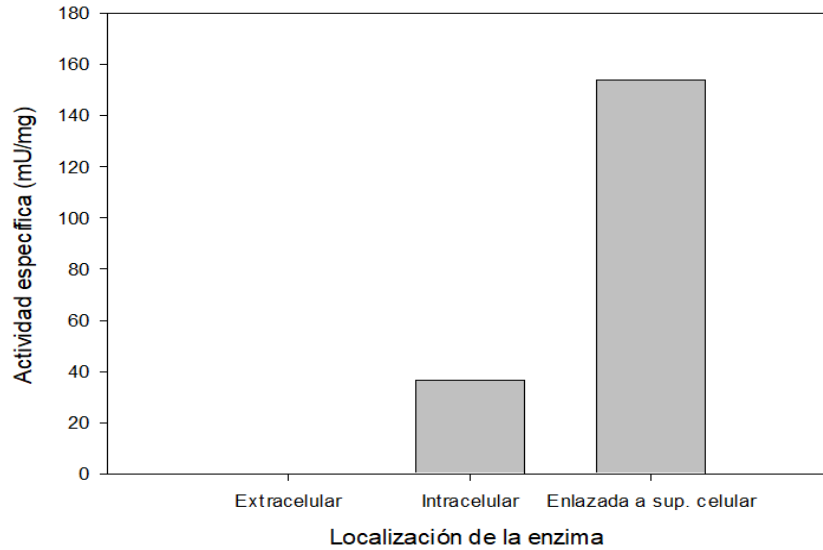


Figura 19. Estandarización de la localización celular de la enzima β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4

6.2.5.3 Determinación de la temperatura óptima en el ensayo enzimático de β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

Se determinó la temperatura óptima en la cual la β -glucosidasa presenta la mayor actividad enzimática. Se probaron 10 temperaturas en intervalos de 5 °C obteniéndose la mayor actividad en 60 °C (Figura 20). Esta temperatura resulta favorable ya que los procesos de sacarificación enzimática se llevan a cabo en temperaturas cercanas, en el caso del presente trabajo la temperatura seleccionada para el proceso de hidrólisis de bagazo de caña es de 55 °C. Esto sugiere que la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* podría tener aplicaciones de interés industrial. Un ejemplo de un microorganismo productor de esta enzima es *Trichoderma reesei* (*Cel3A*) con el cual se reporta una temperatura óptima de 70 °C para actividad β -glucosidasa (Guo, *et al.*, 2016). Por otro lado, se reportan temperaturas similares a las obtenidas en el presente trabajo con 65 °C para *Aspergillus terreus* (Yan *et al.*, 2016) y temperaturas menores a ésta con 45 °C para la levadura *Clavispora lusitaniae* (Ochoa, 2018).

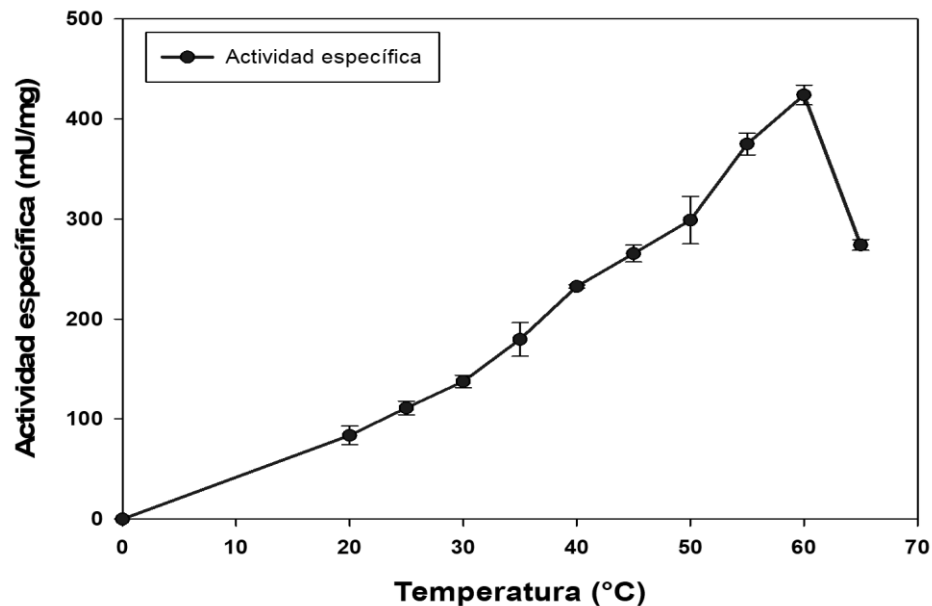


Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad de la β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

6.2.5.4 Estandarización de tiempo de incubación óptimo en el ensayo enzimático de β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

La β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 presentó una velocidad inicial constante de formación de pNP entre 0 - 30 min de incubación a 60 °C, a partir del cual inicia un notable decline de estos valores. Por lo anterior se consideró como tiempo de incubación 15 min al ser el punto intermedio de esta recta con un coeficiente de determinación R^2 : 0.98 (Figura 21).

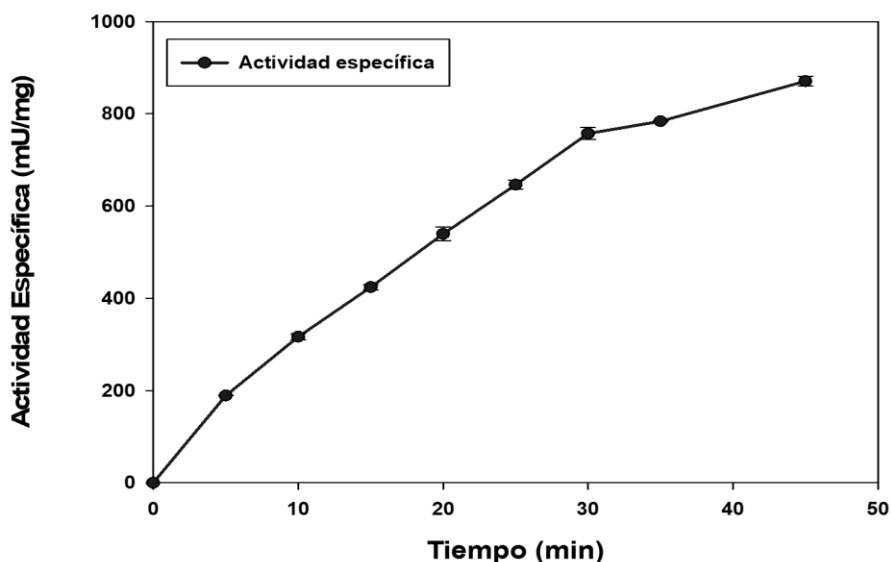


Figura 21. Efecto del tiempo de incubación en la actividad β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4.

6.2.5.5 Estandarización de pH óptimo en el ensayo enzimático de β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4

Finalmente, con los parámetros estandarizados anteriormente, se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de β -glucosidasa utilizando regulador citratos-fosfatos 50 mM, citratos 50 mM y fosfatos de sodio 25 mM. Los resultados indican que la mayor actividad específica se obtuvo en pH 5 con regulador citratos fosfatos. Así mismo este regulador presentó un buen poder amortiguante debido a que no hay cambios drásticos en la actividad al variar décimas en el pH, lo cual es importante en la estabilidad de la enzima. Por el contrario, en el regulador citratos se observa una actividad de β -glucosidasa y estabilidad menor que el resto de los reguladores evaluados. Por otro lado, Se observó que utilizando los reguladores citratos-fosfatos y fosfatos de sodio, la actividad β -glucosidasa presenta un comportamiento similar a pH 6, 6.5 y 7, sin observarse una influencia por el tipo de regulador (Figura 22). Debido a lo anterior, se seleccionó el regulador citratos fosfatos pH 5 para estudios posteriores. Con base a los resultados obtenidos se determinó que la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 presenta mayor actividad en medios ácidos. Incluso se han reportado

actividad de β -glucosidasa de otros microorganismos como *Trichoderma reesei* (Cel3A) en medios más ácidos con pH de 4.5, *Debaryomyces pseudopolymorphus* pH 4, y *Metschnikowia pulcherrima* a pH 4.5 (Arévalo, 2005, González *et al*, 2008, Guo *et al*, 2016). Así mismo, Gil (2015), señala un pH óptimo de 4, para β -glucosidasa de *Talaromyces amestolkiae* en regulador citrato sódico. Por otro lado, Ochoa, (2018) reporta un pH óptimo de 5.5 con regulador citratos fosfatos para la β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae*. En la tabla 7 se presenta una comparación del pH y la temperatura óptima de diversas β -glucosidasas, observándose que los valores óptimos de la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 se encuentran cercanos al promedio de lo reportado en literatura para otros microorganismos.

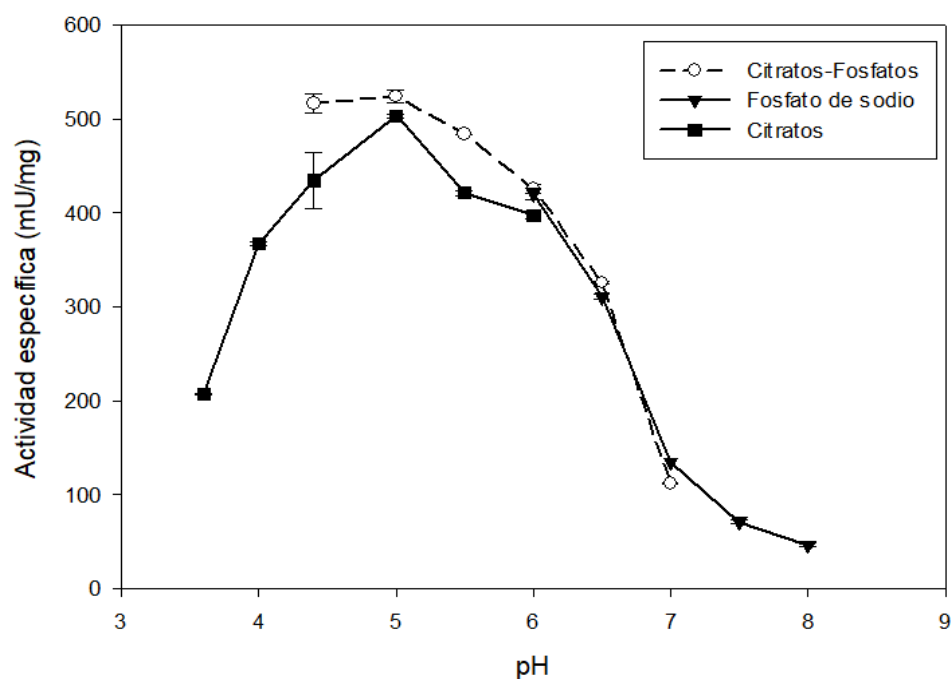


Figura 22. Efecto del regulador y pH en la actividad β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4. (○) Regulador citratos-fosfatos, (▼): Regulador fosfato de sodio, (■) Regulador citratos.

Tabla 7. Temperatura y pH óptimos de actividad β -glucosidasa de diferentes microorganismos

Organismo	T óptima (°C)	pH óptimo	Referencia
<i>Clavispora Y-50464 (BGL1)</i>	45	6.0	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>Clavispora lusitaniae</i>	45	5.5	Ochoa (2018)
<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>	40	4.0	Arévalo, (2005)
<i>Aspergillus terreus</i>	65	5.0	Yan <i>et al.</i> , (2016)
<i>Trichoderma reesei (Cel3A)</i>	70	4.5	Guo <i>et al.</i> , (2016)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	50	4.5	González <i>et al.</i> , (2008)
<i>Candida peltata</i>	50	5.0	Saha & Bothast, (1996)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	22	4.5	Pera <i>et al.</i> , (1999)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	60	5	Presente estudio

*Adaptado de Ochoa, (2018).

6.2.6 Evaluación de la actividad β -glucosidasa en cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4

Con el fin de determinar el comportamiento de la actividad β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 durante una cinética de 96 h, se analizó la actividad enzimática usando glucosa y celobiosa como sustrato. Para los análisis realizados a continuación, se utilizó el extracto enzimático de células completas (enzimas enlazadas a la superficie celular).

6.2.6.1 Cinéticas en matraz

6.2.6.2 Cinética de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 en glucosa

Xanthophyllomyces dendrorhous cultivada en medio mínimo con glucosa (MMG), alcanzó un valor de densidad óptica de 2.9 ± 0.06 a las 96 h de cultivo con una μ_{max} de 0.16 h^{-1} , y un tiempo de duplicación de 4.4 h (Tabla 8). En la figura 23, se observa una fase exponencial desde las 12 a las 24 h de cultivo y una fase estacionaria hasta las 84 h. Así mismo, se observa un consumo del 30 % de la glucosa a las 96 h. De acuerdo con lo reportado en resultados anteriores *X. dendrorhous* es capaz de metabolizar glucosa, sin embargo, en medio mínimo no es posible consumir todo el sustrato debido al agotamiento de las fuentes de nitrógeno. La producción de astaxantina fue determinada al final de la cinética obteniendo un valor de $1.07 \mu\text{g/mL}$ a las 96 h de cultivo.

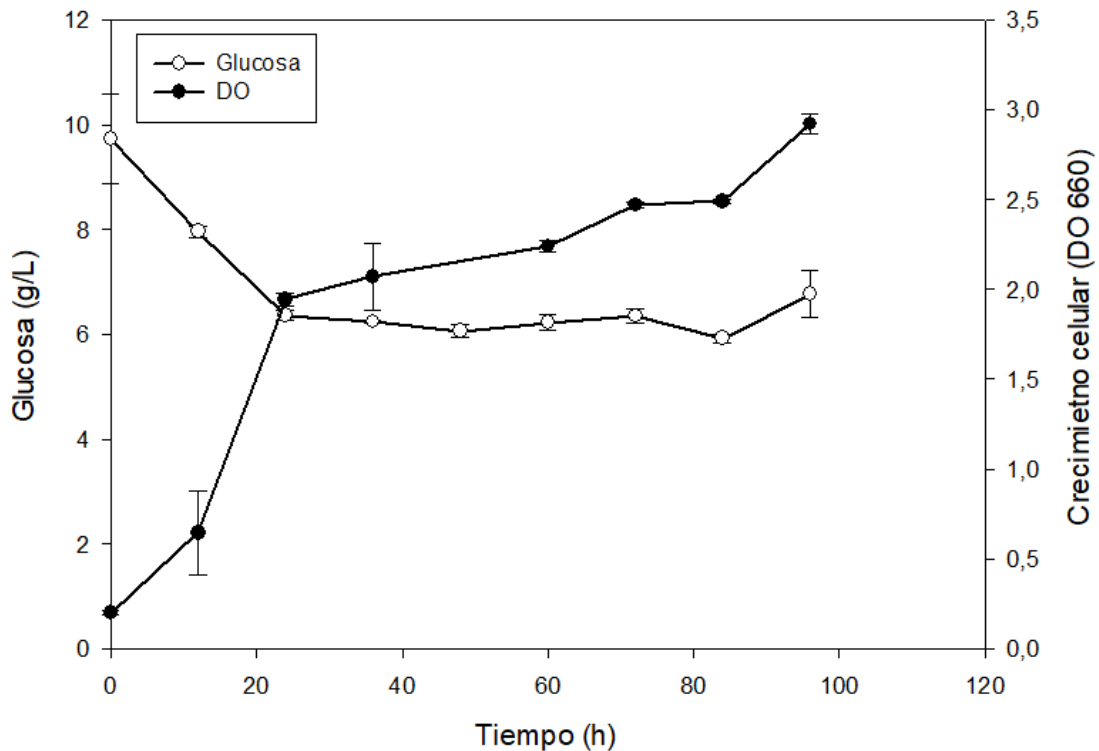


Figura 23. Consumo de sustrato y crecimiento celular de *X. dendrorhous* R4 en medio mínimo con glucosa. (●): glucosa, (○): densidad óptica.

6.2.6.3 Cinética de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 en celobiosa

Xanthophyllomyces dendrorhous al crecer en medio mínimo con celobiosa (MMC) presenta una fase exponencial entre las 0 - 60 h de cultivo con una μ_{max} de 0.028 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 24 h. Se obtuvo un total de 6.9 ± 0.26 unidades de densidad óptica, y un consumo completo de celobiosa. El rendimiento producto con respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) fue superior en cultivos con celobiosa (0.91 mg/g) en comparación con glucosa (0.87 mg/g) (Tabla 8). La glucosa producto de la hidrólisis de la celobiosa, alcanza una concentración de $4.8 \text{ g/L} \pm 0.2$ al final de la fase exponencial (60 h), momento a partir del cual, el ligero consumo de glucosa genera un aumento en la concentración de biomasa a las 84 y 96 h (Figura 24).

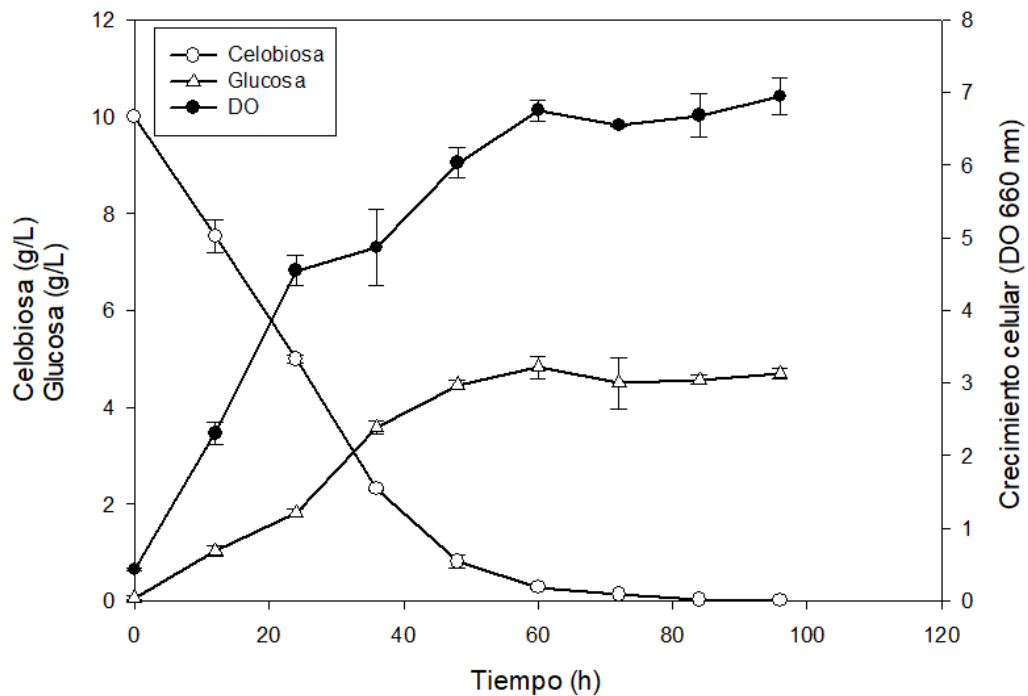


Figura 24. Consumo de sustrato y crecimiento celular de *X. dendrorhous* R4 en medio mínimo con celobiosa. (○): celobiosa, (●): densidad óptica, (Δ): Glucosa generada por hidrólisis de celobiosa.

La concentración de astaxantina fue de $2.79 \mu\text{g/mL}$, 2.6 veces superior al obtenido en glucosa. Evidentemente, la celobiosa estimula la producción de astaxantina, y ofrece

mayor pigmentación en *X. dendrorhous* en comparación con otras fuentes de carbono, por lo anterior y de acuerdo con lo reportado por Cruz & Parajó, (1998), se ha designado a este carbohidrato como uno de los mejores sustratos para la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*.

6.2.6.4 Cinéticas de *X. dendrorhous* en biorreactor con celobiosa como fuente de carbono

Debido a que la mayor concentración de astaxantina en sustratos puros se obtuvo en medio rico con celobiosa como fuente de carbono y a escala de 400 mL en biorreactores, se evaluó una cinética en estas condiciones para determinar el comportamiento de la actividad enzimática en medio rico YPC. Se obtuvo una densidad celular máxima de 13.25 ± 0.5 a las 84 h, 1.98 y 5.32 veces superior a lo obtenido en medio mínimo con celobiosa y glucosa respectivamente a esta misma hora. El valor de μ_{max} fue de 0.03 h^{-1} y el tiempo de duplicación de 22.87 h (Tabla 8). El rendimiento de producto con respecto a la biomasa y el sustrato fueron 1.35 y 1.8 veces superior a los obtenidos con glucosa en medio mínimo respectivamente, y 1.28 y 2.36 veces superior a los obtenidos con celobiosa en medio mínimo respectivamente. La hidrólisis de celobiosa llevó a una acumulación de $0.81 \text{ g/L} \pm 0.005$ de glucosa a las 60 h de cultivo, esto corresponde a un 8.1 % de la concentración inicial de celobiosa. Las concentraciones de glucosa acumuladas son muy bajas por lo cual se estimaría que la actividad hidrolítica de la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* es lenta. La concentración de astaxantina fue de $6.0 \text{ }\mu\text{g/mL}$, 2.1 y 5.6 veces superior al obtenido en MMC y MMG respectivamente (Tabla 8). Cabe resaltar que la producción de astaxantina posee un comportamiento similar a la producción de biomasa como se observó en cinéticas anteriores.

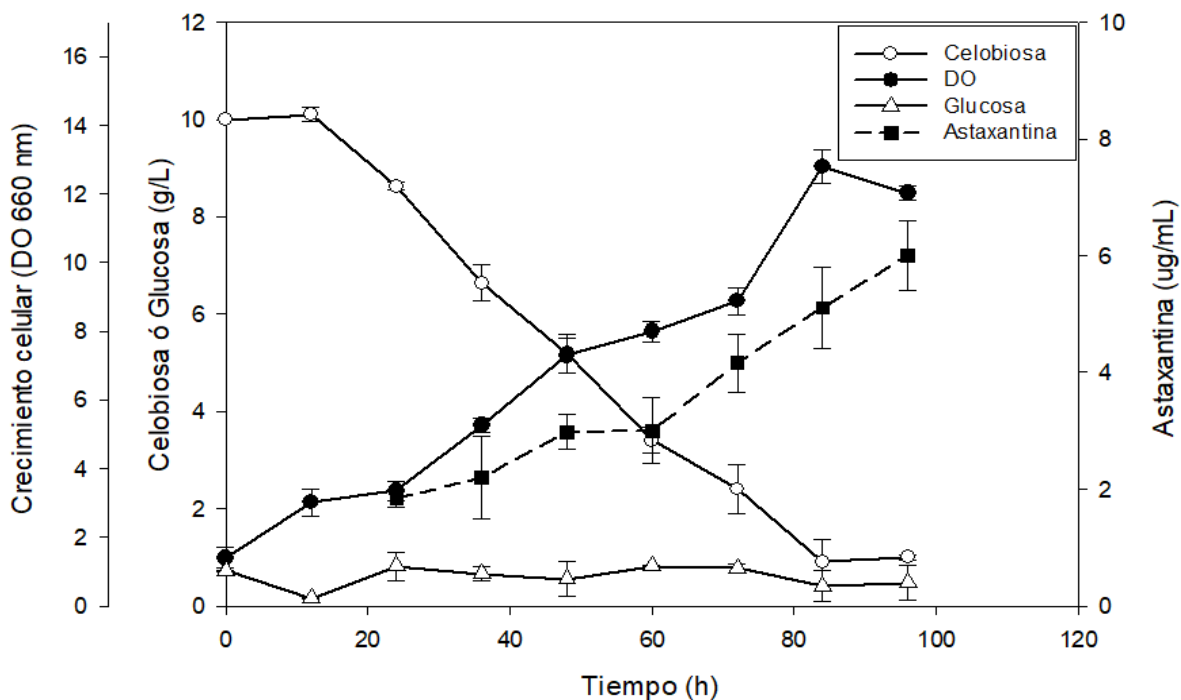


Figura 25. Consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de astaxantina por de *X. dendrorhous* R4 en medio YP con celobiosa. Cinética realizada en biorreactor a 20 °C, 0,5 vvm, 600 rpm. (○): celobiosa, (●): densidad óptica, (Δ): Glucosa generada por hidrólisis de celobiosa, (■): astaxantina.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de *X. dendrorhous* R4 en medio mínimo Breus con glucosa y celobiosa y medio rico (YP) con celobiosa.

Sustrato	μ (h^{-1})	td (h)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{p/s}$ (mg/g)	Astax ($\mu g/mL$)
MMG	0.156	4.43	0.86	0.36	1.07
MMC	0.028	24.0	0.91	0.279	2.79
YPC	0.030	22.87	1.17	0.65	6.00

*td: Tiempo de duplicación, X: Biomasa, S: sustrato. Los rendimientos fueron determinados de forma global a las 96 h para todos los azúcares.

6.2.6.5 Determinación de actividad β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4 en cinéticas de medio mínimo y medio rico (YP) con glucosa y celobiosa

Se evaluó la actividad de β -glucosidasa producida por *X. dendrorhous* R4 creciendo en medio mínimo con glucosa, celobiosa y medio rico (YP) con celobiosa para seguir la actividad de esta enzima en estos sustratos.

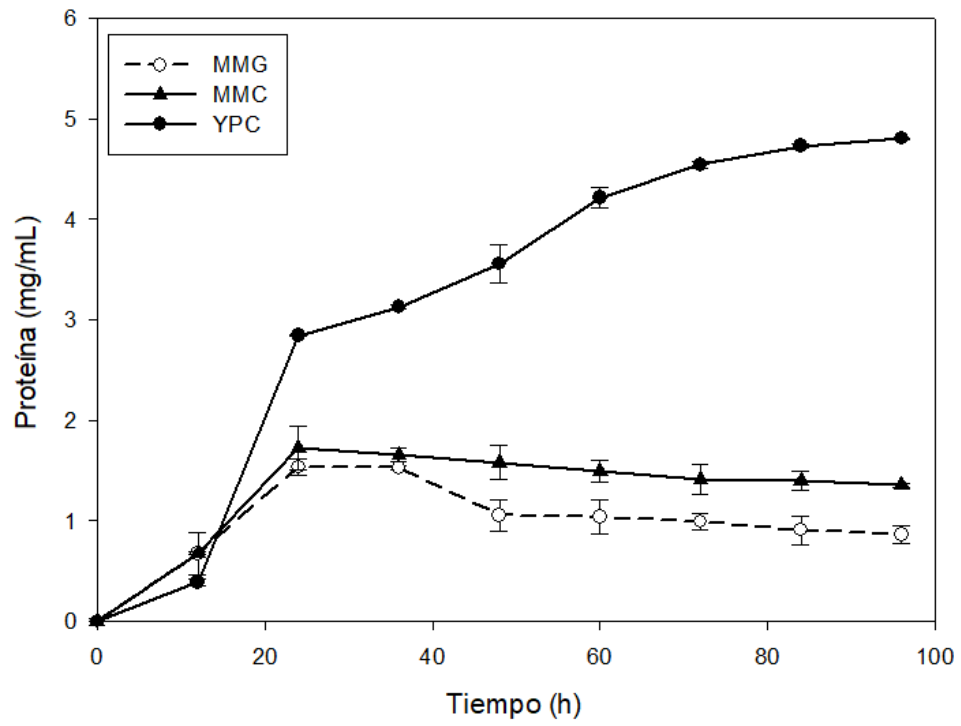
Cuando *X. dendrorhous* R4 crece en medio mínimo con glucosa se observa una concentración máxima de proteína de $1.53 \text{ mg/mL} \pm 0.08$, entre las 24 y 36 h, que tiende a disminuir con el transcurso del tiempo (Figura 26 a). Por otra parte, la actividad específica de β -glucosidasa en medio mínimo con glucosa se mantuvo en valores cercanos a 100 mU/mg durante todo el tiempo de cultivo (figura 26 c). Esto sugiere que la actividad β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 es reprimible por glucosa. Por el contrario, cuando se cultivó *X. dendrorhous* en medio mínimo con celobiosa como fuente de carbono, la actividad específica de β -glucosidasa fue aumentando hasta un valor máximo de $487.352 \text{ mU/mg} \pm 1.4$, a las 72 h. La máxima actividad volumétrica de la β -glucosidasa en cultivos con MMC se observó de igual forma a las 72 h con $97.47 \text{ mU/mL} \pm 0.28$, 4.1 veces superior a la obtenida por glucosa a esa misma hora. Esto permite confirmar que la celobiosa induce la actividad β -glucosidasa, así mismo, después de las 72 h donde se obtuvo la actividad máxima en MMC, el disacárido se agotó por completo generando una disminución del 4.3 % de actividad específica para las 96 h.

Por otro lado, en la cinética en biorreactor usando medio rico y celobiosa como sustrato, se puede observar un comportamiento diferente. La mayor actividad específica β -glucosidasa se obtuvo a las 48 h (Figura 26c) con valores de $4870.45 \text{ mU/mg} \pm 43.3$, siendo 10 veces mayor con respecto a la máxima actividad observada en cultivos con medio mínimo y celobiosa como sustrato. Al tiempo de cultivo de 48h, aún quedaba cerca del 50 % de la celobiosa inicial en el medio, sin embargo, la proteína seguía aumentando exponencialmente debido al aumento de biomasa. Esto generó que la relación de β -glucosidasa en la concentración de proteína estandarizada para los ensayos (0.2 mg/mL) disminuyera observándose una caída de la actividad,

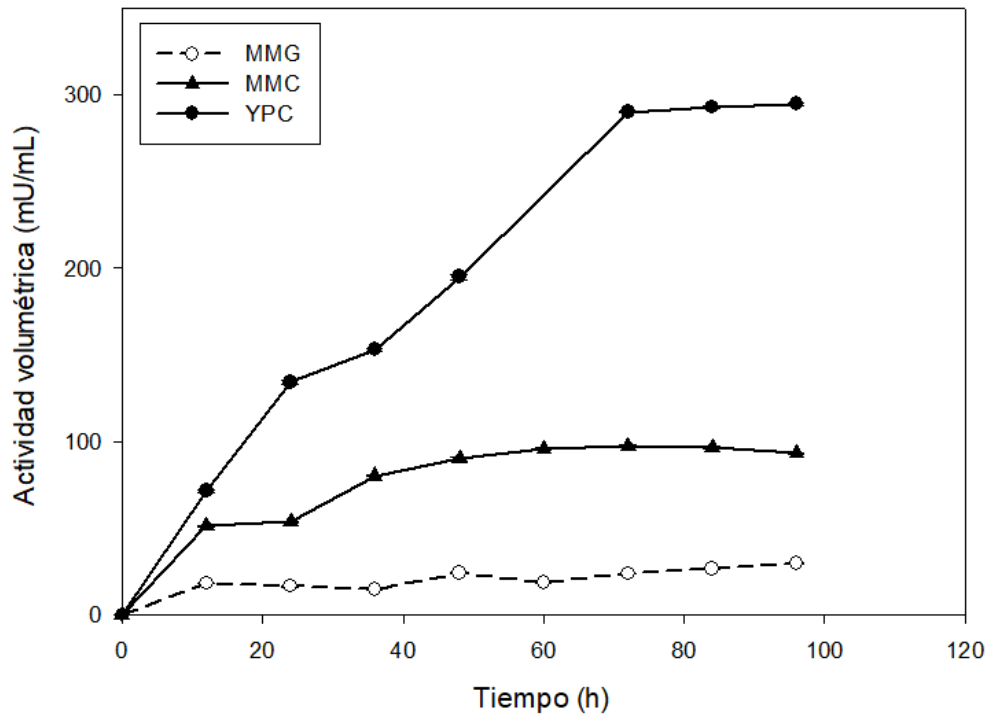
hasta las 72 h donde la concentración de proteína empezó a mantenerse en valores similares hasta las 96 h. De esta forma se puede comprender, que cuando la β -glucosidasa es inducida por celobiosa, esta mantiene sus valores durante el tiempo de cultivo, observándose de forma más clara en MMC donde la proteína aumentó hasta las 24 h y posteriormente se mantuvo constante y la actividad también una vez se llevó a cabo la inducción. Así mismo, aunque se libere glucosa al medio como producto de la hidrólisis de la celobiosa, no es suficiente para reprimir o inhibir de forma significativa la enzima. Esto aclara la estrategia de la levadura para hidrolizar la celobiosa, las bajas actividades de la enzima β -glucosidasa en *X. dendrorhous*, permite hidrolizar de forma lenta el disacárido evitando así grandes acumulaciones de glucosa en el medio, la cual puede afectar en la regulación de la producción de astaxantina. Es por ello, que cuando se implementa este azúcar como fuente de carbono se obtiene la mayor producción de astaxantina con respecto a otros sustratos puros como la glucosa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 enlazada a la membrana o pared celular, es de carácter inducible, es decir, su actividad variará en función de la naturaleza de la fuente de carbono siendo la celobiosa un sustrato inductor. Evidentemente el uso de medio rico con celobiosa como fuente de carbono favorece la inducción de la actividad β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 en comparación con medio mínimo con celobiosa.

a



b



c

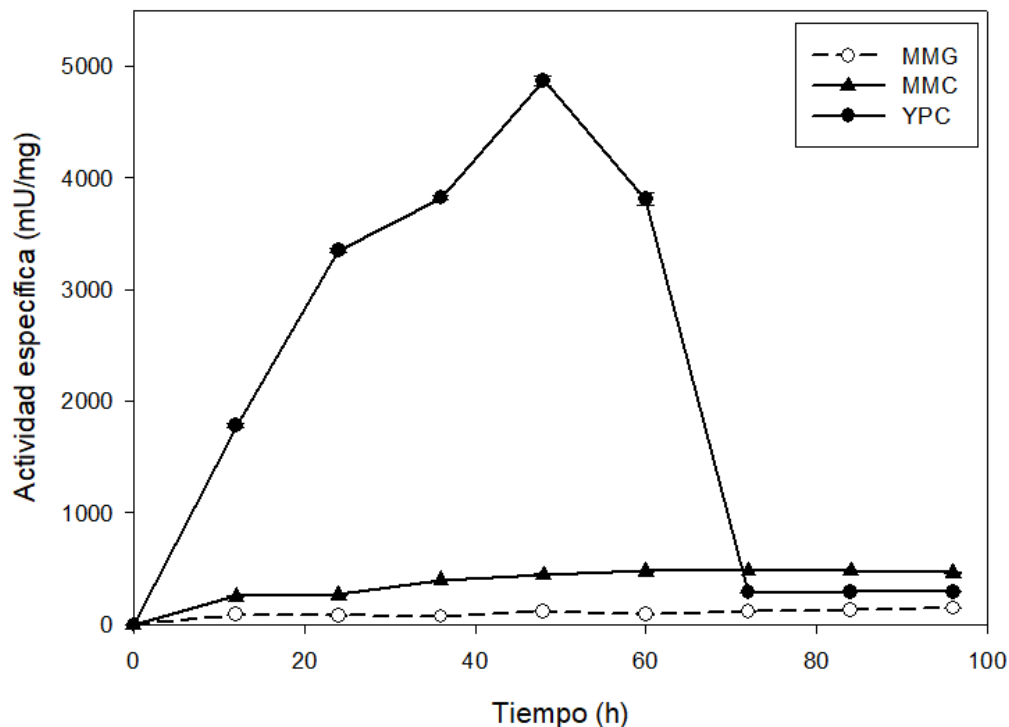


Figura 26. a) Proteína asociada a la membrana, b) determinación de actividad volumétrica y c) específica de la β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4 en cultivos a escala de matraz con MMG y MMC, y cultivo a escala reactor con medio rico con celobiosa (YPC). (○) medio mínimo con glucosa; (▲) medio mínimo con celobiosa; (●) medio rico con celobiosa.

6.2.7 Metabolismo de *X. dendrorhous* R4 en la producción de astaxantina a partir de sacarificados de bagazo de caña

Los azúcares más representativos en la composición de los sacarificados de bagazo de caña son la glucosa, xilosa, celobiosa y en muy bajas proporciones arabinosa (Tabla 10). En *X. dendrorhous* la carotenogénesis está asociada al crecimiento y depende de las condiciones de cultivo tales como la fuente de carbono (Córdova *et al.*, 2018). Se ha demostrado que en medios con glucosa la producción de astaxantina es inducida al inicio de la fase estacionaria, sin embargo, con fuentes de carbono no fermentables como el etanol se incrementa la producción de esta xantofila desde la fase exponencial (Martínez *et al.*, 2015). Por tal motivo, es importante comprender el efecto de las fuentes de carbono en la producción de astaxantina (Figura 27). A

continuación, se propone un análisis del metabolismo de diversos azúcares en *X. dendrorhous* representado en la figura 27, con base a literatura publicada en estudios con otras levaduras, ya que no existe información suficiente de todos estos procesos en *X. dendrorhous*.

El metabolismo de estos azúcares inicia con su incorporación a la célula. Se ha reportado que la glucosa es transportada a través de la membrana por transportadores de hexosas. Si bien no hay suficiente información sobre estos transportadores en *X. dendrorhous*, en *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado 18 transportadores de hexosas (Hxt1-17 y Gal2). Estos transportadores son divididos en tres grupos dependiendo de su afinidad por glucosa: 1) alta afinidad (Hxt6, Hxt7 y Gal2), 2) intermedia afinidad (Hxt2, Hxt3 y Hxt5), y 3) baja afinidad (Hxt2, Hxt4 and Hxt5). Sin embargo, los transportadores Hxt7, Hxt5, Gal2, Hxt1 y Hxt4 pueden permitir el paso de xilosa (ordenados por orden de eficiencia) (Hou *et al.*, 2017). La competencia por estos transportadores es una de las razones por las cuales la xilosa es consumida solo una vez se ha agotado la glucosa en el medio. Con respecto a disacáridos, *X. dendrorhous* R4 tiene la capacidad de hidrolizar la celobiosa antes de ingresarla a la célula en mayor medida por β -glucosidasa asociada a la superficie celular, o introducir la celobiosa e hidrolizarla en el interior celular a unidades de glucosa por acción de β -glucosidasas intracelulares. Esto último sugiere que *X. dendrorhous* R4 debe poseer transportadores de celodextrinas que permitan el paso de celobiosa al interior celular. Cuando la celobiosa es hidrolizada a glucosa extracelularmente, estas moléculas ingresan por transportadores de hexosas.

Una vez ubicada la glucosa en el medio intracelular, se lleva a cabo la glucólisis obteniendo como producto final piruvato, NADH y ATP. En el caso de pentosas como la xilosa, el metabolismo inicia con la conversión de xilosa a xilitol por la xilosa reductasa (XR), posteriormente el xilitol es oxidado a xilulosa por la xilosa deshidrogenasa (XDH). No obstante, es importante comprender que XR tiene afinidad por los cofactores NADH y NADPH, sin embargo, XDH sólo usa NAD⁺ como cofactor, generando así un desbalance de cofactores que resultan en la acumulación de xilitol. Por otro lado, la xilulosa es fosforilada por la xilulosa quinasa (XK) haciendo uso de

ATP para producir xilulosa-5-fosfato, la cual ingresa a la ruta de las pentosas fosfato. Dependiendo de los requerimientos celulares, el flujo de carbono de la ruta de las pentosas puede incorporarse en la glucólisis mediante la producción de fructosa 6-fosfato y glucosa 3-fosfato (Portugal, 2017).

Una vez obtenido el piruvato mediante la glucólisis, este es convertido en acetil coA en la matriz mitocondrial por el complejo piruvato deshidrogenasa. Seguido a esto, el ciclo de Krebs inicia con la formación de citrato a partir de una molécula de acetil coA y oxaloacetato en una reacción de condensación, seguido de varias reacciones enzimáticas para producir GTP, CO₂ y cofactores en forma reducida (NADH y FADH₂), que posteriormente se van a oxidar a ATP en la cadena transportadora de electrones (Portugal, 2017). El citrato mitocondrial es dirigido al citoplasma donde es convertido a acetil co-A y oxaloacetato por el ATP citrato liasa (ACL). El acetil co-A formado puede dirigirse a la producción de malonil co-A para la síntesis de lípidos o a hidroximetilglutaril-coA (HMG-coA) como precursor de la ruta de mevalonato para la producción de astaxantina (Zhu & Jackson, 2015). Una vez obtenido el HMG-coA, y el ácido mevalónico a partir de acetil-coA en la ruta del mevalonato, inicia la biosíntesis de astaxantina con el isopentenil pirofosfato (IPP) (5C). El IPP es condensado con su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAP) para formar geranil pirofosfato (GPP) (C10). Consecutivas adiciones de IPP forman farnesil pirofosfato (FPP) (C15) y geranil geranil pirofosfato (GGPP) (C20). Dos de estas últimas moléculas son condensadas para producir fitoeno (C40) (carotenoide con ausencia de color) mediante el enzima fitoeno-βcaroteno sintasa (*crtYB*). La desaturación de este compuesto por el fitoeno desaturasa (*crtI*) conduce a la formación de licopeno (carotenoide rojo), cuya ciclación mediante fitoeno-βcaroteno sintasa produce β-caroteno (carotenoide naranja). Finalmente, el β-caroteno es oxidado a astaxantina por la adición de un grupo oxo e hidroxilo en la posición C4 y C3 respectivamente en cada anillo posicionado en los extremos de la molécula catalizado por el *crtS* (astaxantina sintasa) (Chávez, *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2015).

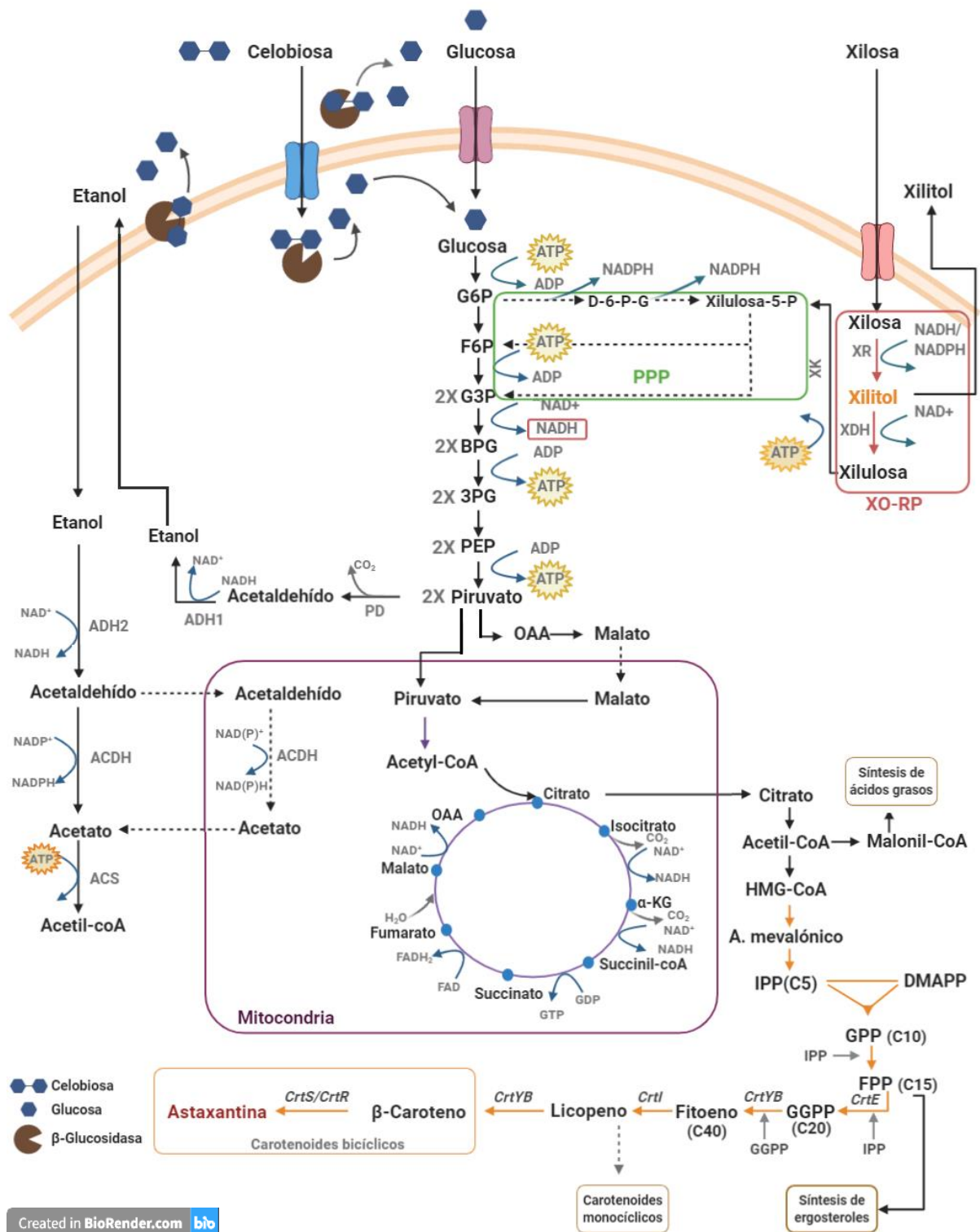


Figura 27. Producción de astaxantina a partir de sacarificados de bagazo de caña por *X. dendrorhous*. Adaptado de: Boubekeur *et al.*, (2001); Zhu & Jackson (2015); Portugal, (2017). Figura realizada por autor en <https://biorender.com/>

Abreviaturas de la figura 27. G6P: glucosa 6-fosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; G3P gliceraldehído 3-fosfato; BPG: 1,3-bifosfoglicerato; 3PG: 3-fosfoglicerato; PEP: fosfoenolpiruvato; OAA: oxaloacetato; α -KG: α -Cetoglutarato; HMG-coA: Hidroximetilglutaril-coA; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; GPP: geranil pirofosfato; GGPP: geranilgeranil pirofosfato; XR: xilosa reductasa; XDH: xilosa deshidrogenasa; XK: xilulosa quinasa; PPP: ruta de pentosas fosfato; XO-RP: ruta de oxido reducción de la xilosa; PD: piruvato descarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; ACDH: acetaldehído deshidrogenasa; ACS: acetil-coA sintetasa; *crtl*: fitoeno desaturasa; *crtS*: astaxantina sintasa; *crtYB*: fitoeno- β -caroteno sintasa; *crtE*: GGPP sintasa; *crtR*: citocromo p450 reductasa.

A diferencia de otras levaduras carotenogénicas como *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, *X. dendrorhous* es una levadura facultativa que produce etanol por fermentación de azúcares (Chávez, *et al.*, 2010). En condiciones anaeróbicas el flujo de carbono se dirige hacia el metabolismo fermentativo donde se obtienen cofactores oxidados y etanol a partir de piruvato (Portugal, 2017). No obstante, al ser la concentración de oxígeno un factor importante en el proceso de producción de astaxantina (carotenoide oxigenado), es posible que aún en condiciones aeróbicas se produzca etanol. En este escenario, concentraciones altas de glucosa en el medio (>0.15 g glucosa/L) aceleran la glucólisis generando altas cantidades de piruvato el cual no puede continuar su transformación en el ciclo de Krebs debido a que el complejo piruvato deshidrogenasa que cataliza la conversión de piruvato a acetil co-A en la mitocondria, es inhibido por las altas cantidades de ATP generadas en la glucólisis. Por tal motivo, el piruvato es dirigido a la producción de etanol en un fenómeno denominado efecto Crabtree (Portugal, 2017). En este caso, el flujo de carbono se dirige a la producción de etanol, iniciando con la acción del piruvato descarboxilasa sobre el piruvato obtenido de la glucólisis, generando como producto acetaldehído que posteriormente se convierte a etanol por el alcohol deshidrogenasa 1. Es importante destacar, que Hara *et al.*, (2014) evaluaron 13 promotores y determinaron que el promotor más fuerte en *X. dendrorhous* corresponde al del alcohol deshidrogenasa (*Padh4*) incluso con una expresión mayor al promotor de actina. Los altos niveles de expresión de *Padh4* puede ser una razón de la producción continua de etanol durante la síntesis de astaxantina por *X. dendrorhous* aun cuando se usan sustratos diferentes a glucosa. También se obtuvo una expresión considerable con *Phxt*, que corresponde a un transportador de

hexosas lo cual explica el exitoso consumo de glucosa cuando está presente en el medio de cultivo.

Así mismo, cuando las concentraciones de azúcar son reducidas y aumenta la concentración de oxígeno, tanto *X. dendrorhous* como *P. rhodozyma* (estado asexual) son capaces de consumir el etanol producido mediante su oxidación vía acetaldehído-acetato-acetil-coA (Chávez, *et al.*, 2010). El alcohol deshidrogenasa 2 dependiente de NAD⁺ oxida el etanol hacia acetaldehído. Este compuesto es posteriormente convertido a acetato por el acetaldehído deshidrogenasa (ACDH). Algunos estudios sugieren que esta última reacción puede ocurrir tanto en el citoplasma como en la mitocondria, proceso que puede ser influenciado por la relación NADP/NAD en la célula (Wang *et al.*, 1998). En levaduras como *S. cerevisiae* se han detectado dos ACDH, una con ubicación mitocondrial (reprimida por glucosa) la cual puede utilizar NAD⁺ y NADP⁺ como cofactor y es activada por K⁺, y otra ACDH citoplasmática que utiliza NADP⁺ y es activada por Mg²⁺ (Boubekeur *et al.*, 2001). Finalmente, el acetato es convertido a acetil-coA por la acetil-coA sintetasa la cual requiere ATP y una molécula de coA. No obstante, el NADH generado por el metabolismo del etanol aumenta la relación NADH/NAD⁺ lo cual también genera inhibición del ciclo de Krebs cuyos productos son principalmente NADH, FADH₂ y GTP. Lo anterior genera un bloqueo de la división celular y de la replicación permitiendo que el acetil-coA sea aprovechado como precursor de la síntesis de astaxantina (Chávez, *et al.*, 2010). Así mismo, la re-asimilación de etanol se ha asociado a la expresión de genes importantes en la producción de astaxantina: *crtYB* (fitoeno β caroteno-sintasa), *crtl* (fitoeno deshidrogenasa), y *crtS* (astaxantina sintasa), así como el incremento en la cantidad de carotenoides totales por promover la síntesis de novo (Chávez, *et al.*, 2010; Marcoleta *et al.*, 2011).

Es importante destacar, que la síntesis del metabolismo en general mencionado anteriormente fue estructurado a partir de lo reportado en diferentes estudios para levaduras, ya que la información específica de algunas rutas aún no ha sido bien establecida en *X. dendrorhous*.

6.3 Etapa 3. Mutagénesis aleatoria en *X. dendrorhous* R4

Con el objetivo de encontrar mutantes que asimilaran mejor la xilosa, uno de los principales azúcares presentes en sacarificados de bagazo de caña, se realizó una mutagénesis aleatoria con NTG sobre la mutante hiper productora de astaxantina *X. dendrorhous* R4.

Se seleccionaron y sembraron en MMX las colonias más grandes y con mayor coloración con respecto a la cepa sin mutagenizar. El medio de cultivo sólido contenía xilosa como presión de selección. Se observaron colonias aisladas en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de las cuales se aislaron 63 colonias de cada dilución. Las colonias seleccionadas fueron plaqueadas nuevamente en MMX para confirmar su crecimiento y realizar una selección de las colonias con crecimiento más rápido y abundante (Figura 28a). De las 126 colonias plaqueadas, se seleccionaron 3 de la dilución 10^{-2} y 6 de la dilución 10^{-3} y se sembraron en cajas con MMX por 7 días. De esta nueva resiembra se seleccionaron, por su mayor crecimiento y pigmentación, 2 colonias, provenientes de la dilución 10^{-2} . A estas colonias se les llamó R4-X18 y R4-X34 (Figura 28b). Las colonias seleccionadas de la dilución 10^{-3} fueron descartadas debido a un crecimiento lento y pobre (Figura 28c). Posteriormente se realizó una comparación entre las mutantes de *X. dendrorhous* R4, R4-X18 y R4-X34 en MMX sólido. Se seleccionó la mutante R4-X18 debido a que presentó mejor crecimiento y una coloración roja típica de la astaxantina en contraste con una coloración naranja de la mutante X34. Finalmente, las mutantes R4 y R4-X18 de *X. dendrorhous* se sembraron en placas de MMX y YPX, y se observó un mayor y rápido crecimiento en R4-X18 en comparación con su progenitora la cepa R4 en ambos medios (Figura 28d). Así mismo, se observó una mejor coloración de las dos cepas en MMX en comparación con YPX, posiblemente debido a un estrés celular por la limitada concentración de nutrientes lo que induce la producción de astaxantina. Debido a esto, se decidió evaluar el crecimiento de la mutante *X. dendrorhous* R4-X18 en medio líquido MMX con el fin de compararlo con sus cepas parental directa R4 y nativa.

Es importante destacar que la concentración de NTG y tiempo de exposición usados en el presente trabajo, son cercanos al promedio utilizado en diferentes trabajos previos, en los cuales se obtuvo con éxito mutantes de *X. dendrorhous* (Tabla 9). Se seleccionó una concentración de 100 µg/mL de NTG y 15 min de exposición, debido a que, a concentraciones y tiempos mayores, no se observó crecimiento de mutantes.

Tabla 9. Comparación entre concentraciones de NTG y tiempo de exposición en mutagénesis de *X. dendrorhous*

NTG (µg/mL)	Tiempo de exposición (min)	Fuente
200	30	Gassel <i>et al.</i> , (2013)
120	20	Barbachano <i>et al.</i> , (2014)
100	30	Hermosilla <i>et al.</i> , (2003)
100	30	Baeza <i>et al.</i> , (2009)
100	15	Presente trabajo

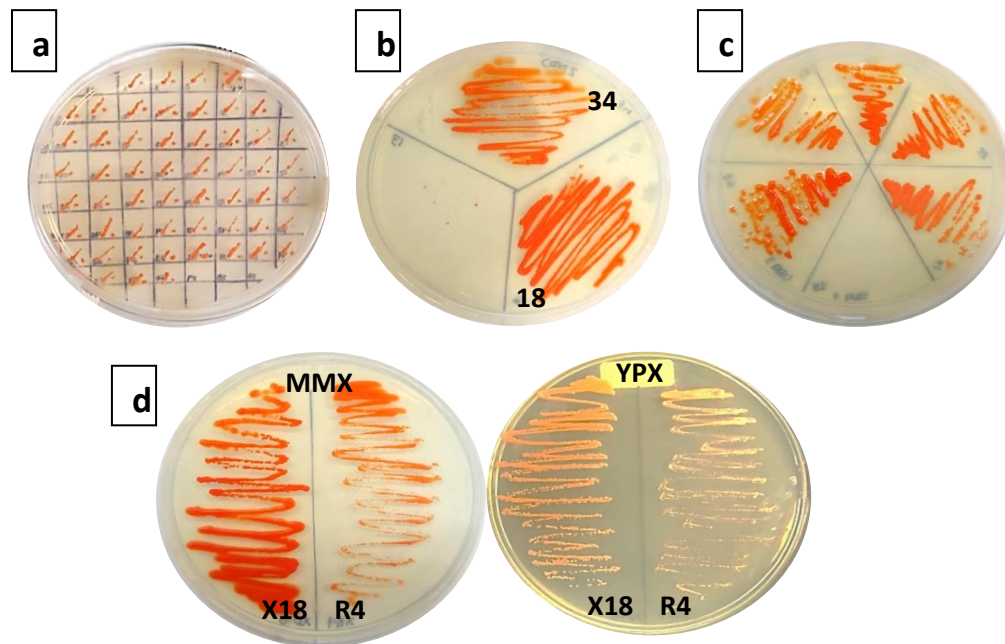


Figura 28. Mutantes de *X. dendrorhous* R4 que asimilan xilosa. a). Selección de mutantes en MMX. b). Mutantes R4-X18 y R4-X34 seleccionadas de la dilución 10^{-2} . c). Mutantes seleccionadas de la dilución 10^{-3} . d). Comparación del crecimiento de las mutantes R4-X18 (izquierda) y R4 (derecha) en MMX y YPX. Las imágenes fueron tomadas 20 días después de la siembra con el fin de obtener una mayor coloración que mejorase la visualización de las mutantes.

6.3.1 Cinéticas de crecimiento de cepas de *X. dendrorhous* nativa, y mutantes en medio mínimo con diferentes sustratos

El crecimiento celular de la cepa nativa de *X. dendrorhous*, su mutante R4 hiper productora de astaxantina y la doble mutante R4-X18 se evaluó en diversas fuentes de carbono (glucosa, celobiosa, xilosa) con el fin de comparar el efecto de estos azúcares en la producción de astaxantina. Los cultivos se realizaron en medio mínimo con el fin de evitar interferencias de otros componentes contenidos en el medio rico YP. Los azúcares evaluados (glucosa, xilosa y celobiosa) hacen parte de la composición principal de sacarificados de residuos lignocelulósicos y se usaron a una concentración del 1%. Así mismo se evaluaron dos sacarificados SBC2.5 y SBC10 los cuales difieren en la concentración y composición de azúcares, con el fin de determinar cuál tiene mayor efecto en la producción de astaxantina (Tabla 10). Los SBC fueron

suplementados con medio mínimo. El SBC2.5 fue obtenido con menor cantidad de enzima (100 EGU/g) y posee menor cantidad de azúcares totales (2.5 g/L), sin embargo, posee celobiosa en su composición. El SBC10 fue obtenido con mayor concentración de enzima (2000 EGU/g), y la concentración total de azúcares aumenta 2.4 veces, pero no posee celobiosa en su composición, disacárido que ha demostrado inducir la producción de astaxantina. Las condiciones del proceso de sacarificación se mantuvieron en 12 h, a 55 °C y 150 rpm.

Tabla 10. Composición de sacarificados SBC2.5 y SBC10

% Azúcar	SBC2.5	SBC10
Celobiosa	10.3	0
Glucosa	41.8	64.8
Xilosa	31.2	30.2
Arabinosa	16.6	4.9
Azúcares totales (g/L)	2.5	10

6.3.1.1 Crecimiento celular de *X. dendrorhous* nativa, y mutantes en medio mínimo con diferentes sustratos

Debido a que las mutaciones aleatorias pueden afectar el crecimiento de las mutantes con respecto a su cepa parental, se evaluó el crecimiento celular de la doble mutante (R4-X18), su cepa parental R4, y la cepa nativa de *X. dendrorhous* en diferentes fuentes de carbono con el fin de comparar el crecimiento y producción de astaxantina. En la figura 29a, se observa un mayor crecimiento de la cepa nativa en medios con SBC10 (DO 13 ± 1), seguido de aquellos que contenían celobiosa y glucosa los cuales alcanzaron una densidad óptica a 660nm similar (DO 6.5 ± 0.06). Seguidamente se obtuvo una DO de 3.7 ± 0.2 con SBC2.5 y un crecimiento deficiente con xilosa. Por otro lado, en la figura 29b, se observa que la mutante R4 creció mejor en los dos sacarificados con respecto a los cultivos con azúcares puros. En resultados anteriores se ha demostrado que la mezcla de azúcares favorece el crecimiento de esta mutante (R4), sin embargo, la mayor concentración de azúcares en el SBC10 aumentó el crecimiento 2.5 veces con respecto a SBC2.5. El comportamiento en el consumo de azúcares puros por la mutante R4 coinciden con las cinéticas en medio rico

presentadas en resultados anteriores en este trabajo. Después de los sacarificados, la mayor densidad óptica se obtuvo con celobiosa, seguido de glucosa y finalmente xilosa, con disminución de 2.9, 4.7, y 10.7 veces respectivamente, en comparación con SBC10. La figura 29c, corresponde al crecimiento de la doble mutante R4-X18, observándose al igual que la mutante R4 y la nativa, que el mayor crecimiento a las 96 h se obtuvo con el SBC10 con una densidad óptica de 12.3 ± 0.08 . El segundo sustrato que produjo mayor crecimiento fue la celobiosa (5.22 ± 0.08), seguido de SBC2.5 (3.39 ± 0.04), glucosa (3.16 ± 0.1), y xilosa (2.7 ± 0.4). Es importante destacar que la producción de biomasa por R4-X18 en xilosa como fuente de carbono aumentó 2.13 y 9.47 veces con respecto a la mutante R4 y nativa cultivada en esta pentosa respectivamente. De igual forma, se observa una disminución en la fase de adaptación en la doble mutante R4-X18 correspondiente a 12 h para la mayoría de los sustratos evaluados, con respecto a la cepa nativa y R4 cuya adaptación se extiende hasta las 24 h. La producción global de biomasa muestra de forma más clara un aumento de crecimiento en xilosa en la mutante R4-X18 en comparación con la cepa nativa, y R4 (figura 29 d). Así mismo, se puede observar que la cepa R4 presenta un aumento en el consumo de xilosa con respecto a la nativa, y esta capacidad se refuerza en la doble mutante R4-X18. Por otro lado, el mayor crecimiento y producción de biomasa (biomasa final menos biomasa inicial) se observó cuando las tres cepas usaron el SBC10 como sustrato, el cual contiene mayor proporción de azúcares totales (10 g/L) con respecto al SBC2.5 (2.5 g/L).

En estudios presentados anteriormente se observó que la mayor producción de biomasa se obtuvo usando SBC (DO 15.2 ± 0.4), seguido por celobiosa (DO 11.6 ± 0.06) y mezcla de azúcares los cuales resultaron favorables para el crecimiento *X. dendrorhous* R4, obteniendo un crecimiento celular de 11.6 ± 0.1 unidades de densidad óptica. En las cinéticas de crecimiento de la cepa nativa y mutantes de *X. dendrorhous* hubo menor producción de biomasa debido a que se usó un medio mínimo cuya fuente de nitrógeno es un factor limitante en el crecimiento. Sin embargo, la producción de biomasa continúa siendo mayor en cultivos con SBC, lo cual confirma que el uso de SBC ricos en glucosa y xilosa son un sustrato potencial para el cultivo de *X. dendrorhous*. Stoklosa *et al.*, (2019), reportan mayor crecimiento (10.2 g/L) de

P. rhodozyma en glucosa como fuente de carbono, en comparación con xilosa y arabinosa. El cultivo con 20 g/L de xilosa obtuvo menor biomasa con sólo 3.4 g/L, lo cual afirma la dificultad tanto de *X. dendrorhous* como de *P. rhodozyma* en la asimilación de esta pentosa. En la figura 30 se presenta una comparación del crecimiento de las cepas nativa, R4 y R4-X18 de *X. dendrorhous* creciendo en medio mínimo con xilosa al 1%. La mutante R4-X18 presentó un crecimiento más rápido con respecto a su cepa parental la mutante R4. Como se observó en la figura 29a, la cepa nativa de *X. dendrorhous* tiene un crecimiento deficiente en xilosa, motivo por el cual se observa ausencia de su crecimiento en medio sólido.

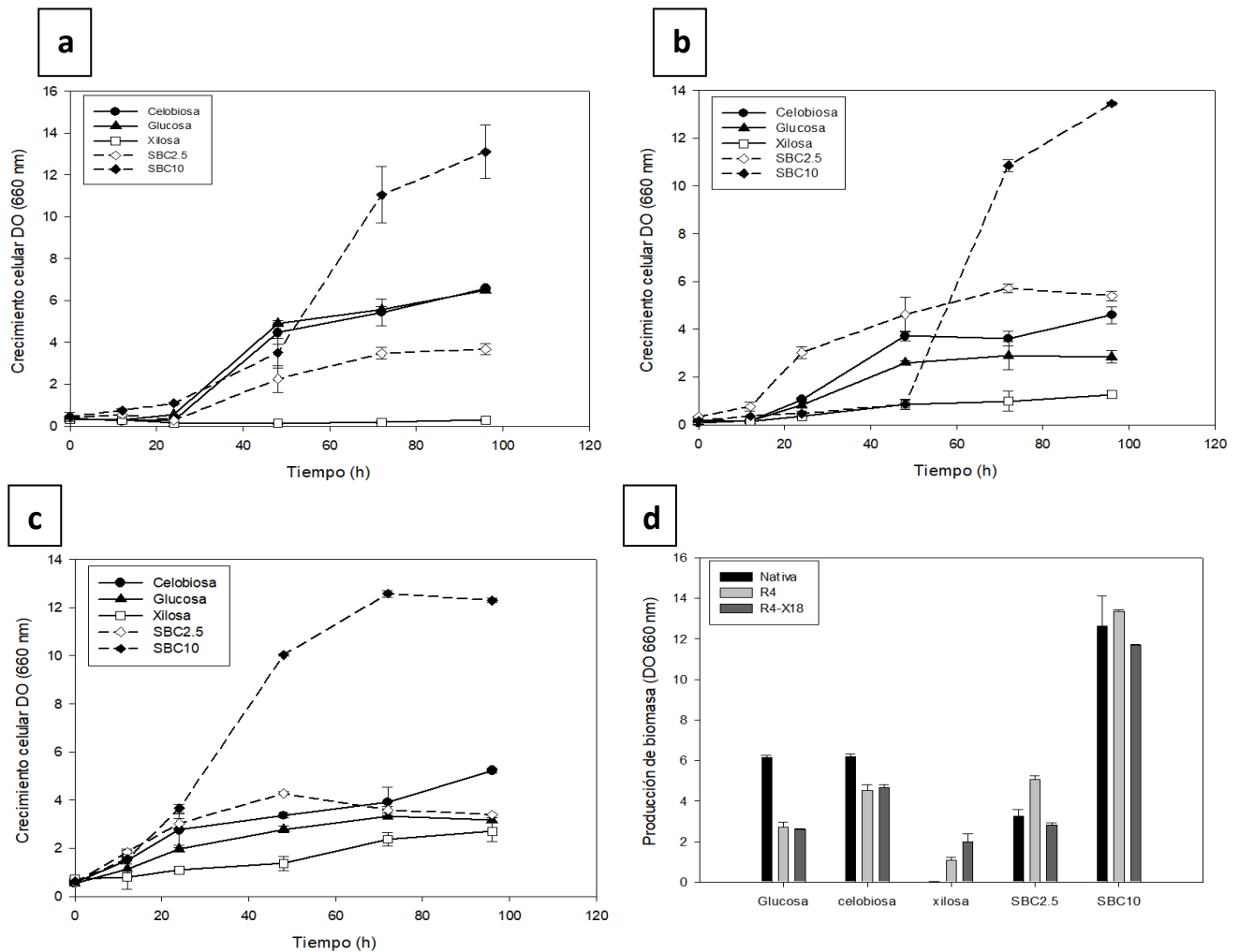


Figura 29. Crecimiento celular de *X. dendrorhous*: a) cepa nativa, b) mutante R4, c) mutante R4-X18 d) Comparación en la producción global de biomasa de las tres cepas evaluadas. (●): celobiosia, (▲): glucosa, (□): xilosa, (◇): SBC2.5, (◆): SBC10.

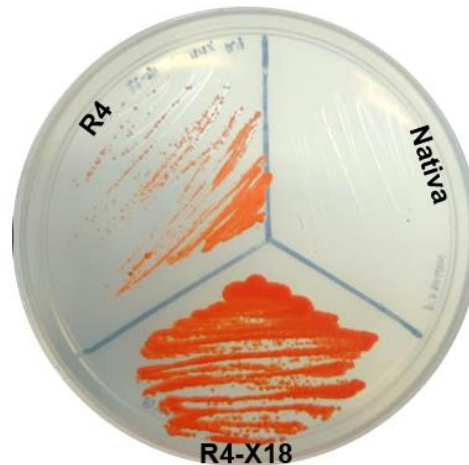


Figura 30. Crecimiento en placa de la cepa nativa, R4 y R4-X18 de *X. dendrorhous* en medio mínimo con xilosa al 1 %.

6.3.1.2 Consumo de diversos sustratos por *X. dendrorhous* nativa, y mutantes

Por otro lado, se determinó el perfil de consumo de los diversos sustratos en las mutantes evaluadas. El consumo de azúcares de los SBC2.5 y SBC10 se analizaron y graficaron como azúcares totales. La cepa nativa de *X. dendrorhous* consumió casi en su totalidad la glucosa, celobiosa y azúcares del SBC2.5 y SBC10. La xilosa sólo se consumió en un 30 % (Figura 31 a).

La mutante R4 presentó un consumo de azúcares más lento con respecto a la nativa, consumiendo aproximadamente solo un 40 % de glucosa, celobiosa y xilosa a las 96 h. Así mismo se observó que de los tres azúcares puros, la celobiosa es el azúcar que se consume más lento por la mutante R4, lo cual resulta benéfico debido a complejos procesos de regulación de la ruta de astaxantina por parte del producto de la hidrólisis de celobiosa (glucosa). De igual forma, se observa que la estrategia del consumo lento de este disacárido se obtuvo en la mutante R4, ya que su cepa parental (nativa) si tiene la capacidad de consumir el 94 % de la celobiosa en 96 h. Por otro lado, la mutante R4 consumió en su totalidad el SBC2.5 a las 48 h, y el SBC10 en un 90.6 % a las 96 h (Figura 31b).

El consumo de azúcares por la mutante R4-X18 fue de 31.7, 41.7 y 38.7 % para celobiosa, glucosa y xilosa respectivamente. El consumo de SBC10 fue mayor en la mutante R4-X18 en comparación con R4, consumiéndose el 100 y 90.5% respectivamente a las 96 h (Figura 31 c).

Una estrategia para mejorar el consumo de sustrato sería la suplementación del medio con mayor fuente de nitrógeno, o el uso de sacarificados suplementados con medio mínimo enriquecido con extracto de levadura. No obstante, la presencia de compuestos secundarios producto de la degradación de la biomasa lignocelulósica puede favorecer el consumo y crecimiento de *X. dendrorhous*, ya que, aunque los SBC están suplementados con un medio mínimo, los azúcares pueden consumirse en su totalidad a diferencia de los cultivos con sustratos puros. Ésta mejora de consumo por el uso de sacarificados se puede comprobar en la figura 31 en la cual la cepa nativa y las mutantes R4 y R4-X18 son capaces de asimilar casi el 100 % de los azúcares iniciales del SBC10 aún con la baja concentración de nutrientes que aporta el medio mínimo. Stocklosa *et al.*, (2019) reportan un consumo del 50 % de xilosa a las 96 h y del 75 % a las 168 h, en comparación de un consumo del 100 % de glucosa a las 72 h y de 100 % a las 96 h para arabinosa en *P. rhodozyma*. Esto indica que la asimilación de xilosa es lenta para este tipo de levaduras, posiblemente debido a un desbalance de cofactores que no permite la transformación completa de xilosa a xilulosa 5 fosfato impidiendo que se incorpore a las rutas metabólicas (ruta de las pentosas fosfato) (Manjarres *et al.*, 2016, Núñez, 2017).

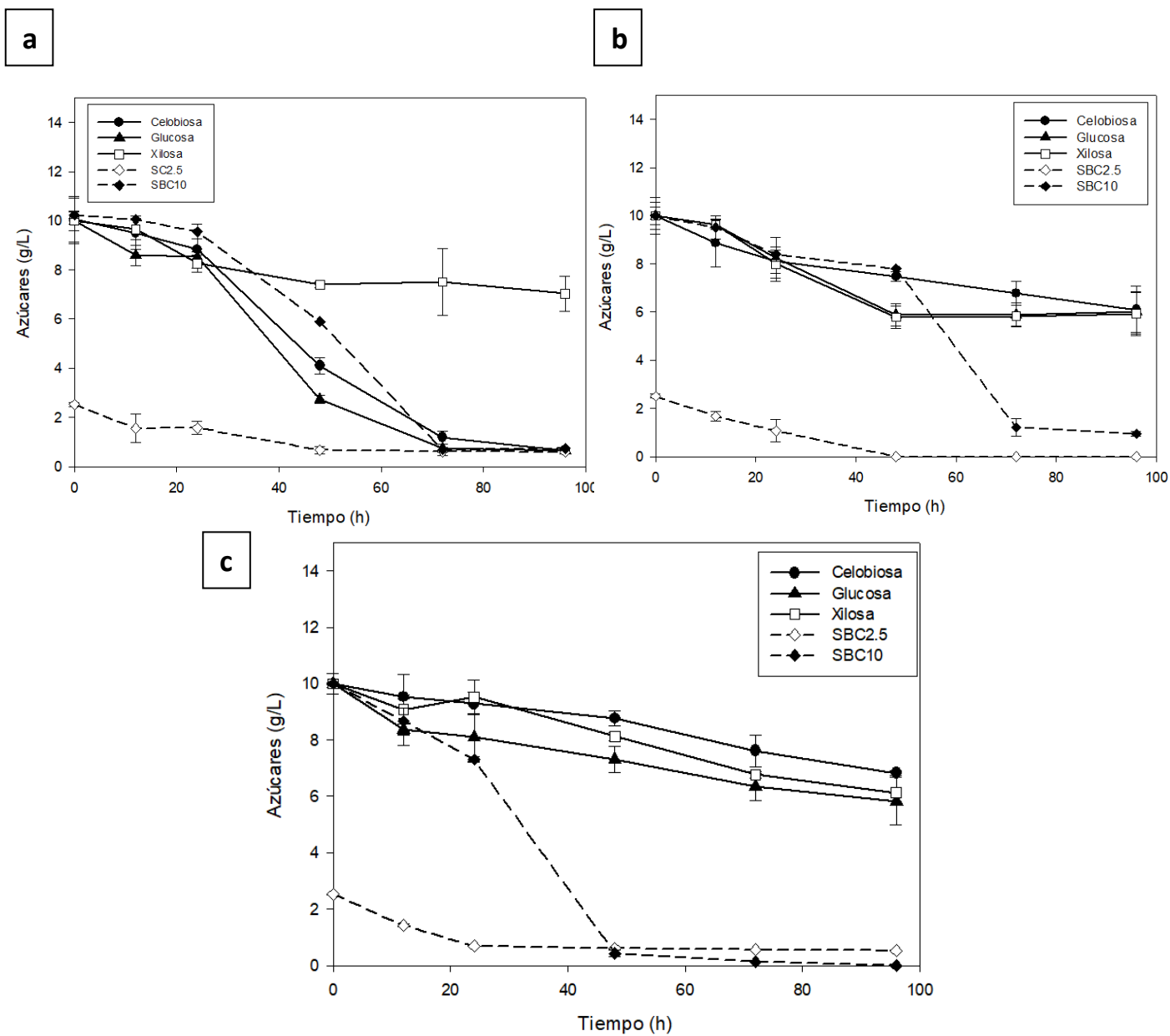


Figura 31. Consumo de sustratos por: a). cepa nativa, b), mutante R4, c) mutante R4-X18, de *X. dendrorhous*. (●): celobiosa, (▲): glucosa, (□): xilosa, (◇): SBC2.5, (◆): SBC10.

6.3.1.3 Producción de carotenoides totales y astaxantina por *X. dendrorhous* nativa, y mutantes en medio mínimo con diferentes sustratos

Se determinó la producción de astaxantina al finalizar el cultivo con el fin de comparar la mutante R4-X18 con su parental R4 y nativa. La producción de astaxantina fue mayor en las mutantes R4 y R4-X18 en todos los sustratos evaluados con respecto a la nativa, obteniéndose la mayor producción con el SBC10 (Figura 32). El incremento de astaxantina en cultivos con SBC10 es debido posiblemente a la disminución de la represión que ejercen algunos azúcares como la glucosa cuando están en altas concentraciones. De igual forma, la coasimilación de glucosa, xilosa y celobiosa presentes en los sacarificados favorecen el crecimiento y producción de astaxantina como se ha observado en los resultados anteriores. La mutante R4-X18 presentó una producción de astaxantina similar a R4 en cultivos con glucosa y celobiosa. No obstante, se observa que la mutante R4-X18 presenta un aumento de la producción de astaxantina de 1.73 y del 2.07 veces en cultivos con xilosa y SBC10 respectivamente, en contraste con lo obtenido con la mutante R4 para estos mismos cultivos. Lo anterior permite evidenciar que la mutante R4-X18 tiene una mejor asimilación de la xilosa para la producción de astaxantina con respecto a su cepa parental R4, ya que su producción aumentó tanto en cultivos con xilosa como en SBC10 cuya composición posee un 30 % de esta pentosa. En la tabla 11, se observa que la producción de astaxantina por la cepa nativa de *X. dendrorhous* fue menor en todos los carbohidratos evaluados en comparación con la mutante R4 y R4-X18. Así mismo, el rendimiento de producto con respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) en la mutante R4-X18 fue más alto en cultivos con xilosa, y el rendimiento de producto con respecto a sustrato ($Y_{p/s}$) fue más alto en SBC2.5, en comparación a otras fuentes de carbono (Tabla 11). Sin embargo, es importante destacar que la producción de astaxantina en las tres cepas evaluadas fue superior en cultivos con SBC10, siendo la mutante R4-X18 la que presentó valores más altos de astaxantina, siendo 2.1 y 2.5 veces mayor con respecto a R4 y nativa respectivamente. La mayor producción de carotenoides puede ser debido a que la levadura consumió casi por completo los azúcares en los sacarificados. Lodato *et al.*, (2007) reportan que en *X. dendrorhous* el mayor consumo

de sustrato coincide con la inducción de biosíntesis de pigmentos. Esto concuerda con Marcoleta *et al.*, (2011) quien establece que una vez consumida la fuente de carbono, especialmente la glucosa, aumenta la expresión de genes carotenogénicos permitiendo así aumentar la producción de astaxantina. Incluso, comprobó que en mutantes de *X. dendrorhous* incapaces de producir astaxantina no existió represión por glucosa, lo que sugiere que la incapacidad para sintetizar astaxantina causa la desregulación de un número significativo de genes involucrado en las últimas etapas de la ruta metabólica, disminuyendo la represión por glucosa. Por tanto, es posible que existan más procesos de regulación de la ruta de astaxantina en *X. dendrorhous* que aún son desconocidos. Finalmente, se confirma que la xilosa es un sustrato importante en la producción de astaxantina, y así mismo, el SBC10 (con 30% de xilosa) sigue siendo el mejor sustrato en la producción de biomasa y astaxantina, y se espera que al realizar los cultivos a escala de biorreactor la producción mejore debido a un aumento en la transferencia de oxígeno y masa entre célula y sustrato cuando se realiza en biorreactores.

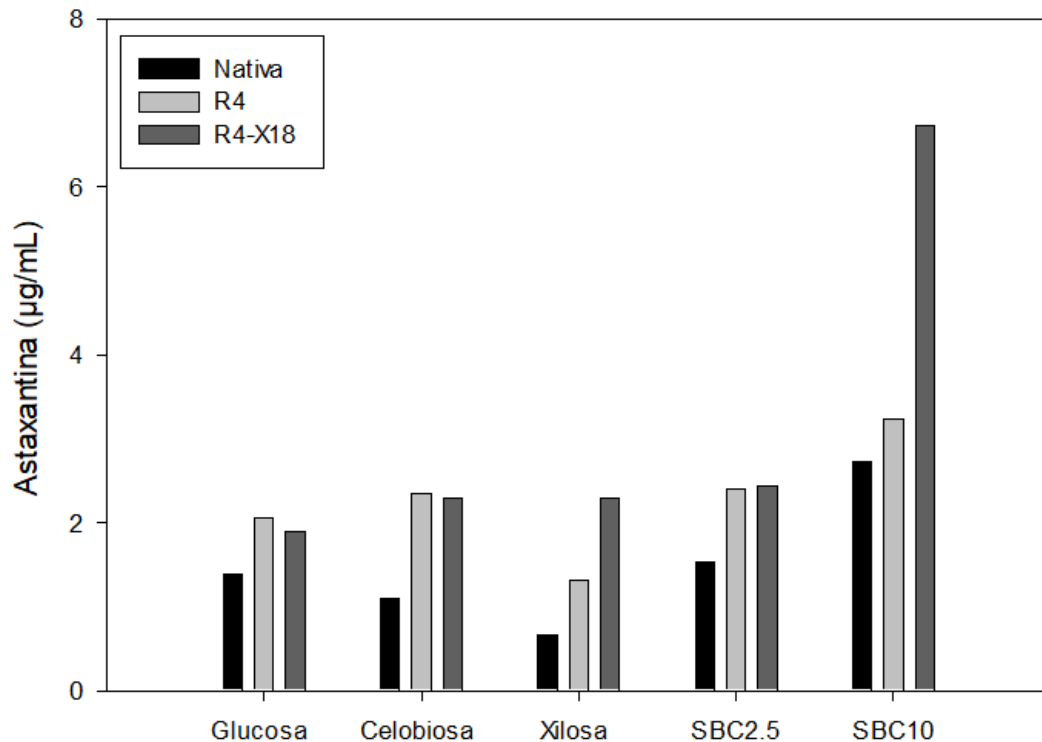


Figura 32. Producción de astaxantina por las cepas nativa, R4 y R-X18 de *X. dendrorhous* en diferentes sustratos

Tabla 11. Parámetros cinéticos de cepas de *X. dendrorhous* con diferentes fuentes de carbono

	Nativa			R4			R4-X18		
	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$	P	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$	P	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$	P
Glucosa	0.48	0.15	1.39	1.77	0.51	2.07	1.59	0.45	1.9
Celobiosa	0.38	0.12	1.09	1.15	0.59	2.34	1.06	0.72	2.3
Xilosa	-	-	0.67	3.20	0.32	1.32	2.70	0.59	2.29
SBC2.5	1.02	0.79	1.54	1.01	0.96	2.40	1.88	1.21	2.43
SBC10	0.46	0.28	2.73	0.79	0.35	3.24	1.20	0.67	6.72

* $Y_{p/x}$: rendimiento de producto con respecto a biomasa (mg/g); $Y_{p/s}$: rendimiento de producto con respecto a sustrato (mg/g); P: astaxantina ($\mu\text{g/mL}$)

6.3.2 Determinación de la estabilidad de la mutante R4-X18

Con el fin de determinar la estabilidad de la mutación cuando se elimina la presión de selección, se evaluó el crecimiento en medio mínimo con xilosa de la mutante R4-X18 partiendo de dos inóculos diferentes, uno que procedía de medio YPX (R4-X18X) y otro de medio YPD (R4-X18G). En la figura 33 se puede observar que la mayor producción de biomasa se obtuvo con la mutante R4-X18 procedente del inóculo con xilosa, cuyo crecimiento fue 1.72 veces mayor que cuando la cepa provenía de un inóculo con glucosa. Esto puede indicar que existe cierta inestabilidad en la mutación y resulta adecuado mantener la mutante R4-X18 en xilosa para evitar que pueda haber una reversión de la mutación hacia el fenotipo parental. El consumo de sustrato en la cepa R4-X18G llegó a un valor constante a las 48 h, sin embargo, la cepa R4-X18X mostró un consumo continuo con tendencia a continuar agotando el sustrato después de las 96 h (Figura 33). Por otro lado, se evaluó la producción de astaxantina a las 96 h. La producción de este pigmento fue mayor en la mutante R4-X18X con respecto a

la cepa R4-X18G, reportando valores de 1.24 µg/mL y 0.92 µg/mL respectivamente. Es importante destacar que como se ha observado en el presente trabajo, la glucosa ejerce una represión en la ruta de carotenoides en la mutante R4. Además de esto, otro factor que puede influir en la estabilidad de las mutaciones es el número de cromosomas que poseen esta alteración. Debido a lo anterior diversos autores han estudiado el nivel de ploidía en *X. dendrorhous*, sin embargo, los resultados son discrepantes (Hermosilla *et al.*, 2003; García 2012; Pollman *et al.*, 2017b). Hermosilla *et al.*, (2003), comprobaron que la cepa ATCC 2430 (UDC 67-385) de *X. dendrorhous* es diploide, mediante una técnica que consistía en mutar con NTG a *X. dendrorhous* y posteriormente forzarla a revertir su mutación, permitiendo volver al fenotipo de la cepa silvestre con éxito. Lo anterior sugiere que las mutaciones aleatorias en cepas diploides pueden realizarse en solo un cromosoma permitiendo que esta sea revertida por recombinación homóloga. De este modo, Yamamoto *et al.*, (2016), también presentan una estrategia para la modificación de *X. dendrorhous*, basado en el “knockout” del gen *CYP61* para inhibir la síntesis de ergosterol introduciendo en su lugar la resistencia a un antibiótico. Debido al estado diploide de *X. dendrorhous* Yamamoto *et al.*, (2016) estiman que es posible que uno de los cromosomas obtuviera la resistencia por recombinación homóloga, pero el otro podría continuar sin modificarse. Con el fin de hacer una presión para un doble “knockout”, los autores proponen pases en cultivos con un aumento gradual en la concentración de antibiótico, para inducir una recombinación homóloga doble, y así eliminar el riesgo de reversión de mutaciones. No obstante, Fay *et al.*, (2019) reportan incluso poliploída en levaduras del tipo *Saccharomyces*, lo cual puede abrir la posibilidad de que este fenómeno se presente en otras levaduras como *X. dendrorhous*, cuya ploidía aún continúa siendo incierta.

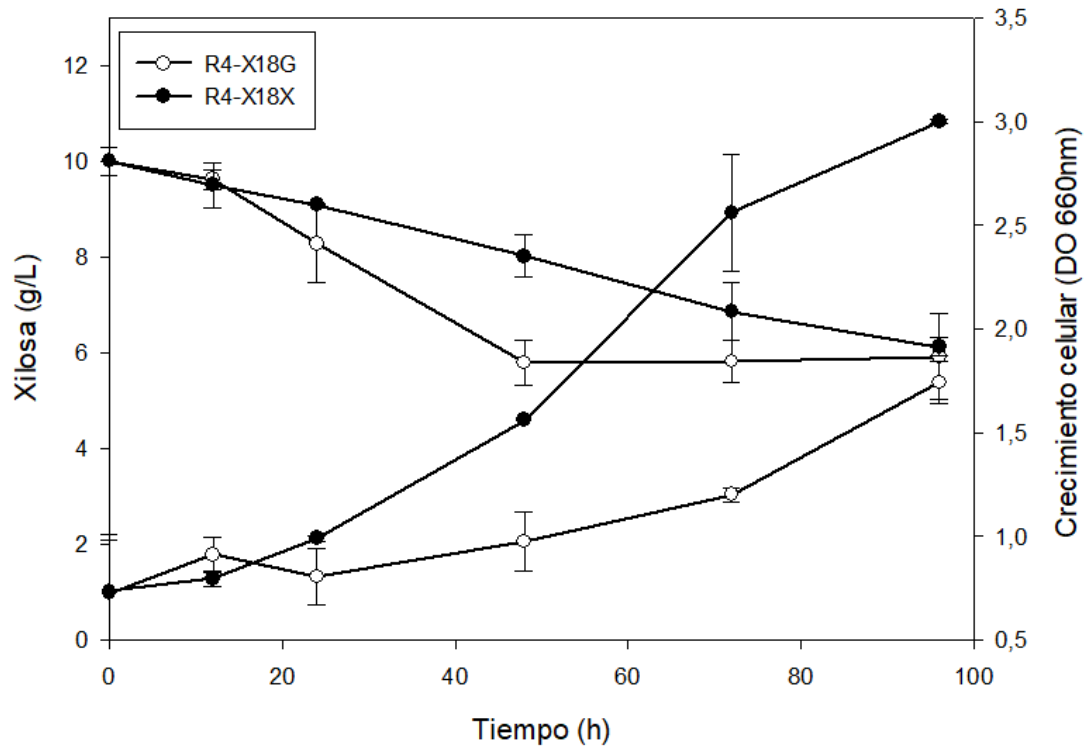


Figura 33. Crecimiento celular y consumo de xilosa por las cepas R4-X18G y R4-X18X. (●) R4-X18X, (○) R4-X18G

6.3.3 Comparación de cinéticas de crecimiento en biorreactor de la mutante R4 y R4-X18 de *X. dendrorhous* en SBC como sustrato

En resultados anteriores se presentó la cinética de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 en SBC como sustrato, sin embargo, la concentración inicial fue de 6.6 g/L de azúcares totales (glucosa y xilosa). Por tal motivo, en el presente apartado se evaluó el crecimiento de las mutantes R4 y R4-X18 en SBC10 (10 g/L de azúcares totales). Los SBC10 fueron complementados con medio mínimo Breus enriquecido en extracto de levadura con el fin de mejorar la producción de biomasa mediante el aumento de la fuente de nitrógeno. La adición del inóculo y nutrientes del medio mínimo redujo la concentración de azúcares totales iniciales a 9.5 g/L (64.8 % glucosa y 30.2 % xilosa). Los cultivos se llevaron a cabo en biorreactores con volumen de trabajo de 400 mL, 0.5 vvm, 20 °C y 600 rpm.

Las dos mutantes presentaron un crecimiento similar llegando a una densidad máxima de 16.5 (660nm) a las 108 h. Para las dos cepas, la fase de adaptación fue de 24 h, seguida de una fase exponencial hasta las 60 h donde inició la fase estacionaria (figura 34). Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento fue superior en la mutante R4-X18 con 0.059 h^{-1} , en comparación con la mutante R4 (0.054 h^{-1}) y en todas las fuentes de carbono evaluadas anteriormente (Tabla 5 y 12). De este modo, la mutante R4-X18 tuvo el menor tiempo de duplicación (11.7 h) en comparación con la mutante R4 en SBC10 (12.8 h) y sustratos puros (Tabla 5 y 12). Lo anterior permite comprender que la mutante R4-X18 posee una mejor asimilación de la xilosa, por lo cual crece más rápido en este azúcar en comparación con la mutante R4.

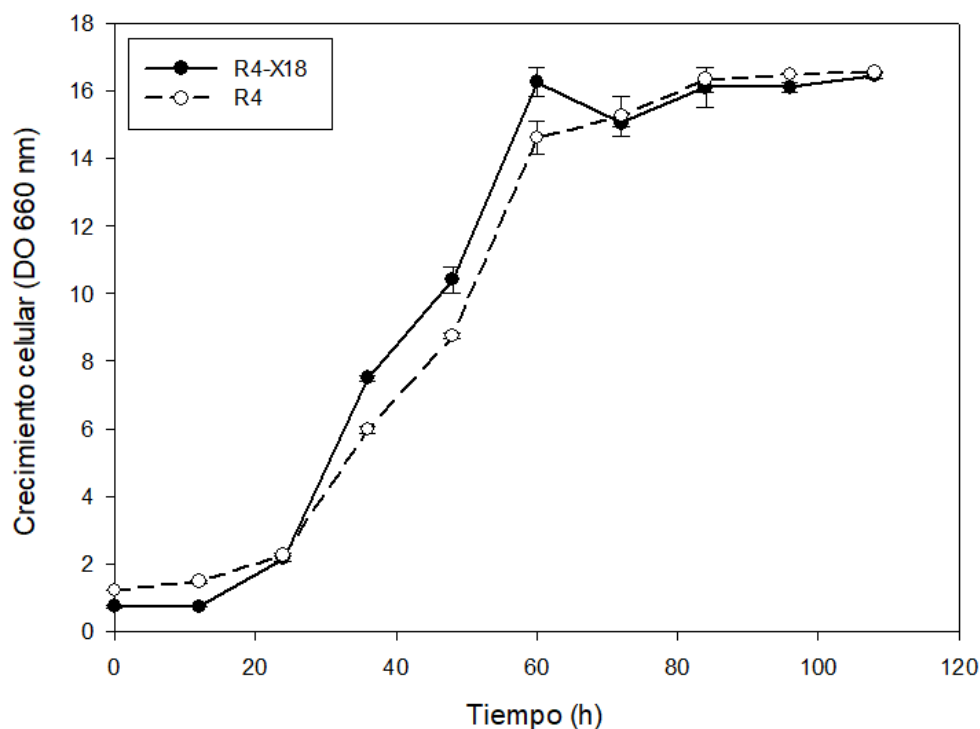


Figura 34 Crecimiento celular de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en SBC10 como sustrato. (●) R4-X18, (○) R4

Se cuantificó el consumo de azúcares reductores totales para las mutantes R4 y R4-X18 implementando SBC10 como sustrato. El consumo de sustrato en las dos mutantes tuvo un comportamiento similar, consumiendo un 93 % a las 60 horas y 96 % a las 108 h para las dos cepas. Este comportamiento nos indica que la mutación

que posee la cepa R4-X18 no está relacionada con el consumo de xilosa o la incorporación de este azúcar a la célula, sino posiblemente a su metabolismo intracelular.

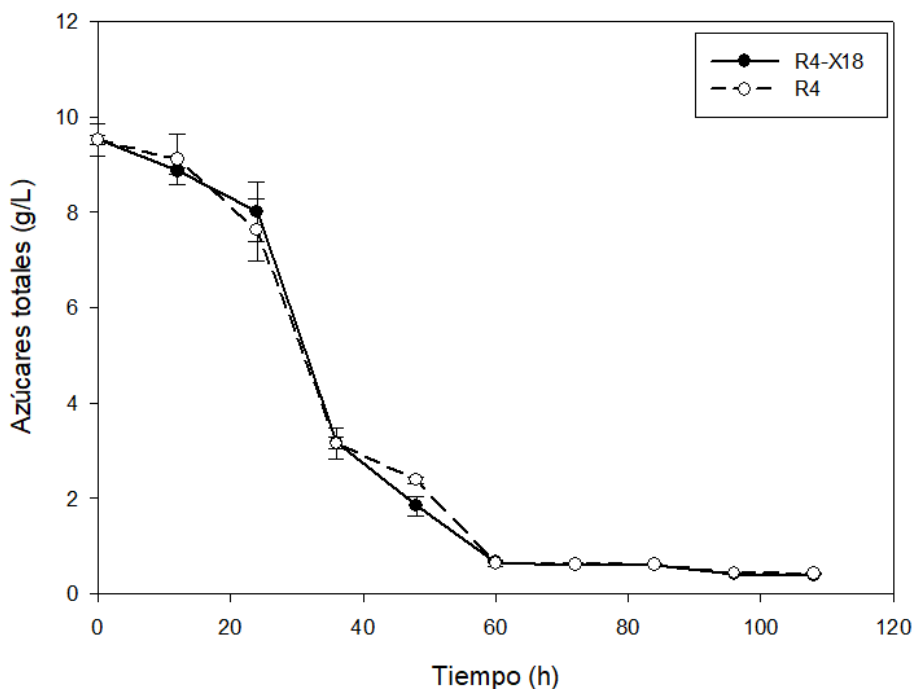


Figura 35. Consumo de azúcares totales del SBC10 por *X. dendrorhous* (○) R4 y (●) R4 X18.

Respecto a la concentración de carotenoides totales por gramo de biomasa, y la producción de astaxantina en las mutantes R4 y R4-X18 creciendo en sacarificados de bagazo de caña, la mutante R4-X18 presentó mayor producción de carotenoides totales con respecto a R4. La mayor producción de estos pigmentos fue a las 96 h para la mutante R4-X18 (340 $\mu\text{g/g}$ biomasa seca) donde disminuyó la producción hasta el valor máximo de la cepa R4 a las 108 h (329 $\mu\text{g/g}$ biomasa seca) (Figura 36). La producción de astaxantina de la mutante R4-X18 aumentó un 45.3 % a las 96 h con respecto a la mutante R4 a esta misma hora (Tabla 12). Así mismo, es importante destacar que la concentración de astaxantina producida por la mutante R4-X18 ha sido la más alta en el presente trabajo. Incluso fue 24.5 % superior a la obtenida en cultivos con celobiosa, la cual había presentado un mejor efecto en la producción de

astaxantina en *X. dendrorhous* R4 respecto a otros sustratos. Así mismo, la productividad de astaxantina (Q_A), rendimiento de producto con respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) y rendimiento de producto con respecto a sustrato ($Y_{p/s}$) aumentaron un 45 % en la mutante R4-X18 en comparación con la mutante R4 en SBC10. Por otro lado, el aumento de la producción de astaxantina y biomasa en la mutante R4-X18 sin modificar la velocidad de consumo de la xilosa con respecto a R4, indica que pudo presentar una mutación a nivel de la ruta de oxidación-reducción de la xilosa, la cual era el punto crítico en la asimilación de esta pentosa y/o directamente en la ruta de síntesis de carotenoides.

Stoklosa *et al.*, (2019), reportan un valor superior de astaxantina (9.55 $\mu\text{g/mL}$) para *X. dendrorhous* creciendo en hidrolizados de bagazo de sorgo dulce sin desintoxicación con una concentración inicial de azúcares totales de 87 g/L (aproximadamente). Sin embargo, reporta valores de Q_A , $Y_{p/x}$ y $Y_{p/s}$ de 0.057 $\mu\text{g/mL/h}$, 0.61 mg/g, 0.21 mg/g respectivamente, siendo estos inferiores a los reportados en el presente trabajo para la mutante R4-X18 (Tabla 12).

Por otro lado, la producción de astaxantina de la mutante R4-X18 (7.66 $\mu\text{g/mL} \pm 0.3$) fue superior a lo reportado por Harith, (2019) en cultivos con *X. dendrorhous* en hidrolizados de harina de colza (6.7 $\mu\text{g/mL}$), y el uso de hidrolizados de madera de eucalipto (1.75 $\mu\text{g/mL}$) reportados por Cruz & Parajó (1998) para esta misma levadura. Así mismo, Montani *et al.*, (2011), reporta valores inferiores de astaxantina (reportada como carotenoides) de 2.56 y 2.99 $\mu\text{g/mL}$ por la mutante JTM 185 de *Phaffia rhodozyma* creciendo en hidrolizados de bagazo de caña y paja de cebada respectivamente.

Con base en los resultados positivos obtenidos en el presente trabajo, el uso de la mutante R4-X18 y de sacarificados de bagazo de caña ricos en glucosa y xilosa, permitirán obtener mayores rendimientos de astaxantina y disminuir los costos de producción al utilizar un sustrato renovable que promueve el desarrollo sostenible convirtiendo la industria de los pigmentos en un proceso más amigable con el ambiente

y con mayor productividad, concediéndole ventaja comercial a la astaxantina natural frente a la astaxantina sintética.

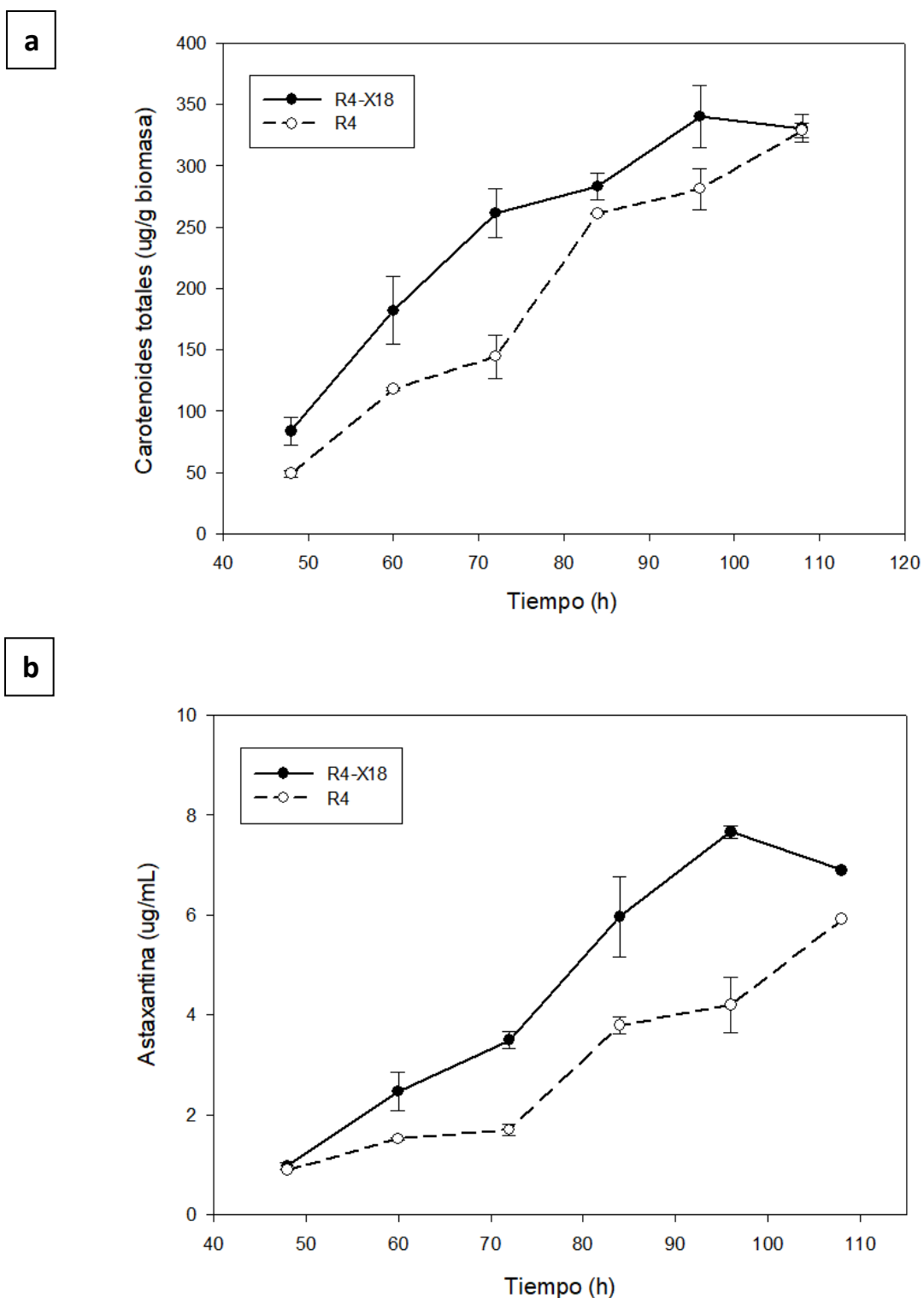


Figura 36. (a) Producción de carotenoides totales y (b) astaxantina por las mutantes R4-X18 y R4 de *X. dendrorhous* en SBC10 como sustrato. (●) R4-X18, (○) R4.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de las mutantes R4-X18 y R4 de *X. dendrorhous* en cultivos de biorreactor con SBC10 como sustrato.

Cepa	μ (h ⁻¹)	td (h)	P ($\mu\text{g/mL}$)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{p/s}$ (mg/g)	Q_A (mgL ⁻¹ h ⁻¹)
<i>X. dendrorhous</i> R4-X18	0.059	11.73	7.66	1.05	0.84	0.079
<i>X. dendrorhous</i> R4	0.054	12.86	4.19	0.57	0.46	0.043

μ : Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹), td: Tiempo de duplicación (h), P: Producto (astaxantina $\mu\text{g/mL}$), Y: Rendimiento (mg/g), X: Biomasa, S: sustrato, Q_A : productividad de astaxantina (mgL⁻¹h⁻¹). Los rendimientos se determinaron de forma global a las 96 h

7. CONCLUSIÓN

La sacarificación enzimática de bagazo de caña permite obtener hasta un 68 % de conversión de la fracción de holocelulosa en azúcares fermentables totales, cuya composición rica en glucosa (65 %) y xilosa (30 %) puede ser utilizada como sustrato por *X. dendrorhous* en la producción de astaxantina.

Xanthophyllomyces dendrorhous R4 tuvo la capacidad de asimilar al 100% glucosa, celobiosa y xilosa, como sustratos puros y en mezcla en proporción 1:1:1 para el crecimiento y la producción de astaxantina. Así mismo, se comprobó que es posible la coasimilación de xilosa y celobiosa cuando existe una mezcla de estos sustratos.

La celobiosa y xilosa como sustratos puros favorecieron la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* R4, obteniendo valores máximos de 5.8 y 4.5 µg/mL respectivamente. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento en estos sustratos es 1.2 y 2.65 veces inferior respectivamente a la obtenida en glucosa.

Xanthophyllomyces dendrorhous R4 presentó actividad β-glucosidasa en extractos proteicos intracelulares (35 %), extracelulares (0.55 %) y asociados a la superficie celular (64.4 %), siendo esta última de carácter inducible por celobiosa.

El consumo de celobiosa por *X. dendrorhous* R4 es 2 veces más lento que el consumo de glucosa. Esto se debe a la baja actividad β-glucosidasa lo cual evita que se acumule su producto (glucosa) y reprima el crecimiento y producción de astaxantina como ocurre en cultivos con glucosa como única fuente de carbono.

Los sacarificados de bagazo de caña son un sustrato potencial para la producción de astaxantina, ya que *X. dendrorhous* R4 tuvo los mayores rendimientos de producto con respecto a sustrato (0.87 mg/g) cuando se usaron estos hidrolizados en comparación con el uso de azúcares puros.

La mutante R4-X18 asimila mejor la xilosa, lo que permitió incrementar 2.13 y 1.73 veces el crecimiento y la producción de astaxantina en cultivos con xilosa en comparación a su cepa parental R4. De igual forma la mutante R4-X18 aumentó 45 %

la producción de astaxantina y los rendimientos de este producto con respecto a biomasa y sustrato en cultivos con SBC10 con respecto a R4.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A., & Navarro, E. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Valencia: Aleta Ediciones. ISBN: 978-84-15225-50-8
- Aguillón, L. (2018). Estudio de los procesos de pirólisis-gasificación de residuos agrícolas del cultivo. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C, México.
- Akhtar, N., Aanchal, Goyal, D., & Goyal, A. (2016). Biodiversity of cellulase producing bacteria *Henequén* and their applications. *Cellulose Chemistry and Technology*, 50(9-10), 983-995.
- Alcaíno, J., Baeza M., & Cifuentes, V. (2014). Astaxanthin and related xanthophylls. En: Martín J. F. *et al.* (Eds) Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites, *Fungal Biology*, 1st ed. (pp 187-208). Springer Science and Business Media.
- An, G., Kim, C., Choi, E., & Rhee, S. (1996). Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT- 5FO1C. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 515-518. doi.org/10.1016/S0922-338X(97)86996-6
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173. doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003
- Arévalo, M. (2005). Estudio de la actividad glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. (Tesis doctoral), Universidad de Castilla- La Mancha. España
- Baeza, M., Retamales, P., Sepúlveda, D., Lodato, P., Jiménez, A., & Cifuentes, V. (2009). Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Basic Microbiology*, 49(2), 135-141. doi: 10.1002/jobm.200800096.
- Barbachano, A., Castelblanco, L., Ramos, A., Cerda, C., Salgado, L., Flores, C., & Ponce, T. (2014). Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Archives of Microbiology*, 196(6), 411–421. doi:10.1007/s00203-014-0979-x
- Barredo, J., García, C., Kosalkova, K., & Barreiro, C. (2017). Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*, 3(3), 44. doi:10.3390/jof3030044
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(4), 375-407. doi: 10.1080/07388550290789568.
- Boubekeur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., & Guérin, B. (2001). Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 268(19), 5057–5065. doi:10.1046/j.1432-1033.2001.02418.x

- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011. doi:10.4061/2011/787532
- Bussamra, B., Freitas, S., & Costa, A. (2015). Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Bioresource Technology*, 187, 173–181. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.117
- Casablanca, E., Ríos, N., Terrazas, E., & Álvarez, M. (2011). Producción de β -glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1).
- Castelblanco, L. (2015). Caracterización metabólica y genética de la carotenogénesis en cepas mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). (Tesis de doctorado), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México
- Castro, L. (2018). Estandarización de las condiciones del proceso de producción de etanol a partir de celobiosa por *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BG (Tesis de maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México
- Chávez, C., Flores, Z., & Flores-Cotera, L. (2010). Una vista integral de la síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. *BioTecnología*, 14(3), 24-38.
- Cifuentes, A., González, M., Vargas, S., Hoeneisen, M., & González, N. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 36(3-4), 343-357. doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006
- Conadesuca. (2016). Boletín técnico informativo del sector de la caña de azúcar 2016. Recuperado el 10 junio de 2020 de: <http://www.conadesuca.gob.mx/DocumentosEficProductiva/TecnicosInformativos/Boletin%20Tecnico%20Informativo%20Enero%202016.pdf>
- Córdova, P., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2018). Microbiological synthesis of carotenoids: pathways and regulation. En: Queiroz, L., Jacob-Lopes, E., Rosso, V. (Eds), *Progress in Carotenoid Research*, 1ra edición. (pp 63-83). Santiago, Chile: InTech.
- Córdova, P., González, A., Nelson, D., Gutiérrez, M., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2017). Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450ome) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Genomics*, 18(1). doi:10.1186/s12864-017-3942-9
- Cortés, T. (2013). Evaluación de pretratamiento con líquidos iónicos próticos para la producción de bioetanol de segunda. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Chile.
- Cruz, J., & Parajó, J. (1998). Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chemistry*, 63(4), 479–484. doi:10.1016/s0308-8146(98)00061-2
- Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Hatta, B. (2011). Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de

- compuestos químicos de importancia sensorial. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 325-334.
- Fay, J., Liu, P., Ong, G., Dunham, M., Cromie, G., Jeffery, E., Ludlow, C., & Dudley, A. (2019). A polyploid admixed origin of beer yeasts derived from European and Asian wine populations. *PLoS Biology*, 17(3). doi.org/10.1371/journal.pbio.3000147
- Flores, L., Martín, R., & Sánchez, S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 341–347. doi:10.1007/s002530000498
- García, A. (2012). Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. (Tesis doctoral), Universidad de León, México.
- García, C., Kosalková K., Sánchez, IC. (2018) Extraction and analysis of carotenes and xanthophylls produced by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In: Barreiro C., Barredo JL. (eds) *Microbial Carotenoids. Methods in Molecular Biology*, vol 1852. Humana Press, New York, NY
- Gassel, S., Schewe, H., Schmidt, I., Schrader, J., & Sandmann, G. (2012). Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. *Biotechnology Letters*, 35(4), 565–569. doi:10.1007/s10529-012-1103-4
- Gervasi, T., Pellizzeri, V., Benameur, Q., Gervasi, C., Santini, A., Cicero, N., & Dugo, G. (2017). Valorization of raw materials from agricultural industry for astaxanthin and β -carotene production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Natural Product Research*, 32(13), 1554–1561. doi:10.1080/14786419.2017.1385024
- Gil, J. (2015). Estudio de las β -glucosidasas del complejo celulolítico de *Talaromyces amestolkiae*: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Golubev, W. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*, 11(2), 101–110. doi:10.1002/yea.320110202
- González, E. (2016). 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 no publicada). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- González, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J. M., Batista, F., & Brena, B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, 1469-1475. doi: 10.1007/s10529-008-9708-
- Granda, P. (2015). Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Chile.
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y., & Nozaki, K. (2016). Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidasas of *Trichoderma reesei*. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 100, 4959-4968. doi: 10.1007/s00253-016-7342-x
- Ha, S., Galazka, J., Joong, E., Kordic, V., Kim, H., Jin, Y., & Cate, J. (2013). Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. *Metabolic Engineering*, 15:134-43. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.005.
- Hara, K., Morita, T., Endo, Y., Mochizuki, M., Araki, M., & Kondo, A. (2014). Evaluation and screening of efficient promoters to improve astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6787-6793. doi: 10.1007/s00253-014-5727-2.
- Harith, T. (2019). Production of astaxanthin by *xanthophyllomyces dendrorhous* DSMZ 5626 using rapeseed meal hydrolysates as substrate. (Tesis doctoral), University of Reading. Inglaterra.
- Hasan, M., Azhar, M., Nangia, H., Chandra, P., & Prasad, B. (2016). Influence of high-pressure homogenization, ultrasonication, and supercritical fluid on free astaxanthin extraction from β -glucanase-treated *Phaffia rhodozyma* cells, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(2), 116-122, DOI: 10.1080/10826068.2014.995807
- Hermosilla, G., Martínez, C., Retamales, P., León, R., & Cifuentes, V. (2003). Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(4):279-87. doi: 10.1023/a:1026090008405
- Hernández, J., Villa, M., Veloz, J., Rivera, K., González, R., Plascencia, M., & Trejo-Estrada, S. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, 100(3), 1238–1245. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.062
- Hou, J., Qiu, C., Shen, Y., Li, H., & Bao, X. (2017). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. *FEMS Yeast Research*, 17(4). doi: 10.1093/femsyr/fox034.
- Hu, Z., Zheng, Y., Wang, Z., & Shen, Y. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 586-590. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.017
- Huerta, J., Ruiz, R., Montes, M. Carmen., & Hidalgo, M. (2005). Clonación molecular del gen de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena*. XI congreso nacional de biotecnología y bioingeniería
- Jagtap, S., & Rao, C. (2018). Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9015-9036. 6 doi.org/10.1007/s00253-018-9294-9
- Jeffries, T. (1983). Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: *Pentoses and Lignin. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, vol 27. Springer, Berlin, Heidelberg
- Kaushal, M., Ahlawat, S., Makut, B., Goswami, G., & Das, D. (2019). Dual substrate fermentation strategy utilizing rice straw hydrolysate and crude glycerol for liquid biofuel production by *Clostridium sporogenes* NCIM 2918. *Biomass and Bioenergy*, 127, 105257. doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105257

- Keris, U., & Gurol, M. (2017). Using ozone for microalgal cell disruption to improve enzymatic saccharification of cellular carbohydrates. *Biomass and Bioenergy*, *105*, 59-65. doi: 10.1016/j.biombioe.2017.06.023
- Kim, H., & Pack, M. (1989). Cloning and expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, *11*(5), 313-316. doi.org/10.1016/0141-0229(89)90048-3
- Kim, J., Lee, Y., & Kim, T. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *199*, 42–48. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.085
- Koo, B., Kim, H., Park, N., Lee, S., Yeo, H., & Choi, I. (2011). Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, *35*(5), 1833–1840. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.014
- Kothari, D., Lee, J., Chon, J., Seo, K., & Kim, S. (2019). Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* SK984 with oak leaf extract and inorganic phosphate supplementation. *Food Science and Biotechnology*, *28*(4), 1171-1176. doi.org/10.1007/s10068-019-00604-w
- Krisch, J., Tako, M., Papp, T., & Vagvolgyi, C. (2010). Characteristics and potential use of β -glucosidases from *Zygomycetes*. In: A. Méndez-Vilas (ed). *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp 891-896.
- Lee, J., Koo, B., Choi, J., Choi, D., & Choi, I. (2008). Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass resource for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*, *99*(8), 2736–2741. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.003
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S., & Van, M. (2007). Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *35*(3), 151–158. doi:10.1007/s10295-007-0275-8
- Lim, K., Yusoff, F., Shariff, M., & Kamarudin, M. (2017). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, *10*(3), 738-773. doi:10.1111/raq.1220054
- Liu, S., Liu, B., Wang, H., Xiao, S., Li, Y., & Wang, J. (2018). Production of astaxanthin at moderate temperature in *Xanthophyllomyces dendrorhous* using a two-step process. *Engineering in Life Sciences*, *18*(10), 706-710. doi.org/10.1002/elsc.201800065
- Liu, Y., & Wu, J. (2008). Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production. *Biotechnology and Bioengineering*, *101*(5), 996–1004. doi:10.1002/bit.21978
- Liu, Z., Weber, S., & Cotta, M. (2013). Isolation and characterization of a β -glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *BioEnergy Research*, *6*(1), 65-74.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A., & Cifuentes, V. (2007). Expression of the carotenoid

- biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 40(1), 73-84. doi.org/10.4067/S0716-97602007000100008
- López, H., Zumalacárregui, L., & Pérez, O. (2017). Simulación de los procesos de extracción de B-caroteno natural, astaxantina, biodiesel y glicerol a partir de *Dunaliella salina*. *Revista Ingeniería UC*. 24(2) 231-240.
- López, L., Cárdenas, A., & Zambrano, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (69), 317-326.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Manjarres, K., Arias, M., Molina, Y., Betancur, M., & Rodríguez, E. (2016). Producción de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de fermentación de residuos de palma de aceite. *Actualidad & Divulgación Científica* 19 (2): 403 – 409pp.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74, 1-16. doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11, 190. doi:10.1186/1471-2180-11-190
- Martínez, A., Chávez, C., Vásquez, J., & Flores, L. (2018). A common mechanism explains the induction of aerobic fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*. *Microbial Cell Factories*, 17(53). doi.org/10.1186/s12934-018-0898-7
- Martínez, P., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2015). Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. *BMC Genomics*, 16(1), 289. doi: 10.1186/s12864-015-1484-6.
- Mata, L., Montañez, J., Méndez, A., & Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. doi: 10.1186/1475-2859-13-12
- McWilliams, A. (2018). The global market for carotenoids. *BCC Research*: Wellesley, MA, USA. Recuperado el 6 de junio 2018 de: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>
- Mehmood, S., Gulfranz, M., Rana, N., Ahmad, A., Ahring, B., Minhas, N., & Malik, M. (2009). Ethanol production from Sorghum bicolor using both separate and simultaneous saccharification and fermentation in batch and fed batch systems. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), 2857-2865.
- Meléndez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 3.
- Miao, L., Chi, S., Mengru, W., Liu, Z., & Li, Y (2019). Deregulation of phytoene- β -carotene synthase results in derepression of astaxanthin synthesis at high glucose concentration in *Phaffia rhodozyma* astaxanthin-overproducing

- strain MK19. *BMC Microbiology*, 19(133). doi.org/10.1186/s12866-019-1507-6
- Montanti, J., Nghiem, N., & Johnston, D. (2011). Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 655-665. doi.org/10.1007/s12010-011-9165-7
- Nakkharat, P., & Haltrich, D. (2006). Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 304–313. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.12.015
- Núñez, D. (2017). Estrategias para la producción biotecnológica de xilitol a partir de hidrolizados lignocelulósicos mediante modificación genética de una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo. España
- Ochoa, E. (2018). Estudio de la regulación de la β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae* (Tesis de maestría). Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México
- Ostling, J., Carlberg, M., & Ronne, H. (1996). Functional domains in the Mig1 repressor. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 753–761. doi:10.1128/mcb.16.3.753
- Palma, H. (2016). Evaluación de medios de cultivo para la producción de astaxantina a partir de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 (Tesis de maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Pan, X., Wang, B., Gerken, H., Lu, Y., & Ling, X. (2017). Proteomic analysis of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* in response to low carbon levels. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 1091–1100. doi:10.1007/s00449-017-1771-5
- Panis, G., & Carreon J. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18 175–190. doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007
- Parajó, J., Santos, V., & Vázquez, M. (1997). Co-production of carotenoids and xilitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnology Letters*, 19(2), 139–142. doi:10.1023/a:1018356113002
- Park, K., Song, M., & Lee, J. (2008). Production of carotenoids by β -ionone-resistant mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* using various carbon sources. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(2), 197-203. doi.org/10.1007/s12257-007-0160-3
- Pera, L., Rubinstein, L., Baigorí, M., de Figueroa, L., & Callieri, D. (1999). Influence of manganese on cell morphology, protoplasts formation and β -d-glucosidase activity in *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiology Letters*, 171(2), 155-160.
- Pollmann, H., Breitenbach, J., Wolff, H., Bode, H., & Sandmann, G. (2017a). Combinatorial biosynthesis of novel multi-hydroxy carotenoids in the red

- yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*, 3(1), 9. doi:10.3390/jof3010009
- Pollmann, H., Breitenbach, J., & Sandmann, G. (2017b). Engineering of the carotenoid pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* leading to the synthesis of zeaxanthin Hendrik. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1):103-111. doi: 10.1007/s00253-016-7769-0
- Ponce, M., & Pérez, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva*, 21, 273-277.
- Portugal, D. (2017). Exploring yeast as a cell factory for the production of carboxylic acids and derivatives (Tesis doctoral), Lund University. Suecia
- Ramírez, D. (2016). Evaluación de parámetros para la sacarificación del bagazo de caña con enzimas de *Cellulomonas flavigena* PR-22 (Tesis de pregrado). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Reider, A., Ouellet, M., Szmidt, H., Keasling, J., & Mukhopadhyay, A. (2016). Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10. doi: 10.1038/srep19512
- Research and Markets, (2015). Global astaxanthin market-sources, technologies and application. Recuperado el 7 de mayo de 2020 de: <http://www.researchandmarkets.com/reports/3129287/global-astaxanthin-market-sources-technologies>
- Ríos, F. (2017). Producción de etanol celulósico a partir de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, productoras de la β -glucosidasa y endoglucanasa de *Cellulomonas flavigena* PR-22 (Tesis doctoral no publicada). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Rodrigues, A., Haven, M., Lindedam, J., Felby, C., & Gama, M. (2015). Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and Microbial Technology*, 79-80, 70-77. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.06.019
- Rodríguez, M., Fuente, J., & Barredo, J. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88:645-658. doi10.1007/s00253-010-2814-x
- Rubin, E. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 4 (7206), 841-845. doi:10.1038/nature07190.
- Saini, R., Keum, Y. (2017). Progress in microbial carotenoids production. *Indian Journal of Microbiology*, 57, 129-130. doi.org/10.1007/s12088-016-0637-x
- Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Production, purification and characterization of a highly glucose- tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3165-3170.
- Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylasmaki, E., Ward, M., & Penttila, M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei*-glucosidase BGLII (Cel1A). *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4546-4553.

- Schroeder, W., & Johnson, E. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology*, 139(5), 907-912. doi.org/10.1099/00221287-139-5-907
- Sedmak J., Weerasinghe D., & Jolly S. (1990). Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, 4: 107-112. oi.org/10.1007/BF00163282
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (2018). La producción de caña de azúcar supera los 55 millones de toneladas en 2018. Recuperado el 14 marzo de 2020 de: <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-produccion-de-cana-de-azucar-supera-las-55-millones-de-toneladas-en-2018?idiom=es>
- Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., & Thines, M. (2015). The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. *BMC Genomics*, 16(1). doi:10.1186/s12864-015-1380-0
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.030
- Stoklosa, R., Johnston, D., & Nghiem, N. (2018). Utilization of sweet sorghum juice for the production of astaxanthin as a biorefinery co-product by *Phaffia rhodozyma*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3124–3134. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03154
- Stoklosa, R., Johnston, D., & Nghiem, N. (2019). *Phaffia rhodozyma* cultivation on structural and non-structural sugars from sweet sorghum for astaxanthin generation. *Process Biochemistry*, 83, 9-17. doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.005
- Tlustý, M., Rhyne, A., Szczebak, J., Bourque, B., Bowen, J., Burr, G., Marx, C., & Feinberg, L. (2017). A transdisciplinary approach to the initial validation of a single cell protein as an alternative protein source for use in aquafeeds. *PeerJ*. 5: e3170. doi: 10.7717/peerj.3170.
- Vázquez, A. (2013). Producción de xilanasas por *Aspergillus Sp* en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido (Tesis de maestría). Universidad Iberoamericana, México.
- Vázquez, M. (2001). Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Food Technology and Biotechnology*, 39(2) 123–128 (2001).
- Villegas, M., Aguilar, D., Balagurusamy, N., Montañez, J., & Morales, L. (2019). Agro-industrial wastes for the synthesis of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: mesquite pods-based medium design and optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 150, 107260. doi:10.1016/j.bej.2019.107260
- Wang, X., Mann, C., Bai, Y., Ni, L., & Weiner, H. (1998). Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 822-830. doi: 10.1128/JB.180.4.822-830.1998.

- Wu, W., Lu, M., & Yu, L. (2010). Citrus residues isolates improve astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 65(9-10), 594-598. doi: 10.1515/znc-2010-9-1010
- Yamamoto, K., Kiyotaka, Y., Hará, Toshihiko, M., Nishimura, A., Sasaki, D., Jun, I., Ogino, C., Kizaki, N., & Kondo, A. (2016). Enhancement of astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by efficient method for the complete deletion of genes. *Microbial Cell Factories*, 13;15(1):155. doi: 10.1186/s12934-016-0556-x
- Yan, F., Xia, W., Zhang, X., Chen, S., Nie, X., & Qian, L. (2016). Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *Journal of Zhejiang University Science B (Biomed & Biotechnol)*, 17(6), 455-464. doi: 10.1631/jzus.B1500317
- Young, E., Lee, S., & Alper, H. (2010). Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 24. doi.org/10.1186/1754-6834-3-24
- Zhao, X., Liu, H., Zhang, X., Zhang, G., & Zhu, H. (2019). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* microencapsulated by spray drying: characterization and antioxidant activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(1), 93-102 pp. doi.org/10.1002/aocs.12170
- Zhu, Q., & Jackson, E. (2015). Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 65-72. doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.010