



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA

**Caracterización de la mutante de *Xanthophyllomyces*
dendrorhous R4-X18 creciendo en sacarificados de
bagazo de caña**

T E S I S

Que presenta

JOSUE MONTIEL CRUZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Ciudad de México

Febrero, 2024

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. Héctor Mario Poggi Varaldo

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería - CINVESTAV

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco (CINVESTAV-Zacatenco), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Ponce Noyola.

El desarrollo de esta tesis de Maestría contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) a través de la beca número 781628.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía y por recompensarme con mi magnífica familia

A mi directora de tesis:

La Doctora María Teresa Ponce Noyola, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente proyecto, así como su inmensa paciencia y sus valiosas enseñanzas que me han permitido desarrollarme tanto profesional como personalmente.

A mis asesores:

La Doctora Ana Carmela Ramos Valdivia y el Doctor Héctor Mario Poggi Varaldo por sus valiosos aportes y apoyo durante el transcurso de este proyecto.

Al personal del laboratorio de Genética microbiana:

La M. en C. Odilia Pérez Ávalos, por el apoyo técnico, académico y profesional recibido; durante el montaje de técnicas para la purificación de proteínas y métodos para la cuantificación de metabolitos por HPLC. Mi gratitud y admiración.

A Verónica Soto Bellosa, por su apoyo y compromiso que día con día facilita el trabajo de investigación.

A mis amigos y colegas en el laboratorio:

David Guzmán, Connie Chávez, Domingo Jiménez, Aimme Romero, Vanessa Yahuitl y Alejandro Lara, por su grata compañía y por regalarme momentos maravillosos.

A mi familia

Isabel Cruz, Magdaleno Montiel, Lizeth Montiel, Emanuel Montiel, Magdaleno Montiel, Juan José Montiel, Daniel Montiel, Israel Montiel, Nelly Montiel, Jonathan Montiel y Patricia Palancares por estar siempre conmigo aun a pesar de la distancia, gracias por su inmenso amor, por enseñarme a no rendirme y permitirme seguir soñando. Son mi más grande inspiración para poder continuar con mis metas.

A la Coordinación Académica y Jefatura del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, así como a todos los investigadores que me acompañaron durante mi formación y a todas aquellas personas que hicieron posible este proyecto.

DEDICATORIA

A mi madre

Isabel Cruz García

A mi padre

Magdaleno Montiel Martínez

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Biomasa lignocelulósica	16
1.1.1 Bagazo de caña.....	17
1.1.2 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	17
1.1.3 Sacarificación de biomasa lignocelulósica	19
1.1.4 Biorrefinería lignocelulósica	21
1.2 Carotenoides	21
1.2.1 Astaxantina	23
1.3 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	26
1.3.1 Biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	27
1.3.2 Factores nutricionales que regulan la síntesis de astaxantina	28
1.3.3 Asimilación de fuentes de carbono por <i>X. dendrorhous</i>	30
1.3.4 Principales fuentes de carbono aprovechables por <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> 31	
1.3.5 Estrategias de mejora en el rendimiento de astaxantina	32
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 General.....	36
4.2 Específicos.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1 Actividades a realizar	37
5.2 Microorganismos	38
5.3 Cinéticas de crecimiento en sustratos puros y SBC.....	38
5.4 Determinación de crecimiento.....	38
5.5 Sacarificación de bagazo de caña	39
5.6 Determinación de azúcares reductores	39
5.7 Determinación de azúcares por HPLC.....	39
5.8 Determinación de carotenoides totales.....	39
5.9 Determinación de astaxantina por HPLC	40
5.10 Obtención del extracto crudo intracelular	40
5.11 Determinación de actividades enzimáticas	41
5.11.1 β -glucosidasa	41
5.11.2 Actividad xilosa reductasa (XR)	41

5.11.3	Actividad xilitol deshidrogenasa (XDH)	41
5.12	Determinación de proteína por Bradford	42
5.13	Cromatografía de intercambio aniónico	42
5.14	Electroforesis (SDS-PAGE)	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en SBC y sustratos puros	44
6.1.1.	Crecimiento en glucosa	44
6.1.2	Crecimiento en xilosa	46
6.1.3	Crecimiento en celobiosa	49
6.1.4	Crecimiento en SBC	53
6.2	Efecto de la fuente de carbono en la producción de astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18	56
6.2.1	Producción de astaxantina creciendo en glucosa	56
6.2.2	Producción de astaxantina creciendo en xilosa	57
6.2.3	Producción de astaxantina creciendo en celobiosa	59
6.2.4	Producción de astaxantina creciendo en SBC	60
6.3	Determinación de la actividad de β -glucosidasa en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en celobiosa y SBC	63
6.3.1	Actividad β -glucosidasa en celobiosa	63
6.3.2	Actividad β -glucosidasa en SBC	65
6.4	Determinación de la actividad de Xilosa Reductasa en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa y SBC	67
6.4.1	Actividad XR en glucosa	68
6.4.2	Actividad XR en xilosa	69
6.4.3	Actividad XR en SBC	70
6.5	Determinación de la actividad xilitol deshidrogenasa en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa y SBC	73
6.5.1	Actividad XDH en glucosa	73
6.5.2	Actividad XDH en xilosa	74
6.5.3	Actividad XDH en SBC	76
6.6	Purificación parcial de β -glucosidasa, XR y XDH en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo cultivos de glucosa, xilosa, celobiosa y SBC	77
6.6.1	Análisis <i>in silico</i>	78
6.6.2	Purificación parcial de la β -glucosidasa en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 en celobiosa y SBC	78

6.6.3 Purificación parcial de XR y XDH en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 en glucosa, xilosa y SCB	86
7. CONCLUSIONES	95
8. BIBLIOGRAFÍA	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de la biomasa lignocelulósica	16
Figura 2. Acción del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	18
Figura 3. Representación de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina mediante celulasas	19
Figura 4. Estructura y sacarificación del xilano como componente mayoritario en la hemicelulosa.....	20
Figura 5. Estructura general de los isoprenoides.	22
Figura 6. Estructura química de la astaxantina.....	23
Figura 7. Estructura química de estereoisómeros de astaxantina	24
Figura 8. Principales vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de astaxantina	28
Figura 9. Biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i> a partir de xilosa, glucosa y celobiosa.	31
Figura 10. Estrategia experimental.....	37
Figura 11. Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18.....	46
Figura 12. Cinéticas de crecimiento y consumos de xilosa en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18. .	48
Figura 13. Cinéticas de crecimiento en celobiosa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18.....	52
Figura 14. Cinéticas de crecimiento en SBC por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18.....	55
Figura 15. Acumulación de astaxantina por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa, celobiosa y SBC	62
Figura 16. Actividad β -glucosidasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X28 creciendo en celobiosa	65
Figura 17. Actividad β -glucosidasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en SBC.....	67
Figura 18. Actividad xilosa reductasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en glucosa	68
Figura 19. Actividad xilosa reductasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en xilosa ..	70
Figura 20. Actividad xilosa reductasa en <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en SBC	72
Figura 21. Actividad xilitol deshidrogenasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en glucosa	74
Figura 22. Actividad xilitol deshidrogenasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en xilosa	76
Figura 23. Actividad xilitol deshidrogenasa por <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en SBC	77
Figura 24. Fraccionamiento por intercambio aniónico con KCl 0.52 M de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 creciendo en celobiosa	80
Figura 25. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 creciendo en celobiosa	81
Figura 26. Fraccionamiento por intercambio aniónico con KCl 0.52 M de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 creciendo en SBC	83
Figura 27. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 crecidos en SBC.....	84
Figura 28. Fraccionamiento por exclusión molecular de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 crecidos en xilosa	88
Figura 29. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 crecidos en xilosa	89

Figura 30. Fraccionamiento por exclusión molecular de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 crecidos en SBC.....	91
Figura 31. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y <i>X. dendrorhous</i> R4-X18 crecidos en SBC.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de pretratamientos físicoquímicos	18
Tabla 2. Distribución de estereoisómeros de astaxantina en la naturaleza	25
Tabla 3. Composición química promedio de algunos residuos agroindustriales	32
Tabla 4. Parámetros cinéticos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en diferentes sustratos	63
Tabla 5. Análisis in silico de proteínas relacionadas al metabolismo de azúcares en <i>X. dendrorhous</i>	78
Tabla 6. Purificación parcial de β -glucosidasa en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en celobiosa y SBC	85
Tabla 7. Purificación parcial de XR en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en xilosa y SBC	93
Tabla 8. Purificación parcial de XDH en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> R4 y R4-X18 creciendo en xilosa y SBC	94

ABREVIATURAS

ATP Adenosín trifosfato

CoA Coenzima A

crtI Fitoeno desaturasa

crtS Astaxantina sintasa

crtYB Fitoeno- β -caroteno sintasa

DMAP Dimetilalil pirofosfato

FPP Farnesil pirofosfato

GGPP Geranil geranil pirofosfato

GPP Geranil pirofosfato

HMG-CoA Hidroximetilglutaril-CoA

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

IPP Isopentenil pirofosfato

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

pNPG p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

QA Productividad de astaxantina

q_s Consumo específico de sustrato

- SBC** Sacarificados de bagazo de caña
- SOD** Superóxidos dismutasas
- XDH** Xilitiol deshidrogenasa
- XR** Xilosa reductasa
- $Y_{p/s}$** Rendimiento de producto con respecto a sustrato
- $Y_{p/x}$** Rendimiento de producto con respecto a biomasa
- YPC** Extracto de levadura-Peptona-Celobiosa
- YPD** Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa
- YPX** Extracto de levadura-Peptona-Xilosa
- μ** Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

El bagazo de caña es un residuo lignocelulósico producido por la industria azucarera y representa entre el 25 y 40 % del total de materia procesada. El bagazo de caña contiene celulosa y hemicelulosa que pueden convertirse en azúcares simples como glucosa, xilosa y celobiosa que pueden ser aprovechados para la obtención de diferentes productos biológicos. *Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura que metaboliza una gran variedad de fuentes de carbono para la obtención de astaxantina, una xantofila de interés comercial. En el presente trabajo se evaluó el uso de sacarificados de bagazo de caña (SBC), así como de la glucosa, celobiosa y xilosa, presentes en los SBC, en el metabolismo y la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* R4-X18 y su cepa materna R4. La producción de astaxantina en la cepa R4-X18 creciendo en xilosa fue 33 % mayor a la producción obtenida en los SBC donde se obtuvo $11.31 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ del pigmento. No obstante, los SBC fueron el segundo mejor sustrato para la producción de astaxantina en la misma cepa, superando a la glucosa y celobiosa en 5 y 36 %, respectivamente. Así mismo, la cepa R4-X18 superó en 36 y 40 % la producción de astaxantina creciendo en xilosa y celobiosa respecto a su cepa materna.

Por otro lado, en los SCB la cepa R4-X18 tuvo una actividad de xilosa reductasa (XR) 61 % mayor que la obtenida en xilosa. Mientras que, la actividad xilitol deshidrogenasa (XDH) no presentó el mismo comportamiento en R4-X18, ya que se observó mayor actividad creciendo en xilosa como única fuente de carbono, superando la actividad en los SBC con un 34 %. No obstante, las actividades de XR y XDH de la cepa R4-X18 fueron 1.7 veces menor en relación con las actividades de R4 creciendo en xilosa. La actividad β -glucosidasa excedió el 86 % cuando R4-X18 creció en los SBC respecto a la celobiosa. Así mismo, R4-X18 redujo 4 veces su actividad β -glucosidasa con respecto a la cepa R4 crecidas en celobiosa.

Mediante SDS-PAGE se identificaron bandas cercanas a los 34.32 y 43.19 kDa, que sugieren la presencia de XR y XDH en extractos crudos libres de células, parcialmente purificados, de R4 y R4-X18 crecidas en xilosa y SBC. Así mismo, se identificaron bandas de 91.83 kDa relacionadas a la β -glucosidasa en cultivos de celobiosa y SBC.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is a lignocellulosic residue produced by the sugar industry and represents between 25 and 40% of the total processed material. Sugarcane bagasse contains cellulose and hemicellulose that can be converted into simple sugars such as glucose, xylose and cellobiose that can be used to obtain different biological products. *Xanthophyllomyces dendrorhous* is a yeast metabolizing various carbon sources to obtain astaxanthin, a xanthophyll of commercial interest. In the present work, the use of saccharified sugarcane bagasse (SCB) as well as glucose, cellobiose, and xylose, present in the SCB, was evaluated in the metabolism and production of astaxanthin in *X. dendrorhous* R4-X18 and its maternal strain R4. Astaxanthin production in R4-X18 strain growing on xylose was 33% higher than in SBCs where $11.31 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ of the pigment was obtained. However, SBCs were the second-best substrate for astaxanthin production in the same strain, outperforming glucose and cellobiose by 5 and 36%, respectively. Likewise, strain R4-X18 outperformed astaxanthin production by 36 and 40%, growing on xylose and cellobiose compared to its maternal strain.

On the other hand, in SCB, strain R4-X18 had a xylose reductase (XR) activity 61% higher than that obtained in xylose. Meanwhile, xylitol dehydrogenase (XDH) activity did not present the same behavior in R4-X18 since higher activity was observed growing in xylose as the only carbon source, surpassing the activity in SBCs with 34%. However, the XR and XDH activities of strain R4-X18 were 1.7-fold lower relative to the activities of R4 growing on xylose. The β -glucosidase activity exceeded 86% when R4-X18 was grown on SBCs relative to cellobiose. Likewise, R4-X18 reduced 4-fold its β -glucosidase activity concerning the R4 strain grown on cellobiose.

By SDS-PAGE, bands close to 34.32 and 43.19 kDa were identified, suggesting the presence of XR and XDH in partially purified cell-free crude extracts of R4 and R4-X18 grown on xylose and SBC. Likewise 91.83 kDa bands related to β -glucosidase were identified in cellobiose and SBC cultures.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el componente estructural mayoritario de las plantas maderables y no maderables procedentes de prácticas agrícolas, forestales y de industrias papeleras. La lignocelulosa está constituida principalmente por tres polímeros estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa (Figura 1). La celulosa representa de un 40 a 50% de peso seco de la biomasa y está compuesta por dímeros de D-glucosa polidispersos en regiones cristalinas y amorfas unidas por enlaces glucosídicos β -(1-4) dando origen a moléculas de celobiosa (Almenares-Verdecía and Serrat-Díaz, 2008; Guarnizo *et al.*, 2009). La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en polímeros de diferentes azúcares como D-xilosa y L-arabinosa (pentosas); D-manosa, D-glucosa y D-galactosa (hexosas) y ácidos urónicos. El componente dominante de la hemicelulosa es la xilana, representando un 25 a 35 % de la biomasa seca. Finalmente, la lignina es un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano, unidas por enlaces éter (C-O-C) y carbono-carbono (C-C), además constituye entre un 15 a 20 % de la biomasa lignocelulósica (Rubin, 2008; Sindhu, *et al.*, 2016).

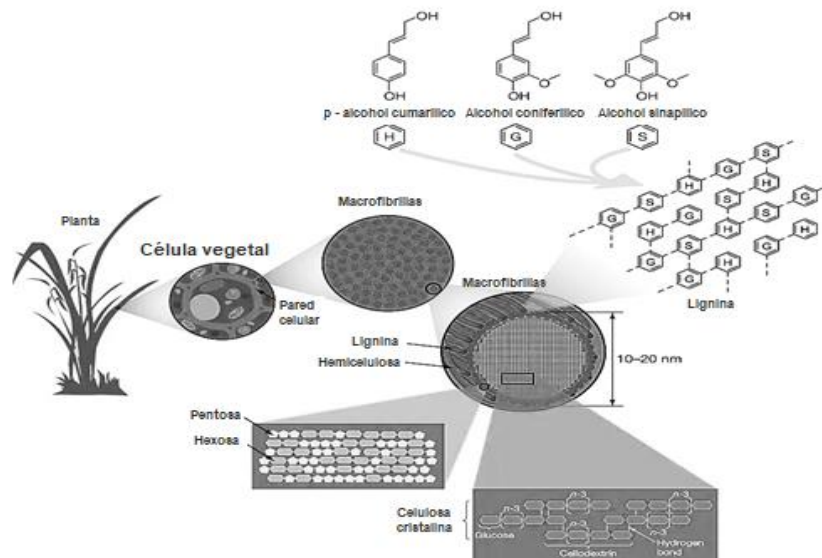


Figura 1. Composición de la biomasa lignocelulósica (Rubin, 2008)

1.1.1 Bagazo de caña

Uno de los materiales lignocelulósicos con mayor generación a nivel mundial, es el bagazo de caña, siendo producido por la industria azucarera. La producción de caña en México durante las últimas décadas se ha incrementado hasta alcanzar los 15.2 millones de toneladas por año según CONADESUCA (2024). Este bagazo se obtiene como subproducto o residuo en los ingenios azucareros después de la extracción del jugo de caña de azúcar y representa aproximadamente entre el 25 y 40 % del total de materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo (Pernalet *et al.*, 2008).

Mediante el procesamiento de materiales lignocelulósicos, a partir de la celulosa y la hemicelulosa, se obtienen azúcares que son usados en la obtención de diferentes productos biológicos (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-Méndez *et al.*, 2019).

1.1.2 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

La conversión de la biomasa lignocelulósica como materia prima involucra: el pretratamiento (remoción de la lignina y cambios en la estructura de la celulosa); destoxificación de la hemicelulosa y sacarificación de la celulosa sea enzimática o química (Carreón-Rodríguez *et al.*, 2009). Cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa, es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos necesitan ser pretratados para facilitar la despolimerización de la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa como se muestra en la Figura 2 (Saha, 2004). Así, el objetivo del procesamiento consiste, por un lado, en incrementar el área expuesta de la materia prima, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa (Galbe & Zacchi, 2002) y por otro generar jarabes de azúcares ricos en pentosas y hexosas (Carreón-Rodríguez *et al.*, 2009).

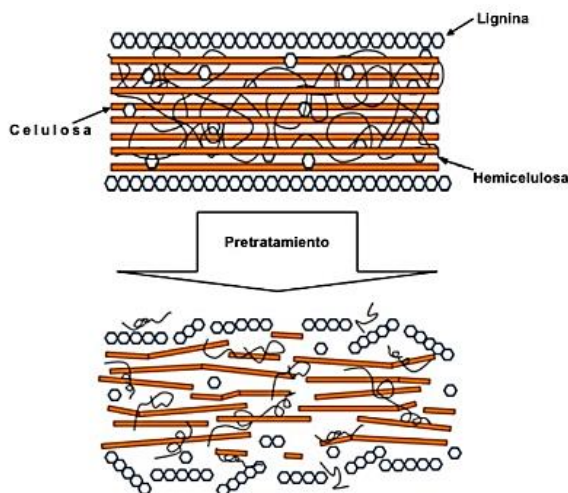


Figura 2. Acción del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Haghighi Mood et al., 2013)

Existe una amplia variedad de procesos fisicoquímicos e incluso biológicos que pueden ser usados como pretratamientos, por ejemplo, tratamiento con ácido sulfúrico diluido, explosión de vapor, uso de solventes orgánicos, líquidos iónicos, pretratamiento alcalino, explosión de fibras con amoníaco, uso de entidades fúngicas como el hongo de la pudrición blanca (Brodeur *et al.*, 2011), entre otros (Tabla 1). Sin embargo, la elección del pretratamiento a utilizar dependerá de la composición del material lignocelulósico y de cómo esté estructurado, determinado por la naturaleza misma de la especie vegetal de la cual provenga la biomasa.

Tabla 1. Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de pretratamientos fisicoquímicos (Brodeur et al., 2011)

Proceso	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Explosión de vapor	Despolimerización	Solubilización alta	Poca o nula
Hidrólisis ácida	Despolimerización	Solubilización alta	Poca o nula
Termólisis	Poca	Solubilización alta	Poca o nula
AFEX	Descristalización	Solubilización baja	Solubilización alta
Hidrólisis alcalina	Relajamiento	Solubilización baja	Solubilización alta

1.1.3 Sacarificación de biomasa lignocelulósica

La sacarificación de la celulosa se lleva a cabo principalmente de manera enzimática mediante el uso de celulasas. Las enzimas provenientes de hongos son consideradas como una de las mejores alternativas para la hidrólisis de fuentes lignocelulósicas, para lo cual se requiere de la acción combinada de diferentes tipos de actividades (Carreón-Rodríguez *et al.*, 2009). En la Figura 3 se puede observar de forma esquemática la acción conjunta de enzimas celulíticas como endoglucanasas (EG) (EC 3.2.1.4), que cortan azarosamente en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, esto causa la disminución en el largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs) (EC 3.2.1.74), actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa (Cuervo *et al.*, 2009; Ratanakhanokchai *et al.*, 2013; Asgher *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018).

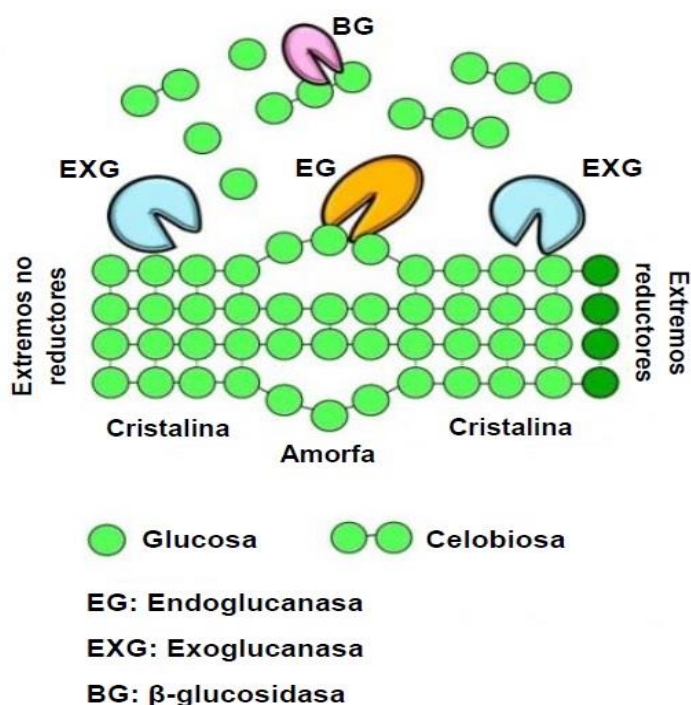


Figura 3. Representación de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina mediante celulasas (Ratanakhanokchai *et al.*, 2013)

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa tiene una estructura heterogénea (Figura 4). El compuesto más abundante de la hemicelulosa es el xilano que contiene xilosa como componente principal y requiere una variedad de enzimas catalíticas para su hidrólisis completa. La endoxilanasas (EC 3.2.1.8) escinde la cadena principal del xilano y produce xilooligosacáridos (Rastogi & Shrivastava, 2017; Chandrakant *et al.*, 2021). Sin embargo, la endoxilanasas por sí misma no puede liberar xilosa del xilano y se requieren esencialmente otras hemicelulasas auxiliares para la hidrólisis completa. La β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) descompone el xilano y la xilobiosa del extremo no reductor para liberar la xilosa. Las glucuronidasas (EC 3.2.1.139) permiten la expulsión de las cadenas laterales del esqueleto de xilano con sustituciones de arabinosa, ácido p-cumárico, ácido glucurónico y acetato (Guo *et al.*, 2018).

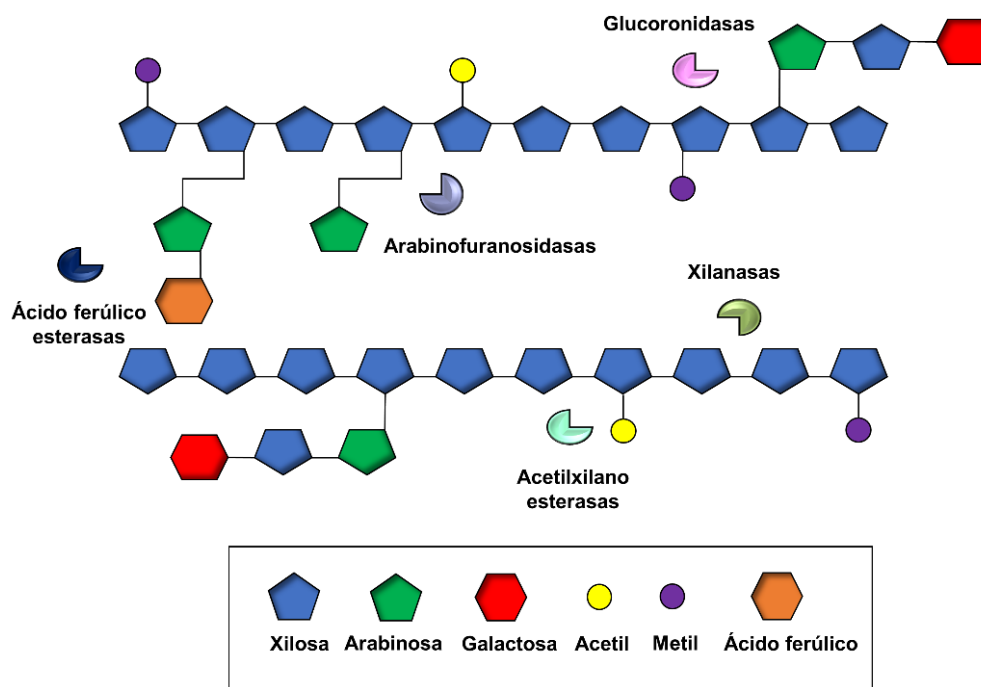


Figura 4. Estructura y sacarificación del xilano como componente mayoritario en la hemicelulosa. Elaboración propia

1.1.4 Biorrefinería lignocelulósica

La biorrefinería se refiere al “procesamiento sustentable de la biomasa en un espectro de productos comercializables y energía” (Cherubini *et al.*, 2009). Este término engloba una red de instalaciones que integran diferentes tecnologías (procesos y equipos) ya sea para separar los constituyentes de la biomasa o para utilizarlos como productos biológicos intactos (productos químicos, materiales, energía y fibra). Los componentes clave de la biomasa se pueden dividir en almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina y aceites, y cada componente es un accionista importante para la formación de productos de valor agregado (Chandel *et al.*, 2010; Schutyser *et al.*, 2018).

La biorrefinería utiliza como base la biomasa lignocelulósica (agro-residuos, residuos forestales, cultivos energéticos, residuos sólidos urbanos, etc.) por la fracción de carbohidratos presente en ella por lo que deben descomponerse en azúcares simples para poder ser usados como materia prima. Los tratamientos fisicoquímicos y enzimáticos permiten obtener principalmente azúcares de 5 y 6 carbonos, por lo que estos azúcares pueden ser fácilmente aprovechados para la producción de biocombustibles y bioproductos (Rastogi & Shrivastava, 2017). Dentro del concepto de biorrefinería, la fermentación es un proceso que es asistido por microorganismos, donde se logra un producto de valor agregado derivado de la transformación de los azúcares generados a partir de la biomasa, siendo algunos de los más importantes los monoalcoholes como etanol y butanol, los polialcoholes como el sorbitol, xilitol y glicerol, así como el ácido láctico y los carotenoides (Chandel *et al.*, 2018).

1.2 Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 40 átomos de carbono, formalmente derivados del fitoeno. Pueden ser de dos clases; carotenos (β -caroteno, α -caroteno o licopeno) y sus derivados oxidados, que contienen funciones hidroxilo, ceto o carboxilo, se denominan tradicionalmente xantofilas (luteína, zeaxantina, cantaxantina o astaxantina). La mayor parte de la diversidad de carotenoides naturales surge de las diferencias en los tipos y niveles de desaturación y otras modificaciones en la cadena de

C₄₀ (Figura 5) (Sánchez *et al.*, 1999; Wöstemeyer, 2005). 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 (Barredo *et al.*, 2017).

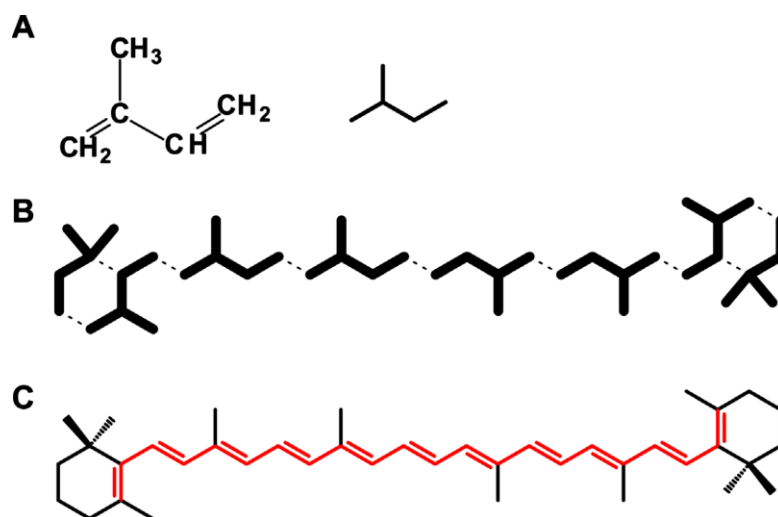


Figura 5. Estructura general de los isoprenoides. incluidos los carotenoides, se derivan de (A) unidades tipo isopreno, 2-metil-1,3-butadieno. (B) El β-caroteno está compuesto por ocho unidades isoprenoides de cinco carbonos. (C) En la estructura del β-caroteno, el sistema conjugado lineal central contiene once dobles enlaces (rojo) (Domonkos *et al.*, 2013).

La propiedad de los carotenoides de absorber la luz se deriva de la presencia de los enlaces dobles conjugados que conforman un cromóforo largo. Este mismo sistema poliénico hace a la molécula extremadamente sensible a la degradación oxidativa y a la isomerización inducida por la luz, el calor y los ácidos. Las propiedades químicas y físicas de los carotenoides *in vivo* pueden modificarse por interacciones con otras moléculas en su microambiente. Por ello las propiedades de los carotenoides libres o en solventes orgánicos son significativamente diferentes. Estas interacciones con otras moléculas, especialmente proteínas, pueden ser cruciales en su función biológica. El caso de las xantofilas es frecuente encontrarlas como una mezcla compleja de ésteres de ácidos grasos, especialmente en las semillas, aunque también se les encuentra como derivados glicosídicos en algunos microorganismos (Sánchez *et al.*, 1999; Domonkos *et al.*, 2013).

En la actualidad, una alta proporción de carotenoides se obtiene sintéticamente, ya que resulta más económico; sin embargo, debido a las restricciones legislativas, cada vez se emplean más los carotenoides de origen natural (Lerfall *et al.*, 2016). Se han aislado y purificado cerca de 600 carotenoides; entre los principales carotenoides de uso comercial se tienen principalmente los α y β caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, capsantina y bixina (Badui, 2006). Son comercialmente importantes debido a sus aplicaciones específicas en los alimentos (como suplementos nutricionales, colorantes y aditivos alimentarios), farmacéuticos (antioxidantes, anti-carcinógenos e inmunomoduladores) y en cosmética (Sánchez *et al.*, 2013). Se prevé que el mercado mundial de carotenoides alcance los \$2.0 mil millones para 2022, a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 5.7% para el período 2017-2022. Este mercado está dominado por el β -caroteno, la luteína y la astaxantina (McWilliams, 2021).

1.2.1 Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β' -caroteno-4,4'-diona, $C_{40}H_{52}O_4$) es un pigmento que pertenece a la familia de las xantofilas (Figura 6) ampliamente distribuida en la naturaleza, particularmente en el medio marino. La astaxantina consta de dos sistemas de anillos de ionona oxigenada unidos por un sistema de dobles enlaces conjugados. La cadena de polieno rica en enlaces dobles y la presencia de grupos carbonilo (C=O) e hidroxilo (OH) en cada ionona son responsables de la excelente capacidad antioxidante de la astaxantina, lo cual juega un papel importante en la captación del oxígeno singlete y en la eliminación de los radicales libres (Kishimoto *et al.*, 2010).

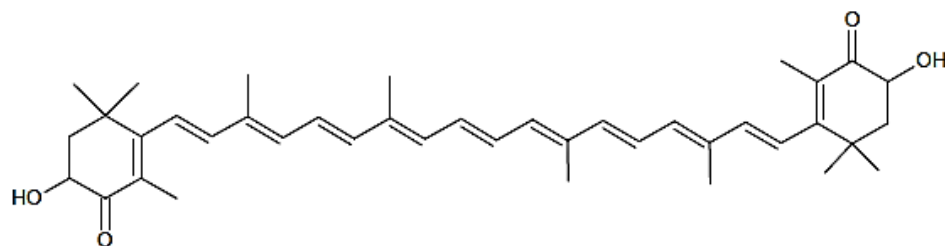


Figura 6. Estructura química de la astaxantina

La astaxantina 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 (Barredo *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2018). Según reporta el Global Market Insights, (2023) el valor de mercado total de la astaxantina superó los 921 millones de dólares con una tasa compuesta anual de crecimiento (CAGR) del 9.1 % dirigido por la creciente demanda de suplementos alimenticios, así como productos de belleza y cuidado personal.

La producción comercial de astaxantina se ha logrado mediante la extracción a partir de crustáceos, síntesis química o síntesis microbiana. Actualmente se utilizan tres microorganismos representativos que incluyen el alga *Haematococcus pluvialis*, la levadura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) y la bacteria *Paracoccus carotinifaciens* para la producción comercial de astaxantina (Mata *et al.*, 2014). Sin embargo, la baja productividad conduce a precios elevados para la astaxantina microbiana. La síntesis química de astaxantina a partir de precursores petroquímicos es actualmente rentable y, por tanto, domina más del 95% del mercado (Wan *et al.*, 2021).

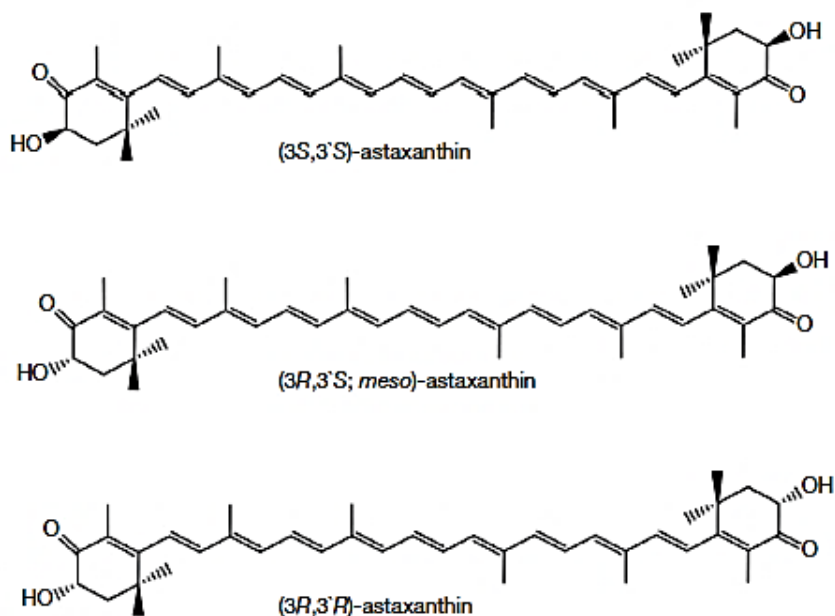


Figura 7. Estructura química de estereoisómeros de astaxantina (Lerfall, 2016)

Dependiendo de la configuración de los grupos hidroxilo en los carbonos asimétricos C3 de los anillos β se pueden formar diferentes isómeros configuracionales. Se han caracterizado tres isómeros ópticos de astaxantina incluyendo un par de enantiómeros (3S,3'S y 3R,3'R) y una meso forma (3S, 3'R) (Figura 7). En la naturaleza es comúnmente encontrar astaxantina en forma de mono y diésteres, así como en complejos con proteínas o ácidos grasos. La esterificación de la astaxantina permite que sea más resistente a fluctuaciones de temperatura y reacciones fotoquímicas como la fotólisis. Los diastereoisómeros de astaxantina tienen diferencias en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, así como en biodisponibilidad. El isómero 3S, 3'S es la forma predominante que se encuentra en la microalga *H. pluvialis*, mientras que el isómero 3R, 3'R es la forma principal en la levadura *X. dendrorhous* (Tabla 2). A diferencia de la astaxantina natural sintetizada por reacciones enzimáticas estereoespecíficas, la astaxantina sintética es una mezcla que contiene los tres estereoisómeros de astaxantina en una relación de 1:2:1 (Yu & Liu, 2020; Stachowiak & Szulc, 2021).

Tabla 2. Distribución de estereoisómeros de astaxantina en la naturaleza (Stachowiak & Szulc, 2021)

Microorganismo	(3S,3'S)	(3R,3'R) y (3R,3'S)	(3R,3'R)
<i>Phaffia rhodozyma</i> (levadura)	-	-	100 %
<i>Hematococcus pluvialis</i> (microalga)	100 %	-	-
<i>Adonis aestivalis</i> (Planta)	-	95 %	5 %

Con base en la diferencia estructural entre los isómeros de astaxantina, se han comparado las bioactividades y propiedades funcionales de estos isómeros. Liu *et al.* (2016c) examinaron la eficacia de tres isómeros ópticos de la astaxantina para inhibir las células de cáncer de colon humano. Los resultados mostraron que la configuración quiral no afectó significativamente la actividad anticancerígena de la astaxantina. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el isómero de astaxantina 3S, 3'S exhibe mayores

actividades antioxidantes y antienviejamiento que los isómeros 3R, 3'R y 3R, 3'S, tanto *in vivo* como *in vitro* (Liu *et al.*, 2016b), e indicaron que los diferentes estereoisómeros pueden tener diferentes mecanismos antioxidantes y antienviejamiento (Liu *et al.*, 2016a).

La levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* es una de las mejores productoras de astaxantina, debido a que puede crecer a altas densidades celulares y a que puede cultivarse económicamente. Por ello se ha estudiado con considerable detalle desde que fue originalmente aislada. Varios trabajos en la literatura han mostrado que diversos factores ambientales, incluyendo los constituyentes del medio de cultivo, afectan la síntesis de astaxantina.

1.3 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Phaffia rhodozyma es un basidiomiceto que tiene una forma anamórfica “no formadora de basidios” y otra teleomórfica “formadora de basidios” conocida como *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Es capaz de formar colonias rojas o naranjas debido a la presencia de pigmentos carotenoides que la protegen del daño oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno (Visser *et al.*, 2003). Algunas de sus características principales, incluyen sintetizar astaxantina como principal pigmento carotenóide y ser una levadura facultativa que produce etanol por fermentación de azúcares, a diferencia de otras levaduras carotenogénicas, como *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Chávez-Cabrera *et al.*, 2010a).

Una de las características más destacables de *X. dendrorhous* es su gran capacidad para asimilar diferentes tipos de azúcares. Palágyi *et al.* (2001) estudiaron la asimilación de 99 fuentes de carbono por 11 cepas distintas de *X. dendrorhous* creciéndolas en medio mínimo. Algunos compuestos fueron utilizados por todas las cepas, mientras que otros fueron solamente utilizados por algunas de ellas. Kusdiyantini *et al.* (1998) reportaron que en medios complejos *X. dendrorhous* logra co-metabolizar mejor los diferentes azúcares, además de que algunos de ellos pueden incrementar la formación de pigmentos. Gracias a esto se ha considerado a *X. dendrorhous* como una excelente opción para la producción

de astaxantina a partir de sacarificados de bagazo de caña. Se han evaluado cepas nativas en sacarificados de lignocelulosa, sin embargo, éstas sólo producen cantidades de carotenoides totales cercanas a 200 µg/g de biomasa seca, siendo concentraciones muy bajas para ser empleadas a nivel industrial (Howard *et al.*, 2003).

1.3.1 Biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*

La biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* inicia a partir de la condensación sucesiva de acetil-CoA, formando 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), que es escindido por la HMG-CoA reductasa para obtener mevalonato. Este mevalonato suministra esqueletos de carbono para la formación del isopentil pirofosfato (IPP), no obstante, la síntesis de la HMG-CoA reductasa es dependiente de la concentración de esteroides en membrana, por lo que es regulada de forma transcripcional por la proteína Sre1, que se localiza en la membrana celular limitando el flujo metabólico de carbono (Berthelot *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2020). El IPP es el precursor de todos los isoprenoides y la IPP isomerasa (gen *idi*) cataliza la conversión de IPP a su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). El siguiente paso es catalizado por la geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) sintasa (gen *crtE*) que añade tres moléculas de IPP para generar GGPP. La fitoeno sintasa (enzima bifuncional codificada por el gen *crtYB*) condensa dos moléculas de GGPP para dar lugar al compuesto denominado fitoeno, que tras tres reacciones de desaturación catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (gen *crtl*) conduce a la formación de licopeno, (Verdoes *et al.*, 1999). La fitoeno sintasa (enzima bifuncional codificada por el gen *crtYB*) cicla el licopeno para dar lugar sucesivamente γ -caroteno y β -caroteno.

Por otro lado, las enzimas fitoeno desaturasa y fitoeno ciclasa compiten por el licopeno como sustrato, por lo que un desbalance en la expresión de alguna de estas enzimas puede generar acumulación de carotenoides monocíclicos disminuyendo la formación de astaxantina (Verdoes *et al.*, 2003; García, 2012). Finalmente, la astaxantina sintasa (gen *crtS*) cataliza la formación de astaxantina a partir de β -caroteno tras la adición de dos grupos ceto en las posiciones 4 y 4' de la molécula y de dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 3' (Ojima *et al.*, 2006). La astaxantina sintasa pertenece a la familia de las

citocromo P450, estas enzimas requieren de un donador de electrones, que generalmente es una citocromo P450 reductasa (CPR), codificada en *X. dendrorhous* por el gen *crtR* (Alcaíno *et al.*, 2008; Alcaíno *et al.*, 2012; Figura 8).

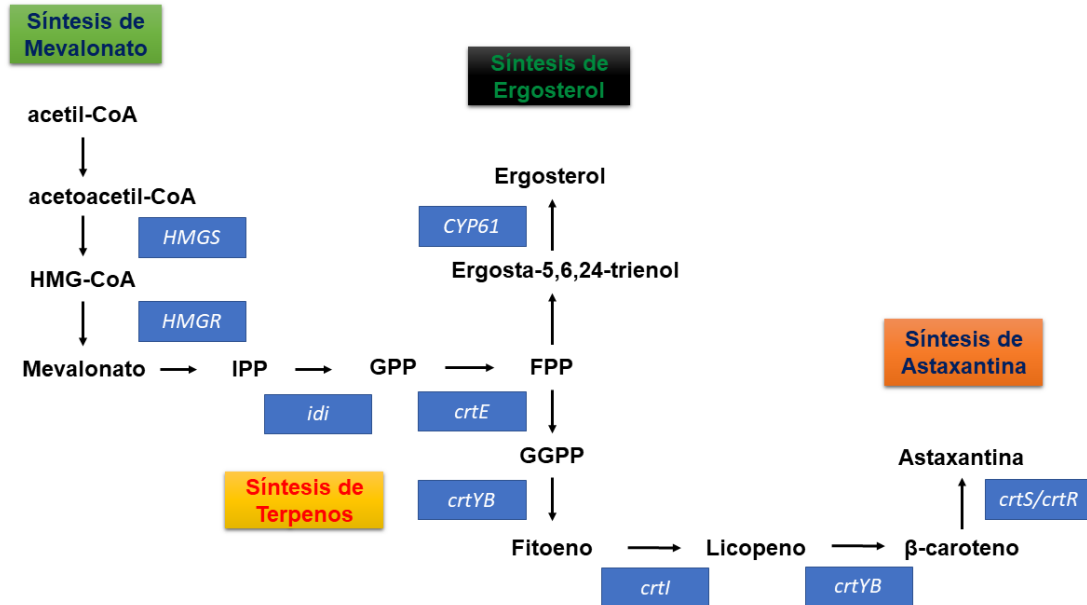


Figura 8. Principales vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de astaxantina. IPP isopentenil-pirofosfato, GPP geranyl-pirofosfato, FPP farnesil-pirofosfato, GGPP geranylgeranyl-pirofosfato, HMGS HMG-CoA sintasa, HMGR HMG-CoA reductasa, idi isopentenilpirofosfato isomerasa, crtE geranylgeranyl-pirofosfato sintasa, crtYB fitoeno sintasa/licopeno ciclase, crtI fitoeno desaturasa, crtS astaxantina sintasa, crtR citocromo P450 reductasa y CYP61 C22-esterol desaturasa (Lara-Meléndez *et al.*, 2023)

1.3.2 Factores nutricionales que regulan la síntesis de astaxantina

Xanthophyllomyces dendrorhous puede llevar a cabo dos tipos de metabolismo dependiendo del tipo de fuente de carbono presente en el medio de cultivo. La glucosa y otros azúcares fermentables son asimilados a través de la ruta glucolítica seguida de una fermentación alcohólica hasta la formación de etanol, incluso en presencia de oxígeno (García, 2012). Por otro lado, las fuentes de carbono no fermentables, como el etanol o el succinato, se transforman en acetil-CoA y se procesan a través del ciclo del ácido cítrico (Marcoleta *et al.*, 2011).

Se sabe que en *X. dendrorhous* existe una relación entre la fuente de carbono y la síntesis de carotenoides. En cultivos suplementados con glucosa, la carotenogénesis se induce sólo después de que en el medio de cultivo se ha agotado la fuente de carbono, lo que sugiere que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* está regulada por represión catabólica. Alcaíno *et al.*, (2016) identificaron una proteína de 863 aminoácidos en *X. dendrorhous* que posee características conservadas de las proteínas “Mig1” que puede unirse a secuencias de ADN llamadas “cajas Mig1” en regiones promotoras de varios genes reprimidos por glucosa. La adición de glucosa a cultivos previamente privados de este azúcar provoca una represión completa de la síntesis de carotenoides y disminuye los niveles de transcripción de los genes carotenogénicos *crtI*, *crtYB* y *crtS* (Martínez-Moya *et al.*, 2015). Los genes reprimidos por glucosa incluyen los que codifican proteínas implicadas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), la cadena de transporte de electrones, el ciclo del glioxilato, la metabolización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa (como los genes GAL, SUC y MAL). Además de algunos genes que codifican para transportadores de glucosa de alta afinidad y muchos genes implicados en las respuestas a diversos estímulos ambientales (Rolland *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2016)

En el caso de fuentes de carbono no fermentables como el etanol aumenta la relación NADH/NAD⁺ y como consecuencia se inhibe el TCA. En cepas nativas de *X. dendrorhous*, comúnmente se observa la acumulación de carotenoides durante la reutilización del etanol en condiciones oxidativas. Chávez-Cabrera *et al.*, 2010b, observaron el incremento en la actividad ATP citrato liasa (ACL), enzima clave para el suministro de acetil-CoA en citosol por la transformación de citrato en oxalacetato, asociado a la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo, y que coincide con el inicio de la síntesis de carotenoides. La expresión de los genes carotenogénicos, *crtYB* (fitoeno sintasa), *crtI* (fitoeno deshidrogenasa) y *crtS* (astaxantina sintasa), de igual forma, ha sido asociada a la reasimilación de etanol (Lodato *et al.*, 2007).

1.3.3 Asimilación de fuentes de carbono por *X. dendrorhous*

X. dendrorhous puede asimilar múltiples fuentes de carbono, fermentables y no fermentables entre los cuales se encuentran glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, lactosa, glicerol, etanol y succinato. No obstante, no todas las fuentes de carbono son adecuadas para la estimulación de la carotenogénesis. En *X. dendrorhous* las fuentes de carbono de asimilación lenta promueven una mayor pigmentación, pero a expensas de una menor tasa de crecimiento (Wozniak, *et al.*, 2011; Martínez-Moya *et al.*, 2015).

Entre las fuentes de carbono fermentables que puede asimilar *X. dendrorhous*, la celobiosa produce la mayor pigmentación, pero otros disacáridos como la maltosa y la sacarosa también dan buenos resultados en términos de pigmentación. El incremento en la síntesis de pigmentos es el resultado de la regulación a nivel transcripcional de la disminución en la síntesis de proteínas generado por el metabolismo fermentativo (Martínez-Moya *et al.*, 2020). Por otro lado, la xilosa es una pentosa que ha mostrado efectos inductores de la vía de carotenogénesis. Esto se debe a que la xilosa también es un azúcar de asimilación lenta y puede metabolizarse sin reprimir el catabolismo de otras fuentes de carbono como lo hace la glucosa. La xilosa puede incorporarse a la vía de las pentosas fosfato gracias a un proceso de oxido-reducción mediado por los genes *xy11*, *xy12* y *xy13* que codifican para las enzimas; xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xiluloquinasa (Figura 9). Posteriormente, ingresa a la glucólisis o pasa directamente a la formación de G-3P que ingresará al ciclo de los ácidos tricarbónicos y finalmente a la ruta del ácido mevalónico para la síntesis de astaxantina (Barredo *et al.*, 2017).

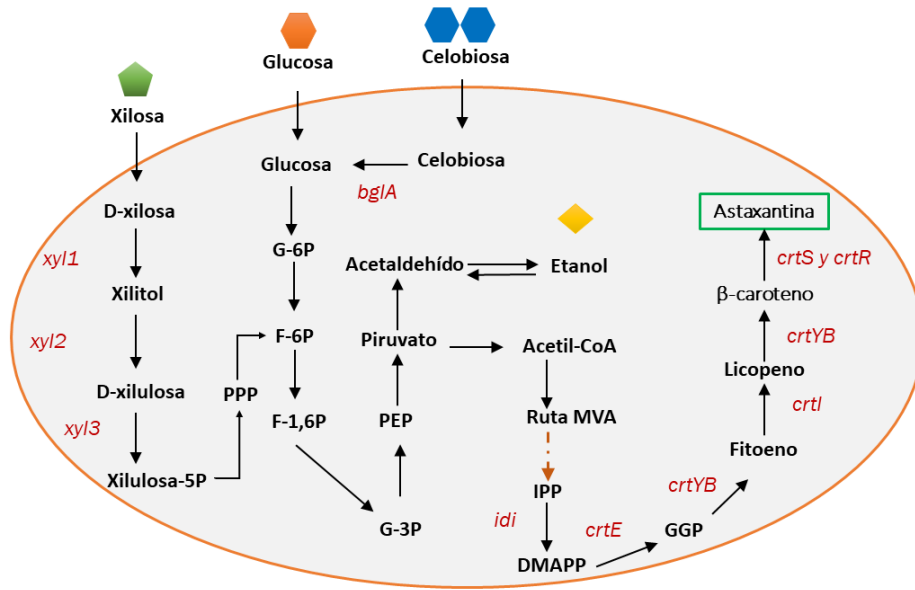


Figura 9. Biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* a partir de xilosa, glucosa y celobiosia. *xyl1* xilosa reductasa, *xyl2* xilitol deshidrogenasa, *xyl3* xilulosa quinasa, PPP ruta de las pentosas fosfato, G-6P glucosa-6-fosfato, F-6P fructosa-6-fosfato, PEP fosfoenolpiruvato, G-3P gluceraldehido-3-fosfato. Elaboración propia

1.3.4 Principales fuentes de carbono aprovechables por *Xanthophyllomyces dendrorhous*

El uso de desechos agroindustriales como fuente de nutrientes para la producción microbiana de compuestos de valor agregado propicia un bioproceso competitivo y sostenible. *X. dendrorhous* es una opción viable para la producción de carotenoides, ya que metaboliza diversas fuentes de carbono tanto refinadas como complejas. El bagazo de caña posee un alto contenido de celulosa y hemicelulosa que puede ser aprovechado en la producción de diversos metabolitos de alto valor agregado como lo son los biocombustibles, edulcorantes (xilitol) y carotenoides (astaxantina) (Tabla 3; Howard *et al.*, 2003; Abril & Navarro, 2012; Rastogi & Shrivastava, 2017). Gracias a esto ha aumentado el interés en el uso de materias primas de bajo costo. El uso de desechos o subproductos de la agricultura y las industrias alimentarias es de gran interés debido a que no sólo proporciona una forma de reducir el costo de producción de astaxantina, sino también ofrece una oportunidad para minimizar los problemas ambientales y energéticos relacionados a la eliminación de estos desechos (Villegas-Méndez *et al.*, 2019). No

obstante, la astaxantina natural no puede competir con la astaxantina sintética debido a su alto costo de producción (Stachowiak & Szulc, 2021). En consecuencia, muchos estudios se han propuesto buscar formas de mejorar la producción natural de astaxantina a bajo costo mediante la búsqueda de cepas sobreproductoras y optimizando las condiciones de crecimiento y producción.

Tabla 3. Composición química promedio de algunos residuos agroindustriales (Rastogi & Shrivastava, 2017)

Componente (%)	Maderas duras	Bagazo de caña	Paja de trigo	Paja de arroz
Celulosa	40-55	32-48	33-38	28-36
Hemicelulosa	24-40	19-24	26-32	23-28
Lignina	18-25	23-32	17-19	12-14

1.3.5 Estrategias de mejora en el rendimiento de astaxantina

Xanthophyllomyces dendrorhous se ha sometido a diferentes tratamientos mutagénicos, ingeniería genética y modificaciones en las condiciones de cultivo con el objetivo de incrementar la producción de astaxantina y reducir costos de producción. Se han aislado mutantes sobreproductoras de astaxantina gracias a tratamientos con antimicina A; N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, o mediante la exposición a rayos gamma en dosis bajas (Sánchez *et al.*, 1999). Algunas de las mutantes obtenidas han mostrado un aumento de dos a cinco veces en el contenido de astaxantina en comparación con cepas silvestres. También se ha obtenido un rendimiento mayor de astaxantina mediante el tratamiento con precursores de la carotenogénesis como mevalonato, glutamato o citrato (Wozniak *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

El aumento del rendimiento resulta de un cambio en los flujos metabólicos hacia las vías productoras de carotenoides. Esto confirma que el suministro de precursores para la carotenogénesis es limitante (Sanchez *et al.*, 2013). En nuestro grupo de trabajo

Barbachano-Torres *et al.*, (2014) obtuvo una cepa (*Xanthophyllomyces dendrorhous* R4) mediante mutagénesis aleatoria con NTG, la cual se caracterizó por su elevada relación de astaxantina/ β -caroteno (26.7), así como, su incremento en la concentración de astaxantina (2.6 veces) con respecto a la cepa silvestre. Posteriormente, Rangel-Basto (2020) obtuvo una doble mutante a partir de la cepa *X. dendrorhous* R4, la cual se denominó R4-X18. Esta mutante fue seleccionada por su fenotipo color rojo intenso en un medio que contenía xilosa como única fuente de carbono. Además, mostró mejores rendimientos de astaxantina creciendo en sustratos puros como glucosa, xilosa y celobiosa en comparación a su cepa parental R4.

2. JUSTIFICACIÓN

La biomasa lignocelulósica es una fuente alternativa de carbono y energía renovable que promete reducir el consumo de energías no renovables, siendo el bagazo de caña uno de los residuos lignocelulósicos más abundantes en México, con una generación de 15.2 millones de toneladas por año. Así mismo, resulta atractivo su uso para generar productos de alto valor agregado como lo es la astaxantina, con un valor de comercialización de \$ 2,000 dólares por kilogramo. La cepa mutante R4-X18 de *Xanthophyllomyces dendrorhous* asimila xilosa y celobiosa presentes en los sacarificados de bagazo de caña, con mayor rendimiento de astaxantina que sus cepas parentales. Por lo que es importante conocer más sobre el metabolismo de la xilosa y la celobiosa en esta levadura con el fin de diseñar bioprocesos que puedan ser llevados a nivel industrial a partir de sustratos de bajo costo como son los sacarificados.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento mutagénico que sufrió *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4-X18 mejoró la producción de astaxantina en comparación con su cepa materna R4, creciendo en SBC y xilosa y celobiosa.

Las actividades de XR, XDH y β -glucosidasa de *X. dendrorhous* R4-X18 relacionadas al metabolismo de la xilosa y celobiosa respectivamente, sufrieron cambios por el tratamiento mutagénico.

X. dendrorhous R4-X18 puede crecer y producir astaxantina a partir de SBC mejor que en otras fuentes de carbono como xilosa, celobiosa y glucosa.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar los cambios metabólicos en la mutante de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4-X18 respecto a la cepa R4, creciendo en glucosa, celobiosa, xilosa y sacarificados de bagazo de caña para la producción de astaxantina.

4.2 Específicos

- I. Definir los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC y en los sustratos puros glucosa, xilosa y celobiosa.
- II. Analizar y comparar las actividades de XR, XDH y β -glucosidasa en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en los SBC, glucosa, xilosa y celobiosa.
- III. Comparar el perfil electroforético desnaturalizante de las proteínas en los extractos crudos entre las cepas R4 y R4-X18 creciendo en los diferentes sustratos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

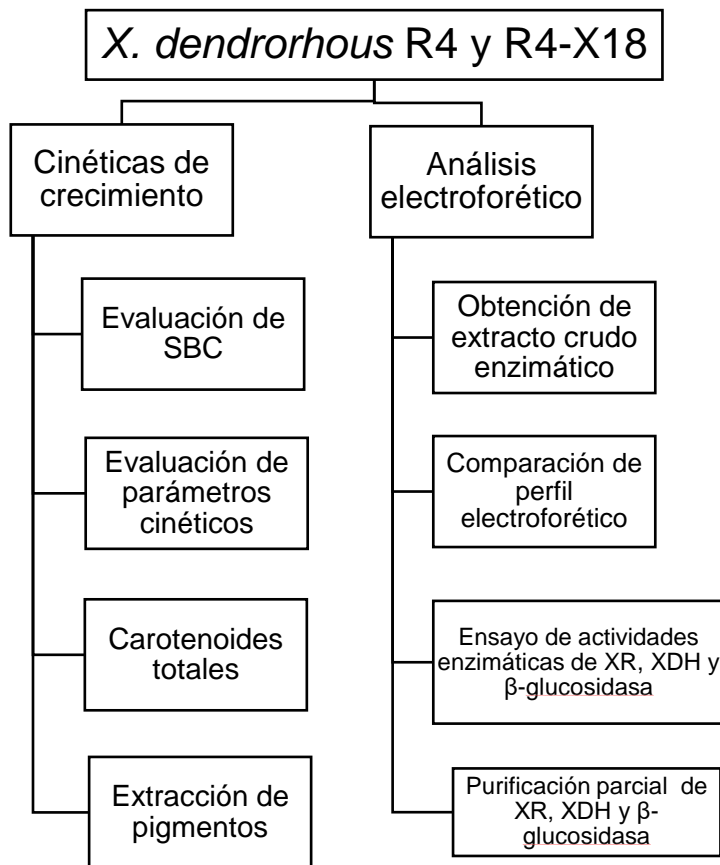


Figura 10. Estrategia experimental

5.1 Actividades a realizar

- I. Comparar el efecto de los SBC sobre el crecimiento y la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en cinéticas en matraz
- II. Evaluar las actividades de XR, XDH y β -glucosidasa en los cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa, celobiosa y en SBC
- III. Comparar el perfil electroforético desnaturalizante relacionado a XR, XDH y β -glucosidasa entre las cepas *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 para identificar cambios relacionados al metabolismo de las fuentes de carbono

5.2 Microorganismos

Xantophyllomyces dendrorhous R4 (Barbachano-Torres, 2014) y R4-X18 (Rangel-Basto, 2020) se usaron en el presente trabajo. El mantenimiento de las cepas se hizo mediante siembras mensuales por duplicado en placa en medio mínimo Breus suplementado con xilosa (MMBX) (0.5 g/L de extracto de levadura, 1 g/L sulfato de amonio, 0.05 g/L de sulfato de magnesio, 10 g/L de xilosa 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.

5.3 Cinéticas de crecimiento en sustratos puros y SBC

Los preinóculos se obtuvieron a partir de dos asadas de cada una de las cepas en matraces Erlenmeyer “bafleados” de 250 mL conteniendo 50 mL de medio MMBX. Los cultivos se incubaron a 20 ± 2 °C, 200 rpm (Gyrotory Water Bath Shaker mod. G67) durante 48 h. Se resembraron en un segundo matraz con medio YPD (20 g/L bactopectona, 10 g/L extracto de levadura, 10 g/L glucosa) en una relación al 10 % v/v, conservando las condiciones de temperatura y agitación durante 72 h, esto con la finalidad de obtener mayor cantidad de biomasa. El crecimiento celular obtenido se empleó como inóculo para las cinéticas en matraz manteniendo la relación de biomasa 10 % v/v en medio YP al 1 % p/v de glucosa (D), xilosa (X), celobiosa (C) o SBC al 0.6 % de azúcares totales. Las muestras se tomaron cada 12 h y se almacenaron a -4 °C para su análisis posterior.

5.4 Determinación de crecimiento

El crecimiento de *X. dendrorhous* R4-X18 se determinó de forma indirecta por medición de densidad óptica. Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó 5 min a 5,000 rpm. El botón celular se lavó dos veces con agua destilada, se resuspendió en el volumen original. Se hicieron diluciones 1:10, posteriormente cada dilución se leyó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 660 nm (JENWAY 6320D) y se determinó la concentración de biomasa a través de la curva patrón ($Y = 2.0103 X - 0.0685$) donde “Y” es la absorbancia y “X” es la concentración celular en g/L.

5.5 Sacarificación de bagazo de caña

Para la sacarificación se utilizó bagazo de caña al 2 % pretratado con NaOH, el cual se resuspendió en 2 L de regulador de citratos 25 mM a pH 4.8. Posteriormente, se adicionaron 7.4 g de enzima Celluclast® (Novozymes). La reacción se llevó a cabo por 12 h a 50 °C a 150 rpm. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se concentró en rotavapor hasta obtener una concentración de azúcares totales de 33.46 g/L.

5.6 Determinación de azúcares reductores

En tubos de ensayo se adicionaron 450 µL de agua destilada, 50 µL de sobrenadante de cultivo y 1.5 mL de reactivo DNS. Se llevaron las muestras a ebullición en baño María por 5 min y se enfriaron en baño de agua corriente. Después se adicionó 3 mL de agua destilada y se leyó a 550 nm (espectrofotómetro JENWAY 6320D). La concentración de glucosa y xilosa se calculó con curvas patrón realizadas con soluciones estándar de 0 a 500 µg.

5.7 Determinación de azúcares por HPLC

Se colectó 1 mL de muestra y se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm. El sobrenadante obtenido se diluyó 1:10 con agua grado HPLC y se filtró a través de una membrana acrodisco (ϕ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 µm, PALL) y se inyectaron 20 µL del filtrado. Se utilizó la columna Hi-Plex H300X7.7-mm (Agilent) y un detector de índice de refracción (IR). La fase móvil fue una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min. La concentración de cada metabolito se calculó utilizando curvas estándar para celobiosa, glucosa y xilosa.

5.8 Determinación de carotenoides totales

Los carotenoides totales se determinaron tomando 2 mL de muestra, posteriormente se centrifugó a 8,000 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 resuspendió en el volumen original y se volvió a centrifugar desechando el sobrenadante. Se agregaron 2 g de perlas de vidrio (ϕ 500 µm) y se adicionaron 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55 °C. Se agitó en el vórtex durante 2 min y posteriormente se adicionó 1 mL de NaCl al 20%, 1 mL de acetona y 1 mL de hexanos como solvente de

extracción. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 2 min, posteriormente se centrifugaron 15 min a 10,000 rpm, se recuperó la fase orgánica y se midió la absorbancia a 474 nm 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 $E_{1\%} = 2100$ y la ecuación 1 (An *et al.*, 1989).

$$CT \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{A_{474} * 100}{21} \quad (\text{Ec 1})$$

C_T : Concentración de carotenoides totales

$$Y_{p/x} [\mu g/g \text{ células}] = C_T / [\text{biomasa (g/mL)}]$$

5.9 Determinación de astaxantina por HPLC

La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo por HPLC (Agilent Technologies modelo 1260 Infinity) inyectando 20 μL de muestra previamente extraída (ver apartado 5.8). Se tomó una muestra de 400 μL de carotenoides totales y se secó con nitrógeno gaseoso, posteriormente se resuspendió la muestra en 100 μL de metanol. El flujo de trabajo empleado para esta determinación 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) con una longitud de onda 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.

5.10 Obtención del extracto crudo intracelular

Se tomó 1 mL de las muestras de cultivos en medio MMX, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se aplicaron dos lavados con agua estéril al paquete celular, posteriormente se resuspendió en 500 μL de regulador de fosfatos 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 enzimática y electroforesis.

5.11 Determinación de actividades enzimáticas

5.11.1 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). Se mezclaron 100 μ L de extracto enzimático, más 1 mL de pNPG 1mM disuelto en regulador citratos fosfatos 50 mM pH 5, se incubó a 60 °C durante 15 min, se detuvo la reacción con 1 mL de Na_2CO_3 1 M. Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la concentración de pNP liberado con ayuda de una curva patrón. Una unidad de actividad de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de pNP por minuto en las condiciones estándar de ensayo.

5.11.2 Actividad xilosa reductasa (XR)

La actividad de XR se midió por la disminución de la absorbancia a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) durante 2 min, dada por la oxidación del NADH o NADPH. La mezcla de reacción se hizo en una celda de cuarzo adicionando 600 μ L de regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2, 100 μ L de agua estéril, 100 μ L de xilosa 0.1 M, 100 μ L de NADH 1.15 mM y 100 μ L de extracto enzimático crudo.

5.11.3 Actividad xilitol deshidrogenasa (XDH)

La actividad de XDH se midió por el aumento de la absorbancia a 340 nm (espectrofotómetro Spectronic 21D) durante 2 min dado por la reducción del NAD. Se hizo la mezcla de reacción en una celda de cuarzo usando 600 μ L de regulador TRIS-HCl 0.05 M pH 8.5, 100 μ L de MgCl_2 100 mM, 100 μ L de xilitol 0.1 M, 100 μ L de NAD 1.15 mM y se adicionaron 100 μ L de extracto crudo.

Para el cálculo de ambas actividades específicas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{V_{\text{total}} * \Delta\text{Abs}}{\epsilon * V_{\text{enzima}} * E * d}$$

d= paso de luz a través de la celda (cm)

V_{total} = volumen total de la mezcla (mL)

V_{enzima} = volumen del extracto enzimático utilizado (μ L)

ϵ = coeficiente de extinción molar de NADH y NAD para un paso de luz de 1 cm (6.22 L/mmol*cm)

E= Concentración de proteína en la muestra (mg/mL)

Δ Abs= cambio en la absorbancia a con respecto al tiempo (abs/min)

U = Unidad de actividad enzimática definida como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADH (XR) o reduce 1 μ mol de NAD (XDH) en 1 min (μ mol/mg*min).

5.12 Determinación de proteína por Bradford

Se tomaron 100 μ L de extracto crudo al cual se le adicionó 1 mL de reactivo de Bradford (Bradford, 1976) y se mezcló cuidadosamente para finalmente dejar reposar por 5 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm (se utilizaron 100 μ L de agua destilada como blanco para la corrección de la absorbancia). El reactivo de Bradford se preparó disolviendo 100 mg de Coomassie Azul brillante G-250 en 50 mL de etanol al 95 % hasta la disolución parcial del colorante. Se agregaron 100 mL de H₃PO₄ al 85 % para disolver completamente el colorante, finalmente se llevó a un volumen de 1000 mL y se filtró a través de papel Whatman (10 μ m) y se depositó en un frasco ámbar. Se estimó la proteína contra una curva realizada con albúmina de suero de bovino de 1 a 20 μ g “Y=0.0423X (μ g/ μ L) + 0.0355”.

5.13 Cromatografía de intercambio aniónico

La muestra de extracto crudo se hizo pasar por una columna de Q Sepharosa Fast Flow (Biorad) (2x6 cm), lavada con KCl 1 M y equilibrada con 30 mL de regulador Tris-HCl 25 mM pH 7.2. Se tomaron 200 μ L de muestra de extracto crudo y se eluyeron con KCl 0.52 M obteniendo fracciones de 2 mL, posteriormente se midió la concentración de proteína en cada fracción leyendo absorbancia a 280 nm. Se juntaron varias fracciones y se evaluó actividad β -glucosidasa con pNPG.

5.14 Electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis en una dimensión se llevó a cabo usando un gel de poliacrilamida al 12 %. El gel separador se preparó agregando 6 mL de acrilamida/bisacrilamida (30:0.8), 3.75 mL de amortiguador (4X) Tris-HCl/SDS pH 8.8, 5.25 mL de agua desionizada, 50 µL de persulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 15 µL de TEMED. El gel de carga se preparó usando 0.65 mL acrilamida/bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de amortiguador (4X) Tris-HCl/SDS pH 6.8, 3.05 mL de agua desionizada, 50 µL de persulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 15 µL de TEMED. Las muestras cargadas en el gel de una dimensión (extracto crudo intracelular obtenido del apartado 6.9) se prepararon con amortiguador SDS/ β -mercaptoetanol (20:1) a una relación 1:1 con un volumen final de 30 µL. Se homogenizaron las muestras y se llevaron a baño María por 5 min a 95 °C, posteriormente se cargaron los pozos con 30 µL y se corrieron los geles por 10 min a 75 V y finalmente a 120 V. La tinción se realizó sumergiendo el gel en una solución de azul de Coomassie al 0.1 % disuelto en metanol/ácido acético/agua (25:10:65) por una noche. El desteñido se hizo retirando la solución de tinción y sumergiendo el gel en una solución metanol/ácido acético/agua (30:7:63) hasta eliminar todo el colorante del fondo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC y sustratos puros

Con el fin de determinar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18, se cultivó a ambas cepas en glucosa, xilosa y celobiosa, así como en los sacarificados de bagazo de caña. Cada una de las cepas fue evaluada en cada sustrato de forma individual y se compararon las velocidades específicas de crecimiento (μ), de formación de producto (q_p), de consumo de sustrato (q_s); productividad (Q_A) y los rendimientos de biomasa ($Y_{x/s}$), de astaxantina ($Y_{p/x}$) y la producción específica ($Y_{p/s}$), así como las actividades enzimáticas de XR, XDH y β -glucosidasa. Los resultados se presentan por sustrato.

6.1.1. Crecimiento en glucosa

Para los cultivos de las cepas R4 y R4-X18 en glucosa, el consumo de la fuente de carbono comenzó a partir de las 24 h, coincidiendo con el inicio de la fase de crecimiento exponencial (Figura 11). Posteriormente, a las 48 h la cepa R4 consumió cerca del 60 % de la glucosa, mientras que la cepa R4-X18 sólo consumió el 44 %, lo cual indicó diferencias significativas en el consumo de este sustrato. A partir de las 60 h el consumo de glucosa disminuyó de forma gradual para ambas cepas lo que indicó el establecimiento de un estado estacionario. Bajo estas condiciones, la velocidad específica de consumo de glucosa fue de 0.12 ± 0.007 g_s/g_xh para ambas cepas. Es decir, no hubo cambios significativos entre ambas cepas al consumir glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, la concentración residual de glucosa fue mayor en la mutante R4-X18 con una diferencia de 1.12 g/L con respecto a la cepa R4.

Por otro lado, el crecimiento de la cepa R4 en glucosa alcanzó una concentración celular máxima de 5.14 ± 0.08 g/L en 132 h (Figura 11) con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.08 ± 0.01 1/h y un rendimiento celular ($Y_{x/s}$) de 0.67 ± 0.04 g_x/g_s (Tabla 4). A su vez, la producción de biomasa por la mutante R4-X18 alcanzó una concentración celular máxima a las 96 h con 4.32 ± 0.19 g/L (Figura 11) a una μ de 0.072

± 0.001 1/h y un rendimiento $Y_{x/s}$ de 0.58 ± 0.06 g_x/g_s (Tabla 4). Para ambas cepas la fase de crecimiento exponencial inició a partir de las 24 h. No obstante, para la cepa R4-X18 la fase de crecimiento exponencial finalizó a las 48 h, mientras para R4 se extendió hasta las 60 h (Figura 11). Sumado a esto la μ de la cepa R4 fue 1.2 veces superior con respecto a la cepa R4-X18. En consecuencia, la concentración celular obtenida por R4-X18 fue menor a la concentración de R4 usando glucosa como fuente de carbono. Así mismo, el rendimiento $Y_{x/s}$ fue más alto en la cepa R4, ya que mostró mayor aprovechamiento de la glucosa para la formación de biomasa que su mutante R4-X18.

El incremento en los rendimientos celulares obtenidos en el presente trabajo también ha sido observado por otros autores. Así, Cannizzaro *et al.*, (2004) observaron que al modular la velocidad de dilución en cultivos en lote alimentado de *X. dendrorhous* silvestre, se podía incrementar o disminuir el flujo de carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato dando como resultado cambios en el rendimiento de biomasa. No obstante, mutantes de *X. dendrorhous* mostraron cambios más significativos en el flujo de las pentosas fosfato y por lo tanto en el rendimiento de biomasa. Por su parte, Torres-Haro *et al.*, (2021) observaron que al modificar los nutrientes del medio de cultivo utilizando glucosa como fuente de carbono para *X. dendrorhous* podían incrementar los rendimientos de biomasa hasta valores de 0.58 ± 0.03 g_x/g_s.

Por otro lado, la cepa R4-X18 redujo su concentración celular a partir de las 108 h, indicando el inicio de la fase de muerte celular, mientras que la cepa R4 permaneció en fase estacionaria. Este comportamiento en el crecimiento celular se ha observado en otras mutantes de *X. dendrorhous* con respecto a sus cepas maternas, así como diferencias en la producción de carotenoides (Stachowiak, 2013). Xiao *et al.*, (2015) identificaron que las cepas mutantes de *Phaffia rhodozyma* con menor crecimiento también mostraron una menor concentración de proteínas intracelulares durante las primeras 24 h de cultivo. Lo cual sugirió que la fuente de carbono, ATP y NADH que eran utilizados para el crecimiento celular, así como para otros constituyentes celulares se redirigían a la síntesis de otros metabolitos afectando el metabolismo primario.

En conclusión, tanto la cepa R4 como la mutante R4-X18 pueden consumir glucosa a la misma velocidad, sin embargo, el catabolismo de la glucosa puede ser diferente entre ambas cepas, ya que la cepa R4 logró acumular mayor cantidad de biomasa, así como

una baja concentración residual de glucosa, lo cual podría indicar que la cepa mutante R4-X18 además de consumir menor cantidad de glucosa está utilizando el acetil-CoA derivado de la glucólisis para otros procesos celulares distintos al crecimiento celular.

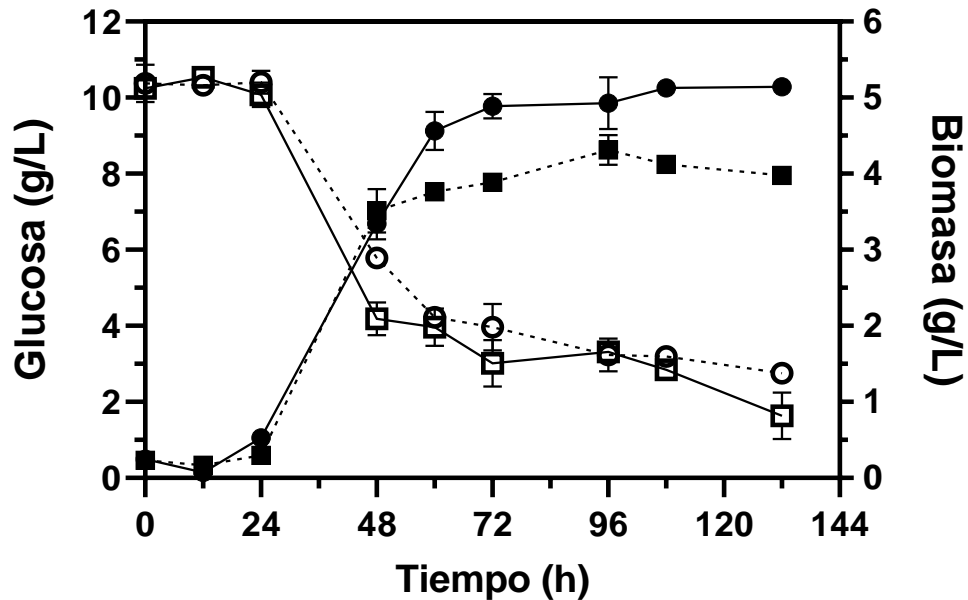


Figura 11. Cinéticas de crecimiento (●) (■) y consumo de glucosa (□) (○) por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 respectivamente.

6.1.2 Crecimiento en xilosa

Respecto al consumo de xilosa, éste inició a partir de las 48 h en la cepa R4 llegando a consumir cerca del 70 % de la pentosa a las 72 h el cual coincidió con la fase de crecimiento exponencial de dicha cepa (Figura 12). Posteriormente, el consumo de la xilosa disminuyó de forma constante hasta consumir el 84 % en 132 h con una velocidad específica de consumo de 0.11 ± 0.004 g_s/g_xh. Por lo que R4 requirió el doble de tiempo para poder metabolizar la xilosa en comparación a los cultivos en glucosa (Figura 12). De modo similar, la cepa R4-X18 consumió la xilosa de forma acelerada a partir de las 72 h con una diferencia de 24 h con respecto a la cepa R4. Por otro lado, la q_s fue de 0.09 ± 0.005 g_s/g_xh que coincidió con la fase de crecimiento exponencial. Si bien ambas cepas se comportaron de forma similar al crecer en xilosa, se observaron diferencias en la velocidad específica de consumo de sustrato, siendo mayor en R4 respecto que en R4-

X18. Así mismo, ambas cepas tuvieron un menor consumo de sustrato al crecer en xilosa que en celobiosa, no obstante, esta diferencia fue mayor en la mutante R4-X18.

Con relación al crecimiento de las cepas R4 y R4-X18 en xilosa, la cepa R4 alcanzó una concentración celular máxima de 5.24 ± 0.33 g/L, similar a la concentración obtenida en los cultivos en glucosa (Figura 12). Por otro lado, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa fueron de 0.064 ± 0.001 1/h y 0.57 ± 0.01 g_x/g_s respectivamente (Tabla 4), siendo 1.3 y 1.2 veces menor a los valores obtenidos para los mismos parámetros en glucosa. Este comportamiento puede estar relacionado a la prolongación de la fase lag que presentó R4 en xilosa, que duró aproximadamente 48 h, mientras que en glucosa la fase lag fue de sólo 24 h.

La cepa R4-X18 mostró la misma conducta al crecer en xilosa, prolongando la fase lag. De igual manera, el rendimiento de biomasa en R4-X18 no presentó cambios significativos con respecto al rendimiento obtenido en glucosa. No obstante, la producción de biomasa en los cultivos de R4-X18 alcanzaron una concentración máxima ligeramente superior a los cultivos en glucosa con 5.42 ± 0.28 g/L (Figura 12). Esta concentración fue incluso mayor a la obtenida por la cepa R4 en ambas condiciones. Sin embargo, la μ fue 1.3 veces inferior a la observada en R4 al crecer en xilosa. Esta diferencia en la μ de R4-X18 tuvo como consecuencia el desplazamiento de la fase estacionaria. Es decir, la fase de crecimiento exponencial en R4-X18 finalizó a las 132 h, mientras que en R4 esta misma fase se detuvo a las 108 h.

En conclusión, ambas cepas tuvieron comportamientos similares al crecer en xilosa, mostrando fases lag muy prolongadas con respecto a los cultivos en glucosa. Existen factores que pueden estar relacionados con la prolongación de la fase lag como el transporte de xilosa al interior celular, ya que existen transportadores específicos o inespecíficos que pueden estar limitados por su baja afinidad a la xilosa por lo que puede propiciar un aumento en la síntesis de transportadores para solventar esta baja afinidad. Se ha observado que en levaduras que carecen de un sistema de transporte específico de xilosa como *Saccharomyces cerevisiae*, contienen transportadores de hexosas (Hxt) que median la captación de glucosa y también han mostrado mediar la captación de xilosa, aunque con menor afinidad (Vasylyshyn *et al.*, 2020). Sin embargo, muchas especies nativas asimiladoras de pentosas tienen sistemas de transporte de baja y de

alta afinidad, tanto transportadores que facilitan la difusión como simportadores de protones. No obstante, en *X. dendrorhous* aún no se conoce sobre este proceso de transporte. Así mismo, la lenta asimilación de la xilosa puede ser el resultado de su catabolismo, ya que se requiere de la síntesis de un gran número de enzimas para alimentar vías metabólicas como la óxido-reducción de la xilosa y la vía no oxidativa de las pentosas fosfato (PPP) para poder ingresar a la glucólisis y posteriormente llegar a acetil-CoA en el ciclo de los ácidos tricarbónicos en el metabolismo aerobio. Por lo tanto, la célula debe reponer una mayor cantidad de ATP, cofactores y enzimas para así poder asimilar con mayor facilidad la xilosa (Berlanga, 2004). En comparación, el metabolismo de la glucosa no requiere el paso de óxido-reducción ni el de PPP para poder ingresar a la glucólisis (Ochoa-Chacón *et al.*, 2022).

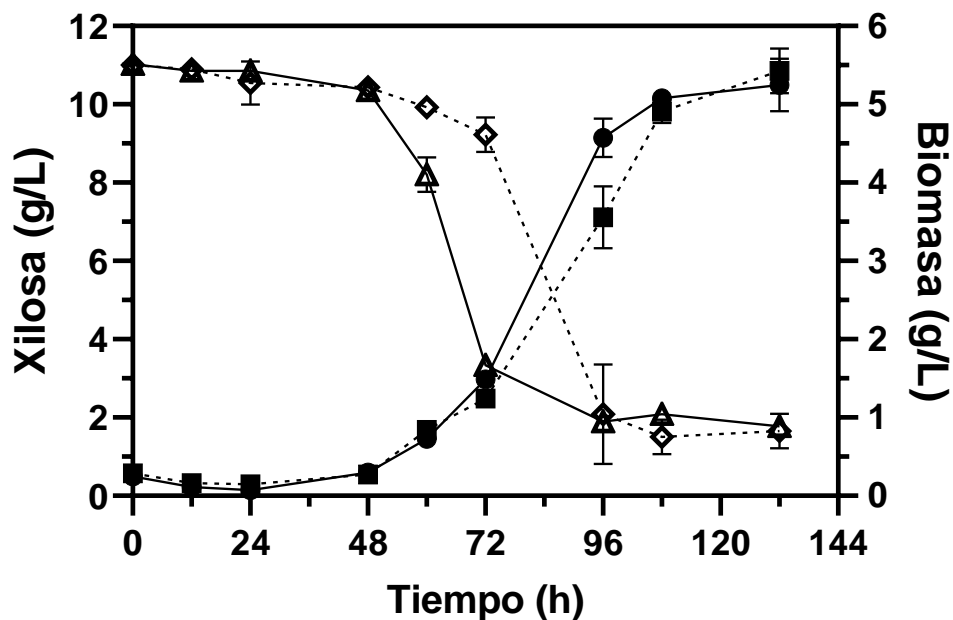


Figura 12. Cinéticas de crecimiento (●) (■) y consumos de xilosa (Δ) (◇) en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 respectivamente.

6.1.3 Crecimiento en celobiosa

X. dendrorhous R4 y R4-X18 se hicieron crecer en medios de cultivo suplementados con aproximadamente 10.68 ± 0.41 g/L de celobiosa. La cepa R4 consumió cerca del 60 % de este azúcar durante las primeras 24 h, siendo más rápido en comparación con el consumo de la glucosa y xilosa respectivamente (Figura 13a). Sin embargo, a las 48 h se acumuló 1.84 ± 0.44 g/L de glucosa, producto de la hidrólisis de la celobiosa. A las 60 h la glucosa acumulada alcanzó 3.34 ± 0.23 g/L superando por 7.4 veces la concentración de celobiosa residual. La velocidad específica de consumo de celobiosa fue 0.18 ± 0.008 g_s/g_xh, 1.5 y 1.6 veces mayor a obtenida cuando creció en glucosa y xilosa respectivamente. Al agotarse la celobiosa, la cepa R4 consumió la glucosa acumulada presentando un ligero crecimiento diáuxico a partir de las 72 h (Figura 13a).

Respecto a la cepa R4-X18 creciendo en celobiosa, ésta acumuló 2.5 veces más glucosa con respecto a la cepa R4. Por lo que, la cepa R4 sólo acumuló glucosa a partir de las 60 h y posteriormente la consumió, mientras que la mutante R4-X18 acumuló glucosa hasta el final de la cinética. Los cultivos de R4-X18 en celobiosa tuvieron una q_s de 0.31 ± 0.02 g_s/g_xh siendo 2.6 veces mayor a la obtenida por la misma cepa en glucosa con 0.12 ± 0.01 g_s/g_xh, así mismo, superó 1.8 veces la q_s obtenida por su cepa materna R4 en el mismo sustrato. Este comportamiento se reflejó en la concentración de celobiosa, agotándose sólo cerca del 49 % de este disacárido a partir de las 24 h, mientras que para los cultivos en glucosa el mismo consumo tomó cerca de 48 h (Figura 13b).

La concentración de celobiosa disminuyó a partir de las 12 h de cultivo resultando en la acumulación de glucosa (Figura 13b). No obstante, la glucosa se agotó a las 24 h coincidiendo con el inicio de la fase de crecimiento exponencial, por lo que la glucosa acumulada durante este periodo fue utilizada por *X. dendrorhous* R4-X18 para su crecimiento. Así mismo, el consumo de celobiosa disminuyó de forma gradual a las 24 h. Posteriormente a las 60 h la concentración de glucosa acumulada fue casi igual a la de la celobiosa residual con 3.78 ± 1.7 g/L y 3.97 ± 1.9 g/L respectivamente (Figura 13b). Lo anterior tuvo un impacto directo en el crecimiento de *X. dendrorhous* R4-X18 ya que la levadura entró en una fase estacionaria, por lo que no hubo cambios significativos en la acumulación de biomasa al final de la cinética (132 h), resultando en un incremento en la

acumulación de glucosa por 7.96 ± 1.75 g/L, mientras que la concentración de celobiosa residual fue 1.06 ± 0.41 g/L.

La disponibilidad de glucosa está relacionada a la actividad β -glucosidasa y su capacidad para hidrolizar la celobiosa. Sin embargo, *X. dendrorhous* R4-X18 no pudo aprovechar la glucosa libre de forma eficiente. Esto quiere decir que hay diferencias significativas en el metabolismo de R4-X18 al consumir la glucosa proveniente de la hidrólisis de la celobiosa, ya que este comportamiento no se observó en los cultivos de glucosa como sustrato puro.

Los cultivos de la cepa R4 en celobiosa alcanzaron un crecimiento máximo de 4.38 ± 0.01 g/L en 132 h de crecimiento (Figura 13a). No obstante, la μ obtenida en este sustrato fue de 0.080 ± 0.001 1/h, similar a la obtenida en glucosa y superior a la que obtuvo en xilosa por 1.3 veces. En cuanto al rendimiento de biomasa se tuvo un valor de 0.41 ± 0.01 g_x/g_s, siendo más bajo que el rendimiento obtenido en la glucosa teniendo una diferencia de 0.26 y 0.16 g_x/g_s para la xilosa.

El crecimiento de la cepa R4-X18 en celobiosa alcanzó una concentración de 1.44 ± 0.08 g/L en 108 h siendo la más baja en comparación con las otras fuentes de carbono (Figura 13b). Esto resultó en una velocidad específica de crecimiento muy baja con 0.039 ± 0.001 1/h. Por lo tanto, el rendimiento de biomasa obtenido fue 3.4 veces menor al que tuvo su cepa materna R4 usando el mismo sustrato. Así mismo, ambas cepas presentaron un ligero crecimiento diaúxico en presencia de celobiosa, ya que tuvieron una fase de crecimiento exponencial a partir de las 24 h, seguido por una segunda fase a las 72 h. Al agotarse la celobiosa, la cepa R4 consumió la glucosa acumulada presentando un crecimiento diáuxico a partir de las 72 h, siendo más marcado en la cepa R4.

La diferencia en el crecimiento entre ambas cepas puede estar relacionada a la capacidad de cada cepa para metabolizar la celobiosa ya sea por la actividad β -glucosidasa o por el transporte celular. Los genes involucrados en el metabolismo de la celobiosa están organizados de una manera única en los organismos que asimilan este disacárido. Estos genes codifican proteínas reguladoras de respuesta a celobiosa, transportadores y β -glucosidasas que son organizados como un sólo operón o por múltiples genes independientes. No obstante, existen mecanismos que regulan la acción

de estos genes, por ejemplo, la glucosa funciona como un inhibidor de diferentes enzimas hidrolíticas retrasando el co-metabolismo de otros azúcares (Parisutham *et al.*, 2017).

Se ha observado que el factor de transcripción CRE1 (represor catabólico de carbono, RCC) en géneros como *Trichoderma* y *Aspergillus* se une al dominio represor de ciertos genes que codifican enzimas hidrolíticas limitando su expresión. Castro *et al.*, (2014) demostraron la relación entre la represión catabólica por carbono (RCC) y la expresión de genes que codifican para enzimas celulolíticas en cepas de *Trichoderma reesei* con delección del gen *Cre1* permitió el incremento en los niveles de expresión de genes que codifican para β -glucosidasas en medios que contenían celulosa, glucosa y soforosa. Esto podría explicar la disminución en el consumo de celobiosa mientras se acumula glucosa afectando los genes de *bgIX* que codifican para β -glucosidasas. No obstante, estos factores de transcripción pueden estar implicados en el transporte de la fuente de carbono, lo cual podría explicar porque no hubo consumo de glucosa en la cepa R4-X18.

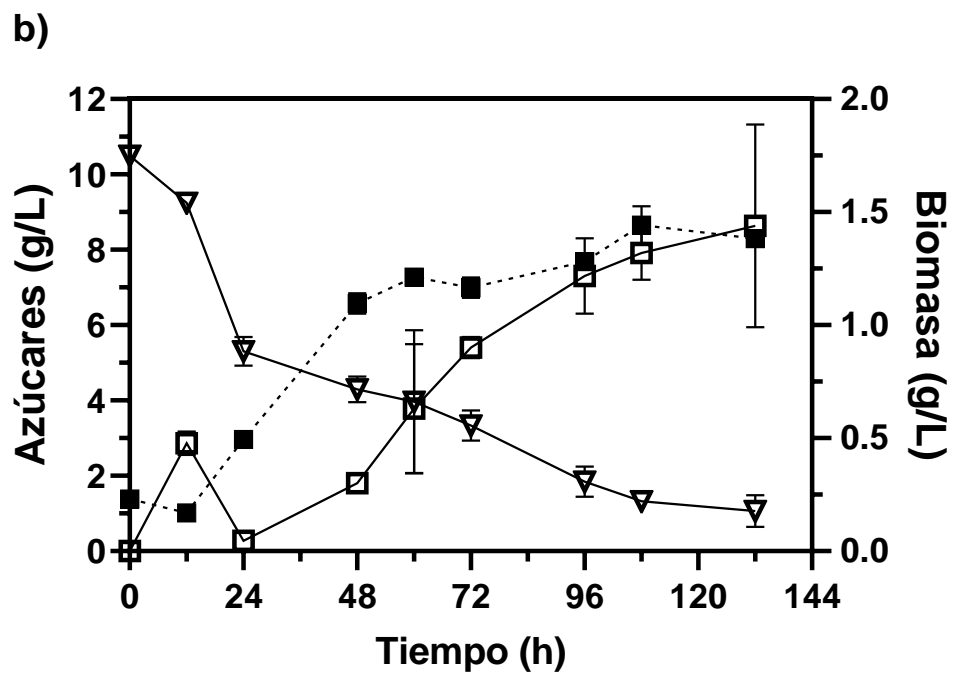
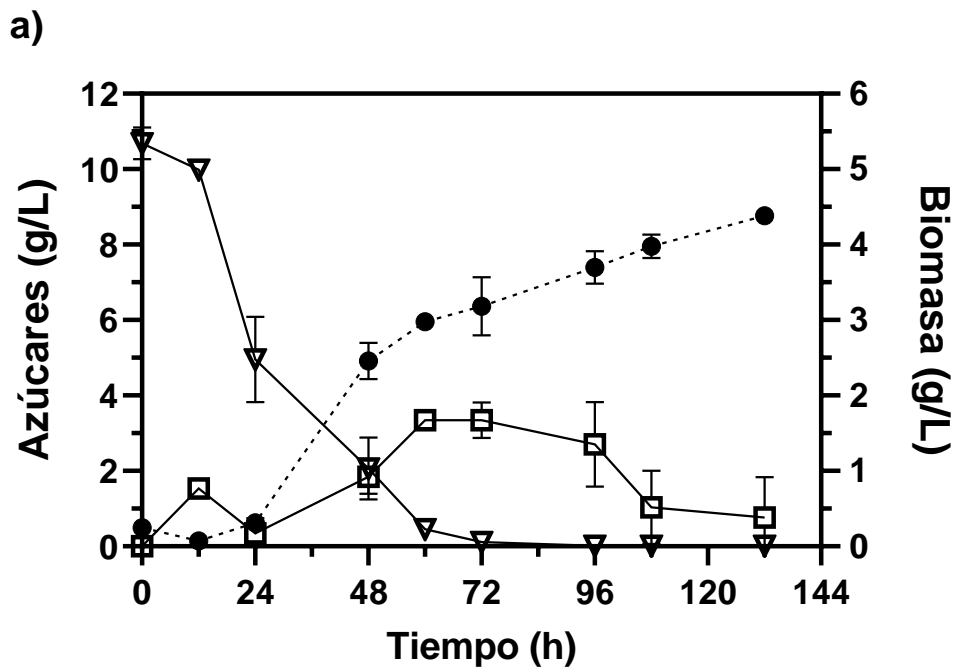


Figura 13. Cinéticas de crecimiento en celobiosa por a) (●) *X. dendrorhous* R4 y b) (■) R4-X18. Concentración de celobiosa (▽) y glucosa (□).

6.1.4 Crecimiento en SBC

Los sacarificados de bagazo de caña fue el cuarto sustrato evaluado. Por ser un sustrato complejo, se midió el perfil de azúcares al inicio y durante la cinética. Los azúcares más representativos en dicha mezcla fueron glucosa, xilosa y celobiosa con 3.45 ± 0.03 ; 1.74 ± 0.01 y 0.93 ± 0.03 g/L respectivamente. La concentración de azúcares totales fue de aproximadamente 6.67 ± 0.30 g/L.

Como se observa en la figura 14a, *X. dendrorhous* R4 logró cometabolizar los tres azúcares a partir de las 24 h. No obstante, se evidenció la preferencia por la glucosa con un consumo del 20 % durante las primeras 48 h, mientras que la xilosa tuvo un consumo del 5.3 % y la celobiosa del 3.8 %. Posteriormente la glucosa se agotó a las 60 h seguido por la xilosa a las 72 h y finalmente la celobiosa fue el último azúcar consumido a las 108 h (Figura 14a). La q_s de la mezcla de azúcares fue 0.086 ± 0.004 g_s/g_xh siendo menor a la velocidad de consumo de la celobiosa. Por otro lado, la cepa R4-X18 tuvo una q_s de 0.08 ± 0.006 g_s/g_xh en los SBC, similar a la q_s de R4, además fue 1.5 y 3.2 veces menor a la obtenida por la misma cepa en glucosa y celobiosa respectivamente. El consumo de azúcares por la mutante R4-X18 siguió el mismo patrón observado en la cepa R4 con agotamiento de la glucosa a partir de las 60 h (Figura 14b). Así mismo, la xilosa se agotó a las 96 h teniendo una diferencia de 24 h con respecto a su cepa parental R4, por otro lado, la celobiosa se agotó a las 108 h para ambas cepas, lo cual sugiere cambios en el metabolismo de asimilación de xilosa por la cepa R4-X18.

El crecimiento de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 después de 123 h alcanzó una concentración de 4.54 ± 0.03 y 4.27 ± 0.29 g/L respectivamente (Figura 14a). Así mismo, los rendimientos de biomasa para R4 y R4-X18 fueron de 0.68 ± 0.05 y 0.64 ± 0.05 g_x/g_s respectivamente. Aunque la concentración de biomasa y el rendimiento $Y_{x/s}$ fue similar para ambas cepas cultivadas en SBC, se observaron diferencias significativas en la μ , siendo de 0.058 ± 0.001 1/h en la cepa R4, 1.2 veces mayor que en R4-X18. Las cepas R4 y R4-X18 mostraron el mismo patrón de crecimiento diaúxico, iniciando la primera fase de crecimiento exponencial a partir de las 24 h correspondiendo al consumo de glucosa, seguido por una segunda fase a las 96 h que coincidió con el consumo de xilosa y celobiosa. Esto se debe a que *X. dendrorhous* prioriza el catabolismo de la glucosa

hasta su agotamiento y posteriormente cambian su metabolismo para poder consumir xilosa y celobiosa (Córdova *et al.*, 2016). La preferencia por la glucosa se debe a que en la mayoría de los microorganismos las enzimas necesarias para el catabolismo de la glucosa son de carácter constitutivo por lo cual no se ven afectadas por la presencia de xilosa o celobiosa (Martinez-Moya *et al.*, 2020).

La cepa R4-X18 al igual que su cepa parental R4 logró crecer en todos los sustratos, incluso tuvo el mismo comportamiento en presencia de xilosa, la cual estimuló el crecimiento, alcanzando concentraciones más altas de biomasa con respecto a la observada en glucosa, celobiosa y los SBC. De igual manera, la celobiosa fue el sustrato con menor producción de biomasa, y por ende en rendimiento para ambas cepas. Sin embargo, el crecimiento de R4-X18 en este azúcar fue aún más bajo que el que presentó R4.

Para los cultivos en SBC, ambas cepas no presentaron diferencias significativas en la producción de biomasa y en el rendimiento $Y_{x/s}$, la única diferencia entre ambas fue la velocidad de crecimiento la cual se vio favorecida en R4. Así mismo, la cepa R4 tuvo mayor producción de biomasa y mejores rendimientos en glucosa, celobiosa y en SBC que la cepa R4-X18. *X. dendrorhous* R4-X18 es una doble mutante y se ha observado que las cepas mutantes tienen menores tasas de crecimiento y de consumo de sustrato que sus cepas parentales (Cannizzaro *et al.*, 2004). *X. dendrorhous* puede crecer en diferentes sustratos como ácidos orgánicos, disacáridos como sacarosa, celobiosa y monosacáridos como fructosa, xilosa, arabinosa y en hidrolizados lignocelulósicos ricos en glucosa, celobiosa y xilosa. Esto se debe en gran medida a que posee herramientas enzimáticas que permiten asimilar dichas fuentes. (Nghiem *et al.*, 2009 Montanti *et al.*, 2011; Villegas-Méndez *et al.*, 2019; Martinez-Moya *et al.*, 2020).

En el presente estudio se confirmó la capacidad de *X. dendrorhous* para crecer en xilosa y celobiosa como sustratos puros, así como en sacarificados de bagazo de caña. Así mismo, la xilosa promovió el crecimiento celular acumulando 1.25 veces más biomasa que la glucosa, mientras que los SBC tuvieron el mismo efecto sobre el crecimiento celular acumulando la misma cantidad de biomasa que la glucosa, siendo fuentes de carbono favorables para *X. dendrorhous* R4 y R4-X18.

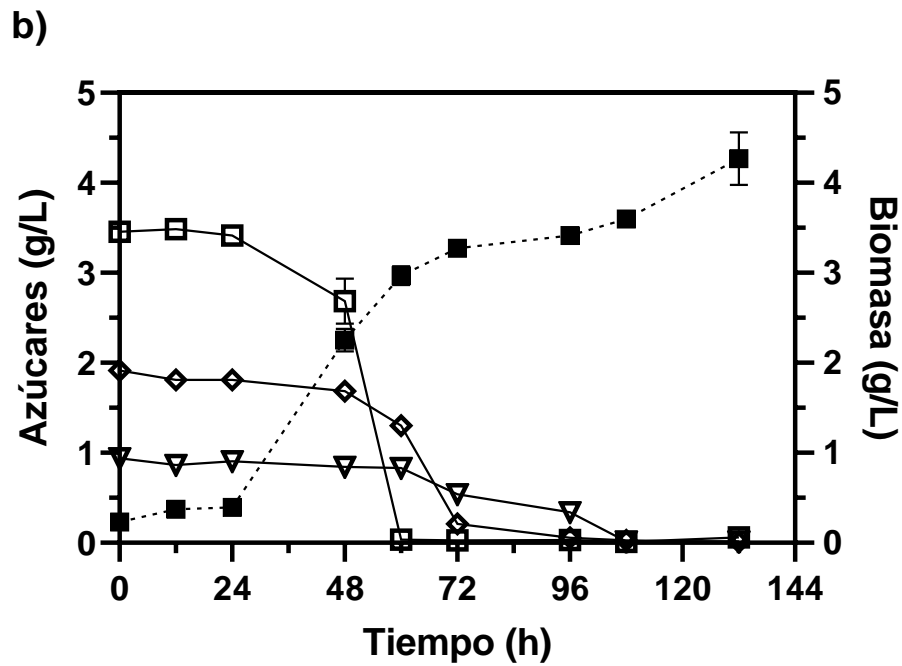
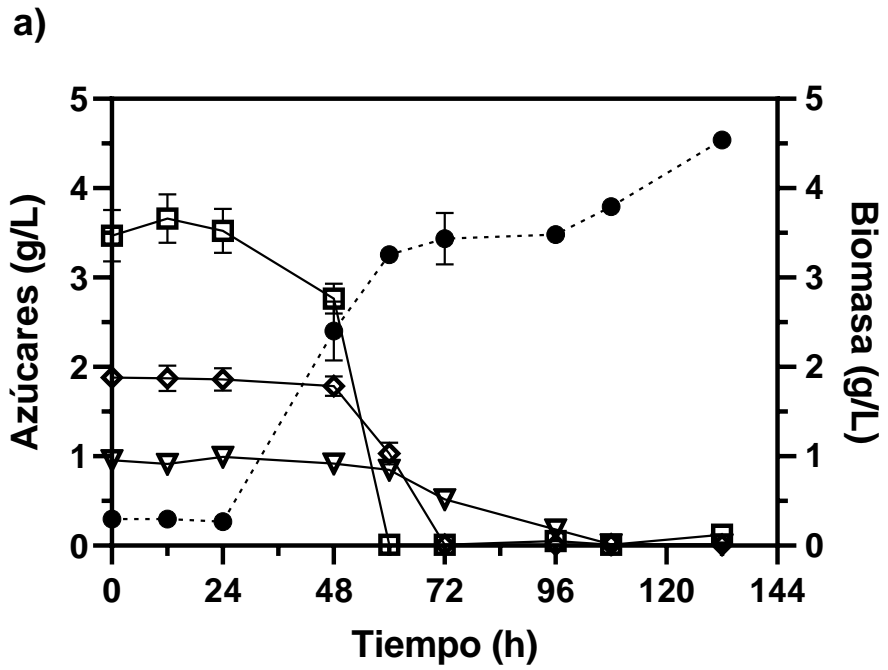


Figura 14. Cinéticas de crecimiento en SBC por a) (●) *X. dendrorhous* R4 y b) (■) R4-X18. Consumo de celobiosa (∇), glucosa (□) y xilosa (◇)

6.2 Efecto de la fuente de carbono en la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18

Se evaluó la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa, celobiosa y SBC comparando variables como el rendimiento de producción específica ($Y_{p/s}$), rendimiento de astaxantina ($Y_{p/x}$) y productividad (Q_A). Para la cuantificación de astaxantina se tomaron muestras a partir de las 12 hasta las 132 h para todos los cultivos. De igual manera, los resultados se presentan por sustrato.

6.2.1 Producción de astaxantina creciendo en glucosa

La acumulación de astaxantina por la cepa R4 usando glucosa inició durante el cese en la fase de crecimiento exponencial alcanzando $2.52 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se observó que la síntesis de astaxantina incrementó a partir de las 60 h, por lo que el incremento en la concentración de astaxantina se dio a medida que la fase de crecimiento exponencial se acercaba a la fase estacionaria. El resultado fue $11.01 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ de astaxantina en 96 h siendo el punto con mayor concentración durante toda la cinética, bajo estas condiciones la productividad fue de $0.11 \pm 0.01 \text{ mg/Lh}$ (Figura 15a).

Así mismo, la producción de astaxantina por la cepa R4-X18 creciendo en glucosa presentó el mismo comportamiento que la cepa R4 al crecer en el mismo sustrato. Iniciando la producción de este pigmento a las 60 h alcanzando una concentración máxima a las 96 h con $10.75 \pm 1.07 \mu\text{g/mL}$ y con una productividad de $0.11 \pm 0.01 \text{ mg}_p/\text{Lh}$ estos resultados fueron similares a lo que presentó la cepa R4 (Figura 15b). Después de las 96 h la concentración de astaxantina disminuyó. Esta disminución puede estar relacionada con la reducción de la biomasa derivado del proceso de muerte celular. Por otro lado, el rendimiento de astaxantina en glucosa ($Y_{p/s}$) para R4 y R4-X18 fue de 1.47 ± 0.19 y $1.49 \pm 0.04 \text{ mg}_p/\text{g}_s$ respectivamente, mientras que el rendimiento de astaxantina por gramo de célula a partir de glucosa ($Y_{p/x}$) para R4 y R4-X18 fue de 2.18 ± 0.15 y $2.56 \pm 0.36 \text{ mg}_p/\text{g}_x$ respectivamente. La producción de astaxantina coincidió con el cese de la fase crecimiento exponencial a partir de las 48 h teniendo un incremento de 16 veces en tan sólo 48 h (Figura 15a).

Lo anterior sugiere un cambio en el flujo de carbono hacia la síntesis de carotenoides, ya que mientras la célula se encuentra en crecimiento, el flujo de carbono se mantiene en el metabolismo central y no puede ser utilizado para la obtención de metabolitos secundarios. Hu *et al.*, (2005) observaron este comportamiento en *X. dendrorhous*, encontrando que la formación de astaxantina iniciaba sólo después del cese en el crecimiento celular a partir de las 48 h. Sugiriendo que para obtener una mayor producción de astaxantina es necesario obtener cierta cantidad de biomasa y extender el periodo de formación de astaxantina, suministrando más glucosa al medio de cultivo. Es decir, incrementando la relación C/N para inhibir el crecimiento. Así mismo, Xiao *et al.*, (2015) observaron que durante la fase lag el contenido de proteína intracelular incrementaba significativamente, mientras que el contenido de astaxantina se redujo ligeramente. Así como el incremento en la acumulación de metabolitos intracelulares en la fase exponencial, la cual afectó considerablemente la cantidad de carbono, ATP y NADH que se dirige hacia la síntesis de proteínas. En consecuencia, el flujo de carbono hacia la carotenogénesis se redujo resultando en un bajo contenido de astaxantina y en un rápido incremento de biomasa.

6.2.2 Producción de astaxantina creciendo en xilosa

En cuanto a la producción de astaxantina en cultivos de xilosa, la cepa R4 comenzó a producir este pigmento a partir de las 48 h, coincidiendo con el inicio de la fase de crecimiento exponencial. La producción de astaxantina alcanzó una concentración máxima de $10.86 \pm 1.18 \mu\text{g/mL}$ en 108 h (Figura 15a). Los rendimientos $Y_{p/s}$ y $Y_{p/x}$ en xilosa fueron de $1.21 \pm 0.13 \text{ mg}_p/\text{g}_s$ y $2.14 \pm 0.21 \text{ mg}_p/\text{g}_x$ respectivamente, así mismo la productividad fue de $0.11 \pm 0.03 \text{ mg/Lh}$. En comparación a los cultivos en glucosa, estos rendimientos junto con la productividad fueron ligeramente menores, incluso la producción máxima de astaxantina se obtuvo hasta las 108 h mientras que en glucosa se obtuvo a las 96 h. Además, la producción de astaxantina en cultivos de glucosa comenzó durante la fase tardía de crecimiento exponencial, mientras que en xilosa fue al inicio de la fase de crecimiento exponencial. Martínez-Moya *et al.*, (2015) observaron que *X. dendrorhous* al crecer en una fuente de carbono fermentable como la glucosa, la

producción de astaxantina se indujo durante la fase tardía del crecimiento exponencial. Mientras que en presencia de una fuente de carbono no fermentable como el succinato la producción de astaxantina se dio durante el inicio de la fase de crecimiento exponencial. Esto se debe a que probablemente en cultivos de glucosa hay una mayor generación de acetil-CoA a través de la glucólisis, mientras que en cultivos de succinato la producción de piruvato es a través de la gluconeogénesis. No obstante, la glucosa es un represor de algunas enzimas de la ruta de carotenogénesis en *X. dendrorhous* por lo que podría ser una de las causas principales de la producción de astaxantina durante la fase tardía de crecimiento exponencial. Por otro lado, la xilosa también es considerada como una fuente de carbono no fermentable por lo que podría explicar porque se produce astaxantina durante el inicio de la fase de crecimiento exponencial.

Por otro lado, la concentración máxima de astaxantina por la cepa R4-X18 se obtuvo a las 132 h con 16.94 ± 0.94 $\mu\text{g/mL}$ siendo 1.6 veces mayor a la obtenida en glucosa y 1.5 veces mayor a la que obtuvo la cepa R4 en xilosa (Figura 15b). Así mismo, la productividad de astaxantina en xilosa fue de 0.15 ± 0.02 mg_p/Lh , 1.4 veces mayor a la obtenida en glucosa y 1.5 veces mayor a la productividad de la cepa R4 en el mismo sustrato. El rendimiento de xilosa para la producción de astaxantina ($Y_{p/s}$) fue de 1.81 ± 0.01 mg_p/g_s , mientras que el rendimiento de producción específica ($Y_{p/x}$) fue 3.19 ± 0.03 mg_p/g_x , siendo ambos superiores a los rendimientos que obtuvo la cepa R4 en el mismo sustrato, superando en 1.5 veces el rendimiento para cada caso (Tabla 4). La producción de astaxantina en cultivos de xilosa por la cepa R4-X18 se mantuvo por más de 108 h, mientras que, en cultivos en glucosa, la producción disminuyó a partir de las 96 h (Figura 14b). La diferencia en la producción de astaxantina entre ambos sustratos está relacionada con el crecimiento celular, ya que se observó un crecimiento más lento en la mutante R4-X18 cuando se cultivó en xilosa a diferencia de los cultivos en glucosa. Es decir, que la producción de astaxantina en xilosa tuvo como resultado el desplazamiento de la carotenogénesis. Por lo tanto, durante el catabolismo de la xilosa, la cepa mutante R4-X18 pudo redireccionar el flujo de carbono hacia la síntesis de astaxantina reduciendo la cantidad de carbono disponible para el metabolismo primario, en consecuencia, la μ de la cepa R4-X18 se vio afectada siendo 1.4 veces menor con respecto a la μ observada en glucosa (Tabla 4). Vustin *et al.*, (2004) demostraron que para un máximo rendimiento de astaxantina es necesario reducir la velocidad de crecimiento, significativamente menor

a la μ_{\max} para redirigir el flujo de acetil-CoA, ATP y NADPH hacia la síntesis de astaxantina. Esto se puede lograr mediante la reducción en la síntesis de proteínas por la disponibilidad de la fuente de nitrógeno o en el aumento de la fuente de carbono.

En *X. dendrorhous* R4-X18 la xilosa fue mejor estimulante para la carotenogénesis que la glucosa, esto pudo deberse a que la xilosa no ingresa directamente a la glucólisis como la glucosa. La xilosa ingresa por oxidación-reducción a la ruta de las pentosas fosfato en forma de xilulosa-5-fosfato. No obstante, ingresa a la vía no oxidativa por lo cual no puede generar la misma cantidad de NADPH que la glucosa. Además, el catabolismo de la xilosa requiere de condiciones aerobias para poder suministrar cofactores a la vía redox de la xilosa. *X. dendrorhous* es una levadura con baja o nula actividad superóxido dismutasa (SOD) lo cual la hace sensible a las especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de astaxantina se induce para combatir la acumulación de ROS provenientes de la fosforilación oxidativa (Cannizzaro *et al.*, 2004; Shimizu & Matsuoka, 2019; Martinez-Moya *et al.*, 2020).

6.2.3 Producción de astaxantina creciendo en celobiosa

La síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* R4 usando celobiosa como sustrato se dio a partir del cese en el crecimiento exponencial al igual que en los cultivos de glucosa y xilosa. No obstante, la concentración máxima de astaxantina se obtuvo a las 132 h con $4.32 \pm 1.06 \mu\text{g/mL}$ con una diferencia de 36 y 24 h con respecto a los cultivos en glucosa y xilosa respectivamente, por lo cual la productividad fue la más baja con $0.03 \pm 0.01 \text{ mg/Lh}$ (Figura 15a). Así mismo, los rendimientos $Y_{p/s}$ y $Y_{p/x}$ fueron de $0.40 \pm 0.01 \text{ mg}_p/\text{g}_s$ y $0.92 \pm 0.17 \text{ mg}_p/\text{g}_x$ respectivamente. La celobiosa fue el sustrato con menor capacidad para estimular la carotenogénesis en la cepa R4, ya que tuvo la producción de astaxantina más baja respecto a otras fuentes de carbono como la glucosa y la xilosa. Por otro lado, la mutante R4-X18 alcanzó una concentración máxima de astaxantina a las 132 h con $7.20 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$, superando la producción de astaxantina por la cepa R4 en el mismo sustrato. Sin embargo, la concentración de astaxantina por la mutante R4-X18 fue inferior a la concentración que se obtuvo en los cultivos de glucosa y xilosa respectivamente (Figura 15b).

Los cultivos de R4-X18 en celobiosa tuvieron una productividad de astaxantina de 0.05 ± 0.01 mg_p/Lh y un rendimiento en la producción de astaxantina ($Y_{p/s}$) de 0.71 ± 0.10 mg_p/g_s siendo 2.1 y 2.5 veces menor a los valores obtenidos en la glucosa y la xilosa respectivamente (Tabla 4). Sin embargo, el rendimiento de producción específica de astaxantina ($Y_{p/x}$) fue de 5.73 ± 0.40 mg_p/g_x superando 2.2 veces el rendimiento obtenido con glucosa y 1.8 veces superior al de xilosa (Tabla 4). Estos rendimientos son el resultado de una baja producción de biomasa y una alta tasa de conversión de celobiosa. Sin embargo, aún con la baja producción de biomasa, los cultivos en celobiosa de la cepa R4-X18 lograron generar mayor cantidad de astaxantina por gramo de célula sólo por debajo de la glucosa. Es decir, que la celobiosa logró estimular la carotenogénesis en mayor medida en comparación con la xilosa, pero a un costo muy alto en la obtención de biomasa.

Por otra parte, la producción de astaxantina por ambas cepas creciendo en celobiosa inició a partir de las 48 h al igual que en los cultivos de glucosa y xilosa, por lo que la carotenogénesis en todos los casos se indujo durante el cese del crecimiento exponencial. No obstante, en ambas cepas se observó que después de las 48 h la producción de astaxantina cesó, la cual coincidió con la acumulación de glucosa y el inicio de una nueva fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto, se pudo haber reactivado el metabolismo primario para poder consumir la glucosa acumulada. En consecuencia, el suministro de carbono, ATP y otros cofactores para la síntesis de carotenoides pudieron haberse limitado. Sin embargo, en la cepa R4-X18 la nueva fase de crecimiento exponencial fue muy corta, así como el bajo consumo de glucosa resultando en una producción de astaxantina no tan limitada como en la cepa R4.

6.2.4 Producción de astaxantina creciendo en SBC

Finalmente, se evaluó la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en los SBC. Por su parte la cepa R4 al igual que en las otras fuentes de carbono evaluadas mostró un incremento en la producción de astaxantina a partir de las 48 h, con una concentración de 4.19 ± 0.47 µg/mL superando a los cultivos en glucosa (2.52 ± 0.27 µg/mL), xilosa (0.87 ± 0.38 µg/mL) y celobiosa (2.12 ± 0.29 µg/mL). La producción máxima

de astaxantina se alcanzó a las 132 h con $21.80 \pm 1.82 \mu\text{g/mL}$ y una productividad de $0.16 \pm 0.01 \text{ mg}_p/\text{Lh}$, colocándose como el sustrato con mayor productividad de astaxantina con respecto a la glucosa, la xilosa y la celobiosa (Figura 15a). Por su parte, los rendimientos $Y_{p/s}$ y $Y_{p/x}$ fueron los más altos con respecto a las otras fuentes de carbono con $3.31 \pm 0.55 \text{ mg}_p/\text{g}_s$ y $4.89 \pm 0.46 \text{ mg}_p/\text{g}_x$ (Tabla 4).

La mutante R4-X18 mostró el mismo comportamiento que la cepa R4 al crecer en los SBC, ya que durante las primeras 48 h se observó un mayor estímulo en la producción de astaxantina en comparación con otras fuentes de carbono alcanzando una concentración de $3.88 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ (Figura 15b). Al igual que la cepa R4, la mutante R4-X18 alcanzó una concentración máxima de astaxantina a las 132 h con $11.31 \pm 1.50 \mu\text{g/mL}$ siendo 1.9 veces menor a la concentración de la cepa R4 creciendo en los SBC (Figura 15b). La productividad fue de $0.086 \pm 0.01 \text{ mg}_p/\text{Lh}$. Por otro lado, el rendimiento $Y_{p/x}$ en los SBC fue de $2.72 \pm 0.72 \text{ mg}_p/\text{g}_x$ manteniéndose por debajo del rendimiento alcanzado por la cepa R4 por 1.8 veces. Mientras que, el rendimiento $Y_{p/s}$ fue de $1.71 \pm 0.33 \text{ mg}_p/\text{g}_s$ siendo 1.9 veces inferior con respecto a R4.

La producción de astaxantina por las cepas R4 y R4-X18 presentó estadios de baja producción relacionados con el crecimiento diaúxico derivado del metabolismo de diferentes fuentes de carbono. No obstante, la disminución secuencial de cada fuente de carbono (glucosa, xilosa y celobiosa) tuvo como resultado el incremento en la producción de astaxantina derivado de la desaceleración de la fase de crecimiento. Es decir, una vez finalizado el metabolismo primario por el agotamiento de la fuente de carbono, los productos del catabolismo reactivaron la carotenogénesis en respuesta a dicho estrés. Por lo tanto, los resultados anteriores confirman que a partir de la xilosa y los SBC se puede producir mayor cantidad de astaxantina por gramo de sustrato utilizado, estimulando positivamente la carotenogénesis.

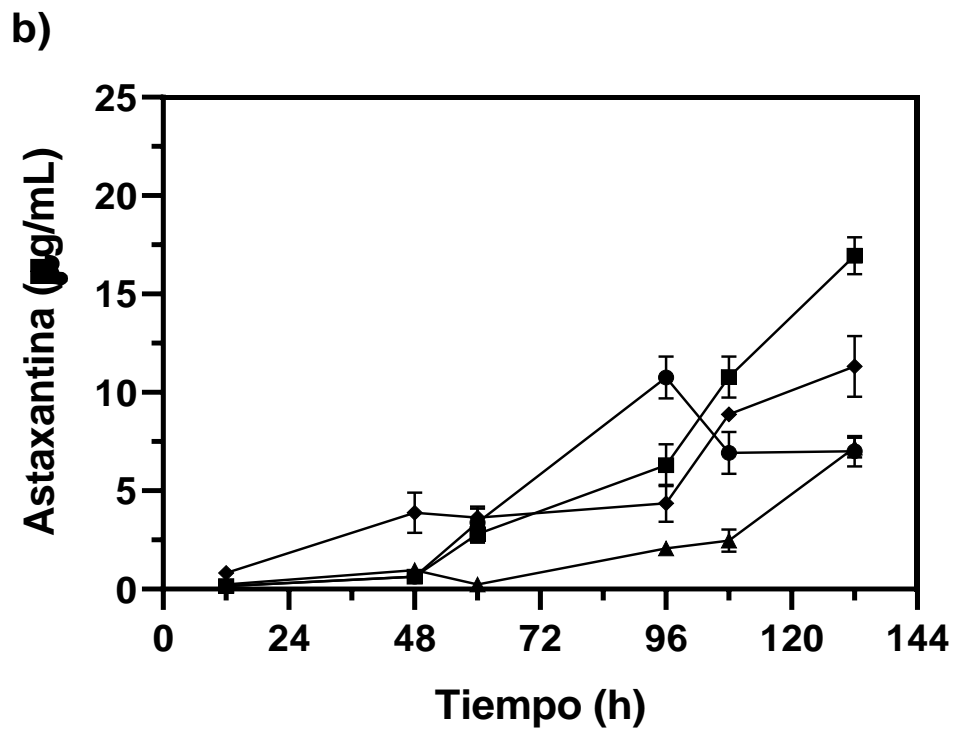
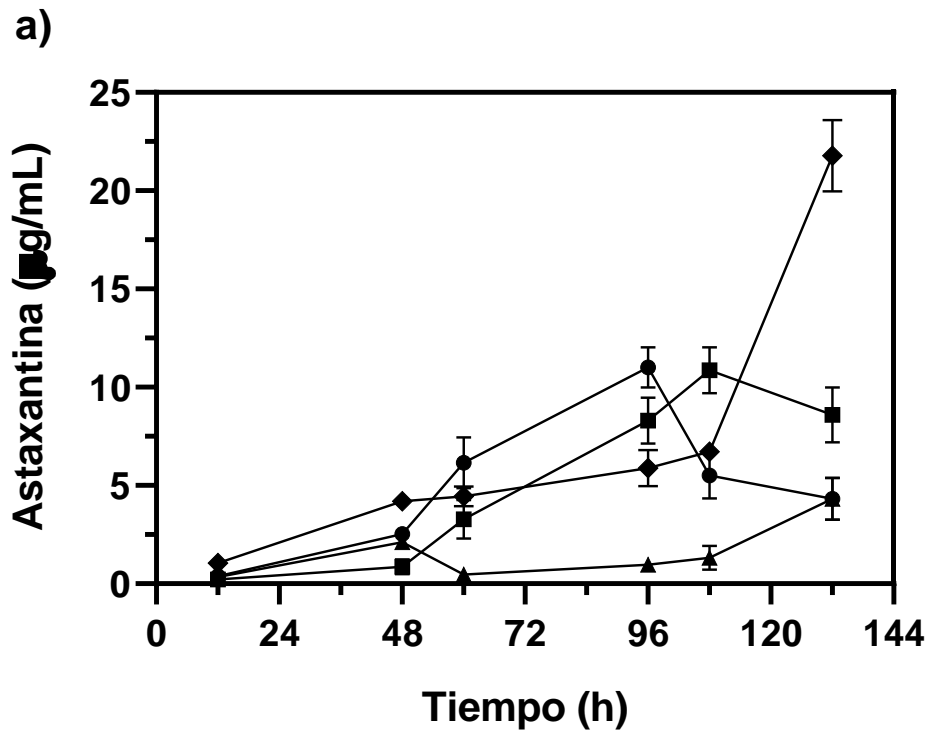


Figura 15. Acumulación de astaxantina por a) *X. dendrorhous* R4 y b) R4-X18 creciendo en (●) glucosa, (■) xilosa, (▲) celobiosa y (◆) SBC

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en diferentes sustratos

Cepa	Glucosa		Xilosa		Celobiosa		SBC	
	R4	R4-X18	R4	R4-X18	R4	R4-X18	R4	R4-X18
Yx/s (g/g)	0.67 ± 0.04	0.58 ± 0.07	0.57 ± 0.01	0.57 ± 0.0	0.41 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.68 ± 0.05	0.64 ± 0.05
Yp/x (mg/g)	2.18 ± 0.15	2.56 ± 0.36	2.14 ± 0.21	3.19 ± 0.03	0.92 ± 0.17	5.73 ± 0.40	4.89 ± 0.46	2.72 ± 0.72
Yp/s (mg/g)	1.47 ± 0.19	1.49 ± 0.04	1.21 ± 0.14	1.81 ± 0.01	0.38 ± 0.08	0.71 ± 0.10	3.31 ± 0.55	1.71 ± 0.31
μ (h-1)	0.085*	0.072*	0.064*	0.05*	0.08*	0.039*	0.058*	0.049*
qs (g/gh)	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.0	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.09 ± 0.0	0.08 ± 0.01
QA (mg/Lh)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.0	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.01

μ: Velocidad específica de crecimiento, se calculó con respecto al crecimiento exponencial presentado en cada sustrato, qs: Velocidad específica de consumo de sustrato, qp: Velocidad específica de formación de producto, QA: Productividad de astaxantina, *: Error menor al 10 %.

6.3 Determinación de la actividad de β-glucosidasa en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en celobiosa y SBC

6.3.1 Actividad β-glucosidasa en celobiosa

Con el fin de encontrar una explicación sobre las diferencias en el crecimiento y la producción de astaxantina entre las cepas R4 y R4-X18 al crecer en celobiosa, se evaluó la actividad de β-glucosidasa a las 24, 60 y 108 h. La cepa R4 presentó actividad β-glucosidasa durante el inicio del crecimiento exponencial (24 h) con 5.21 ± 0.17 mU/mL (Figura 16), coincidiendo con el punto donde se observó una disminución en la concentración de celobiosa del 53 %. Posteriormente, durante la transición de la primera fase de crecimiento exponencial a la segunda fase de crecimiento, la actividad incrementó a 32.69 ± 0.87 mU/mL (60 h), dando lugar al agotamiento de la celobiosa presente en el medio de cultivo (Figura 16). Mientras tanto, la acumulación de glucosa alcanzó una concentración de 3.34 ± 0.24 g/L, a pesar de esto, la actividad β-glucosidasa

se mantuvo por 108 h durante la segunda fase de crecimiento exponencial alcanzando actividades de 56.48 ± 6.94 mU/mL (Figura 16). Si bien la acumulación de glucosa pudo inhibir la síntesis de β -glucosidasa, existe la posibilidad de que el gen *bglx* se encuentre expresado a niveles basales y, por lo tanto, la producción de biomasa permitió la acumulación de la actividad β -glucosidasa, manteniéndose la actividad hasta por 108 h. Este comportamiento se ha observado en *Talaromyces amestolkiae*, donde la adición constante de 0.5 o 1 % de glucosa a cultivos en medio Mandels con 1 % de glucosa o Avicel causó la represión de β -glucosidasa hasta niveles basales (de Eugenio *et al.*, 2017).

Por su parte, la cepa mutante R4-X18 también mostró actividad de β -glucosidasa durante el crecimiento exponencial (6.32 ± 0.87 mU/mL) con disminución en la concentración de celobiosa del 49 % (Figura 16). Sin embargo, la actividad de β -glucosidasa durante el inicio de la segunda fase de crecimiento exponencial (60 h) fue 3 veces menor (10.55 ± 2.34 mU/mL) con respecto a la cepa R4, por lo tanto, el consumo de celobiosa se redujo y en consecuencia el crecimiento de la cepa mutante R4-X18 fue menor. Al igual que la cepa R4, la mutante R4-X18 también presentó actividad β -glucosidasa a las 108 h, no obstante, la actividad fue de 14.41 ± 5.72 mU/mL, 4 veces menor al de la cepa R4 (Figura 16). La diferencia en la actividad β -glucosidasa entre ambas cepas puede deberse al tratamiento mutagénico que tuvo la cepa R4-X18, afectando el metabolismo de la celobiosa haciéndolo más sensible a la represión por glucosa. Así mismo, la baja actividad de β -glucosidasa en la cepa R4-X18 tuvo como resultado un bajo rendimiento de biomasa con respecto a R4. No obstante, la cepa R4-X18 acumuló mayor cantidad de astaxantina que la cepa R4. Se ha observado que el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y la síntesis de esteroides compiten con la síntesis de astaxantina, por lo cual una desviación del metabolismo primario pudo impulsar la carotenogénesis (Vustin *et al.*, 2004).

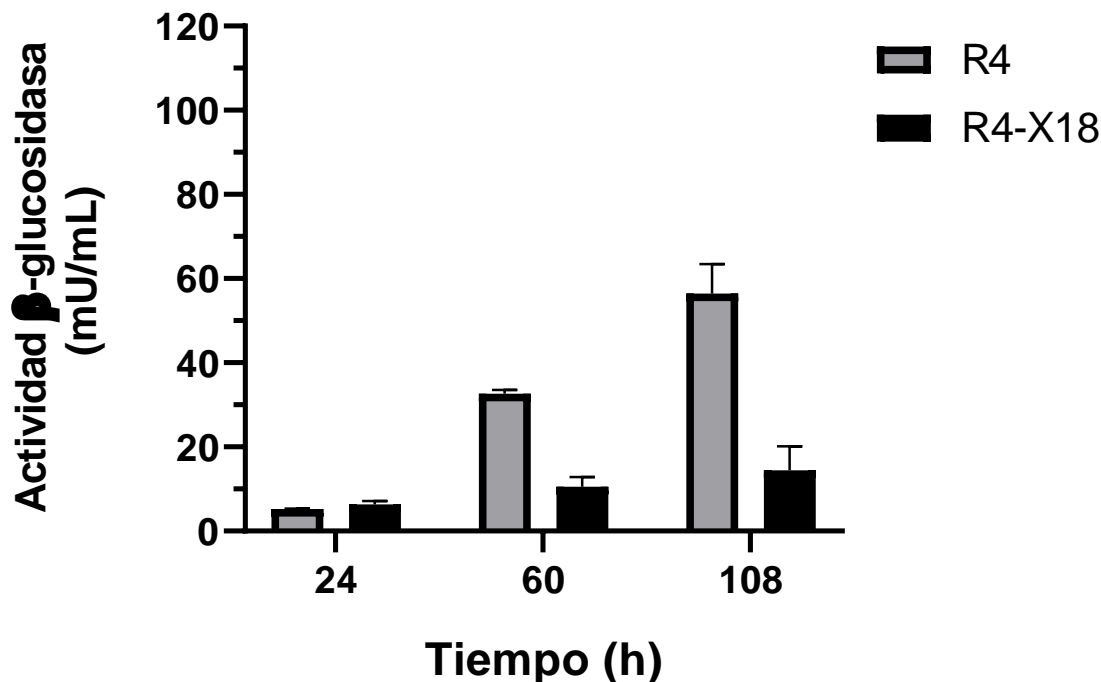


Figura 16. Actividad β -glucosidasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en celobiosa

6.3.2 Actividad β -glucosidasa en SBC

Por otro lado, la actividad de β -glucosidasa de la cepa R4 en los SBC al inicio del crecimiento exponencial fue de 7.91 ± 2.08 mU/mL, similar a la obtenida en los cultivos en celobiosa. Posteriormente, al final del crecimiento exponencial (60 h) la actividad incrementó a 46.73 ± 0.61 mU/mL y con ello se observó la disminución en la concentración de celobiosa (Figura 17). Finalmente, a las 108 h la actividad β -glucosidasa llegó hasta 82.79 ± 13.96 mU/mL, 1.5 veces mayor a la actividad que presentaron los cultivos de R4 en celobiosa como única fuente de carbono (Figura 17). El incremento en la actividad β -glucosidasa está relacionado con el agotamiento de las fuentes de carbono, es decir, se observó un cambio significativo en la concentración de celobiosa sólo a partir del agotamiento de la glucosa (60 h) y la xilosa (72 h). Así mismo, la actividad de β -glucosidasa que presentaron los cultivos de la cepa R4-X18 en los SBC fue mayor a los cultivos en celobiosa por la misma cepa. Durante el inicio de la fase de crecimiento exponencial (24 h) se observó actividad β -glucosidasa de 11.04 ± 2.69 mU/mL. Al igual

que la cepa R4, la mutante R4-X18 incrementó su actividad enzimática a partir del agotamiento de la glucosa a las 60 h (31.31 ± 3.12 mU/mL). Finalmente, a las 108 h de cultivo en SBC la mutante R4-X18 alcanzó una actividad β -glucosidasa de 103.21 ± 1.04 mU/mL (Figura 17). En comparación, la actividad β -glucosidasa que registraron ambas cepas en los cultivos de celobiosa fue menor a la actividad que presentaron los cultivos en SBC. No obstante, la mutante R4-X18 tuvo una actividad 1.8 veces mayor a la registrada por la cepa R4 en los SBC, además superó por 7.2 veces la actividad que tuvo en celobiosa (Figura 17).

Para la β -glucosidasa se han caracterizado inductores como la celulosa, celobiosa o xilobiosa que regulan positivamente la producción de esta enzima, así como otros disacáridos. Se ha observado que la xilosa, el xilano, el salvado del trigo, así como la fructosa han mostrado capacidad para inducir la producción de β -glucosidasa. Sin embargo, se ha observado que en hongos del género *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Talaromyces* la celobiosa es un inductor pobre de la β -glucosidasa o incluso no son inductores, por lo tanto, la fuente de carbono tiene un efecto diferente en cada microorganismo. Se han identificado factores de transcripción tanto en hongos como en levaduras que regulan la producción de enzimas hidrolíticas. Estos factores se dividen en reguladores positivos como XYR1, ACE2 y en reguladores negativos como lo son represores ACE1, y represores catabólicos del carbono CRE1. Estos factores de transcripción se activan por la interacción con inductores de bajo peso molecular derivados del metabolismo de la celulosa como oligosacáridos o productos de transglicosilación que ingresan al interior de la célula (Hanif *et al.*, 2004; Amore *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2016; de Eugenio *et al.*, 2017).

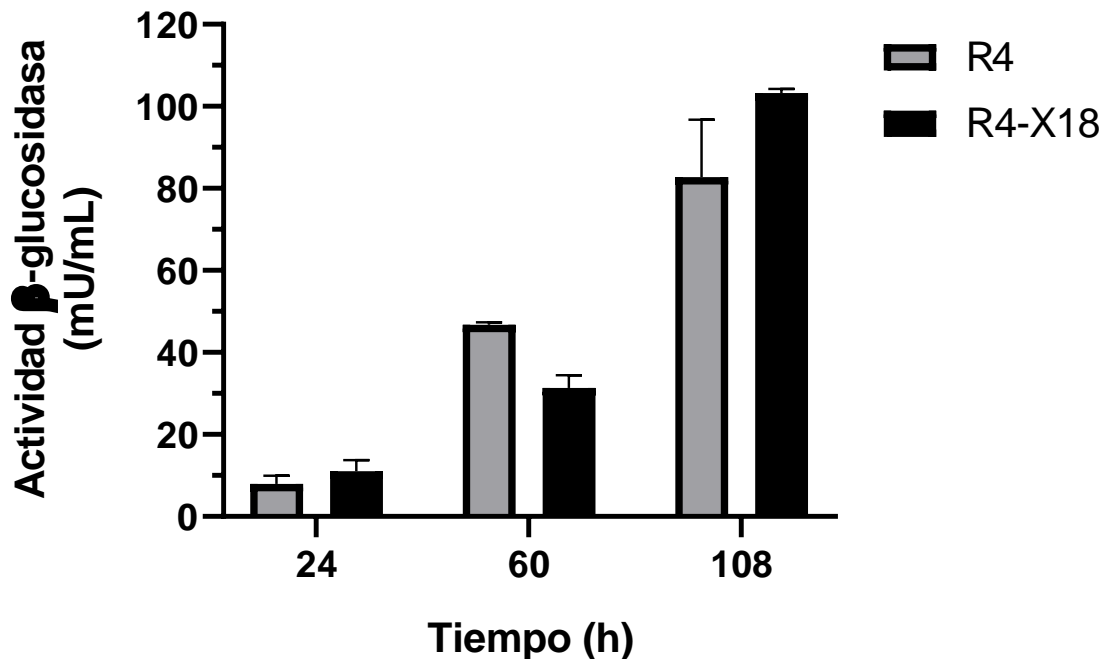


Figura 17. Actividad β -glucosidasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC

6.4 Determinación de la actividad de Xilosa Reductasa en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa y SBC

Durante las cinéticas de crecimiento en xilosa, *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 mostraron retraso en el crecimiento exponencial hasta por 48 h, comportamiento que no se observó en los cultivos de glucosa, celobiosa y SBC. Por lo anterior se decidió evaluar la actividad de la xilosa reductasa (XR), enzima involucrada en el metabolismo de la xilosa. Para evaluar cambios en la actividad de la XR se tomaron muestras durante la fase lag, el crecimiento exponencial y la fase estacionaria (24, 60 y 108 h). Las muestras se compararon con los cultivos de las cepas R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, ya que se utilizaron como controles negativos para la actividad XR.

6.4.1 Actividad XR en glucosa

La cepa R4 mostró actividad XR en cultivos en glucosa, al inicio del crecimiento exponencial (24 h) con 0.49 ± 0.01 mU/mg y al final del crecimiento exponencial (60 h) con 0.34 ± 0.01 mU/mg (Figura 18). Para el final de la cinética, la actividad disminuyó considerablemente hasta 0.07 ± 0.01 mU/mg. Por su parte, la cepa R4-X18 también mostró actividad XR durante el crecimiento en glucosa. A las 24 h tuvo una actividad de 0.28 ± 0.01 mU/mg, 1.8 veces menor a la actividad de la cepa R4. Así mismo, la actividad XR en la mutante R4-X18 cesó a partir de las 60 h con actividades de 0.09 ± 0.01 . Para las 108 h no se observaron cambios significativos en la actividad XR de la cepa R4-X18, ya que se obtuvieron valores de 0.07 ± 0.01 mU/mg al final de la cinética (Figura 18). Es decir, la actividad de XR en la mutante R4-X18 se presentó sólo durante la fase lag, mientras que en la cepa R4 la producción de XR se mantuvo hasta el final del crecimiento exponencial. Por otro lado, cabe señalar que la cepa R4 mostró mayor actividad de XR en presencia de glucosa con respecto a la mutante R4-X18, lo que podría indicar que la XR en esta última cepa tiene mayor sensibilidad a la represión o inactivación por glucosa que su cepa materna R4.

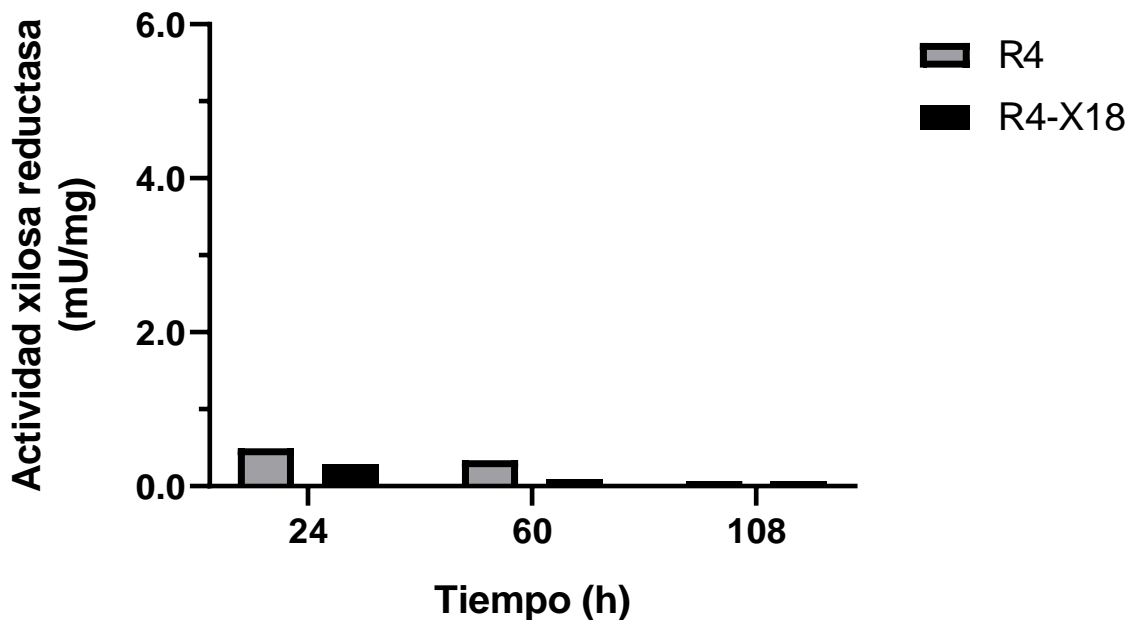


Figura 18. Actividad xilosa reductasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa

6.4.2 Actividad XR en xilosa

Los cultivos en xilosa de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 tuvieron mayor actividad de XR en comparación con los cultivos en glucosa. A las 24 h la actividad de XR en la cepa R4 tuvo un valor de 1.94 ± 0.01 mU/mg (Figura 19), 4 veces mayor a la actividad que tuvo en presencia de glucosa. A las 60 h la misma cepa tuvo una actividad de 0.34 ± 0.06 mU/mg (Figura 19) reduciendo su actividad en un 82 % con respecto a la actividad inicial. Finalmente, la actividad enzimática a las 108 h fue 0.07 ± 0.02 mU/mg. El comportamiento en la actividad XR fue similar a los cultivos de R4 en glucosa, ya que también presentaron reducción en la actividad enzimática conforme avanzó el tiempo. Lo anterior puede indicar que la actividad XR sólo se encuentra activa durante el crecimiento exponencial como parte del metabolismo primario.

Por su parte, la cepa R4-X18 creciendo en xilosa presentó una actividad de XR de 1.11 ± 0.01 mU/mg a las 24 h (Figura 19) siendo 4 veces mayor a la actividad obtenida por la misma cepa en glucosa. Sin embargo, esta actividad fue 1.8 veces menor a la que presentó la cepa R4 en xilosa. Cabe señalar que a las 60 h la actividad XR en R4-X18 no presentó una reducción como lo hizo en presencia de glucosa, incluso incrementó su actividad 1.5 veces (1.62 ± 0.12 mU/mg). Así mismo, también se alejó del comportamiento que presentó la cepa R4 durante su crecimiento en xilosa y en glucosa. No obstante, a las 108 h de cultivo de la cepa R4-X18 la actividad XR cayó a valores de 0.10 ± 0.04 mU/mg (Figura 19).

El seguimiento de la actividad XR en los cultivos en xilosa mostró que la cepa R4 tuvo mayor actividad durante la fase lag (24 h), mientras que la mutante R4-X18 presentó mayor actividad durante el crecimiento exponencial (60 h). En consecuencia, hubo desplazamiento del consumo de la fuente de carbono en la mutante R4-X18, ya que se observó que durante el crecimiento exponencial (60 h) sólo había consumido el 10 % de la xilosa, mientras que la cepa R4 había consumido cerca del 25 %. El desfasamiento del metabolismo de la xilosa en la cepa R4-X18 también tuvo como resultado una menor tasa de crecimiento celular, ya que a las 96 h la cepa R4 produjo cerca de 4.57 ± 0.24 g/L de biomasa, mientras que R4-X18 produjo 3.55 ± 0.39 g/L. Zha *et al.*, (2012) observaron que el metabolismo de la xilosa puede mejorar incrementando la expresión de XR mediante

la introducción de múltiples copias del gen *xyl1*, si bien puede mejorar la velocidad de consumo no garantiza que el metabolismo sea eficiente. Esto ocurre en gran medida por la acumulación de xilitol, producto de la reducción de la xilosa necesario para la conversión a xilulosa. Por otro lado, Ochoa-Chacón *et al.*, (2022), observaron en *Clavispora lusitaniae* que al incrementar la concentración de xilosa en el medio de cultivo hasta un 5 % se podían incrementar los niveles de expresión de *xyl1* y por lo tanto elevar los niveles de actividad de XR. También, observaron que en 3 % de glucosa el metabolismo de la xilosa se inhibe por completo. Por lo que, en *X. dendrorhous* R4-X18 podría haber una reducción en la estimulación de la expresión de *xyl1* por la xilosa y en consecuencia una menor actividad de XR en comparación con R4.

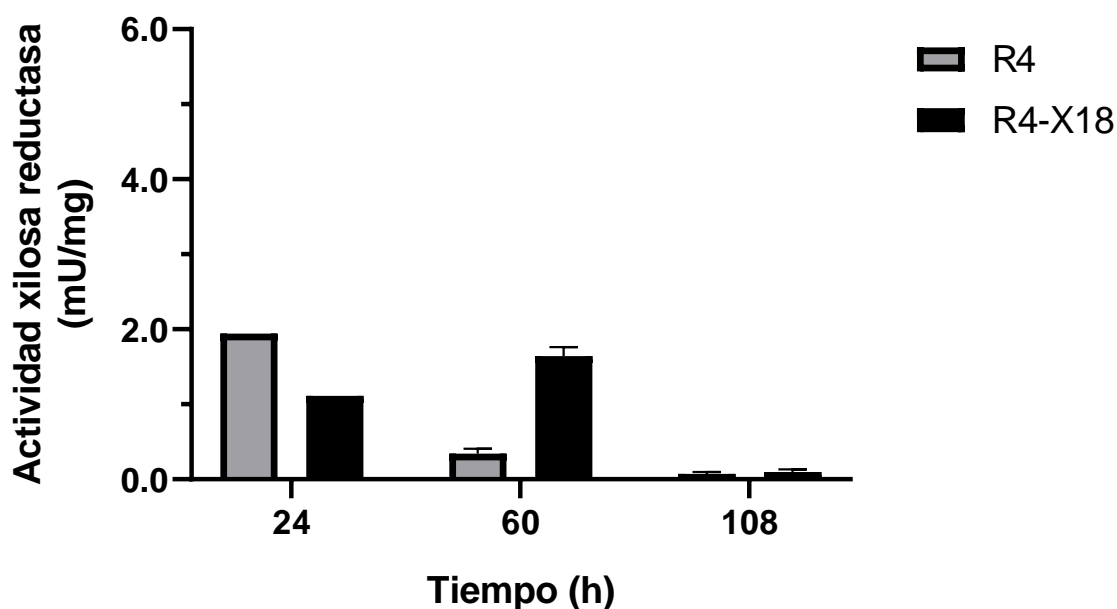


Figura 19. Actividad xilosa reductasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en xilosa

6.4.3 Actividad XR en SBC

La actividad de XR en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC fue mayor en comparación a la actividad de los cultivos en xilosa. Por su parte, la cepa R4 tuvo 2.28 ± 0.14 mU/mg de actividad XR a las 24 h de cultivo (Figura 20) superando 1.2 veces la

actividad que presentó en cultivos de xilosa y 4.7 veces mayor a la actividad en glucosa. A las 60 h la actividad XR en la cepa R4 incrementó a 2.69 ± 0.21 mU/mg (Figura 20), mientras que en xilosa la actividad XR en R4 disminuyó en 82 %. Finalmente, a las 108 h la actividad XR en la cepa R4 se mantuvo en 2.52 ± 0.43 mU/mg (Figura 20), lo cual no sucedió en los cultivos en xilosa y glucosa, ya que en ambas condiciones disminuyó la actividad al llegar a las 60 h. El incremento puede estar relacionado con el agotamiento de la glucosa y por el efecto inductor que tiene la xilosa presente en los SBC, sobre el gen *xyI1*.

Por su parte, la cepa R4-X18 en los SBC también mostró mayor actividad de XR a las 24 h de cultivo con 2.88 ± 0.14 mU/mg (Figura 20) superando la actividad mostrada en xilosa (2.6 veces), lo cual indica que los SBC pueden generar una mayor respuesta del gen *xyI1* que la xilosa. A las 60 h la actividad XR en R4-X18 fue de 1.04 ± 0.07 mU/mg mostrando una reducción del 64 % con respecto a la actividad inicial (Figura 20), mismo comportamiento que presentó al crecer en glucosa y que distó con los cultivos en xilosa. Posteriormente, a las 108 h la actividad XR disminuyó hasta 0.53 ± 0.01 mU/mg (Figura 20).

Por otro lado, ambas cepas presentaron actividad de XR durante el metabolismo de la glucosa, lo cual puede sugerir que a una concentración de aproximadamente 3 g/L de glucosa la expresión del gen *xyI1* o la actividad de la XR no se ven afectados por la presencia de este azúcar. No obstante, a las 60 h la actividad de XR en R4 incrementó durante el consumo de xilosa, mientras que la mutante R4-X18 presentó una disminución en la actividad, esto puede estar relacionado con el efecto inductor que tiene la xilosa sobre cada cepa, siendo más efectivo en R4. Así mismo, los SBC en ambas cepas lograron inducir mayor producción enzimática en comparación a los cultivos en xilosa. Esto se debe a que en *X. dendrorhous* el catabolismo de la glucosa dirige en un 65 % el flujo de carbono hacia las PPP, por lo cual se obtiene mayor cantidad de NADPH el cual es ampliamente utilizado para la producción de proteínas, ácidos grasos entre otros. Además, permite la activación de rutas como la glucólisis y el ciclo de los TCA, permitiendo a la célula mantener un estado más activo a la hora de metabolizar otras fuentes de carbono (Cannizzaro *et al.*, 2004; Martínez-Moya *et al.*, 2015).

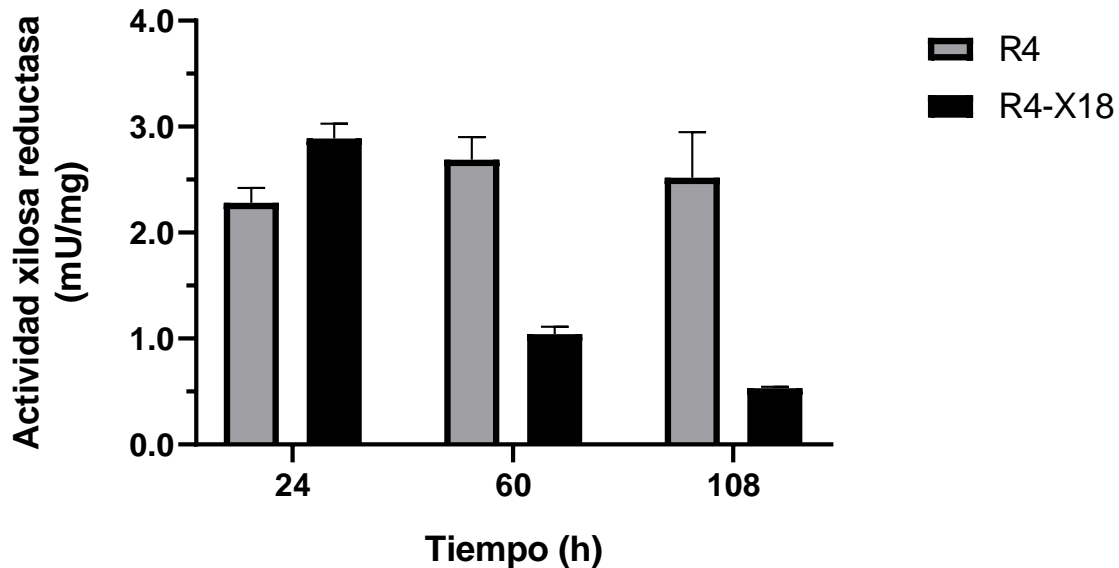


Figura 20. Actividad xilosa reductasa en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC

Se ha observado que, en gran parte de microorganismos como hongos y levaduras, la glucosa puede reprimir o inhibir la síntesis de algunas proteínas con actividad catabólica. En la mayoría de las levaduras fermentadoras de xilosa el catabolismo de carbono está sujeto a represión e inactivación por glucosa. Durante la represión se impide, a nivel transcripcional, la síntesis de enzimas del metabolismo de la xilosa, mientras que la inactivación inhibe las actividades del transporte de xilosa u otras enzimas metabolizadoras de xilosa (Harner *et al.*, 2015). Ribeiro *et al.*, (2021) demostraron el efecto represor de la glucosa sobre el metabolismo de la xilosa en *Spathaspora passalidarum*. Los autores observaron reducción o la nula actividad de XR en presencia de glucosa, así como en los niveles de expresión de *xy11*. Mientras que en los cultivos en xilosa como única fuente de carbono hubo un incremento en la actividad XR, lo mismo ocurrió con la expresión del gen *xy11*. Así, *X. dendrorhous* podría presentar el mismo efecto en presencia de glucosa por lo cual ambas cepas registraron ligera actividad de XR al inicio del crecimiento exponencial y posteriormente cesaron esta actividad, lo que podría indicar que el gen *xy11* puede estar expresándose a niveles basales y a medida que transcurre la cinética disminuye su expresión.

6.5 Determinación de la actividad xilitol deshidrogenasa en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa y SBC

La actividad xilitol deshidrogenasa (XDH) está ligada al metabolismo de la xilosa, ya que es necesaria para la conversión de xilosa a xilulosa mediante la oxidación de xilitol para ingresar a la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato. No obstante, la actividad XDH está limitada por el suministro del cofactor NAD⁺ lo cual afecta la biotransformación eficiente a xilulosa (Hui Qi *et al.*, 2016). Además, la expresión del gen *xyI2* que codifica para la enzima XDH está ligada a la presencia de xilitol, es decir, tiene la función de un inductor para la síntesis de XDH. Por lo anterior se procedió a medir la actividad XDH en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en xilosa, SBC y como controles, los cultivos en glucosa. Los resultados se presentan por sustrato.

6.5.1 Actividad XDH en glucosa

Durante la cinética en glucosa la cepa R4 no mostró actividad XDH al inicio de la fase de crecimiento exponencial (24 h). Posteriormente, durante la fase de transición de crecimiento exponencial a crecimiento estacionario (60 h) se observó ligera presencia de la actividad XDH (0.037 ± 0.001 mU/mg), este valor se mantuvo aún a las 108 h de cultivo (Figura 21). Por su parte la mutante R4-X18 presentó actividad XDH durante las primeras 24 h de cultivo en glucosa con 0.304 ± 0.009 mU/mg a diferencia de la cepa R4, mostrando de igual manera un incremento en la actividad (0.478 ± 0.023 mU/mg) a las 60 h de cultivo superando en 13 veces la actividad mostrada por la cepa R4 al mismo tiempo (Figura 21). Finalmente, a las 108 h de cultivo, la mutante R4-X18 redujo su actividad XDH hasta 0.036 ± 0.004 mU/mg igualando la actividad que presentó la cepa R4. La diferencia en la actividad XDH entre ambas cepas al crecer en glucosa podrían revelar que la mutagénesis que sufrió la cepa R4-X18 tuvo efectos en el gen *xyI2* incrementando su expresión de sus niveles basales.

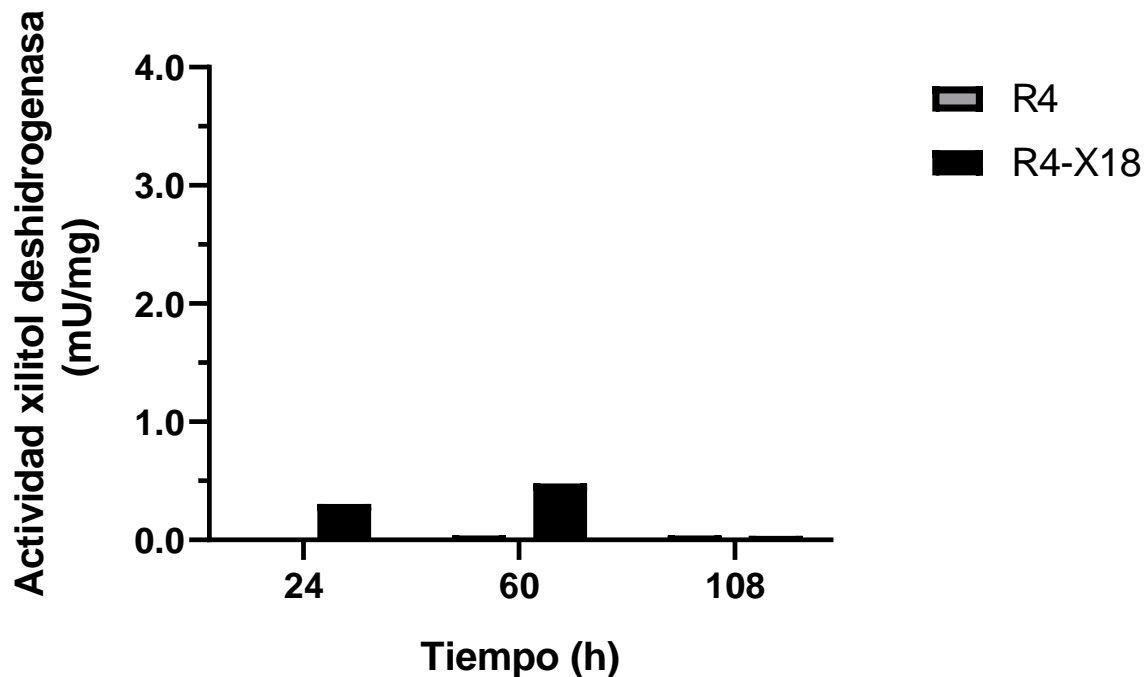


Figura 21. Actividad xilitol deshidrogenasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa

6.5.2 Actividad XDH en xilosa

Los cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en xilosa mostraron un aumento en la actividad XDH en comparación a los cultivos en glucosa, esto se debe a que la actividad enzimática de XDH requiere de un inductor que potencie la producción enzimática, el cual podría ser la xilosa, el xilitol o algún intermediario de esta ruta. Los cultivos de la cepa R4 en xilosa tuvieron actividad XDH a las 24 h con 2.66 ± 0.75 mU/mg (Figura 22), la misma cepa en los cultivos en glucosa no presentó esta actividad. A las 60 h la actividad de XDH en la cepa R4 se redujo en un 90 % (0.27 ± 0.08 mU/mg) con respecto a la actividad a las 24 h (Figura 22). Posteriormente, la actividad disminuyó hasta niveles de 0.13 ± 0.11 mU/mg, no obstante, superando 4.3 veces la actividad mostrada por la misma cepa en glucosa (108 h). La actividad de XDH en la mutante R4-X18 fue de 1.52 ± 0.43 mU/mg (24 h), siendo 1.8 veces menor con respecto a la cepa R4 creciendo en xilosa (Figura 22). No obstante, esta actividad fue 5 veces mayor a la que tuvo la misma cepa en cultivos de glucosa. A las 60 h, la actividad XDH en R4-X18 decayó en un 78 % (0.33 ± 0.13

mU/mg), mientras que la cepa R4 fue cerca del 90 % de la actividad inicial (Figura 22). Finalmente, a las 108 h la actividad de la mutante R4-X18 fue de 0.18 ± 0.02 mU/mg siendo ligeramente mayor a la actividad que registró la cepa R4 en xilosa en ese mismo tiempo (Figura 22). La diferencia en la actividad inicial entre ambas cepas se tradujo en una menor tasa de consumo de xilosa para la cepa R4-X18, así como en una menor velocidad específica de crecimiento.

La reducción de xilitol a xilulosa puede ser un paso limitante en la asimilación de xilosa. Se ha observado que la acumulación de xilitol es una respuesta al desbalance de cofactores causado por las condiciones limitadas de oxígeno. El desbalance tiene lugar porque la xilosa reductasa utiliza principalmente NADPH como cofactor, mientras que la xilitol deshidrogenasa utiliza NAD^+ , por lo que no puede haber una regeneración de cofactores (Karhumaa *et al.*, 2007). Además, bajo estas condiciones la fosforilación oxidativa no puede reoxidar el NADH generado por XDH, por lo tanto, una forma de regenerar el NAD^+ es mediante la acumulación de glicerol (Granström & Leisola, 2013). Así mismo, una mayor actividad de XDH codificada por el gen *xyI2* también es esencial para una eficiente asimilación de la xilosa, al mismo tiempo reduce la formación de xilitol (Han *et al.*, 2020). Por lo tanto, el metabolismo de xilosa en *X. dendrorhous* no estaría limitado por el desbalance de cofactores, ya que en todas las fuentes de carbono evaluadas se mantuvieron en condiciones aerobias. Por lo que la diferencia en la actividad XDH entre ambas cepas puede estar relacionado con la expresión del gen *xyI2*, teniendo una mayor expresión en la cepa R4 permitiendo mayor aprovechamiento de la xilosa que su cepa mutante R4-X18.

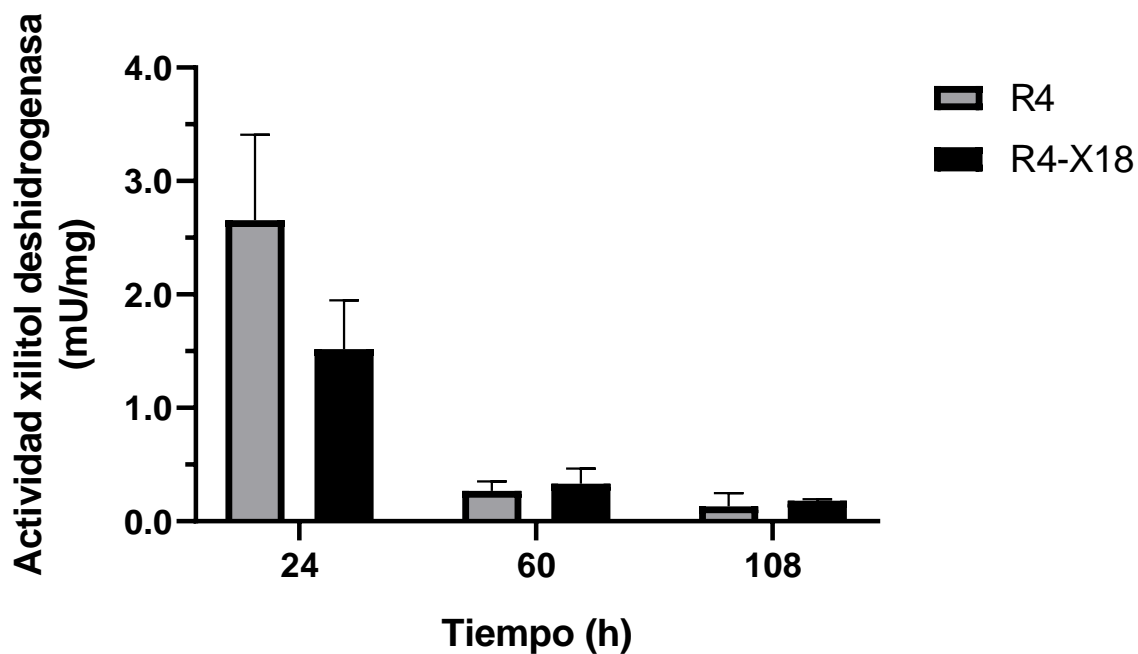


Figura 22. Actividad xilitol deshidrogenasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en xilosa

6.5.3 Actividad XDH en SBC

Los cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en los SBC mostraron menor actividad XDH en comparación a los cultivos en xilosa. La cepa R4 no presentó actividad a las 24 h al igual que en cultivos de glucosa. Posteriormente, a las 60 h la actividad de XDH incrementó a 0.47 ± 0.01 mU/mg siendo 1.7 veces mayor al que presentó esta misma cepa en xilosa (Figura 23). El incremento en la actividad coincidió con el agotamiento de la glucosa presente en los SBC, lo que permitió el consumo de la xilosa. No obstante, la actividad cesó a las 108 h coincidiendo con el agotamiento de la xilosa. Por otro lado, la cepa R4-X18 no presentó actividad de XDH a las 24 y 60 h a diferencia de sus cultivos en glucosa y xilosa. No obstante, presentó mayor actividad a las 108 h con 1.0 ± 0.10 mU/mg (Figura 23) superando en 25 y 6 veces la actividad de sus cultivos en glucosa y xilosa respectivamente. Al igual que la cepa R4, la mutante R4-X18 presentó actividad después del agotamiento de la glucosa. Sin embargo, la diferencia de 48 h entre la actividad de ambas cepas demuestra el desplazamiento del metabolismo de la xilosa en la cepa R4-X18. Krahulec *et al.*, (2010) observaron en cepas mutantes de *S. cerevisiae*

que a concentraciones menores a 4 g/L de glucosa, el metabolismo de la xilosa no se ve afectado, incluso observaron mejoras en el consumo de xilosa. No obstante, el consumo de xilosa disminuyó gradualmente. Esto debido al efecto de la glucosa sobre el flujo de carbono a través de la glucólisis y las pentosas fosfato, ya que en estas rutas se produce NAD^+ y NADPH . Esto podría explicar el aumento en la actividad de XDH en los SBC en comparación a los cultivos en xilosa en ambas cepas.

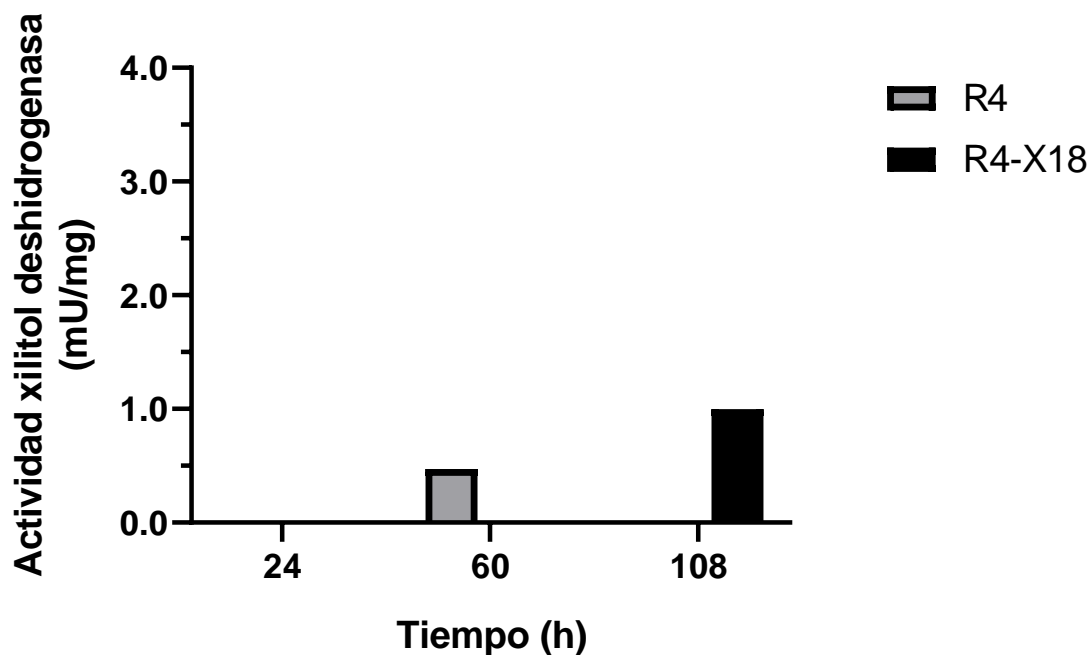


Figura 23. Actividad xilitol deshidrogenasa por *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en SBC

6.6 Purificación parcial de β -glucosidasa, XR y XDH en *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en glucosa, xilosa, celobiosa y SBC

Durante las cinéticas de crecimiento de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en glucosa, celobiosa y xilosa como en SBC, se evaluaron actividades enzimáticas asociadas al catabolismo de dichas fuentes como la β -glucosidasa, XR y XDH. Para identificar la proteína respectiva presente en los extractos crudos se fraccionaron las muestras obtenidas de los ensayos de actividad.

6.6.1 Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* de las enzimas β -glucosidasa, XR y XDH relacionadas al metabolismo de azúcares en *X. dendrorhous* se utilizó como referencia el genoma de *Phaffia rhodozyma* CBS 6938 reportada por la Universidad de Chile en la plataforma NCBI. Las secuencias de aminoácidos pertenecientes a dichas enzimas fueron alimentadas en la plataforma ExPasy - ProtParam tool para obtener parámetros fisicoquímicos como el peso molecular y el punto isoeléctrico teórico. Los valores obtenidos se registraron en la Tabla 5. Así mismo, para predecir la solubilidad teórica de cada proteína se utilizó la plataforma Protein-Sol, la cual permitió identificar que todas las proteínas son citoplásmicas (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis *in silico* de proteínas relacionadas al metabolismo de azúcares en *X. dendrorhous*

Proteína	Peso (kDa)	Punto isoeléctrico	Escala de solubilidad	
β -glucosidasa	91.83	5.18	0.43	Soluble
Xilosa reductasa	34.32	5.86	0.52	Altamente soluble
Xilitol deshidrogenasa	43.19	6.22	0.43	Soluble

La escala de solubilidad es una comparación del promedio de la población de proteínas solubles de *E. coli* siendo el promedio 0.45 y cualquier valor mayor se predice como una proteína altamente soluble y valores por debajo son considerados menos solubles.

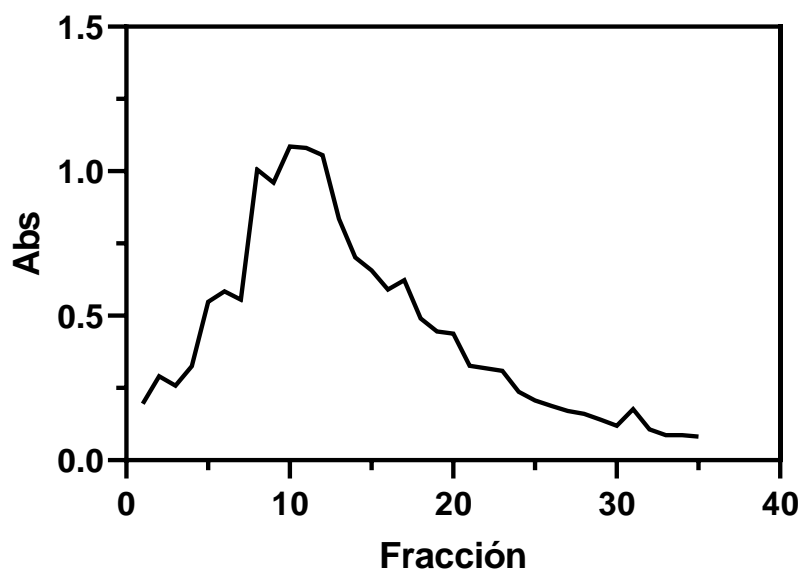
6.6.2 Purificación parcial de la β -glucosidasa en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en celobiosa y SBC

Durante el fraccionamiento por intercambio aniónico de los extractos crudos libres de células de *X. dendrorhous* R4 creciendo en celobiosa, se obtuvieron tres fracciones donde cada una presentó una concentración de proteína total, así como un factor de purificación (FP). Las fracciones se clasificaron de forma consecutiva en I, II y III (Figura 24a). La fracción I (tubos del 1 al 7) presentó una concentración de proteína de 16.89

mg/mL con un FP de 0.47. La fracción **II** (tubos del 8 al 25) tuvo una concentración de 4.6 mg/mL y un FP de 0.04. Finalmente, la fracción **III** (tubos del 26 al 40) tuvo la menor concentración de proteína con 3.42 mg/mL, así mismo, fue la fracción con menor FP con 0.02 (Tabla 6). El perfil electroforético de las fracciones **I**, **II** y **III** siguió el mismo comportamiento que el FP, ya que sólo la fracción **I** presentó un bandeo cercano a los 97.4 kDa, la cual coincidió con el peso molecular obtenido por el análisis *in silico* de la β -glucosidasa para *X. dendrorhous* (Figura 25a).

Por su parte, los extractos crudos de la cepa R4-X18 en celobiosa se dividieron en 4 fracciones las cuales se clasificaron como **E**, **F**, **G** y **H** (Figura 24b). La fracción **E** (tubos 1 al 9) tuvo una concentración de proteína de 1.95 mg/mL con un FP de 0.35, mientras que la fracción **F** (tubos 10 al 20) presentó una concentración 2.3 veces mayor, no obstante, con un FP menor (0.27). La fracción **G** (tubos 21 al 50) tuvo la mayor cantidad de proteína con una concentración de 10.27 mg/mL. Así mismo, fue la fracción con mayor FP (0.41). Finalmente, la fracción **H** (tubos 51 al 66) tuvo una concentración de proteína de 0.01 mg/mL con un FP de 0.09 siendo la fracción con menor actividad β -glucosidasa (Tabla 6). Así mismo, el perfil electroforético mostró un bandeo en la región de los 97.4 kDa en las fracciones **E**, **F** y **G** con relación al peso molecular teórico de la β -glucosidasa. Por otro lado, la fracción **E** mostró dos bandas con mayor intensidad en la región cercana a los 91 kDa, mientras que las fracciones **F** y **G** sólo mostraron una banda con poca intensidad en esta región. Esto puede estar relación con la concentración de proteína obtenida al generar las fracciones (Figura 25b). El bandeo en las fracciones, así como el PF de la cepa R4-X18 en celobiosa fue menor en relación con las fracciones de la cepa R4 (Figura 25a).

a)



b)

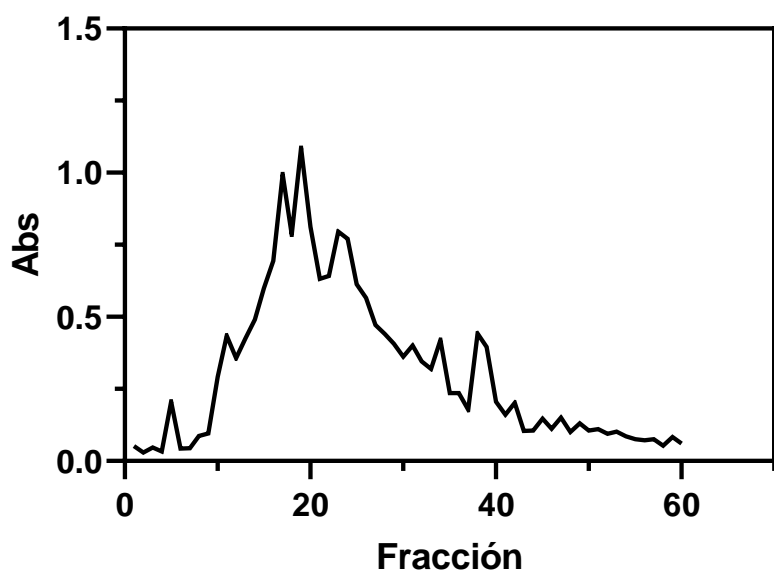


Figura 24. Fraccionamiento por intercambio aniónico con KCl 0.52 M de extractos crudos libres de células en cultivos de b) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 creciendo en celobiosa

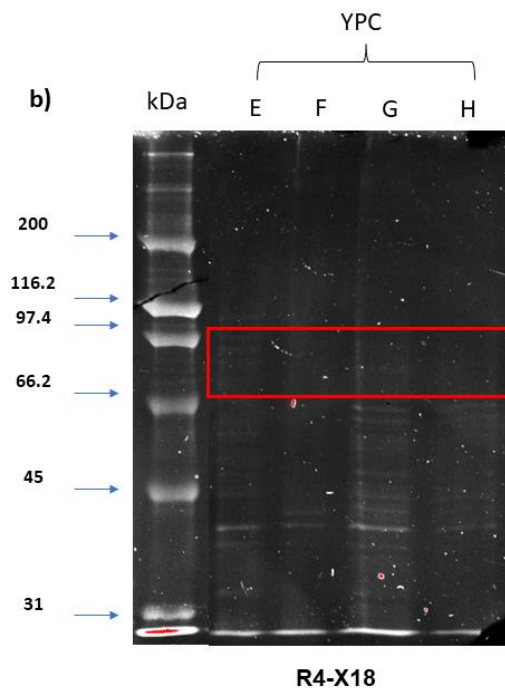
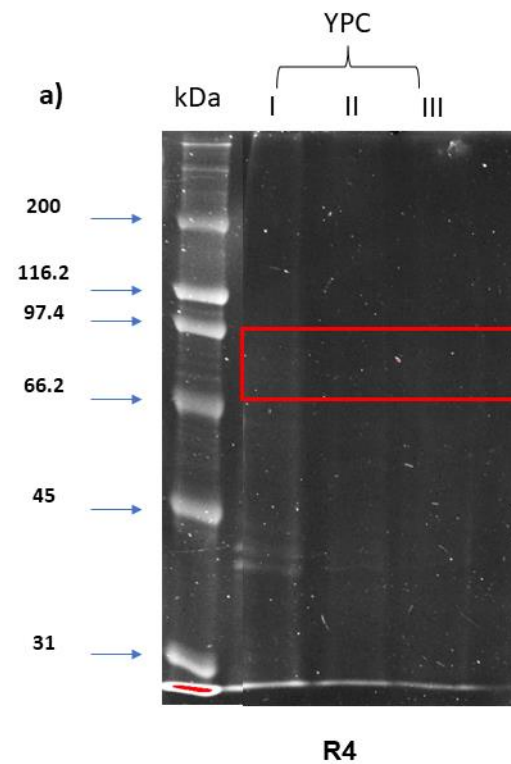


Figura 25. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 creciendo en celobiosa. En el recuadro se encuentran las bandas relacionadas con la presencia de β -glucosidasa

Para los extractos de la cepa R4 en SBC se obtuvieron cuatro fracciones las cuales se clasificaron como **a**, **b**, **c** y **d** (Figura 26a). La fracción **a** (tubos 1 al 3) tuvo una concentración de proteína total de 1.1 mg/mL y un PF de 0.21, así mismo, la fracción **b** (tubos 4 al 13) tuvo una concentración de 1.31 mg/mL, no obstante, el PF fue 5 veces menor (0.04) con respecto a la fracción **a**. Para la fracción **c** (tubos 14 al 23) la concentración de proteína total fue 1.6 veces mayor (1.81 mg/mL) con respecto a la fracción **a**, no obstante, el PF fue similar con 0.22. Finalmente, la fracción **d** (tubos 25 al 31) tuvo la concentración más baja de proteína (0.53 mg/mL). Sin embargo, el PF de la fracción **d** (5.78) fue el más alto obtenido con respecto a las demás fracciones (Tabla 6) lo cual indica que la mayor concentración de β -glucosidasa se podría obtener en esta fracción. En cuanto al perfil electroforético de las fracciones **a**, **b**, **c** y **d** de R4 en los SBC, se observaron bandas con un peso aproximado de 97.4 kDa, no obstante, las fracciones **a**, **b** y **c** mostraron bandas cercanas a los 91 kDa coincidiendo con el bandeo observado en los extractos en celobiosa por la misma cepa (Figura 27a).

Al igual que en la cepa R4, los extractos de la cepa mutante R4-X18 en SBC se dividieron en cuatro fracciones denominadas **o**, **p**, **q** y **r** (Figura 26b). La fracción **o** (tubos 1 al 2) tuvo una concentración de 1.03 mg/mL, mientras que, la fracción **p** (tubos 3 al 11) tuvo una concentración de 2.99 mg/mL. Así mismo, las fracciones **o** y **p** presentaron factores de purificación menores a 1 con 0.03 y 0.07 respectivamente, es decir, tuvieron menor actividad enzimática. Por otra parte, las fracciones **q** (tubos 13 al 16) y **r** (tubos 19 al 23) tuvieron concentraciones de proteína de 1.48 y 0.37 mg/mL respectivamente. Los factores de purificación fueron los más altos con respecto a los factores obtenidos en las fracciones de la cepa R4 con 0.12 y 0.08 respectivamente (Tabla 6). Al igual que el perfil electroforético de los extractos de la cepa R4 en SBC, se observó una banda de 97.4 kDa en las fracciones **p**, **q** y **r** de la cepa R4-X18, así mismo, se observaron bandas de menor tamaño en las fracciones **p** y **q** con un peso aproximado de 90 kDa (Figura 27b). Las β -glucosidasas (BGL, EC 3.2.1.21) son ampliamente producidas por diferentes géneros y especies del reino Fungi incluyendo *Ascomycetos* y *Basidiomicetos*. Las β -glucosidasas se caracterizan por tener un intervalo amplio de pesos moleculares (43-138 kDa) y un intervalo de pH óptimo de 3.5 a 6.0, así como una temperatura óptima entre los 45 °C y los 70 °C (Molina *et al.*, 2016).

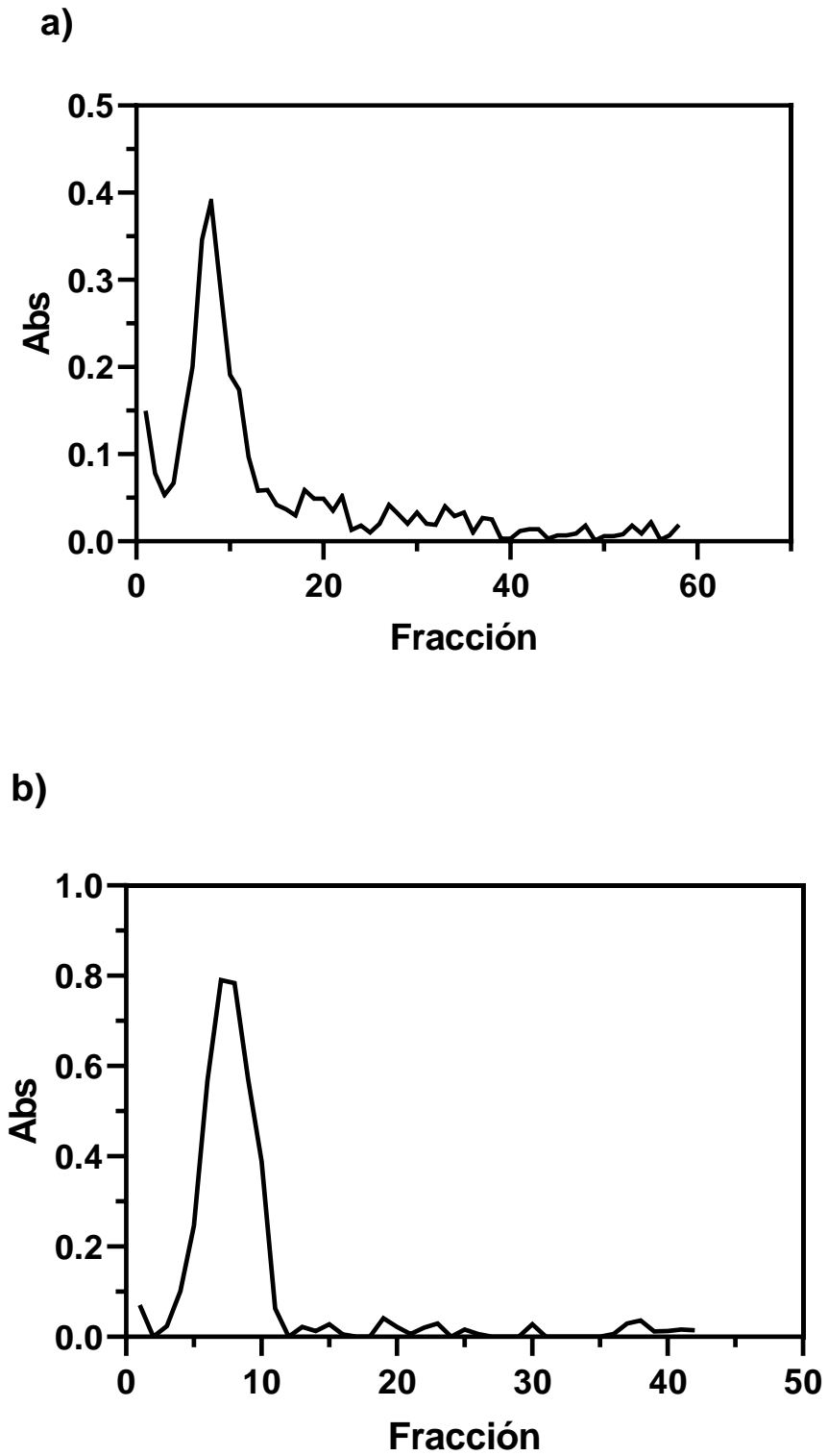


Figura 26. Fraccionamiento por intercambio aniónico con KCl 0.52 M de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 creciendo en SBC

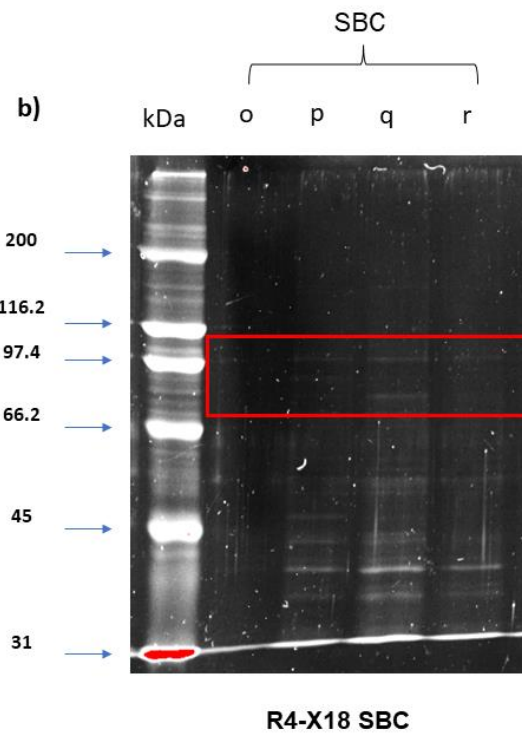
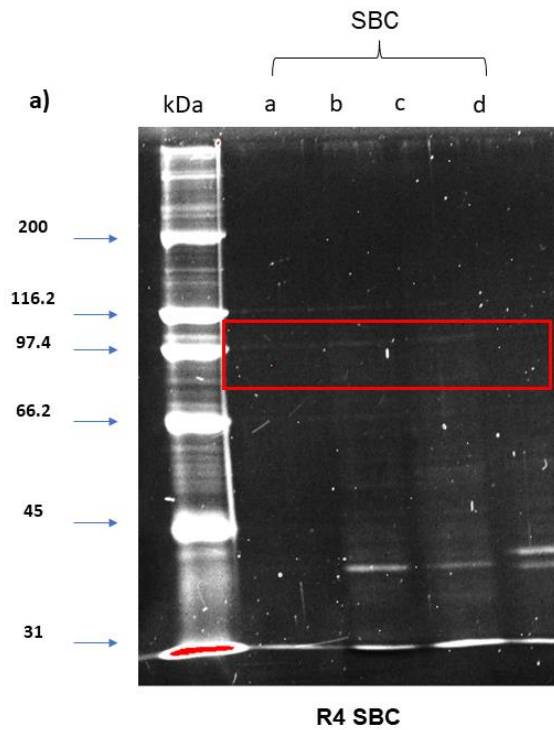


Figura 27. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 crecidos en SBC. En el recuadro se encuentran las bandas relacionadas con la presencia de β -glucosidasa

Tabla 6. Purificación parcial de β -glucosidasa en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en celobiosa y SBC

Paso	Muestra	Proteína total (mg/mL)	Actividad volumétrica (mU/mL)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	YPC-R4	21.6 ± 0.23	23.97 ± 2.08	100	1
Fraccionamiento	I	16.89 ± 0.80	11.22 ± 0.17	78.19	0.47 ± 0.04
	II	4.6 ± 0.37	0.92 ± 0.26	21.30	0.04 ± 0.01
	III	3.42 ± 0.18	0.552 ± 0.09	15.83	0.02 ± 0.01
Extracto crudo	SBC-R4	9.56 ± 0.50	10.11 ± 0.34	100	1
Fraccionamiento	a	1.1 ± 0.02	2.14 ± 0.09	11.51	0.21 ± 0.02
	b	1.31 ± 0.15	0.43 ± 0.00	13.70	0.04 ± 0.00
	c	1.81 ± 0.00	2.26 ± 0.60	18.93	0.22 ± 0.05
	d	0.53 ± 0.12	3.25 ± 0.43	5.54	0.32 ± 0.05
Extracto crudo	YPC R4-X18	24.2 ± 3.09	27.53 ± 1.47	100	1
Fraccionamiento	E	1.95 ± 0.59	9.62 ± 1.56	8.06	0.35 ± 0.04
	F	4.48 ± 1.39	7.54 ± 1.56	18.51	0.27 ± 0.04
	G	10.27 ± 0.69	11.34 ± 1.12	42.44	0.41 ± 0.06
	H	0.01 ± 0.00	2.39 ± 0.43	0.04	0.09 ± 0.01
Extracto crudo	SBC R4-X18	27.27 ± 0.33	27.16 ± 0.52	100	1
Fraccionamiento	o	1.03 ± 0.20	0.92 ± 0.34	3.78	0.03 ± 0.01
	p	2.99 ± 0.07	2.02 ± 1.04	10.96	0.07 ± 0.04
	q	1.48 ± 0.82	3.25 ± 0.43	5.43	0.12 ± 0.01
	r	0.37 ± 0.37	2.27 ± 1.12	1.36	0.08 ± 0.04

6.6.3 Purificación parcial de XR y XDH en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en glucosa, xilosa y SCB

Los extractos crudos libres de células de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 en xilosa y en SBC fueron fraccionados por cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de identificar enzimas como XR y XDH que están relacionadas con el metabolismo de la xilosa. Para los extractos de la cepa R4 crecida en xilosa se obtuvieron dos fracciones denominadas **I** y **II** (Figura 28a). Cada fracción fue empleada para la determinación de la actividad enzimática de XR y XDH, las cuales tuvieron una concentración de proteína total de 7.96 y 13.58 mg/mL respectivamente. Por otro lado, el PF para XR en las fracciones **I** y **II** fue de 1.26 y 0.74 respectivamente, lo cual indicó que la mayor actividad enzimática de XR se encontró en la fracción **I** (Tabla 7). Así mismo, el PF para XDH en las fracciones **I** y **II** fue de 0.14 y 0.17 respectivamente (Tabla 8). El perfil electroforético en la Figura 29a muestra bandas en un intervalo de 31 a 45 kDa. De acuerdo con el análisis *in silico* para XR y XDH en *X. dendrorhous* el peso molecular teórico para ambas enzimas es de 34.3 y 43.2 kDa respectivamente. Lo que podría indicar la presencia de XR y XDH en las fracciones **I** y **II**. Se usaron como controles los extractos de R4 crecida en glucosa, no obstante, también se observaron bandas cercanas a la región de los 45 kDa. Las bandas observadas podrían reafirmar la presencia de estas enzimas a niveles basales, ya que también se observó actividad XR durante las cinéticas de crecimiento en glucosa por parte de la cepa R4.

Por su parte, los extractos de la cepa R4-X18 crecida en xilosa se dividieron en dos fracciones denominadas **E** y **F** (Figura 28b). Al igual que en las fracciones de la cepa R4, las fracciones **E** y **F** de la cepa R4-X18 se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática de XR y XDH. La concentración de proteína para las fracciones **E** y **F** fue de 7.06 y 13.44 mg/mL, así mismo, el PF para XR en ambas fracciones fue de 0.39 y 0.33 respectivamente (Tabla 7). Por otro lado, el PF para XDH en **E** y **F** fue de 0.21 y 1.23 indicando una mayor actividad enzimática para la fracción **F** (Tabla 8). El perfil electroforético mostró bandas cercanas a los 45 kDa para ambas fracciones (Figura 29b). En comparación, el bandeo observado en las fracciones de R4 en xilosa fue más intenso para XR y XDH que el bandeo de la mutante R4-X18. Así mismo, el factor de purificación fue mayor para XR y XDH en las fracciones de R4 con respecto a R4-X18, lo cual podría

estar relacionado con la mayor velocidad de consumo de sustrato que se observó por parte de la cepa R4 en presencia de xilosa, así mismo, también podría haber una mayor expresión de los genes *xyI1* y *xyI2* con relación a la cepa R4-X18.

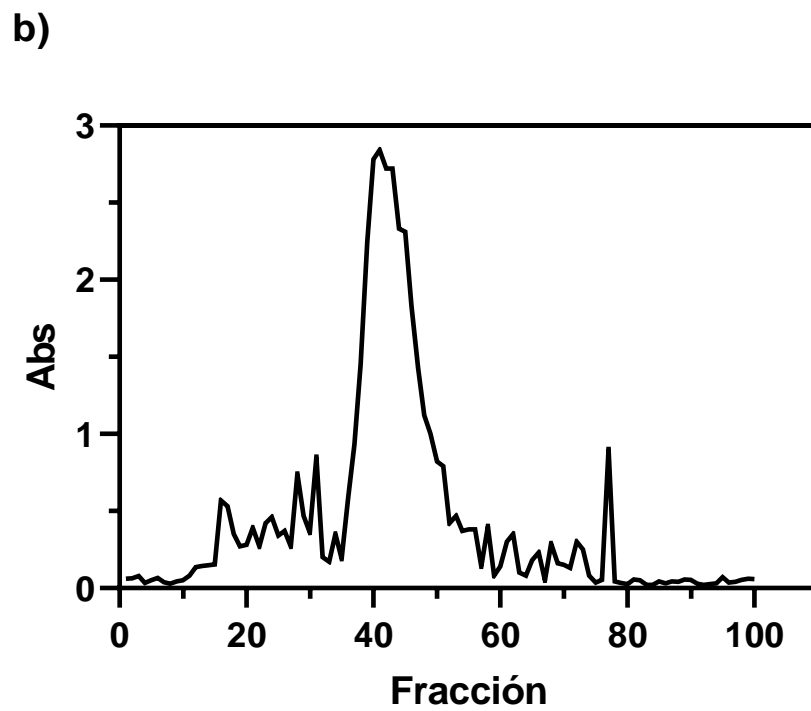
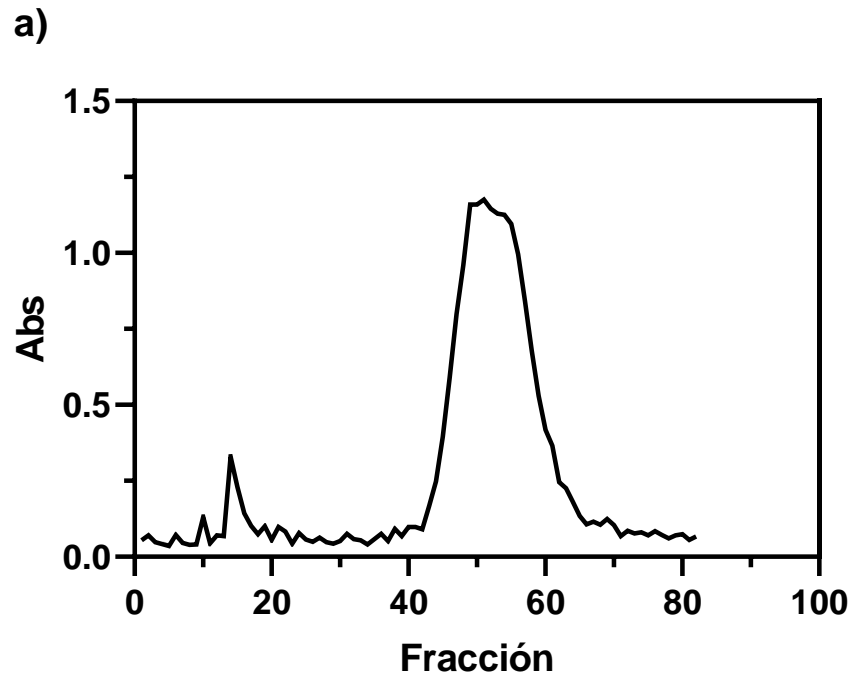


Figura 28. Fraccionamiento por exclusión molecular de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 crecidos en xilosa

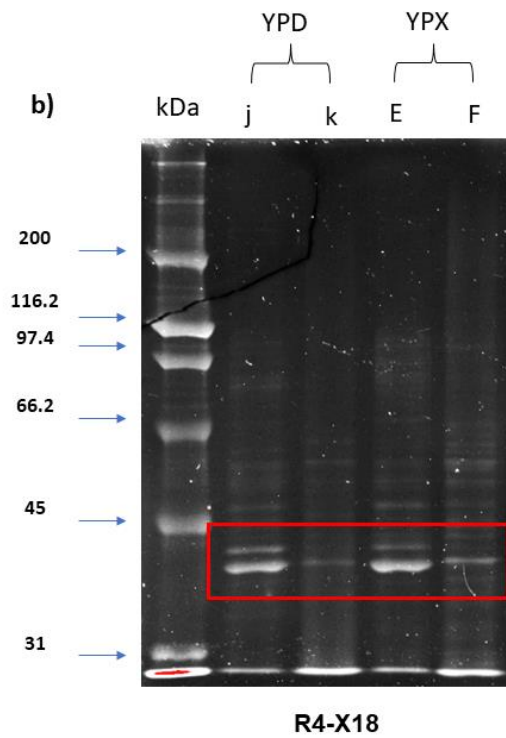
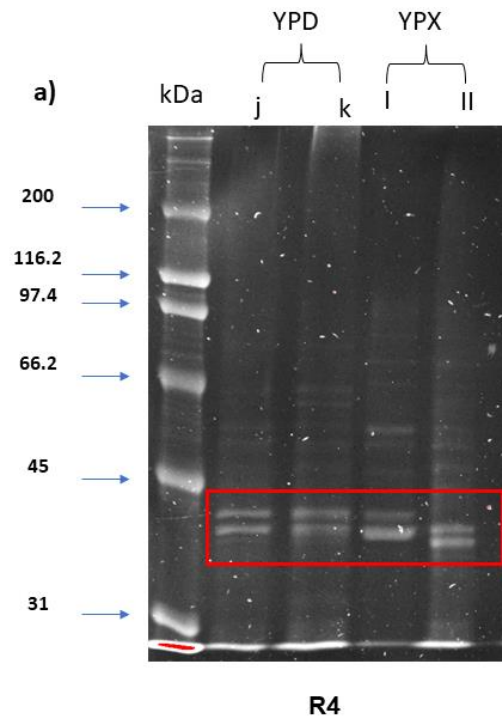


Figura 29. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 crecidos en xilosa. En el recuadro se encuentran las bandas relacionadas con la presencia de XR y XDH

Para el caso de los extractos de la cepa R4 crecida en SBC se dividieron en las fracciones **a** y **b** (Figura 30a), las cuales presentaron concentraciones de proteína de 0.93 y 3.89 mg/mL respectivamente. El PF para XR en las fracciones **a** y **b** de R4 fue de 0.73 y 1.75 respectivamente (Tabla 7). Por lo tanto, se obtuvo mayor actividad de XR en la fracción **b**. Por su parte, el PF para XDH en **a** y **b** fue de 10.75 y 7.75 respectivamente (Tabla 8). Lo cual indicó que en ambas fracciones se obtuvo una cantidad importante XDH. Así mismo, el perfil electroforético de las fracciones **a** y **b** de la cepa R4 en SBC mostró un patrón de bandeo más intenso en comparación con las fracciones obtenidas en xilosa por la misma cepa. Al igual que en los extractos en xilosa de R4 se identificaron bandas en regiones cercanas a los 45 kDa relacionadas a la presencia de XR y XDH (Figura 31a).

En cuanto a los extractos de la cepa R4-X18 crecida en SBC, se obtuvieron cinco fracciones (**o**, **p**, **q**, **r** y **s**) de las cuales sólo **o** y **q** presentaron actividad XR, mientras que las fracciones **o**, **p** y **q** presentaron actividad XDH (Figura 30b). Las fracciones **o**, **p** y **q** tuvieron concentraciones de proteína de 4.48, 7.84 y 4.43 mg/mL respectivamente (Tabla 8). El PF para XR en las fracciones **o** y **q** fue de 19.16 y 2.18 respectivamente (Tabla 7). La fracción **o** presentó mayor actividad de XR en comparación con la fracción **q**, no obstante, en ambas fracciones se logró incrementar la actividad enzimática. La recuperación enzimática fue mayor con respecto a las fracciones obtenidas en xilosa para la misma cepa. Para el caso de XDH el PF en las fracciones **o**, **p** y **q** fue de 0.76, 1.74 y 0.77 respectivamente (Tabla 8). La recuperación de XDH en la fracción **p** fue mayor que en las fracciones de la misma cepa crecida en xilosa. Por su parte, el perfil electroforético en las fracciones **p**, **q**, **r** y **s** mostró bandas en la región cercana a los 45 kDa (Figura 31b), no obstante, las bandas más intensas se observaron en **q**, **r** y **s**.

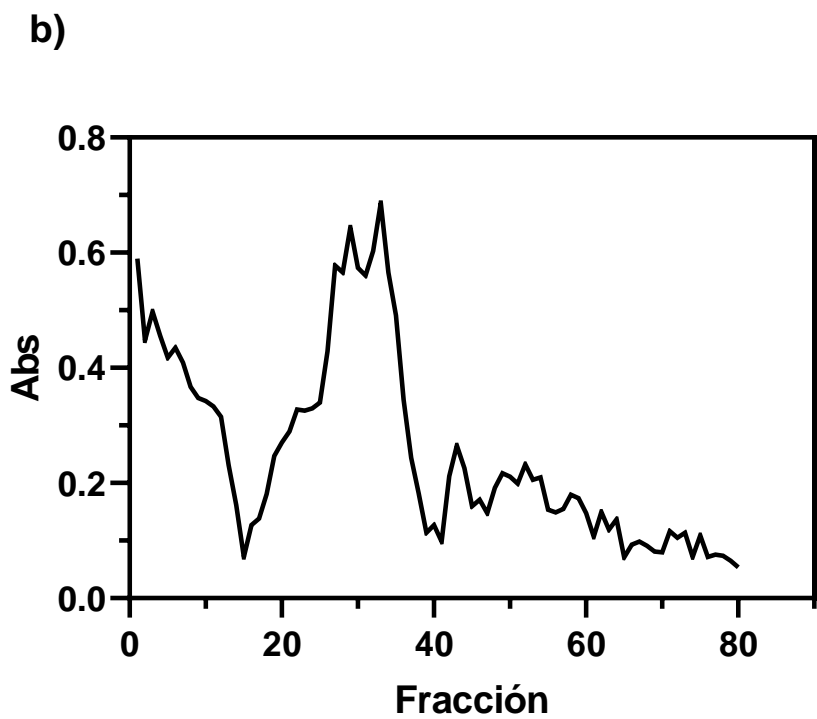
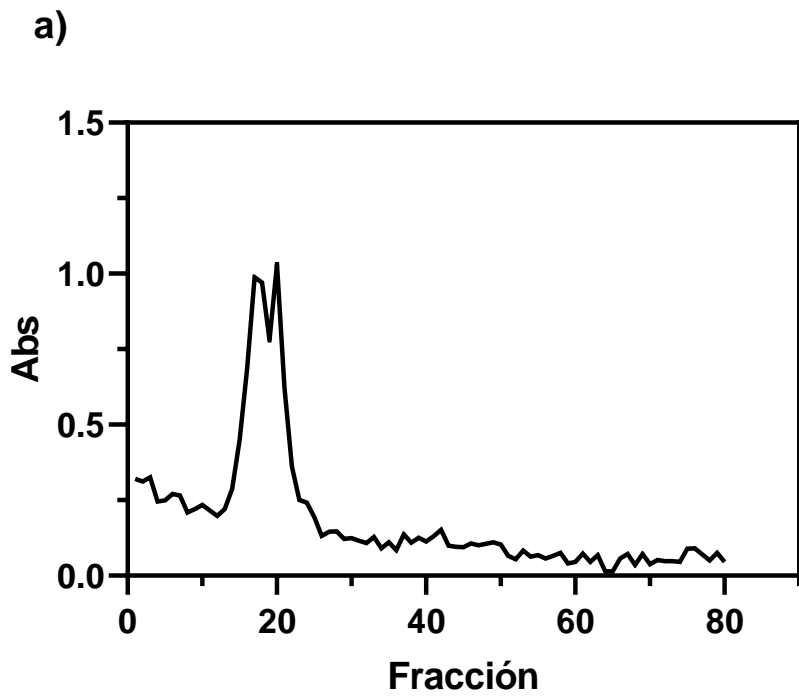


Figura 30. Fraccionamiento por exclusión molecular de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 crecidos en SBC

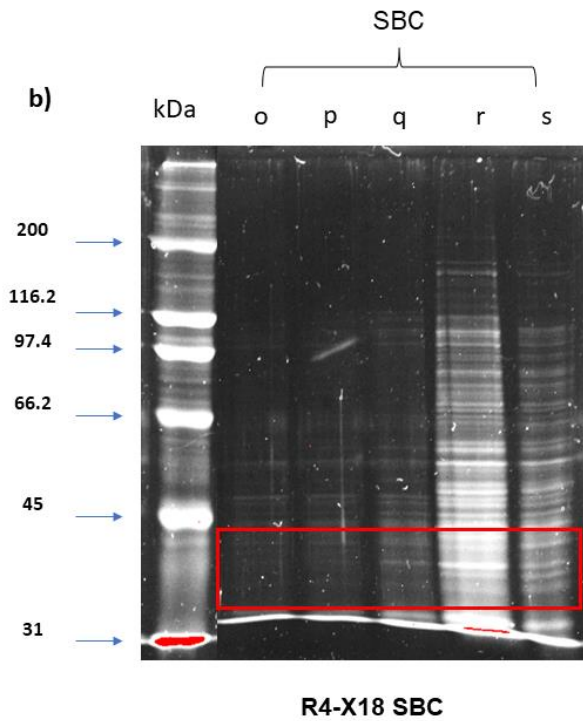
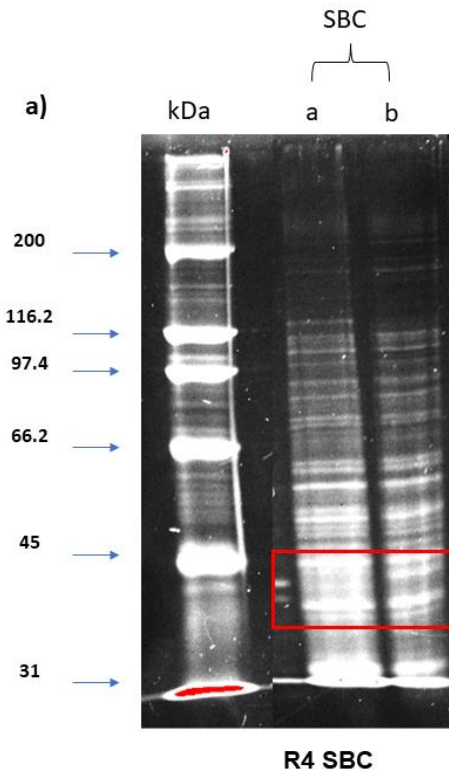


Figura 31. Perfil electroforético de extractos crudos libres de células en cultivos de a) *X. dendrorhous* R4 y b) *X. dendrorhous* R4-X18 crecidos en SBC. En el recuadro se encuentran las bandas relacionadas con la presencia de XR y XDH

Tabla 7. Purificación parcial de XR en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en xilosa y SBC

Paso	Muestra	Proteína total (mg/mL)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	YPX-R4	16.04 ± 0.00	0.4 ± 0.00	100	1
Fraccionamiento	I	7.96 ± 0.12	0.51 ± 0.01	49.63	1.28 ± 0.02
	II	13.58 ± 0.53	0.30 ± 0.01	84.66	0.75 ± 0.03
Extracto crudo	SBC-R4	9.56 ± 0.50	1.18 ± 0.06	100	1
Fraccionamiento	a	0.93 ± 0.02	0.86 ± 0.37	9.73	0.73 ± 0.35
	b	3.89 ± 0.15	2.06 ± 0.00	40.69	1.75 ± 0.09
Extracto crudo	YPX R4-X18	16.51 ± 0.50	2.33 ± 0.68	100	1
Fraccionamiento	E	7.06 ± 0.47	0.91 ± 0.61	42.76	0.39 ± 0.04
	F	13.44 ± 0.13	0.78 ± 0.01	81.41	0.33 ± 0.01
Extracto crudo	SBC R4-X18	27.27 ± 0.33	0.41 ± 0.01	100	1
Fraccionamiento	o	4.48 ± 0.69	7.90 ± 1.23	16.43	19.16 ± 2.73
	p	7.84 ± 0.65	NA	NA	NA
	q	4.43 ± 0.00	0.90 ± 0.00	16.24	2.18 ± 0.02
	r	0.72 ± 0.05	NA	NA	NA
	s	0.96 ± 0.05	NA	NA	NA

Tabla 8. Purificación parcial de XDH en cultivos de *X. dendrorhous* R4 y R4-X18 creciendo en xilosa y SBC

Paso	Muestra	Proteína total (mg/mL)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	YPX-R4	16.04 ± 0.00	0.70 ± 0.00	100	1
Fraccionamiento	I	7.96 ± 0.12	0.10 ± 0.00	49.63	0.14 ± 0.00
	II	13.58 ± 0.53	0.12 ± 0.01	84.66	0.17 ± 0.00
Extracto crudo	SBC-R4	9.56 ± 0.50	0.08 ± 0.00	100	1
Fraccionamiento	a	0.93 ± 0.02	0.86 ± 0.37	9.73	10.75 ± 5.0
	b	3.89 ± 0.15	0.62 ± 0.00	40.69	7.75 ± 0.38
Extracto crudo	YPX R4-X18	16.51 ± 0.50	0.54 ± 0.02	100	1
Fraccionamiento	E	7.06 ± 0.47	0.11 ± 0.01	42.76	0.21 ± 0.02
	F	13.44 ± 0.13	0.66 ± 0.01	81.41	1.23 ± 0.05
Extracto crudo	SBC R4-X18	27.27 ± 0.33	0.24 ± 0.00	100	1
Fraccionamiento	o	4.48 ± 0.69	0.18 ± 0.03	16.43	0.76 ± 0.11
	P	7.84 ± 0.65	0.41 ± 0.03	28.75	1.74 ± 0.17
	q	4.43 ± 0.00	0.18 ± 0.00	16.24	0.77 ± 0.01
	r	0.72 ± 0.05	NA	NA	NA
	s	0.96 ± 0.05	NA	NA	NA

La xilosa reductasa (EC 1.1.1.21) es una aldo-ceto reductasa (AKR) que cataliza el paso inicial en la asimilación de la xilosa mediante la conversión a xilitol. Al igual que la xilosa reductasa, la xilitol deshidrogenasa forma parte de la superfamilia de las AKR y cataliza la oxidación dependiente de NAD(P)⁺ de xilitol a xilulosa. Además, las AKR son proteínas monoméricas con un tamaño aproximado de 320 residuos de aminoácido que pueden unirse a cofactores de nicotinamida sin la necesidad de un motif Rossmann (Jez *et al.*, 1997; Mayr & Nidetzky, 2002; Kratzer *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2022). Los SCB son un excelente sustrato para incrementar la actividad de XR en ambas cepas, ya que en este sustrato se observaron bandas con mayor intensidad en comparación con las bandas obtenidas en xilosa por ambas cepas. Por otro lado, la actividad de XDH, así como el bandeo que presentaron los SCB fue menor al observado en xilosa por ambas cepas, lo cual podría indicar que la actividad de XDH está ligada a la concentración de xilosa.

7. CONCLUSIONES

El tratamiento mutagénico en *X. dendrorhous* R4-X18 afectó negativamente el metabolismo de la xilosa reduciendo 22 % su velocidad específica de crecimiento respecto a la cepa R4, así como en 43 % las actividades de XR y XDH para ambas enzimas. Sin embargo, lo anterior favoreció la producción de astaxantina incrementando en 36 % respecto a su cepa materna. Este comportamiento estaría relacionado a la limitación de cofactores necesarios para la oxido-reducción de la xilosa, disparando la biosíntesis de astaxantina para contrarrestar el estrés oxidativo al interior de la célula. No obstante, los SBC fueron el segundo mejor sustrato para la producción de astaxantina en la misma cepa, superando a la glucosa y celobiosa en 5 y 36 %, respectivamente. Así mismo, la cepa R4-X18 demostró mayor producción de astaxantina, superando en un 36 y 40 % la producción de su cepa materna R4 creciendo en xilosa y celobiosa.

En la cepa R4-X18, la actividad XR fue 61 % mayor en los SBC que en la xilosa como única fuente de carbono, debido posiblemente al metabolismo oxidativo de la glucosa, favoreciendo el consumo de la xilosa, ambos azúcares presentes en los SBC. Mientras que la actividad xilitol deshidrogenasa (XDH) fue mayormente estimulada en cultivos en xilosa siendo 34 % mayor que en los SBC, lo cual podría relacionarse con la concentración de xilosa, permitiendo acumular mayor cantidad de xilitol siendo este metabolito un inductor de dicha enzima.

El tratamiento mutagénico también afectó la actividad β -glucosidasa de R4-X18 siendo 74 % menor con respecto a la actividad presentada por su cepa materna R4, ambas creciendo en celobiosa. Sin embargo, en R4-X18, esta actividad fue 86 % mayor creciendo en SCB que la actividad obtenida en celobiosa. Lo anterior sugiere que la mezcla de azúcares en los SBC tiene un efecto sinérgico sobre el metabolismo de los mismos.

El SDS-PAGE permitió identificar bandas cercanas a los 34.32 y 43.19 kDa, sugiriendo la presencia de XR y XDH en extractos crudos libres de células, parcialmente purificados, de R4 y R4-X18 crecidas en xilosa y SBC. Así mismo, se identificaron bandas de 91.83

kDa relacionadas a la β -glucosidasa, en los extractos de ambos cultivos en celobiosa y SBC.

La mayor intensidad de las bandas relativas a XR, XDH y β -glucosidasa en la cepa R4 respecto a R4-X18, está relacionada con la mayor actividad enzimática presentada en la cepa R4 respecto a R4-X18. Lo anterior sugiere que *X. dendrorhous* R4-X18 sufrió modificaciones en su metabolismo, reduciendo el consumo de la xilosa y celobiosa, pero que favorecieron la producción de astaxantina posiblemente por un estrés oxidativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A. & Navarro, E. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. <https://www.researchgate.net/publication/241216642>
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiology, 8(1), 169. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-169>
- Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A. E., Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2016). The involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in catabolic repression: An active mechanism contributing to the regulation of carotenoid production. PloS One, 11(9), e0162838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162838>
- Alcaíno, J., Fuentealba, M., Cabrera, R., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2012). Modeling the interfacial interactions between CrtS and CrtR from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a P450 system involved in astaxanthin production. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(35), 8640–8647. <https://doi.org/10.1021/jf302287f>
- Almenares-Verdecía, J. F. & Serrat-Díaz, M. de J. (2008). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulosica ii. Tecnología Química, 31(3), 392–407. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543757008>
- Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. Current Genomics, 14(4), 230–249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
- An, G.-H., Schuman, D. B., & Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology, 55(1), 116–124.
- Asgher, M., Bashir, F., & Iqbal, H. M. N. (2014). A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. Chemical Engineering Research and Design, 92(8), 1571–1578. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.09.003>

- Astaxanthin Market Size & Share, Trends Analysis 2024-2032. (s/f). Global Market Insights Inc. Recuperado el 19 de enero de 2024, de <https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market>
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos (4a. Ed.). México: PEARSON EDUCACION. Pigmentos, 7(406-413).
- Barbachano-Torres, A., Castelblanco-Matiz, L. M., Ramos-Valdivia, A. C., Cerda-García-Rojas, C. M., Salgado, L. M., Flores-Ortiz, C. M., & Ponce-Noyola, T. (2014). Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Archives of Microbiology, 196(6), 411–421. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0979-x>
- Barredo, J. L., García-Estrada, 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. <https://doi.org/10.3390/jof3030044>
- Berlanga, M. (2004). Microbiología (5a edn). Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. International Microbiology, 2(6), 119-120. <https://doi.org/10.2436/im.v7i3.9477>
- Berthelot, K., Estevez, Y., Deffieux, A., & Peruch, F. (2012). Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. Biochimie, 94(8), 1621–1634. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.03.021>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A Review. Enzyme Research, 2011, 787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Cannizzaro, C., Christensen, B., Nielsen, J., & Stockar, U. von. (2004). Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. Metabolic Engineering, 6(4), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.06.001>
- Carreón-Rodríguez, O., López, A., Centeno-Leija, S., Reyes, L., Martínez, A., & Fernández-Sandoval, M. (2009). Etanol Carburante. Revista SMBB, 13, 79–102.
- Castro, L., Antoniêto, A. C. C., Pedersoli, W. R., Silva, R., Persinoti, G. F., & Silva, R. N. (2014). Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional

- factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. *Gene Expression Patterns*, 14(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.01.003>
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Chandel, A. K., Singh, O. V., Chandrasekhar, G., Rao, L. V., & Narasu, M. L. (2010). Key drivers influencing the commercialization of ethanol-based biorefineries. *Journal of Commercial Biotechnology*, 16(3), 239–257. <https://doi.org/10.1057/jcb.2010.5>
- Chandrakant, K., Suryakant, V. and Goyal, A. (2021). Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. *Materials Science for Energy Technologies* 4, 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.12.004>
- Chávez-Cabrera C., Flores-Bustamante Z.R., Flores-Cotera L.B. (2010a). Una vista integral de la síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. *BioTecnología*, 14(3), 24-38.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, Z. R., Marsch, R., Montes, M. del C., Sánchez, S., Cancino-Díaz, J. C., & Flores-Cotera, L. B. (2010b). ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1953–1960. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2271-6>
- Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., & de Jong, E. (2009). Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(5), 534–546. <https://doi.org/10.1002/bbb.172>
- CONADESUCA. (s/f). Recuperado el 20 de enero de 2024, de <https://www.siiba.conadesuca.gob.mx/infocana/Consulta/Reporte.aspx?cr=43&lstZaf=2019%2F20&mZafra=1&numero=1&mSZafra=1&mIngenio=1&limitl=78&f=1>
- Córdova, P., Alcaíno, J., Bravo, N., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2016). Regulation of carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: The role of the transcriptional co-repressor complex Cyc8–Tup1 involved in catabolic repression. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0597-1>
- Cuervo, L., Folch, J., Quiroz, R (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Centro de Investigación en Biotecnología*

- de Eugenio, L. I., Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., Alonso, L., Gil-Muñoz, J., Barriuso, J., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2017). Differential β -glucosidase expression as a function of carbon source availability in *Talaromyces amestolkiae*: A genomic and proteomic approach. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0844-7>
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., & Ughy, B. (2013). Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 539–561. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.001>
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 618–628. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1058-9>
- García, A. (2012). Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. (Tesis de maestría). Universidad de León. España.
- Gómez, M., Campusano, S., Gutiérrez, M. S., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2020). Sterol regulatory element-binding protein Sre1 regulates carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Lipid Research*, 61(12), 1658–1674. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000975>
- Granström, T., & Leisola, M. (2013). 17—Microbial production of xylitol and other polyols. En B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, & L. Harvey (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 469–493). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.469>
- Guarnizo, F., Anderson, Martínez, Y., Pedro, N., Valencia, S. & Hoover, A. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia Et Technica*, XV(42),284-289.
- Guo, H., Chang, Y., & Lee, D.-J. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. *Bioresource Technology*, 252, 198–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.062>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>

- Han, X., Hu, X., Zhou, C., Wang, H., Li, Q., Ouyang, Y., Kuang, X., Xiao, D., Xiang, Q., Yu, X., Li, X., Gu, Y., Zhao, K., Chen, Q., & Ma, M. (2020). Cloning and functional characterization of xylitol dehydrogenase genes from *Issatchenkia orientalis* and *Torulaspora delbrueckii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.012>
- Hanif, A., Yasmeen, A., & Rajoka, M. I. (2004). Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.013>
- Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C.-Y., Habash, M. B., Trevors, J. T., & Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1535-z>
- Howard, R. L., Abotsi, E., Rensburg, E. L. J. van, & Howard, S. (2003). Review - Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 602-619. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/1923>
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Wang, Z., & Shen, Y.-C. (2005). Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 771–775. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5566-x>
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., & Penning, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 3) (Pt 3), 625–636. <https://doi.org/10.1042/bj3260625>
- Karhumaa, K., Sanchez, R. G., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-5>
- Kim, S. M., Dien, B. S., Tumbleson, M. E., Rausch, K. D., & Singh, V. (2016). Improvement of sugar yields from corn stover using sequential hot water pretreatment and disk milling. *Bioresource Technology*, 216, 706–713. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.003>
- Kishimoto, Y., Tani, M., Uto-Kondo, H., Iizuka, M., Saita, E., Sone, H., Kurata, H., & Kondo, K. (2010). Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix

- metalloproteinase activity in macrophages. *European Journal of Nutrition*, 49(2), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0056-4>
- Krahulec, S., Petschacher, B., Wallner, M., Longus, K., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2010). Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-16>
- Kratzer, R., Wilson, D. K., & Nidetzky, B. (2006). Catalytic mechanism and substrate selectivity of aldo-keto reductases: Insights from structure-function studies of *Candida tenuis* xylose reductase. *IUBMB Life*, 58(9), 499–507. <https://doi.org/10.1080/15216540600818143>
- Kumar, A., Li, J., Kondaveeti, S., Singh, B., Shanmugam, R., Kalia, V. C., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2022). Characterization of a xylitol dehydrogenase from *Aspergillus flavus* and its application in l-xylulose production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.1001726>
- Kusdiyantini, E., Gaudin, P., Goma, G., & Blanc, P. J. (1998). Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnology Letters*, 20(10), 929–934. <https://doi.org/10.1023/A:1005445808265>
- Lara-Meléndez, A., Guzmán-Hernández, D., Montiel-Cruz, J., & Ponce-Noyola, T. (2023). 5—Engineering of nonconventional yeasts for valuable products including bioethanol. En A. Daverey, K. Dutta, S. Joshi, & T. Gea (Eds.), *Advances in Yeast Biotechnology for Biofuels and Sustainability* (pp. 99–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95449-5.00007-2>
- Lerfall, J. (2016). Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 663–669). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00119-7>
- Lerfall, J., Bendiksen, E. Å., Olsen, J. V., Morrice, D., & Østerlie, M. (2016). A comparative study of organic- versus conventional farmed Atlantic salmon. I. Pigment and lipid content and composition, and carotenoid stability in ice-stored fillets. *Aquaculture*, 451, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.013>

- Lim, K. C., Yusoff, F. Md., Shariff, M., & Kamarudin, M. S. (2018). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 738–773. <https://doi.org/10.1111/raq.12200>
- Liu, X., Luo, Q., Cao, Y., Goulette, T., Liu, X., & Xiao, H. (2016). Mechanism of Different Stereoisomeric Astaxanthin in Resistance to Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food Science*, 81(9), H2280-2287. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13417>
- Liu, X., Luo, Q., Rakariyatham, K., Cao, Y., Goulette, T., Liu, X., & Xiao, H. (2016). Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*, 25, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.009>
- Liu, X., Song, M., Gao, Z., Cai, X., Dixon, W., Chen, X., Cao, Y., & Xiao, H. (2016). Stereoisomers of Astaxanthin Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth by Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7750–7759. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03636>
- 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
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11(1), 190. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-190>
- Martinez-Moya, P., Campusano, S., Córdova, P., Paradela, A., Sepulveda, D., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2020). Convergence between Regulation of Carbon Utilization and Catabolic Repression in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *mSphere*, 5(2), 10.1128/msphere.00065-20. <https://doi.org/10.1128/msphere.00065-20>
- Martinez-Moya, 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. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1484-6>
- Mata, L. C., Montañez, J. C., Méndez, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>

- Mayr, P., & Nidetzky, B. (2002). Catalytic reaction profile for NADH-dependent reduction of aromatic aldehydes by xylose reductase from *Candida tenuis*. *The Biochemical Journal*, 366(Pt 3), 889–899. <https://doi.org/10.1042/BJ20020080>
- McWilliams, A. (2021). The global market for carotenoids. BCC Research: Wellesley, MA, USA. Recuperado el 29 de enero 2021 de: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>
- Molina, G., Contesini, F. J., de Melo, R. R., Sato, H. H., & Pastore, G. M. (2016). β -Glucosidase from *Aspergillus*. En V. K. Gupta (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 155–169). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00011-7>
- Montanti, J., Nghiem, N. P., & Johnston, D. B. (2011). Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 655–665. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9165-7>
- Nghiem, N. P., Montanti, J., & Johnston, D. (2009). Production of astaxanthin from corn fiber as a value-added co-product of fuel ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 154(1–3), 48–58. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8399-5>
- Ochoa-Chacón, A., Martínez, A., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A. C., & Ponce-Noyola, T. (2022). Xylose metabolism in bioethanol production: *Saccharomyces cerevisiae* vs Non-*Saccharomyces* yeasts. *BioEnergy Research*, 15(2), 905-923. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>
- Ochoa-Chacón, A., Ramos-Valdivia, A. C., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Martínez, A., & Ponce-Noyola, T. (2022). Fermentation performance of a Mexican native *Clavispora lusitaniae* strain for xylitol and ethanol production from xylose, glucose and cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*, 160, 110094. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110094>
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., & Sandmann, G. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 275(2), 148–158. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0072-x>

- Palágyi, Zs., Ferenczy, L., & Vágvölgyi, Cs. (2001). Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 95–97. <https://doi.org/10.1023/A:1016689512718>
- Parisutham, V., Chandran, S.-P., Mukhopadhyay, A., Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2017). Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology*, 239, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.001>
- Pernalete, Z., Piña, F., Suárez, M., Ferrer, A., & Aiello, C. (2008). Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: Efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. *Bioagro*, 20(1), 3–10. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612008000100001&lng=es&tlng=es
- Qi, X.-H., Zhu, J.-F., Yun, J.-H., Lin, J., Qi, Y.-L., Guo, Q., & Xu, H. (2016). Enhanced xylitol production: Expression of xylitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and mixed culture of resting cell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(3), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.02.009>
- Rangel-Basto, Y. (2020). Evaluación de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* a partir de sacarificados de bagazo de caña. (Tesis de maestría), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y., Kosugi, A., & Mori, Y. (2013). *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. *Biomass now—cultivation and utilization*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/51820>
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., de Souza, G. B., Mendonça, J. G. P., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana, M. F., da Silveira, W. B., & Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, 157, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>

- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183–201. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00046-6)
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), Article 7206, 841–845. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Saha, B. C. (2004). Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. *Lignocellulose biodegradation* (Vol. 889, pp. 2–34). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0889.ch001>
- Sánchez, A., Flores-Cotera, L. B., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G., & Sánchez, S. (1999). Carotenoids: Structure, function, biosynthesis, regulation and applications. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(3), 175–191. Scopus.
- Sanchez, S., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R., & Flores-Cotera, L. B. (2013). 9—Microbial production of carotenoids. En B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, & L. Harvey (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 194–233). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.194>
- Schutyser, W., Renders, T., Bosch, S. V. den, Koelewijn, S.-F., Beckham, G. T., & Sels, B. F. (2018). Chemicals from lignin: An interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society Reviews*, 47(3), 852–908. <https://doi.org/10.1039/C7CS00566K>
- Shimizu, K., & Matsuoka, Y. (2019). Redox rebalance against genetic perturbations and modulation of central carbon metabolism by the oxidative stress regulation. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107441. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107441>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Stachowiak, B. (2013). Effect of illumination intensities on astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants. *Food Science and Biotechnology*, 22(4), 1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0180-z>
- Stachowiak, B., & Szulc, P. (2021). Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules*, 26(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules26092666>
- Torres-Haro, A., Gschaedler, A., Mateos-Díaz, J. C., Herrera-López, E. J., Camacho-Ruiz, R. M., & Arellano-Plaza, M. (2021). Improvement of a specific culture medium based on

- industrial glucose for carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Processes*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/pr9030429>
- Vasylyshyn, R., Kurylenko, O., Ruchala, J., Shevchuk, N., Kuliesiene, N., Khroustalyova, G., Rapoport, A., Daugelavicius, R., Dmytruk, K., & Sibirny, A. (2020). Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01354-9>
- Verdoes, J. C., Misawa, N., & van Ooyen, A. J. (1999). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(6), 750–755. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19990620\)63:6<750::aid-bit13>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990620)63:6<750::aid-bit13>3.0.co;2-7)
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M., & van Ooyen, A. J. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3728–3738. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3728-3738.2003>
- Villegas-Méndez, M. Á., Aguilar-Machado, D. E., Balagurusamy, N., Montañez, J., & Morales-Oyervides, 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. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107260>
- Visser, H., Vanooyen, A., & Verdoes, J. (2003). Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 221–231. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00158-2)
- Vustin, M. M., Belykh, E. N., & Kishilova, S. A. (2004). Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology*, 73(6), 643–649. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0004-0>
- Wan, X., Zhou, X.-R., Moncalian, G., Su, L., Chen, W.-C., Zhu, H.-Z., Chen, D., Gong, Y.-M., Huang, F.-H., & Deng, Q.-C. (2021). Reprogramming microorganisms for the biosynthesis of astaxanthin via metabolic engineering. *Progress in Lipid Research*, 81, 101083. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101083>
- Wang, B., Pan, X., Jia, J., Xiong, W., Manirafasha, E., Ling, X., & Yinghua, L. (2019). Strategy and regulatory mechanisms of glutamate feeding to enhance astaxanthin yield in

- Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 125, 45–52.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.02.010>
- Wöstemeyer, J., Grünler, A., Schimek, C., & Voigt, K. (2005). 11—Genetic Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Fungi. En D. K. Arora & R. M. Berka (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 5, pp. 257–274). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(05\)80013-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(05)80013-9)
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*, 11(3), 252–262. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00711.x>
- Xiao, A., Jiang, X., Ni, H., Yang, Q., & Cai, H. (2015). Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.02.002>
- Yu, W., & Liu, J. (2020). Astaxanthin isomers: Selective distribution and isomerization in aquatic animals. *Aquaculture*, 520, 734915. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734915>
- Zha, J., Hu, M.-L., Shen, M.-H., Li, B.-Z., Wang, J.-Y., & Yuan, Y.-J. (2012). Balance of XYL1 and XYL2 expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 3, 355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00355>