

03072

28

28

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de  
Ciencias y Humanidades

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR FERMENTACIÓN  
SUMERGIDA POR *Phaffia rhodozyma***

**TESIS**

**FALLA DE ORIGEN**

**Que para obtener el grado de Maestra en Biotecnología**

**presenta la**

**Q.F.B. Elia Velázquez Mejía**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección académica del Dr. Sergio Sánchez Esquivel. Universidad Nacional Autónoma de México.**

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. GENERALIDADES.....	5
2.1 Definición	
2.2 Fuentes de astaxantina	
2.3 Biosíntesis	
2.4 Regulación	
2.5 Usos	
2.6 Demanda	
2.7 Producción fermentativa	
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
4.1 Reactivos grado alimentario	
4.2 Material biológico	
4.3 Medios de cultivo	
4.4 Preparación del inóculo	
4.5 Fermentación	
4.5.1 A nivel de matraz de 500 ml	
4.5.2 Fermentador de 4 l	
4.6 Determinación de biomasa	
4.7 Determinación del pigmento	
4.7.1 Extracción	
4.7.2 Purificación e identificación	
4.7.3 Cuantificación	
4.8 Determinación de la fuente de carbono	
4.9 Determinación de la fuente de nitrógeno	
4.10 Determinación de oxígeno disuelto	
4.11 Determinación del pH	
4.12 Método de la optimización del medio de cultivo	
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
5.1 Identificación y cuantificación del pigmento	
5.2 Selección de la fuente de carbono	
5.3 Variabilidad de la producción de carotenoides totales	
5.4 Evaluación preliminar de los compuestos del medio	
5.5 Explorar el efecto de la fracción de llenado sobre la producción	

- 5.6 Optimización del medio de cultivo
- 5.7 Efecto de el pH inicial sobre la producción
- 5.8 Efecto de la temperatura
- 5.9 Producción en fermentador de 4 l

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....78

BIBLIOGRAFÍA.....80

ANEXO

..... *Para nacer he nacido, al paso de cuanto se aproxima, de cuanto a mi pecho golpea como un nuevo corazón tembloroso.*

*Pablo Neruda.*

## Producción de Astaxantina por fermentación sumergida por *Phaffia rhodozyma*

### RESUMEN

La prohibición de algunos de los colorantes sintéticos (rojos y amarillos), ha propiciado la búsqueda de fuentes naturales, lo cual ha llevado a pensar en los sistemas microbianos como una alternativa de producción.

El objetivo del presente trabajo fue establecer las mejores condiciones para la producción de astaxantina mediante la optimización del medio de cultivo.

Para este trabajo se utilizó una cepa de *Phaffia rhodozyma* (NRRL Y 10922). Para la optimización se tomó como base el medio reportado por Johnson y Lewis (1979), con la siguiente composición (glucosa 15 g/l, extracto de levadura 2 g/l, sulfato de amonio 2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l). La pureza de los reactivos fue sustituida por grado industrial y agua de la llave. Experimentos previos a la optimización, permitieron seleccionar la sacarosa (15 g/l) y extracto de levadura (2 g/l) como las mejores fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, obteniendo una producción volumétrica de 2.1 µg/ml.

Las sales (CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>) se eliminaron del medio después de una evaluación preliminar a la optimización, quedando el medio únicamente con cuatro nutrientes.

Los criterios para la optimización fueron la producción volumétrica obtenida a las 48 h de producción (tiempo de máxima productividad en el medio base).

La optimización se realizó en tres etapas, la primera permitió seleccionar los factores significativamente predictores y las dos últimas para ajustar las concentraciones de los nutrientes. De lo anterior se obtuvo un medio optimizado con el cual se incrementó de 4.6 la producción volumétrica de astaxantina, esto es de 0.75 µg/ml se incrementó a 3.5 µg/ml.

El medio optimizado quedó con la siguiente composición: sacarosa 5.1 g/l; extracto de levadura 0.66 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/l.

El efecto de la aireación y de la agitación sobre la producción fueron evaluadas a nivel de fermentador de 4 l resultando las mejores condiciones (2 vvm y 300-400 rpm) respectivamente; bajo estas condiciones se obtuvo una producción volumétrica de 11.3 µg/ml de carotenoides totales donde el principal pigmento producido fue la astaxantina.

# 1. INTRODUCCIÓN

Vivimos en un mundo de colores: hay color en todo lo que nos rodea, en los árboles, en el cielo, en nuestros vestidos en nuestros hogares. Cuando el color de las cosas familiares difiere de lo que esperamos, generalmente nos desconcertamos, cielos grises significa mal tiempo, ropa negra luto y colores intensos en nuestras casas, nos estimulan. El mismo criterio se aplica en los alimentos. La mayoría de estos tanto en forma natural como procesada, tienen un color característico y bien definido por lo cual se les identifica y se juzga su calidad.

El uso de colorantes no es una invención de la sociedad contemporánea, su práctica data de las primeras civilizaciones, (hace 3000 años). Inicialmente los pigmentos eran obtenidos de fuentes naturales como: extractos de plantas, vegetales, animales y minerales, que siguieron usándose hasta el descubrimiento de los colorantes sintéticos en 1856<sup>1</sup>.

Estudios realizados en los años 70's, demostraron que algunos de los colorantes sintéticos presentaban efectos cancerígenos y embriotóxicos. A partir de ello, se ha observado una tendencia a la sustitución de pigmentos sintéticos por naturales (Newsome, 1986). Dentro del grupo de pigmentos naturales, que ha adquirido mayor importancia se encuentran los carotenoides. Estos compuestos se han utilizado como alternativa para sustituir a los colorantes, rojos y amarillos, sintéticos que fueron prohibidos por la Food and Drug Administration (FDA) en los años 80's ( Tafoya y col., 1993).

Los carotenoides además de ser utilizados como aditivos para dar color a los alimentos, poseen diversas funciones en los animales y en el hombre, incluyendo su conversión a vitamina A, además de estimular la respuesta inmune, al proliferar los linfocitos T y B

---

<sup>1</sup> Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety & Nutrition and the Committee on Public Information.



umentando la actividad de los macrófagos y neutrófilos (Krinsky, 1987); otra función de relevancia médica, es la de actuar como agentes anticancerígenos, por su capacidad de capturar radicales libres, los cuales se han relacionado como causa de algunos tipos de cáncer (Santamaria y Bianchi, 1987; Krinsky, 1987).

Hasta 1971 se conocían más de 400 carotenoides diferentes los cuales se dividen estructuralmente en dos grupos: carotenos y xantofilas, donde el  $\beta$ -caroteno es el principal caroteno y entre las principales xantofilas están la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Britton y Goodwin 1971). De estas xantofilas la astaxantina es un pigmento utilizado ampliamente en la industria de la acuicultura para pigmentar al salmón y trucha ya que proporciona a su carne el color rosa anaranjado característico. La carne de estas especies producidas en cautiverio es blanca, pero puede adquirir su color normal cuando el pez es alimentado con una fuente del pigmento. La producción de salmón en granjas acuícolas ha tenido un incremento sustancial en la década de los 80's, lo cual ha creado una necesidad por astaxantina (An y col., 1991).

En la actualidad la principal fuente para pigmentar al salmón es la astaxantina de origen sintético pero su uso, no ha sido aprobada por la FDA (Lewis y col., 1990). (Sin embargo se espera que a finales de 1994, sea incluida en el código federal de regulación para uso en alimentos). Para la producción de astaxantina natural se ha propuesto el uso de fuentes como: los crustáceos, el alga *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Phaffia rhodozyma*. (Johnson y col., 1991a). Cada fuente natural de astaxantina tiene sus limitaciones y ellas no compiten económicamente con el de origen sintético. No obstante los consumidores prefieren los pigmentos naturales por no estar sujetos a las restricciones que impone la FDA a los colorantes sintéticos, cuestionando su seguridad para ser utilizados como aditivos en alimentos y su menor absorción. (Soon y col., 1992).

Considerando lo anterior, además del costo de producción de la fuente sintética; el aumento por la demanda de este pigmento así como los bajos rendimientos obtenidos del exoesqueleto de crustáceos y los problemas técnicos que este proceso representa; se ha

propiciado el desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando microorganismos. Se ha visto promisorio la producción de astaxantina con *P. rhodozyma* como alternativas a las otras fuentes de obtención. Este microorganismo presenta las siguientes ventajas: a) produce como principal carotenoide la astaxantina; b) tiene un metabolismo heterotrófico; c) a nivel de fermentador produce una alta densidad de células, (Meyer y Du Preez, 1994). Sin embargo la producción de astaxantina en la cepa silvestre es muy baja (de 200 a 300  $\mu\text{g/g}$  levadura (0.02 a 0.03%) (Johnson y col., 1991b); requiriéndose por ello trabajar en el mejoramiento genético del microorganismo y en la optimización del medio de cultivo para incrementar la producción.

Este trabajo pretende encontrar las mejores condiciones de producción del pigmento astaxantina a través de establecer y optimizar, mediante el uso de un método estadístico, un medio de cultivo grado industrial, que permita aumentar la producción de astaxantina y disminuir los costos de producción.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 DEFINICIÓN Y PROPIEDADES QUÍMICAS

La astaxantina (3,3 -dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4-diona), es un oxicarotenoide y pertenece al grupo de las xantofilas. Al igual que otros carotenoides, este pigmento está formado por ocho unidades de isopreno que por condensación dan estructuras carbonadas de cuarenta átomos, llamados tetraterpenos (figura 1). La fórmula molecular de este carotenoide es  $C_{24}H_{30}O_7$  y posee un peso molecular de 596.86; este pigmento fue identificado químicamente por Kuhn y Sorensen, (Kurt, 1990) y presenta forma de cristales de color violeta oscuro, su punto de fusión es aproximadamente de 224°C. Es insoluble en soluciones acuosas, pero soluble en diclorometano (30 g/l), en cloroformo (10 g/l), acetona (0.2 g/l), dimetilsulfoxido (0.5 g/l) y otros solventes polares. Su espectro de absorción representa una estructura depolieneo conjugado, con las siguientes longitudes de onda máxima: 489 nm en cloroformo, 480 nm en acetona y 478 nm en etanol; al igual que otros carotenoides es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis; en condiciones de saponificación sufre una conversión a astaceno (figura 1.a). La astaxantina presenta 2 carbonos asimétricos en la posición 3 y 3' y puede existir en cuatro configuraciones, incluyendo los enantiómeros idénticos (3S,3'S;3R,3'R) y formas meso (3R,3'S;3'R,3S) figura 2 (Muller y col., 1980).

El isómero configuracional 3S, 3'S, se encuentra presente en los huevos de langosta (*Homarus gammarus*), al igual que en la microalga *H. pluvialis*. El isómero configuracional 3R, 3'R se encuentra en un 92% en *P. rhodozyma*, hecho que causó controversia y frenó el desarrollo comercial de la producción, de astaxantina utilizando como fuente natural a *P. rhodozyma*, por las restricciones que pudiera imponer la FDA (al considerar que el isómero 3R, 3'R, no se encontrara en la naturaleza y fuera prohibido el uso de astaxantina como aditivo para alimento de peces). Estudios posteriores demostraron que los isómeros meso y

sus enantiómeros se encuentran en huevos de langosta, camarón, salmón, zooplancton y en el crill del Atlántico y que no tiene relevancia biológica para el salmón, el isómero de astaxantina que ingiera (Johnson y col., 1991b).

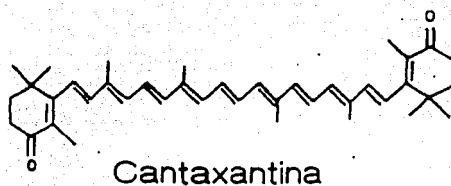
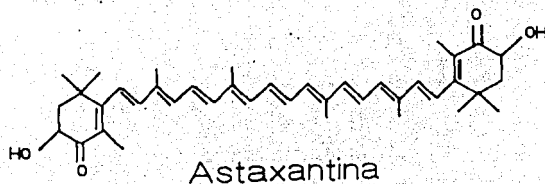


Figura 1 . Estructura química de la astaxantina y de la cantaxantina, carotenoides usados en la acuicultura.

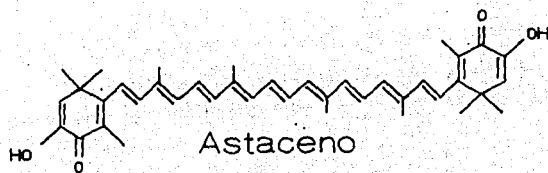


Figura 1a. Estructura química del astaceno

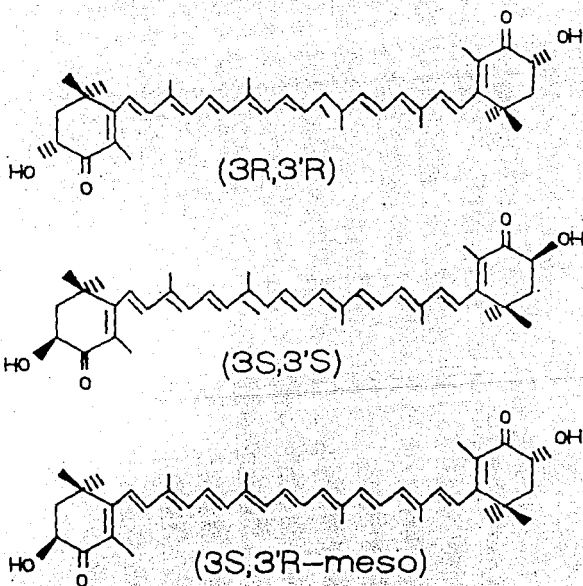


Figura 2. Estructura química de isómeros configuracionales de la astaxantina.

## 2.2 FUENTES DE ASTAXANTINA

### SINTÉTICA

Hoffman -La Roche, (Basel, Suiza), desarrollo varios procesos para la síntesis de carotenoides. En 1964 introdujo cantaxantina como pigmento en alimentos ("Carophyll red") (Johnson y col., 1991 b). Esta fue utilizada con éxito en acuicultura hasta la aparición de la trans astaxantina, recientemente lanzada al mercado por Roche la cual comercialmente recibe el nombre de "Carophyll pink". La astaxantina sintética es la fuente principal, usada para pigmentar al salmón, esta es preferida por los productores de salmón sobre la cantaxantina porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados; este pigmento sintético tiene un costo de 250 dólares por kg, en base a peso seco. El contenido del principio activo es de 8% de astaxantina, y la cantidad de isómero cis no excede el 2%; esta formulación tiene como excipientes gelatina, sacarosa, almidón, ascorbilpalmitato y etoxiquín como anti-oxidante. El procedimiento comercial usado para la síntesis química de astaxantina no es del dominio público y por ello no es factible estimar los costos de manufactura (Johnson y col., 1991b).

Tabla 1.

### CRUSTÁCEOS

Los crustáceos y su caparazón son otra fuente natural de astaxantina que han sido utilizados como alternativa para la pigmentación del salmón en granjas acuícolas (Johnson y col., 1990). Los niveles de carotenoides extraídos son bajos (0 a 200 mg/Kg) y para obtener una pigmentación satisfactoria se requiere la adición del 10 al 25 % de peso en proporción al total de la ración del alimento formulado. Sin embargo, esta fuente contiene altos niveles de cenizas, de quitina y humedad, lo cual ocasiona un problema técnico en la formulación y en la elaboración del alimento. Además el bajo contenido de nutrientes y proteínas no lo hace útil como suplemento en el alimento para peces (Johnson y col., 1980). Otra

desventaja se presenta en los costos de la extracción, la cual puede fluctuar entre \$ 5000 a \$ 15000 dólares por kilogramo, lo cual limita su uso. (Johnson y col., 1991b).

## MICROBIANAS

1. Levadura. *P. rhodozyma* es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycotina del orden de Blastomycetes, fue aislada en los años 70's por Herman Phaff, Martin Miller y Minoru Yoneyama de residuos de árboles caídos en tres regiones en Japón, Alaska y en la USSR (Johnson y col., 1991b).

Andrewes y col., (1976), reportaron que el contenido de astaxantina en esta levadura es del 85% del total de carotenoides presentes. Sin embargo, esta proporción puede variar dependiendo de la cepa y del medio de cultivo en una proporción del 40 al 95 %. La astaxantina producida por la levadura se encuentra en forma libre y además ésta puede sintetizar en bajas concentraciones otros carotenoides. La astaxantina obtenida de *P. rhodozyma* fue probada en dietas para trucha arcoiris, observándose que este pigmento se deposita eficientemente cuando la levadura es adicionada previa ruptura celular. Es decir, al suministrarla integra el pigmento no está disponible y por lo tanto no hay pigmentación. (Johnson y col., 1980).

2. Algas. Ciertas algas verdes del subphylum Chlorophyceae, contienen astaxantina como su principal carotenoide, por su parte *H. pluvialis* produce de 0.5 a 2% de astaxantina en peso seco, donde el 87% del pigmento se encuentra en forma de éster (Yobayashi y col., 1991). Otros autores reportan que la presencia de formas esterificadas de astaxantina puede afectar el depósito y metabolismo de los mismos en el salmón, pero este efecto no ha sido confirmado por otros autores. Otro factor limitante que se presenta es la extracción del pigmento y los requerimientos de luz para crecer lo cual aumenta los costos de producción (Johnson y col., 1991b). Por lo anterior esta fuente no puede competir con la astaxantina sintética.

TABLA 1. FUENTES DE ASTAXANTINA

ORIGEN	REFERENCIA
<i>Haematococcus pluvialis</i> (alga)	Vandamme, 1992
<i>Phaffia rhodozyma</i> (hongo)	Jhonson y col., 1977
Crustáceos	Nelis y De Leenher, 1991
<i>Adonis annua</i> (flor)	Nelis De Leenher, 1991
<i>Brevibacterium</i> 103 (bacteria)	Nelis De Leenher, 1991
<i>Mycobacterium lacticola</i> (bacteria)	Nelis De Leenher, 1991
Síntesis química	Haard, 1988

### 3 BIOSÍNTESIS

Astaxantina es un terpenoide producido a partir de la vía del mevalonato (figura 3). El mevalonato es formado a partir de acetil coenzima A y cetoacetil CoA por medio de la hidroximetilglutaril Co A sintetasa y reductasa (HMGS y HMGR). La vía del mevalonato se encuentra regulada para proveer las cantidades necesarias de isoprenoides y para evitar



una acumulación de intermediarios. Debido a la importancia del colesterol en la salud humana, ha sido muy estudiada esta vía en animales superiores. La regulación a este nivel incluye: a) regulación por feedback por receptores de lipoproteínas de baja densidad, b) una represión mediada por esterol y que afecta a los genes de HMG-CoA sintetasa y reductasa (HMGS y HMGR) y c) regulación postranscripcional de HMGR. La regulación en animales ocurre primariamente en los primeros pasos que controlan la formación del mevalonato. Cuando la célula crece limitada de mevalonato, esta utiliza con alta eficiencia vías que no son la del colesterol. La regulación del mevalonato en hongos y plantas es poco comprendida. En *Saccharomyces cerevisiae* la regulación solo ocurre en las primeras enzimas de la vía, principalmente en HMGR. Estudios realizados en hongos demuestran que al proveer de mevalonato se incrementa la carotenogénesis (Boll y col., 1975).

El mevalonato sufre reacciones de fosforilación para formar el isopentil pirofosfato el cual se condensa con una molécula de dimetilalil-pirofosfato para dar el geranil - pirofosfato. Con sucesivas adiciones de moléculas de isopentil-pirofosfato para dar origen a farnesil-pirofosfato. Este último sufre una segunda adición de isopentil-pirofosfato para formar geranil-geranil pirofosfato, molécula que al condensarse forma fitoeno. El fitoeno sufre una serie de ciclizaciones y desaturaciones que dan origen al  $\beta$ -Caroteno (Goodwin, 1971).

La síntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno propuesta por Andrewes (1976), en *P. rhodozyma* se muestra en la figura 4, en ella se aprecia que el  $\beta$ -caroteno es convertido a equinona directamente, el paso de hidroxiequinona a foenicoxantina supone la presencia de cantaxantina como intermediario pero este paso es muy rápido por lo que no se puede detectar a esta última por cromatografía (Andrewes, 1976). Sin embargo, en los estudios realizados por An y col., (1991), detectaron toruleno y 3,3-dihidroxi- $\beta$ -caroteno -4,4-diona en mutantes de la cepa 67-385 por lo que se propuso una vía de síntesis alternativa (figura 4). En otros microorganismos como en *H. livialis* la vía de síntesis de astaxantina es diferente, debido a la presencia de  $\beta$ -caroteno y de luteína en la fase fotosintética del microorganismo (Johnson y col., 1991b).

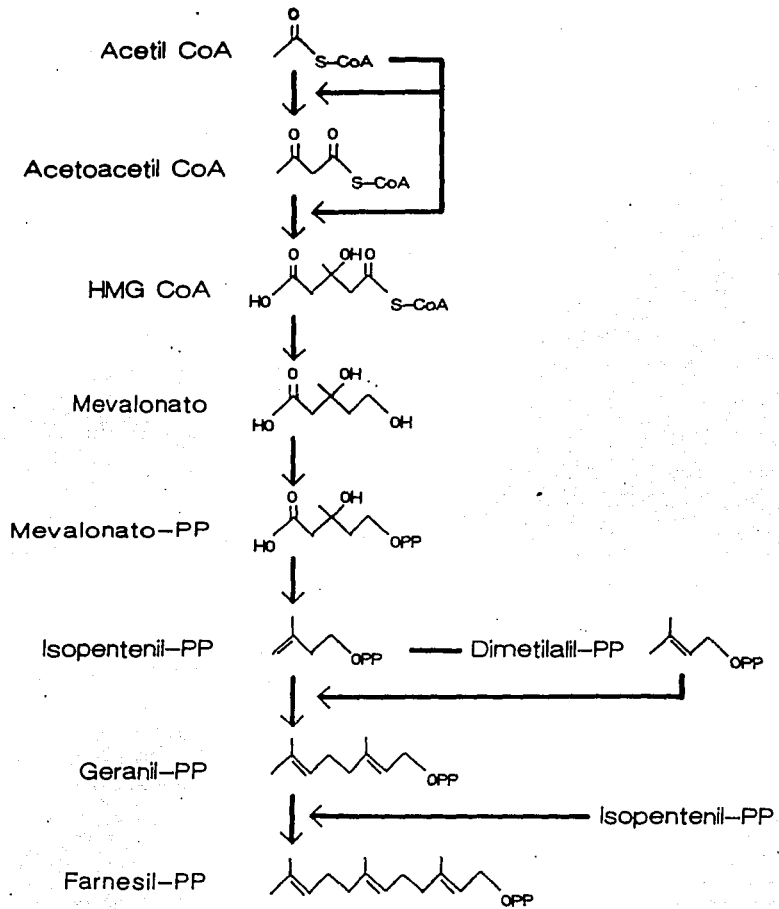


Figura 3. Pasos involucrados en la síntesis de farnesilpirofosfato, intermediario de la vía de producción de astaxantina. Co: Coenzima A, HMG; HMG; Hidroximetilglutaril CoA; PP: Pirofosfato.

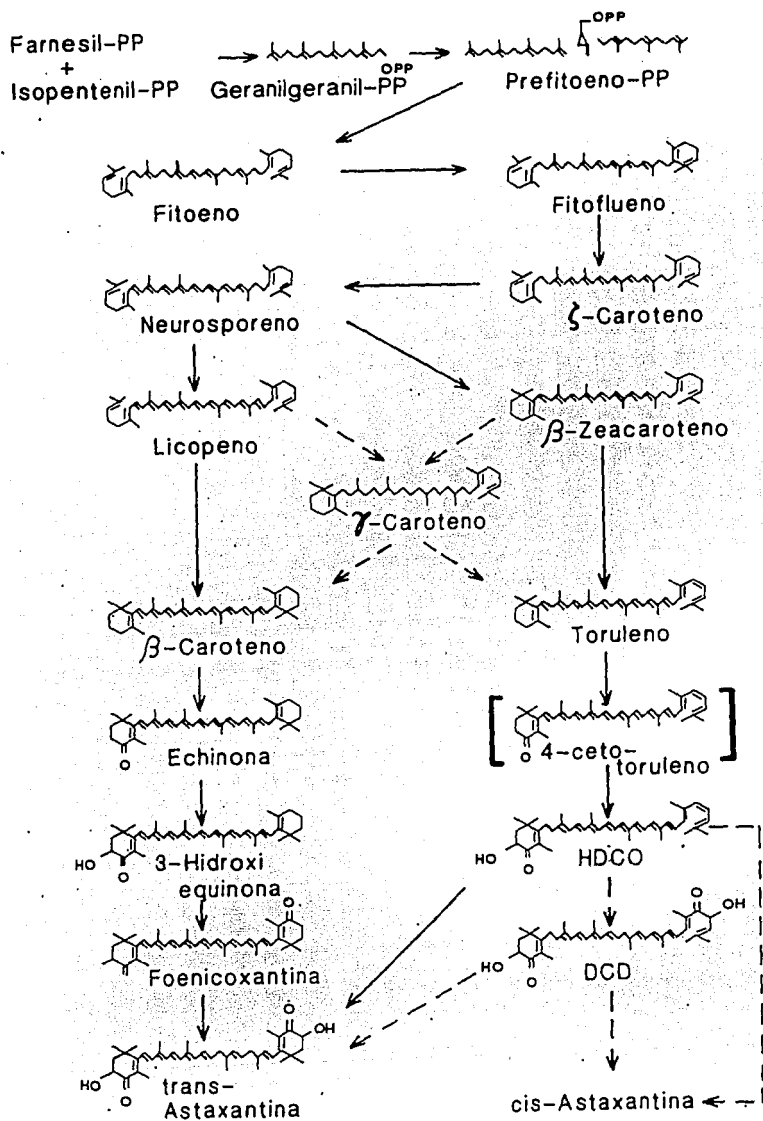


Figura 4. Vía de síntesis de astaxantina propuesta para *P. rhodozyma*. La vía vertical de la izquierda que va de fitoeno a trans astaxantina fue propuesta por Andrewes (1976). La vía vertical de la derecha fue propuesta por An (1991). HDCO: 3-hidroxi -3', 4' - didehidro - $\beta$ , $\Psi$  ,caroteno 4-ona. DCD: 3, 3'-dihidroxi- $\beta$ -, $\gamma$ -caroteno -4,-4'-diona.

astaxantina observada con glucosa (4%) no se registró para sacarosa o para las melazas (Haard, 1988).

Por lo que trata a la fuente de nitrógeno, se ha observado que el extracto de levadura estimuló la producción de carotenoides en *P. blakesleeanus* crecido en presencia de acetato; este efecto no se observó al utilizar glucosa (Rosas, 1993).

El efecto de ciertos aminoácidos como valina y leucina, es estimulador debido a su conversión a  $\beta$ -hidroxi-metilglutaril-CoA, este efecto ha sido estudiado en *P. blakesleeanus* (Johnson y col., 1991b).

En *B. trispora* la glicina estimula la producción de carotenoides (Schwartz, 1989).

En *H. pluvialis* la limitación de nitrógeno favorece la acumulación de astaxantina, por otra parte la presencia de acetato y glicina estimulan esta síntesis, la relación carbono, nitrógeno es muy importante para la producción del pigmento (Kobayashi y col., 1991).

En *P. rhodozyma* si bien no se ha demostrado que la limitación de nitrógeno tenga algún efecto en la producción de astaxantina, en mutantes sobreproductoras del pigmento, la asimilación de nitrógeno es lenta. (An y col., 1991). Estudios realizados por Miller (1984), señalan que esta levadura puede utilizar diversas fuentes de nitrógeno incluyendo la urea, mientras que la etilamina y el nitrato de potasio no pueden ser asimilados. Por otra parte cuando se incrementó la concentración de sulfato de amonio de 0.5 a 5.0 mg/l la producción de astaxantina no se afectó. Sin embargo, cuando se incrementó la concentración de extracto de levadura de 0.1 a 10 mg/ml, se presentó un aumento importante sobre la producción específica de astaxantina (de 156 a 524  $\mu\text{g/g}$  levadura) (Johnson y col., 1979).

## 2.5 USOS Y FUNCIÓN DE ASTAXANTINA

Debido a la importancia comercial del color en la industria avícola y piscícola, se han realizado muchas investigaciones en el uso de carotenoides sintéticos y naturales como fuente de pigmento. Las xantofilas que han adquirido mayor relevancia como aditivo en la industria de alimentos balanceados para aves, son: la capsantina que se encuentra como principal pigmento del pimiento rojo, zeaxantina y luteína que se encuentran en la flor de cempasúchil (*Tzompa xochitl*) (Cerdá-Olmedo, 1985). Sin embargo en la práctica se ha observado que los pigmentos rojos tienen mayor capacidad pigmentante y que pueden ser combinados con pigmentos amarillos, lo cual le da un atractivo color a la yema de huevo, por ejemplo 1 mg de astaxantina puede sustituir a 30 mg de luteína; este uso potencial de la astaxantina representa una ventaja económica para la industria avícola, por la disminución de pigmento que requiere ser utilizado (Nelson y Baptist, 1968).

En la industria acuícola las principales xantofilas utilizadas son: la cantaxantina y la astaxantina. La astaxantina es un importante constituyente de los alimentos para peces, debido a que el salmón y otros animales marinos no pueden sintetizarlo, de novo, por lo que se requiere incluirse en las dietas, la concentración de astaxantina en el salmón va de 3 - 37 mg/Kg; pero su importancia como aditivo radica en proporcionar la pigmentación característica a la carne y a la piel de peces e intervenir en el proceso de la reproducción de estos, participando como agente protector de factores fisicoquímicos, durante el desarrollo embrionario. Otra función importante es la de actuar como precursor de las vitaminas A1 y A2 en dietas carentes de vitamina A. Existen estudios donde se relaciona a la astaxantina con el sabor característico del salmón, cuando este es cocinado (An y col., 1991).

La astaxantina al igual que otros carotenoides tienen un uso potencial como colorantes en cosmetología, pero su inestabilidad frente a factores físicos como la luz y el oxígeno limitan su aplicación en esta área (Katsuyama y col., 1993).

## 2.6 DEMANDA

Según datos estadísticos, publicados en 1990 se calcula que del 10 al 15 % de los alimentos marinos consumidos en el mundo, están representados por los peces. Estos son cultivados en granjas y dentro de los principales productos se encuentra el salmón, calculándose que por cada 10 salmones consumidos en el mundo, 3 provienen de granjas acuícolas (Johnson y col., 1991b).

En Europa especies como el salmón y la trucha juegan un importante papel en la acuicultura. El cultivo de salmón se incremento considerablemente en la década pasada. Solamente en Noruega, Escocia e Islandia en 1986, se produjeron 58,000 toneladas, duplicándose la producción en 1988. Según estudios se espera para el año 2000 la demanda de salmón del Atlántico, coho y chinook, sea cubierta por las granjas acuícolas. Los países que pueden surgir como principales productores para el salmón del pacifico son: Japón, Chile y Canadá. Para el año 2000 se pronostica una producción de salmón de 460,000 toneladas (figura. 5). (Johnson y col., 1991b).

Los productores de salmón utilizan astaxantina y cantaxantina sintética como aditivo en niveles que van de 35 a 75 mg/Kg de alimento; lo cual ocasiona que este aditivo constituya el componente más costoso en la formulación del alimento para salmón

ya que representa del 10 a 15 % del costo total. No obstante, la astaxantina sigue siendo el pigmento preferido, en la acuicultura por encontrarse en forma natural en el salmón y la trucha y depositarse más eficientemente que otras xantofilas (Johnson y col., 1991a).

De forma paralela se ha observado un incremento en la demanda por astaxantina, ya que en 1986 se requirieron más de 6000 Kg de pigmento y para 1990 se pronosticó una demanda mayor a 15,000 Kg (figura 5), lo cual indica un incremento de 2.5 veces en 4 años; el mercado por astaxantina se calculó en más de 100 millones de dólares y esta ha sido cubierto en mayor proporción por la compañía Roche. Esta demanda potencial abre una

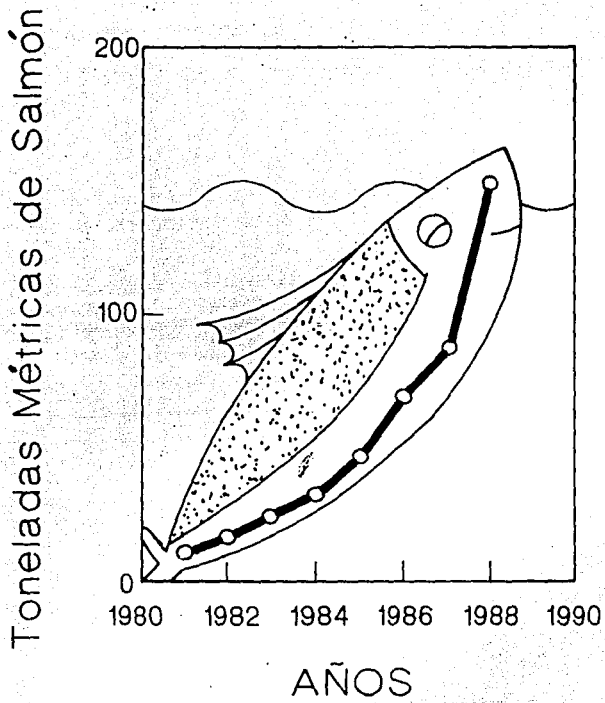


FIGURA 5. Producción de salmón, 1981/1988

gran expectativa de mercado para la producción microbiana de astaxantina. (An y col., 1991; Johnson y col., 1991a)

## 2.7 PRODUCCIÓN FERMENTATIVA

La astaxantina es un pigmento producido por fermentación sumergida por la levadura *P. rhodozyma*. A partir del descubrimiento de su producción en esta levadura se han realizado varios estudios para caracterizar cuales son los parámetros que afectan su síntesis del pigmento. (Johnson y Lewis., 1979). Siendo resultado de ello, se ha determinado la importancia de la temperatura, el pH, el nivel de oxigenación y los componentes del medio de cultivo.

La fermentación de astaxantina se realiza en un rango de pH inicial de 4.5 a 5, manteniéndolo con amortiguador fitalato durante la fermentación. Estudios realizados por Johnson y Lewis, (1979), en fermentador de 4 l, probando cuatro niveles de pH (6.5, 5.5, 4.5, 3.5), demostraron que a 4.5, la velocidad de crecimiento aumentó al igual que la producción de biomasa y el principal pigmento sintetizado fue la astaxantina. En contraste, a un pH de 3.5 se acumuló principalmente  $\beta$ -Zeacaroteno.

La temperatura óptima para la producción de astaxantina es de 22 °C, por arriba de esta temperatura la velocidad de crecimiento y producción disminuye, mientras que el contenido de carotenoides se mantiene estable en un rango de temperatura de 15 a 22 °C. Estudios realizados en otros microorganismos como *Rhodotorula* señalan que a bajas temperaturas (5°C) se acumulan carotenos, mientras a temperaturas de 25 °C, los carotenoides producidos son toruleno y torulorodina. (Meyer y Du Preez, 1994).

Otros estudios realizados por Johnson y Lewis (1979), han demostrado que cuando se mantienen los niveles de oxígeno por abajo de 30 mmol O<sub>2</sub>/h, la producción de astaxantina disminuye, y se acumulan  $\beta$ -caroteno y precursores del pigmento menos polares.

Los niveles de producción de astaxantina obtenidos por diferentes cepas de *P. rhodozyma* son muy variados, dependiendo de las condiciones de cultivo y de los medios utilizados. En



la tabla 2 se resumen: las cepas, las fuentes de carbono, de nitrógeno y los tiempos de máxima producción. Los niveles de producción más bajos fueron de 150  $\mu\text{g/g}$  de levadura en 5 días de fermentación (Evans y col., 1991) y los más altos de 8004  $\mu\text{g/g}$  de levadura en este mismo tiempo los cuales fueron obtenidos con una cepa mejorada genéticamente según reporta una patente europea (Prevatt y col., 1991).

También en la tabla 2 puede apreciarse que las principales fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, sacarosa y melazas, como fuente de nitrógeno el sulfato de amonio en combinación con el extracto de levadura o aminoácidos.

**TABLA 2. NIVELES MÁXIMOS DE PRODUCCIÓN DE  
ASTAXANTINA Y CAROTENOIDES TOTALES PRODUCIDOS POR  
DIFERENTES CEPAS DE *P. RHODOZYMA***

Cepa	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Carotenoides totales ( $\mu$ g/ml)	Carotenoides totales ( $\mu$ g/g lev)	Tiempo de máxima producción horas	Astaxantina ( $\mu$ g/ml)	Astaxantina ( $\mu$ g/g lev)	Origen	Referencia
CBS 225-87	Melaza	Sulfato de amonio	36.6	1490	80	23.6	960	Danisco Bioteknologi	Fleno y col., 1988 (Patente)
	Glucosa	Extracto de levadura	9.52	1340	120	6.2	880		
* QST 11032	Glucosa	Peptona	NR	1375 $\nabla$	120	NR	1100	Quest International	Chapman y col., 1991 (Patente)
N9 *	Jugo de uva	Extracto de levadura y peptona	15.9	2120	120	9.8	1350	Universidad de Sudafrica	Meyer y Du Preez., 1993 a
J4-3 *	Sacarosa	Sulfato de amonio y extracto de levadura	16.6	1153	96	12.96 $\nabla$	900	Universidad de Sudafrica	Meyer y Du Preez., 1993
J4-3	Glucosa	Sulfato de amonio y extracto de levadura	14.9	981	96	11.83 $\nabla$	776	Universidad de Sudafrica	Meyer y Du Preez., 1993
UCD 67-210	Melaza	Peptona, sulfato de amonio y aminoácidos	15.3	1086	120	12.24 $\nabla$	8688 $\nabla$	Universidad de Davis, Cal.	Haard, 1988
ant-1-4 *	Glucosa	Extracto de levadura y aminoácidos	NR	1050	120	NR	840 $\nabla$	Universidad de Wisconsin	An y col., 1983
67-210	Sacarosa	Sulfato de amonio y aminoácidos	1.4	NR	120	NR	1.12 $\nabla$	Universidad de Davis, Cal.	Okagbue y Lewis, 1983
67-210	Glucosa	Extracto de levadura y sulfato de amonio	3.2	450	128 h	2.88 $\nabla$	406	Universidad de Davis, Cal.	Johnson y Lewis., 1979
NCHU FS301*	Glucosa	Extracto de levadura y Peptona	7.8	1633	72 h	6.2 $\nabla$	1306.4 $\nabla$	Universidad de Taiwan	Fang y Cheng., 1993
ENZA E4	Sacarosa	Extracto de levadura, sulfato de amonio y peptona	5.25 $\nabla$	2625 $\nabla$	160 h	4.2	2100 $\nabla$	Enzymatix LTD.	Evans y col., 1990 (Patente)
* PC 8107	NR	Sulfato de amonio y extracto de levadura	NR	10005 $\nabla$	NR	NR	8004	Phillips Petroleum Company	Prevatt y col., 1991 (Patente)

NR: NO REPORTADO

\* : SON CEPAS OBTENIDAS POR MEJORAMIENTO GENÉTICO.

$\nabla$  VALORES APROXIMADOS DE ACUERDO AL 80% DE ASTAXANTINA .

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Encontrar las mejores condiciones de producción del pigmento astaxantina en una cepa de *Phaffia rodozyma*, a través de la implementación y optimización de un medio de cultivo grado industrial.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

- A. Determinar la cinéticas de crecimiento del microorganismo y la cinética de producción de carotenoides totales, en el medio y las condiciones reportadas por Johnson y Lewis (1979); con reactivos grado industrial.
- B. Identificar la astaxantina por cromatografía en capa fina y cuantificarla por cromatografía de líquidos de alta resolución, estableciendo la proporción en la que se encuentra con respecto a los pigmentos presentes.
- C. Modificar el medio de cultivo seleccionado, respecto a la fuente de carbono y nitrógeno.
- D. Optimizar los nutrientes del medio de cultivo, por un método estadístico.
- E. Optimizar las condiciones de producción: pH, temperatura y agitación.
- F. Verificar el perfil de carotenoides producidos en el medio, en condiciones optimizadas empleando un sistema de cromatografía en placa fina y cuantificación en un densitómetro.

G. Realizar pruebas a nivel de fermentador de 4 l con el medio optimizado.

## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 REACTIVOS GRADO ALIMENTARIO

Sulfato de amonio, cloruro de calcio y fosfato monobásico de potasio fueron adquiridas en la droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.

Extracto de levadura (Yestal 400), con las siguientes especificaciones: proteínas 35-45%, cloruros 5.0% máximo, peptona (peptamín C) y glucosa obsequiados por Ariancia Comercial, S. A. de C.V.

Levadura de cerveza autorizada desamargada en polvo de Pharm Yest de México, S.A., con las siguientes especificaciones: proteína de 45-55%, tiamina 120 ug/g, riboflavina 30 ug/g y ácido nicotínico 400 ug/g).

Sacarosa (azúcar de mesa) adquirida en mercados populares.

Harina de pescado obsequiada por Bionova S.A. de C.V., con las siguientes especificaciones: proteína de 82-84%, materias minerales 4-7% y 6-8 de materia mineral.

### AGUA DE LA LLAVE

De acuerdo al análisis fisicoquímico tenía un pH de 6.88 a 7.0. La dureza total y permanente, medida como  $\text{CaCO}_3$ , fue de 130 ppm y 23 ppm, respectivamente. Las sales encontradas fueron: bicarbonatos de calcio y magnesio, sulfatos de magnesio y sodio, y cloruro de calcio (Saval, 1992).

## 4.2 MICROORGANISMO

En la producción de astaxantina por fermentación sumergida se empleó una cepa de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y- 10922, la cual fue proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL., 61604 USA.

## 4.3 MEDIOS DE CULTIVO

### MEDIO DE CONSERVACIÓN

La cepa fue preservada a -20°C en tubos de tapón de rosca con medio que contenía: peptona 0.5%; extracto de levadura 0.3%; extracto de malta 0.3%; glicerol 60% (V/V) y disueltos en agua destilada (Difco, 1966). El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min.

### MEDIO DE PROPAGACIÓN

Con este fin se prepararon cajas con medio de cultivo YM-agar en la siguiente formulación: extracto de levadura 0.3%; extracto de malta 0.3%; peptona 0.5%; glucosa 1% y agar 2% disueltos en agua destilada. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min.

### MEDIO DE PRODUCCIÓN

El medio base contenía: glucosa 1.5%; extracto de levadura 0.2%; sulfato de amonio 0.2%; fosfato monobásico de potasio 0.1%; cloruro de calcio 0.01%; sulfato de magnesio 0.05%; (Jonhson y Lewis, 1979). el pH se ajustó a 4.5 con ácido ftálico 0.1 M. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min. Los reactivos de este medio fueron grado industrial y agua de la llave.

#### 4.4 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo se obtuvo del raspado de colonias de *P. rhodozyma* de cajas de Petri, crecidas durante 5 días sobre el medio YM - agar a 22°C. La biomasa fue resuspendida en agua destilada, obteniéndose una suspensión de células, con una DO de 2.5 (A<sub>540</sub>), la cual fue utilizada para inocular los matraces de la fermentación y el fermentador de 4l.

#### 4.5 FERMENTACIÓN

##### 4.5.1 A NIVEL DE MATRAZ DE 500 ml

Las fermentaciones se realizaron en matraces de 500 ml con deflectores. Los volúmenes de medio de cultivo fueron de 50 ml (al inicio del trabajo y durante la optimización) y de 75 ml (en los experimentos de temperatura, pH), la temperatura de incubación fue de 22°C. En los experimentos donde se evaluó el efecto de la temperatura, se emplearon además 25 y 29°C. Los matraces fueron inoculados al 1% V/V de una suspensión de células con una DO de 2.5, el cual fue constante durante el desarrollo del trabajo. Los matraces fueron colocados en una agitadora orbital Gallenkamp a 170 rpm. El tiempo de fermentación varió entre 48 h (en los experimentos de la evaluación de la mejor fuente de carbono y nitrógeno y durante la optimización del medio), 72 h (tiempo en el que también se evaluaron las fuentes de carbono y nitrógeno, además de la temperatura y pH) y 120 h (cuando se monitoreó toda la fermentación).

##### 4.5.2 FERMENTADOR DE 4 l

En esta fase, las fermentaciones se realizaron en un fermentador New Brunswick Scientific con control de temperatura, agitación, aireación y control automático de pH. Para estos experimentos se utilizó un volumen de trabajo de 3 l, el medio de cultivo se esterilizó a 121 °C durante 20 min y la fuente de carbono fue esterilizada por separado. Las condiciones de operación fueron las siguientes: El fermentador fue inoculado de igual forma que las

fermentaciones a nivel de matraz, el pH inicial fue de 5.0 ajustado con pftalato de sodio. La agitación utilizada en el primer experimento de esta fase fue de 300 rpm la cual fue constante durante toda la fermentación, para el segundo experimento la agitación inicial fue de 300 y fue variándose de acuerdo a la demanda de oxígeno hasta 500 rpm, para los dos experimentos siguientes se utilizó una agitación inicial de 300 rpm y a las 48 h de fermentación se aumentó a 400 rpm. El tiempo total de fermentación fue de 120 h para todos los experimentos.

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La biomasa de cada muestra fue lavada dos veces por centrifugación durante cinco minutos a 4000 rpm. en una centrifuga clínica, y resuspendida en una solución de cloruro de sodio al 0.85% para llevarla al volumen original. Posteriormente se determinó la densidad óptica del cultivo a 540 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo spectronic 21, y se correlacionó con una curva de densidad óptica vs peso seco expresado en mg/ml, la cual se muestra en la (figura 6).

#### 4.7 DETERMINACIÓN DEL PIGMENTO

##### 4.7.1 EXTRACCIÓN

La extracción del pigmento se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Britton (1985) realizando las siguientes adaptaciones: A un ml de muestra (medio de cultivo con células) se les sometió a rompimiento empleando un homogenizador (vortex) y perlas de vidrio de 0.45 - 0.50 mm durante 3 minutos, en una mezcla de solventes (hexano:acetona:alcohol etílico) (100:70:70). Posteriormente se realizó una segunda extracción hasta obtener un precipitado color blanco. La separación de las fases se efectuó por centrifugación durante 5 min. a 5000 rpm; quedando en la epifase de hexano la astaxantina disuelta, la cual fue recuperada con una pipeta Pasteur. El volumen total del

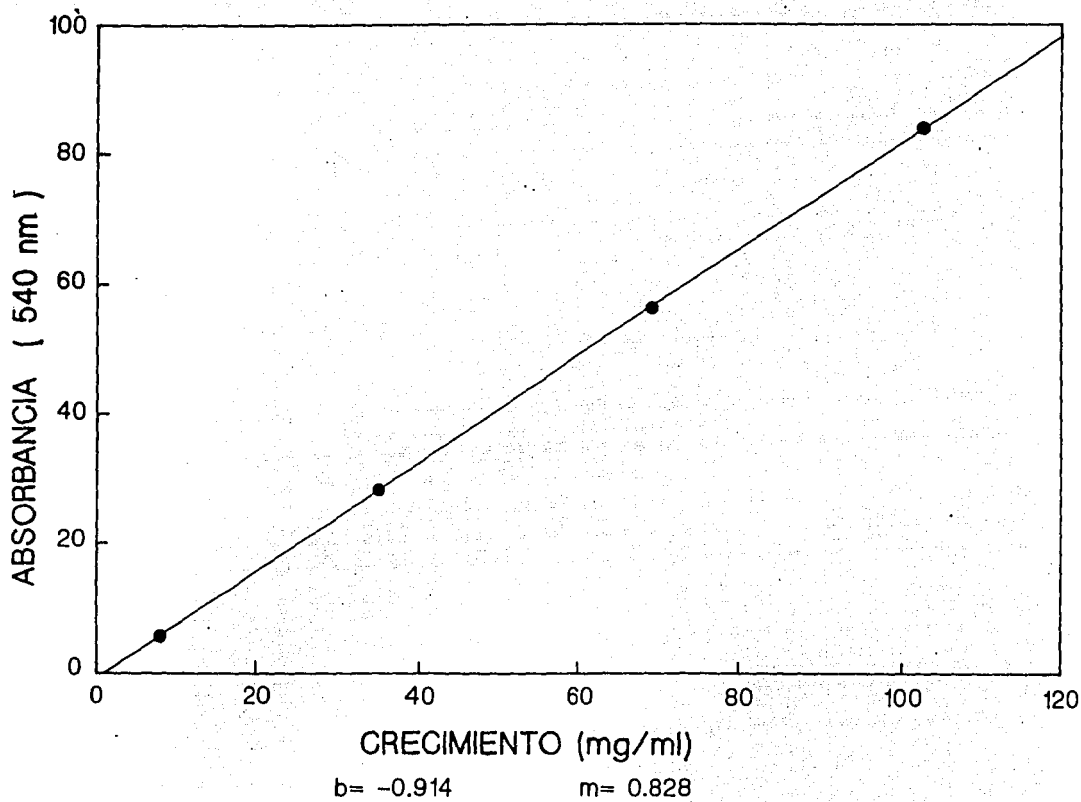


Figura 6. Curva de calibración para la determinación del crecimiento celular por peso seco.



extracto fue medido y se procedió a su cuantificación como se menciona en el texto más adelante.

Durante el proceso de extracción las muestras se protegieron de los factores físicos como la luz y el oxígeno.

#### 4.7.2 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

##### 4.7.2.1. Cromatografía en capa fina (Thin - Layer Chromatography, TLC).

Se realizó para la separación de astaxantina. Las cromatografías se realizaron sobre placas de sílica gel 60 (Kiesel DC - alufalien sin indicador fluorescente) de 20 x 20 cm x 0.2 mm. Se aplicaron 20 µg de extracto en hexano de las muestras a evaluar.

La elución de las muestras fue realizada en una fase móvil conteniendo éter de petróleo:acetona (80:20), en una cámara sobresaturada. Se utilizó un estándar de astaxantina proporcionado por Hoffman La Roche.

La identificación se llevó a cabo mediante la contrastación del Rf de los pigmentos obtenidos de los extractos celulares y el del estándar y la cuantificación de la astaxantina por medio de un densitómetro marca Camag tlc Scanner ii.

##### 4.6.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Esta técnica se realizó con la misma finalidad que la de TLC, contrastando el Tr de los extractos y el del estándar.

Para este ensayo se trató previamente la columna del sistema con ácido fosfórico en metanol (1g/100 ml) durante 1 h a una velocidad de flujo de 1 min. La fase móvil contenía

hexano:acetona (76:14) y como fase estacionaria se utilizó una columna de sílica 60, 5  $\mu\text{m}$ , Supelcosi TMLC-Si 250 X 5 mm (Supelco, Inc. Bellefonte, PA, USA).

Las condiciones de análisis fueron las siguientes: velocidad de flujo 1.5 ml/min, absorbancia 470 nm, el volumen de inyección fluctuó entre 10 y 80  $\mu\text{l}$ .

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo para líquidos de alta resolución Millipore con un espectrofotómetro Waters-Millipore Lambda-max Lc-481, un inyector Waters U6K, una bomba Waters-590 y un integrador Varian modelo 4400.

#### 4.7.3 CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de carotenoides totales se realizó con un espectrofotómetro, utilizando el coeficiente de absorbancia específica ( ${}^1\%E_{1\text{cm}}$ ) = coeficiente de extinción específico de astaxantina en hexano el cual es de 2100 según lo reportado por los laboratorios La Roche. La longitud de onda a la cual se leyeron las muestras fue 472 nm, por ser la astaxantina el principal componente.

El cálculo se realizó aplicando la siguiente relación matemática propuesta por Britton (1985).

$$\mu\text{g de carotenoides} = (A)(10^6)/({}^1\%E_{1\text{cm}})(100)$$

donde:

A= es la absorbancia observada.

$10^6$ = factor para expresar los carotenoides en  $\mu\text{g}$ .

${}^1\%E_{1\text{cm}}$  = coeficiente de extinción específico para astaxantina en hexano.

100 = constante para eliminar el factor de porcentaje.

#### 4.8 DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Para la cuantificación de sacarosa se utilizó la técnica de antrona (Loewus, 1952). Para el sistema de reacción se realizaron diluciones de los extractos celulares, con el fin de obtener una concentración teórica entre 1-40 µg de sacarosa. Se agregaron 100 µl de antrona y 1000 µl de ácido sulfúrico concentrado, a las muestras y después fue medida la absorbancia a 620 nm y la concentración se determinó de acuerdo a la curva patrón (figura 7).

#### 4.9 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno se determinó de acuerdo con el método de Kjeldahl (AOAC, 1970). Para la determinación se utilizaron 200 mg de muestra, las cuales se mezclaron con 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se adicionaron perlas de vidrio para controlar la ebullición, llevando a digestión completa la materia orgánica. Las muestras se dejaron enfriar y se diluyeron hasta un volumen de 350 ml con agua destilada. Posteriormente se añadieron 40 ml de una solución concentrada de hidróxido de sodio (100 g en 100 ml agua), previamente enfriado sobre hielo, haciéndola resbalar lentamente por la pared del matraz de manera que se estratifiquen las dos soluciones. Enseguida se realizó la destilación y el destilado fue recibido en 50 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.1N que previamente se le adicionó rojo de metilo como indicador, la destilación se llevó a cabo hasta tener un volumen de 250 ml. Finalmente se realizó la titulación del exceso de ácido con solución de valorada de NaOH (0.1N), hasta el viraje amarillo del indicador.

Se corrigió mediante la determinación en blanco de los reactivos usados, empleando la. Los

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(\text{ml blanco} - \text{ml problema}) N(\text{NaOH})(0.014) 100}{\text{peso de la muestra}}$$

#### 4.10 DETERMINACIÓN DEL OXÍGENO DISUELTO

La medición del oxígeno disuelto en los fermentadores se llevó a cabo con electrodos de tipo galvánico.

#### 4.11 DETERMINACIÓN DEL pH

Después de separar las células del caldo de cultivo por centrifugación, se determinó en el sobrenadante el valor del pH con un potenciómetro digital marca Beckman modelo 3500.

#### 4.12 MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para lograr tal propósito se ha planteado el uso del diseño estadístico de experimentos, el cual puede proporcionar de una manera rápida y sistematizada resultados satisfactorios en términos de producción.

Existen diferentes diseños experimentales los cuales tienen sus ventajas y desventajas sin embargo, dentro de estos, los diseños factoriales han demostrado ser de los más eficientes y sencillos. Estos diseños tienen las siguientes ventajas:

- i) Se puede trabajar con un gran número de variables y realizar pocos experimentos; a pesar de que no permiten explorar exhaustivamente una amplia región del espacio de los factores, pueden indicar tendencias y así determinar una dirección para futuros experimentos.
- ii) Son diseños de gran utilidad al principio de la investigación, cuando no se conocen las variables que tienen mayor efecto sobre el fenómeno a explicar.

iii) Con estos diseños se pueden construir otros de mayor complejidad que se ajusten a lo sofisticado que pueda resultar el problema.

iv) La interpretación de los resultados obtenidos con estos diseños, se puede realizar en base al sentido común y la aritmética elemental. (Box y col., 1989).

Los criterios para realizar la optimización de los nutrientes del medio de cultivo fueron los siguientes: primero se estableció la producción volumétrica, expresada en  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides totales como respuesta a evaluar; en segundo lugar los experimentos se realizaron a las 48 h de fermentación, por ser el tiempo de máxima productividad en el medio base; tercero, el número de repeticiones utilizado fue de tres, ya que previo a la optimización de los nutrientes del medio de cultivo, se realizó un estudio para evaluar la variabilidad en un mismo experimento y un cuarto fue que las respuestas obtenidas en cada uno de las corridas experimentales no debían de ser menores a la desviación estándar de cada una de las corridas experimentales, ya que sí fuera mayor indicaría un error de experimentación.

Para la optimización de los componentes del medio de cultivo, se realizó un diseño experimental en tres etapas: la primera con la finalidad de localizar los factores significativamente predictores, las dos siguientes para ajustar las concentraciones.

Es importante señalar que el tamaño del diseño así como la fracción a utilizar depende del número de variables a evaluar y de la disponibilidad de equipo y material.

Para el primero y segundo experimento de la optimización del medio se realizaron un diseño factorial  $2^4$ , utilizando  $\frac{1}{2}$  de la fracción para ambos casos. Lo anterior con el propósito de disminuir a la mitad el número de experimentos, lo cual dió como resultado una matriz con 8 corridas experimentales como se muestra en la tabla (tabla 3). Para el siguiente experimento se planteó un diseño factorial completo  $2^2$  la matriz aparece en la sección de resultados.

TABLA 3  
 FACTORIAL FRACCIONADO 2<sup>2</sup>

<i>Observación</i>	<i>Factor</i>			
	X1	X2	X3	X4
1	-	-	-	-
2	-	-	+	+
3	-	+	-	+
4	-	+	-	+
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	+	-	-
8	+	+	+	+

El punto de partida fue el medio modificado 2 y utilizando como punto central la concentración original; estos componentes fueron codificados de la siguiente manera: sacarosa, X1; sulfato de amonio, X2; fosfato monobásico de potasio, X3; extracto de levadura, X4.

Posteriormente se estableció, para cada variable las unidades experimentales (+ y -); lo que se entiende como variaciones hacia arriba y hacia abajo, sobre el punto central para cada factor que se decidió explorar; el tamaño de la variación se determina de acuerdo a la experiencia del investigador o bien a la información preliminar que del experimento se tenga.

Los coeficientes de contraste fueron calculados en los diseños planteados lo cual permitió la determinación del efecto de la variable a evaluar; este cálculo se determinó por la siguiente relación matemática:

$$b_j = \frac{1}{4} \sum A_j Y_i \quad (1)$$

Donde:

$b_j$  = Coeficiente de comparación

$A_j$  = Nivel del componente  $j$  (+ o -)

$Y_i$  = La producción volumétrica ( $\mu\text{g/ml}$ )

En todos los experimentos se calculó la  $Y_o$ , que es la  $Y$  promedio de las respuestas obtenidas.

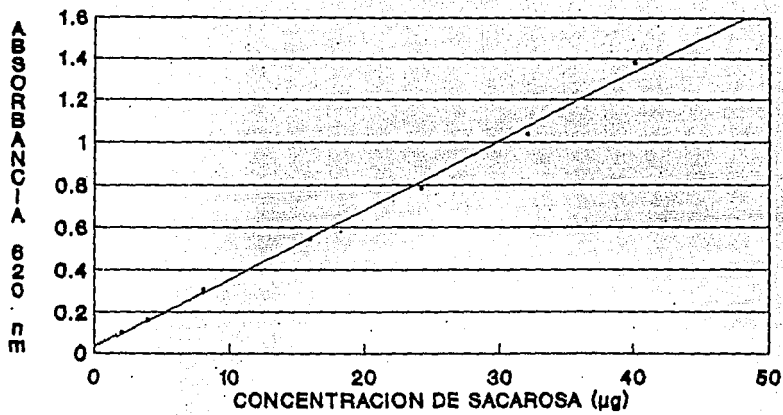


Figura 7. Curva patrón de concentración de sacarosa VS absorbancia (620 nm).  
Cuantificación colorimétrica por el método de antróna



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PIGMENTO

Con la finalidad de corroborar, si la cepa empleada es productora de astaxantina y si ésta aparecía en la proporción de 85%, como lo había reportada Andrewes y col., (1976), se llevó a cabo una fermentación en el medio y bajo las condiciones de cultivo reportadas por Johnson y Lewis, (1979) las mismas que utilizó Andrewes, (pH 4.5, 150 rpm., temperatura 22 °C), en matraces de 500 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio de cultivo y por triplicado.

El medio contenía en su formulación, glucosa como fuente de carbono y una mezcla de sulfato de amonio y extracto de levadura (Yestel 400), como fuente de nitrógeno inorgánico y orgánica respectivamente (tabla 4).

En este medio, los reactivos grado analíticos fueron sustituidos por reactivos grado industrial y agua de la llave.

Las curvas de crecimiento de *P. rhodozyma* y producción de carotenoides totales se muestra en la figura 8. Como se aprecia en el perfil de la curva de crecimiento el microorganismo alcanza su fase estacionaria a las 48 h de incubación y su máximo crecimiento fue de 5.7 mg/ml. El pH decrece de 4.5 a 2.6, para mantenerse constante durante la fase estacionaria. La producción volumétrica máxima de carotenoides totales fue de 1.20 µg/ml y se presentó a las 72 h, manteniéndose constante hasta el término de la fermentación.

La producción específica máxima de carotenoides totales fue de 210 µg/g levadura, la cual se mantuvo constante hasta las 120 h. La productividad específica máxima es de 2.9 µg/g

**TABLA 4. MEDIO DE PRODUCCIÓN CON REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL**

<i>NUTRIENTE</i>	<i>CONCENTRACION ORIGINAL (%)</i>
<i>Glucosa</i>	1.5
<i>Sulfato de amonio</i>	0.2
<i>Extracto de levadura (Yestel 400)</i>	0.2
<i>Fosfato monobásico de potasio</i>	0.1
<i>Cloruro de calcio</i>	0.01
<i>Sulfato de magnesio</i>	0.05

de levadura/h la cual se obtuvo a las 72 h de la fermentación, mientras que la productividad volumétrica fue de 0.016  $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ .

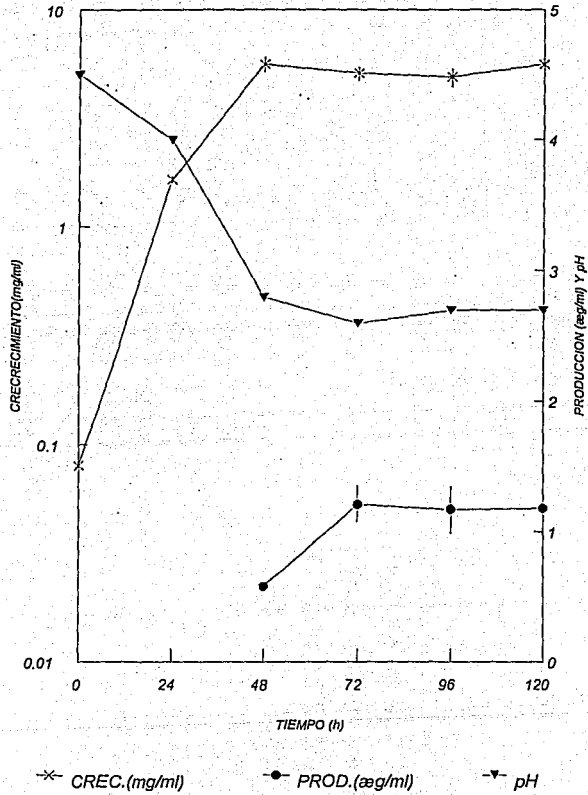


Figura 8. Crecimiento y producción de carotenoides totales de *P. rhodozyma*, en matraces de 500 ml con deflectores y 50 ml de medio de cultivo. Los matraces fueron incubados a 22 °C y 150 rpm.

La identificación del pigmento se realizó por TLC, en una fase móvil éter de petróleo:acetona (80:20), como se indicó en la sección Material y Métodos. Los resultados se muestran en la figura 9; donde en el carril número uno se aplicó el estándar de astaxantina proporcionado por La Roche, el cual presentó un Rf de 0.34, en los carriles del 2 al 5, se aplicaron muestras de extractos de la fermentación a diferentes tiempos (48, 72, 96 y 120 h), en las cuales aparece una mancha con un Rf igual al estándar y una segunda mancha muy tenue que no aparece en la foto que puede ser un intermediario menos polar de la síntesis de astaxantina.

La cuantificación de astaxantina se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), según se indica en la sección Material y Métodos. En virtud de que las muestras analizadas, provenían de caldo de fermentación de las 120 h y considerando que el perfil de carotenoides obtenidos en la cromatografía de placa fina no se altera en el transcurso de la fermentación la cuantificación se realizó únicamente en este tiempo. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la figura 10, el cromatograma A corresponde al estándar de astaxantina, en el cual aparecen 5 picos que presentan los siguientes tiempos de retención: 5.25 min el astaceno, a los 5.84 min el semiastaceno, la trans astaxantina aparece en un tiempo de 7.48 min y el isómero cis astaxantina a los 8.98 min, el cual es un producto de degradación de la trans astaxantina y un pico muy pequeño a los 9.54.

En el cromatograma B, que corresponde al extracto celular, muestra 3 picos bien definidos, el primero apareció en un tiempo de retención de 7.30 min y corresponde en posición a la trans astaxantina del cromatograma A, el segundo con un tiempo de retención de 8.96 min y el tercero a los 9.58 min, corresponden en posición al isómero cis de astaxantina.

Un resumen de estos resultados se presentan en la tabla 5 donde se puede ver que la producción volumétrica de astaxantina fue de 0.73  $\mu\text{g/ml}$  y la específica correspondió 121  $\mu\text{g/g}$  de levadura, lo cual indica que un 66.4 % de los carotenoides totales producidos por *P.*

*rhodozyma*, corresponde a trans astaxantina bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas y para esta cepa. De acuerdo a lo reportado por Johnson y col., (1991b) la proporción de astaxantina varía de acuerdo a la cepa y a las condiciones de cultivo entre 40 a 95 %.

TABLA 5. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *P. rhodozyma* DETERMINADA A LAS 120 H DE FERMENTACIÓN.

Crecimiento ( $\text{ng/ml}$ )	5.6
Producción volumétrica de carotenoides totales ( $\mu\text{g/ml}$ )	1.1
Producción específica de carotenoides totales ( $\mu\text{g/g}$ de levadura)	186.0
Producción volumétrica de astaxantina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.73
Producción específica de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ de levadura)	130.0
Productividad volumétrica de astaxantina ( $\mu\text{g/ml/h}$ )	0.006
Productividad específica de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ de levadura)	1.0
% de astaxantina	66.4

La astaxantina fue determinada por HPLC

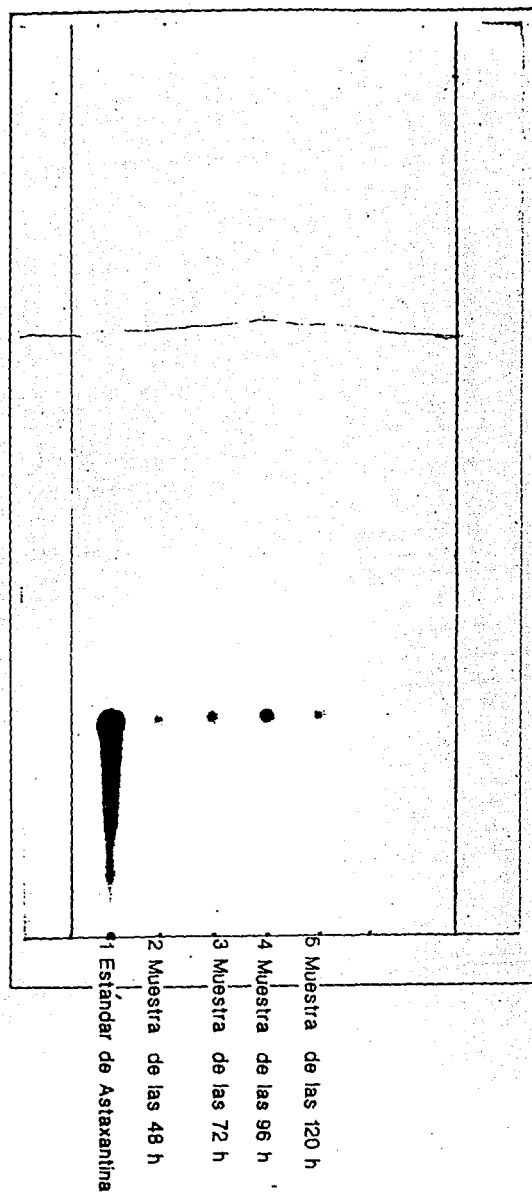


Figura. 9 Cromatografía en placa fina de Astaxantina y extractos de *P. rhodozyma*

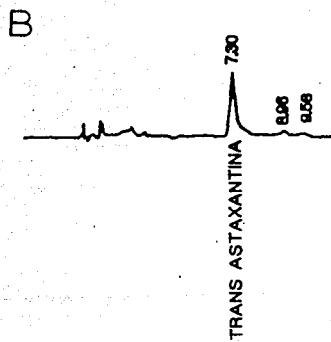
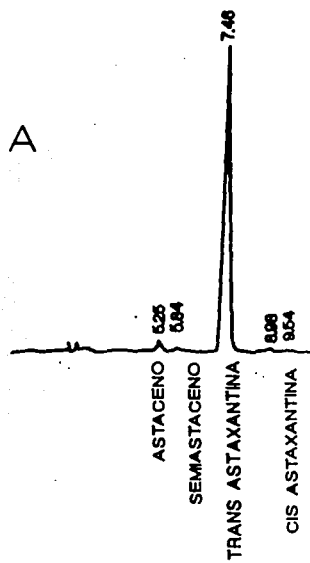


Figura. 10. HPLC, Cromatogramas de A) Estándar de Astaxantina. B) Extracto de células de *P. rhodozyma*

## 5.2 SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO

Estudios realizados por Johnson y Lewis, (1979), reportaron que en *P.rhodozyma*, la producción de astaxantina por gramo de levadura disminuye al aumentar la concentración de glucosa; sin embargo, como el rendimiento total de levadura se incrementa substancialmente con la concentración de glucosa en el medio, al final se produce más astaxantina en términos volumétricos. Resultados semejantes han reportado Okagbue y Lewis, (1983). Debido al efecto negativo de la glucosa sobre la producción de pigmento, se decidió también probar a la sacarosa como fuente de carbono alterna, ya que ésta permite obtener una densidad de células igual a la producida con glucosa y no se ha reportado de ningún efecto negativo sobre la producción de pigmento en mutantes sobreproductoras al aumentar la concentración del azúcar según lo reportaron Fang y Cheng, (1993).

Para seleccionar la mejor fuente de carbono y nitrógeno, se realizó un experimento, en el cual la sacarosa fue sustituida por la glucosa 1.5%. Como fuente de nitrógeno orgánico se utilizaron 4 nutrientes complejos grado alimentario, los cuales son utilizados en fermentaciones a nivel industrial; peptona (Peptamin C), 0.96%; harina de soya desgrasada, 0.22%; harina de proteína de pescado, 0.11%; estas fuentes se sustituyeron por el extracto de levadura presente en el medio de cultivo base, pero manteniendo igual el contenido total de nitrógeno, determinado por el método de Kjeldahl, según se indica en Material y Métodos (tabla 6). El sulfato de amonio al 0.2%, se mantuvo constante; no se creyó necesario sustituirlo por otras fuentes de nitrógeno inorgánicas alternativas, ya que este componente es una fuente de nitrógeno económica. En los medios que no contenían el extracto de levadura se les suplementó éste, pero en una concentración de 0.015%, únicamente para evitar que el microorganismo estuviera limitado de alguna vitamina o elementos traza necesarios para el crecimiento que estuvieran presentes en el extracto.

El experimento se realizó en los tiempos y condiciones indicados en sección de Material y Métodos. En las tablas 7 y 8 en estas aparecen los datos de la producción y la productividad volumétrica, a las 48 y 72 h, de fermentación respectivamente, ya que del experimento



**TABLA 6. FUENTES DE NITRÓGENO PRBADAS**

<b>FUENTE DE NITRÓGENO</b>	<b>% DE NITRÓGENO</b>
<b>Peptamín C</b>	<b>15.86</b>
<b>Harina de soya desgrasada</b>	<b>8.60</b>
<b>Extracto de levadura (Yestál 400)</b>	<b>7.59</b>
<b>Harina de proteína de pescado</b>	<b>3.25</b>
<b>Levadura autólizada</b>	<b>7.70</b>

**TABLA 7**

**PRODUCCIÓN Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA EN  
DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO 48 h DE  
FERMENTACION.**

FUENTE DE NITRÓGENO	PRODUCCIÓN VOLUMÉTRICA ( $\mu\text{g/ml}$ )		PRODUCTIVIDAD ( $\mu\text{g/ml/h}$ )	
	GLUCOSA 1.5 %	SACAROSA 1.5 %	GLUCOSA 1.5 %	SACAROSA 1.5 %
EXTRACTO DE LEVADURA (0.2 %) + ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{SO}_4$ (0.2 %)	1.05 ± 0.09	2.1	0.021	0.043
PEPTONA (0.096 %) + ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{SO}_4$ (0.2 %)*	0.16 ± 0.05	0.114 ± 0	0.002	0.007
HARINA DE PESCADO (0.117 %) + ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{SO}_4$ (0.2 %)*	0.3 ± 0.019	0.06 ± 0.01	0.002	0.001
HARINA DE SOYA (0.22 %) + ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{SO}_4$ (0.2 %)*	0.33 ± 0	0.30 ± 0.035	0.006	0.006
SULFATO DE AMONIO (0.53 %)*	0	0	0	0
EXTRACTO DE LEVADURA (0.4%)	1.17 ± 0.06	1.2 ± 0.04	0.024	0.025
LEVADURA AUTOLIZADA (0.22 %) + ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{SO}_4$ (0.2 %)*	0.28 ± 0.08	0.22 ± 0.068	0.019	0.018

EXTRACTO DE LEVADURA (0.15 g/L) COMO FUENTE DE VITAMINAS \*

anterior se observó que la máxima productividad se obtiene a las 72 h. Como control se utilizó el medio base (condición en la que la glucosa 1.5 % es la fuente de carbono y el extracto de levadura 0.2 % en combinación con el sulfato de amonio 0.2 % son la fuente de nitrógeno). La mejor condición comparada con este medio, resulta ser aquella donde se sustituyó la glucosa 1.5 % por sacarosa 1.5 % mientras que el extracto de levadura al igual que el sulfato de amonio se mantuvieron con la misma concentración que en el medio control; en esta condición la productividad volumétrica fue de 0.043  $\mu\text{g/ml/h}$  esto es el doble con respecto al control (0.021  $\mu\text{g/ml.h}$ ) a las 48 h, mientras que la producción volumétrica en esta condición fue de 2.1  $\mu\text{g/ml}$ . Otras de las condiciones que presentaron una productividad alta a este tiempo de fermentación fueron aquellas que tienen dos veces más de extracto de levadura como única fuente de nitrógeno, sacarosa o glucosa como fuente de carbono, (0.024  $\mu\text{g/ml.h}$  y 0.025  $\mu\text{g/ml.h}$  respectivamente) las cuales son muy parecidas al control; mientras que a las 72 h de fermentación en estas mismas condiciones se logró una producción volumétrica igual o mayor y una productividad (0.019  $\mu\text{g/ml.h}$  y 0.023  $\mu\text{g/ml.h}$ ) mayor al control. En las condiciones donde únicamente se utilizó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno se observó un pobre crecimiento, por lo cual no se determinó la producción del pigmento. En las condiciones donde se utilizó la peptona, levadura autolizada, harina de pescado y la harina de soya como fuente de nitrógeno se presentó una productividad y producción volumétrica por debajo de la obtenida con el control por lo cual el extracto de levadura no pudo ser eliminado del medio original, al contrario de la glucosa. La mejor condición de acuerdo a la productividad volumétrica (0.043) a las 48 h de fermentación fue aquella donde se sustituyó la glucosa por sacarosa como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno se utilizó al extracto de levadura en combinación con sulfato de amonio a una concentración de 0.2%. Este resultado permitió reducir el tiempo de fermentación a 48 h y realizar los siguientes experimentos a tiempo fijo; en este experimento no se determinó la concentración de astaxantina debido a que Johnson y Lewis, (1979), reportaron que el perfil de carotenoides no se alteró al probar la sacarosa como fuente de carbono. Con los resultados anteriores se generó un nuevo medio (modificado 1) donde se sustituyó a la glucosa por sacarosa (Tabla 9).

**TABLA 8**

**PRODUCCIÓN Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA EN DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO 72 h DE FERMENTACION.**

FUENTE DE NITRÓGENO	PRODUCCION VOLUMÉTRICA (µg/ml)		PRODUCTIVIDAD (µg/ml/h)	
	GLUCOSA 1.5 %	SACAROSA 1.5 %	GLUCOSA 1.5 %	SACAROSA 1.5 %
EXTRACTO DE LEVADURA (0.2 %) + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.2 %)	1.37	1.71	0.012	0.023
	±	±		
PEPTONA (0.096 %) + NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (0.2 %)*	0.18	0.114	0.002	0.0015
	±	±		
HARINA DE PESCADO (0.117 %) + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.2 %)*	0.543	0.39	0.007	0.005
	±	±		
HARINA DE SOYA (0.22 %) + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.2 %)*	0.97	0.98	0.013	0.014
	±	±		
SULFATO DE AMONIO (0.53 %)*	0	0	0	0
EXTRACTO DE LEVADURA (0.4%)	1.88	1.34	0.026	0.019
	±	±		
LEVADURA AUTOLIZADA (0.22 %) + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.2 %)*	0.92	0.86	0.012	0.012
	±	±		
	0.11	0.12		

\* EXTRACTO DE LEVADURA (0.15 g/L) COMO FUENTE DE VITAMINAS

**TABLA 9. MEDIO DE PRODUCCIÓN CON REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL MODIFICADO 1**

<i>NUTRIENTE</i>	<i>CONCENTRACION (%)</i>
<i>Sacarosa</i>	1.5
<i>Sulfato de amonio</i>	0.2
<i>Extracto de levadura (Yestel)</i>	0.2
<i>Fosfato monobásico de potasio</i>	0.1
<i>Cloruro de calcio</i>	0.01
<i>Sulfato de magnesio</i>	0.05

#### 4.1 VARIABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y ASTAXANTINA

Con la finalidad de conocer la variación de la producción de astaxantina y de carotenoides totales en la cepa utilizada se revisó la variabilidad entre experimentos independientes y la variabilidad en un mismo experimento.

Para evaluar la variabilidad en un mismo experimento, se utilizaron 5 matraces de 500 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio original y para evaluar el efecto de repetición en cada matraz se realizaron cinco determinaciones del pigmento. Las muestra se trataron bajo las mismas condiciones experimentales y se analizaron en el mismo tiempo para evitar el efecto de otras variables extrínsecas que pudieran alterar los resultados.

Los resultados se presentan en la tabla 1 y 2 del anexo donde la variabilidad en la producción de carotenoides totales y de astaxantina a las 120 h de fermentación en un mismo experimento se resumen. El análisis de varianza para carotenoides nos indicó que no existe diferencia significativa cuando se utilizan cinco matraces con cinco repeticiones que cuando se utilizan tres matraces con dos repeticiones, por lo que se decidió utilizar estas ultimas condiciones para evaluar carotenoides. Para astaxantina únicamente se analizaron tres matraces con tres repeticiones y no existió efecto de repeticiones, estas fueron las condiciones que se utilizaron en los experimentos donde se evaluó astaxantina.

Para determinar la variabilidad en la producción de carotenoides totales entre experimentos se repitieron en fechas diferentes, bajo las mismas condiciones y se aplicó un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias los resultados indican que existe diferencia significativa entre experimentos por lo que siempre se incluyó para cada experimento independiente un control para la variabilidad de astaxantina únicamente se evaluaron dos experimentos realizados en fechas diferentes los datos indicaron que no existe diferencia significativa. Los datos se muestran en las tablas 3 y 4 del anexo.

### 5.3 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO

Como fase previa a la optimización de los componentes del medio se decidió, eliminar algunas de las sales (el sulfato de magnesio y el cloruro de calcio), considerando que estos nutrientes se encuentran en el agua de la llave y en el extracto de levadura grado alimentario (Yestal 400) ver especificaciones en Materiales y Métodos y es posible que estos por si solos satisfagan los requerimientos nutricionales por estos minerales y con esto reducir el número de componentes a evaluar en la optimización. Los resultados obtenidos a las 48 horas de fermentación, (figura 11) muestran que no existe diferencia significativa en la producción de astaxantina, cuando se eliminaron las sales del medio. Lo cual resulto en una formulación que se muestra en la tabla 10. Por el contrario, en otros microorganismos se ha reportado que la limitación de ciertas sales en el medio de cultivo, como el magnesio, el fierro y el sulfato, disminuyen la producción de carotenoides; de igual forma, Kobayashi y col., (1991), han observado que el fierro estimula la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, cuando se crece en presencia de acetato como fuente de carbono. En *P. rhodozyma* fue demostrado un efecto en la producción de carotenoides cuando, fue crecido el microorganismo en presencia de succinato, posiblemente debido a la formación de radicales oxigenados; sin embargo no se ha reportado ningún estudio sistemático respecto al efecto de otras sales en la producción de astaxantina (Johnson y col., 1991b).

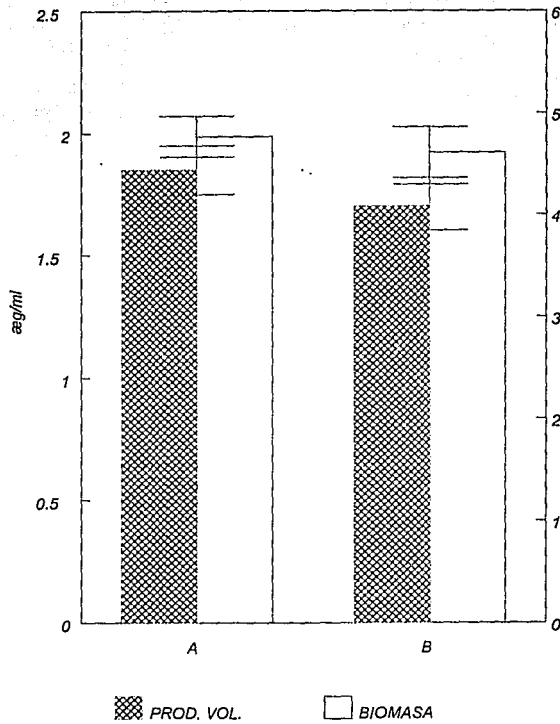


Figura 11. Efecto de cloruro de calcio y sulfato de magnesio sobre la producción de carotenoides totales sobre la producción de carotenoides totales. El experimento se llevó acabo en matraces con deflectores, 50 ml de medio de cultivo, incubados a 22 ° C.



**TABLA 10. MEDIO DE PRODUCCIÓN CON REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL  
MODIFICADO 2**

NUTRIENTE	CONCENTRACIÓN (%)	CALIDAD	PRODUCTORES	COSTO NS/ha	ORIGEN
Sacarosa	1.5	Industrial	Ingenios Nacionales	1.2	Nacional
Sulfato de amonio	0.2	Industrial	Productos Químicos Monterrey	0.320	Parcialmente Nacional
Extracto de levadura (Yestal 400)	0.2	Industrial	Arancia Ingredientes, S.A.	16.27	Nacional
Fosfato monobásico de potasio	0.1	Industrial	Fertilizantes Mexicanos, S.A. Induquim, S.A. de C.V.	7.80	Nacional

6 precios cotizados en 1993

#### 5.4 EXPLORACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA FRACCIÓN DE LLENADO SOBRE LA PRODUCCIÓN

Como antecedente a la optimización del medio de cultivo, se consideró importante evaluar el efecto de la fracción de llenado sobre la producción de carotenoides; ya que este parámetro nos indica el efecto de la transferencia de oxígeno sobre la producción a nivel de matraces agitados (Saval, 1992).

El efecto del oxígeno sobre la producción de astaxantina, a nivel de matraces agitados ha sido poco estudiada en *P. rhodozyma*. De los autores que han realizado estos estudios esta Johnson y Lewis (1979), en los cuales probó diferentes fracciones de llenado de medio de cultivo, y diferentes velocidades de agitación en matraces de 500 ml con deflectores. En ellos se evaluó la transferencia de oxígeno (por el método indirecto del sulfito de sodio), reportando que a una velocidad de oxígeno disuelto de 3.6 mmol/h, la producción de biomasa disminuyó en un 50% y la producción de astaxantina en un 75%.

Estudios de Long y col., 1992, en *P. rhodozyma*, señalan que la producción de biomasa se favoreció en niveles de aireación de 6 ppm de oxígeno disuelto, en matraces de 250 ml, con 90 ml de medio de cultivo jugo de uva (con una concentración de glucosa - fructosa de 220 g/l) como fuente de carbono.

Para la realización de este experimento se utilizaron matraces con deflectores de 500 ml, ya que es el tipo de matraces que favorecen una mejor transferencia de oxígeno (Saval 1990) y un mejor patrón de mezclado por la turbulencia generada con los deflectores. Las fracciones de llenado utilizadas fueron 0.05, 0.1, 0.15 bajo estas condiciones no se encontró diferencias de producción de pigmento, los resultados obtenidos pueden deberse a que el intervalo de fracción de llenado evaluada fue muy pequeño y no permitió ver diferencias importantes en la producción del pigmento en este tipo de matraz; además se probaron tres diferentes agitaciones (150, 200, y 250), sin embargo los resultados tampoco mostraron

incrementos en la producción del pigmento por lo que se decidió evaluar esta variable a nivel de fermentador de 4 l, en posteriores experimentos.

Con fines prácticos se decidió utilizar una fracción de llenado de 0.15 que corresponde a 75 ml de medio de cultivo, ya que esta permitiría muestrear un mayor volumen de muestra en el transcurso de la fermentación sin alterar las condiciones del cultivo.

## 5.5 OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Un problema que se presenta en la industria de las fermentaciones está relacionado con la productividad del medio de cultivo; debido a que en la mayoría de los casos los medios utilizados, han sido desarrollados por métodos empíricos de ensayo y error, lo cual ocasiona que no siempre se tengan las concentraciones óptimas de los nutrientes. De tal manera que los medios de cultivo pueden optimizarse, ya sea modificando el porcentaje de alguno o todos los componentes del medio, obteniéndose uno donde la producción se aumente a un menor costo o bien cubriendo costos excesivos de producción haciendo más redituable el proceso.

Para la optimización del medio se planteo tres experimentos para el primero se tomaron los siguientes puntos centrales para la variable X1 fue 1.5%, para X2, 0.2%, para X3, 0.1 y para X4, 0.2%. El nivel superior e inferior para cada una de las variables se estableció a un 50% sobre la concentración original, tanto hacia arriba como hacia abajo.(Tabla 11).

La matriz del experimento aparece en la tabla 12; las respuestas obtenidas y los coeficientes de contrastes en la tabla 13. Los resultados del primer experimento nos indican de acuerdo a los valores calculados para los coeficientes de comparación, las concentraciones de los nutrientes deben ser aumentadas, ya que los cuatros coeficientes tienen signo positivo y el valor absoluto de estos es mayor al valor absoluto de la desviación estándar de cada una de las corridas con excepción del sulfato de amonio, cuyo coeficiente es muy cercano a cero. Sin embargo, al comparar la media de las respuestas obtenidas contra la producción el

medio control, no se observó diferencia significativa entre ellos ( $Y_0 = 1.09 \mu\text{g/ml}$  y  $C = 1.5 \mu\text{g/ml}$ ), lo cual pudiera deberse a que el centro experimental y los niveles (+ y -) establecidos están muy lejos de los valores óptimos.

TABLA 11 NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA CADA NUTRIENTE.

Nutriente	Concentración base	Nivel	
		+	-
Sacarosa (X1)	1.5	2.25	0.75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X2)	0.2	0.30	0.10
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (X3)	0.10	0.15	0.05
Extracto de levadura (X3)	0.2	0.60	0.40

TABLA 12. DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO  $2^3$

Observación	Factor				Respuesta Y ( $\mu\text{g/ml}$ )	S	CV %
	X1	X2	X3	X4			
1	-	-	-	-	0.64	0.00	1.0
2	-	-	+	+	0.84	0.14	16
3	-	+	-	+	0.84	0.14	16
4	-	+	-	+	0.71	0.13	18
5	+	-	+	-	1.57	0.05	3.0
6	+	-	+	-	1.25	0.19	15
7	+	+	-	-	1.0	0.00	0.3
8	+	+	+	+	1.8	0.12	0.6

Matriz No 1 con ocho corridas experimentales donde la respuesta evaluada fue la producción volumétrica la cual fue de terminada a las 48 h de fermentación. Y, es la respuesta; S, la desviación estándar, CV %, el coeficiente de variación; X1, Sacarosa; X2, Sulfato de amonio; X3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y X4, extracto de levadura.

TABLA 13. COEFICIENTES DE COMPARACIÓN

Componente	Coefficiente de comparación
X1	+ 0.64
X2	+ 0.0
X3	+ 0.13
X4	+ 0.36

Por lo tanto para el siguiente experimento se modificaron los centros experimentales para la variable X1, X3 y X4; mientras que para la variable X2 se respetó el mismo centro experimental, debido a que el coeficiente de contraste fue cero, con los datos anteriores se pretendía aumentar la eficiencia del diseño.

En este segundo experimento, se respetaron los criterios establecidos en el primer experimento para ello se realizó un diseño factorial  $2^4$ , utilizando únicamente la fracción de  $1/2$ ; lo cual dio como resultado 8 corridas experimentales, la matriz se muestra en la Tabla 15, en la cual aparecen las respuestas obtenidas al evaluar, los niveles bajo y alto de las concentraciones de los nutrientes (Tabla 14). Para este experimento los centros experimentales establecidos fueron los siguientes: para la variable X1, 3.0%; X3, 0.15%; X4, 0.4%; los niveles alto y bajo se establecieron para la variable X1, X2 y X3, aumentando un 50% del punto central a cada una de las variables; los resultados se muestran en la tabla 14.

Los coeficientes de comparación se calcularon con la relación matemática anterior y se muestran en la tabla 16; los cuales indican que los componentes X1 y X2, son los que presentan mayor importancia y se sugiere aumentarse ya que tienen signo positivo y el

valor absoluto de estos no es menor a la desviación típica del experimento, lo que indico que los cambios observados no se deben a un error experimental. Mientras que para los componentes X3 y X4, se sugiere no modificar la concentración central pues sus coeficientes de comparación son cero.

TABLA 14. NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA CADA NUTRIENTE.

Nutriente	Concentración base (%)	Nivel	
		+	-
Sacarosa (X1)	3.0	4.5	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (X2)	0.20	0.30	0.10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (X3)	0.15	0.23	0.075
Extracto de levadura (X4)	0.40	0.60	0.20

TABLA 15. DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO 2<sup>3</sup>

Observación	Factor				Respuesta Y (µg/ml)	S	CV %
	X1	X2	X3	X4			
1	-	-	-	-	1.01	0.13	12
2	-	-	+	+	1.21	0.10	8
3	-	+	-	+	1.42	0.09	6
4	-	+	-	+	1.10	0.18	12
5	+	-	+	-	2.23	0.15	6.0
6	+	-	+	-	1.52	0.20	13
7	+	+	-	-	1.30	0.10	7.6
8	+	+	+	+	2.16	0.05	2.3

Matriz No 2 con ocho corridas experimentales donde la respuesta evaluada fue la producción volumétrica la cual fue de terminada a las 48 h de fermentación. Y, es la respuesta; S, la desviación estándar; CV %, el coeficiente de variación; X1, sacarosa; X2, sulfato de amonio; X3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; X4, extracto de levadura.

TABLA 16. COEFICIENTE DE COMPARACIÓN DEL EXPERIMENTO

Componente	Coefficiente de comparación
X1	+ 0.87
X2	0
X3	0
X4	0.52

El tercer diseño experimental, se realizó aumentando un 15 % a la variable X1 y un 10 % a la variable X4, para establecer los nuevos centros experimentales, las variables X3 y X2, ya no fueron evaluadas, por tener coeficientes de comparación igual a cero. Para este experimento se realizó un factorial completo  $2^2$  el cual dio origen a cuatro experimentos, la matriz y las respuestas obtenidas se presentan en la tabla 18. El experimento se realizó bajo las condiciones y criterios establecidos al principio de la optimización.

Los resultados de los coeficientes de comparación aparecen en la tabla 19. Los cuales indican que al evaluar la variable X1 de un nivel de 6.1% a 4.1 %, el coeficiente es muy cercano a cero y es menor que la desviación estándar obtenida, por lo cual se sugiere quedarse con la concentración intermedia de 5.1%; al ser evaluada la variable X4 en un rango de 0.78% a 0.53%, dio un coeficiente de comparación de 0.35, este valor todavía está por arriba de la desviación estándar lo cual pudiera ser aumentado para siguientes experimentos (Tabla 17). Sin embargo se decidió para esta investigación que darnos con el valor intermedio de 0.66%. En la tabla 20 aparecen las concentraciones finales, con las cuales se obtuvo, un aumento en la producción de carotenoides totales de dos veces con respecto al medio control tal y como se muestra en la figura 12 esta comparación se realizó a las 48 h de fermentación, que fue el tiempo en el cual se realizó la optimización.

TABLA 17. NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA CADA NUTRIENTE

Nutriente	Concentración base (%)	Nivel	
		+	-
Sacarosa (X1)	5.1	6.1	4.1
$(NH_4)_2SO_4$ (X2)	0.20	0.20	0.20
$K_2HPO_4$ (X3)	0.15	0.23	0.075
Extracto de levadura (X3)	0.66	0.78	0.53

TABLA 18. DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 2<sup>2</sup>

Observación	Factor		Respuesta	S	CV %
	X1	X4	Y (µg/ml)		
1	-	+	1.8	0.29	15
2	-	+	2.20	0.21	10
3	-	+	2.45	0.21	9
4	-	+	2.20	0.22	10

Matriz No 3 con cuatro corridas experimentales donde la respuesta evaluada fue la producción volumétrica de terminada a las 48 h de fermentación.



TABLA 19. COEFICIENTES DE COMPARACIÓN DEL EXPERIMENTO

Componente	Coefficiente de comparación
X1	+ 0.05
X4	+ 0.35

P

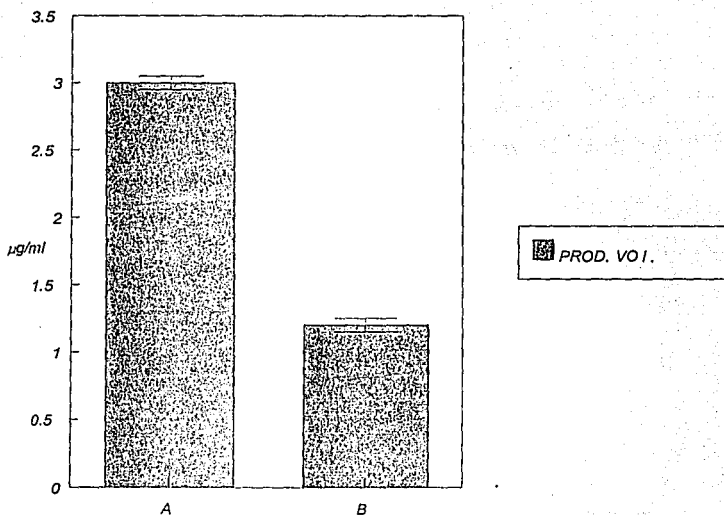


Figura 12. Comparación de la producción volumétrica entre dos medios de producción, obtenidos a las 48 h de fermentación, tiempo en el cual se realizó la optimización del medio de cultivo.

Se realizó un experimento adicional, siguiendo la cinética durante 120 h (Figura 13), tomando muestra cada 24 h, en el cual se comparó la producción volumétrica en el medio

**TABLA 20**

**MODIFICACIÓN DE LAS CONCENTRACIÓN DE LOS  
NUTRIENTES EN EL MEDIO OPTIMIZADO**

<i>Nutriente</i>	<i>Concentración original (%)</i>	<i>Concentración (%) en el medio optimizado</i>
<i>Sacarosa</i>	1.5	5.1
<i>Sulfato de amonio</i>	0.2	0.2
<i>Extracto de levadura (Yestel 400)</i>	0.2	6.6
<i>Fosfato monobásico de potasio</i>	0.1	0.15

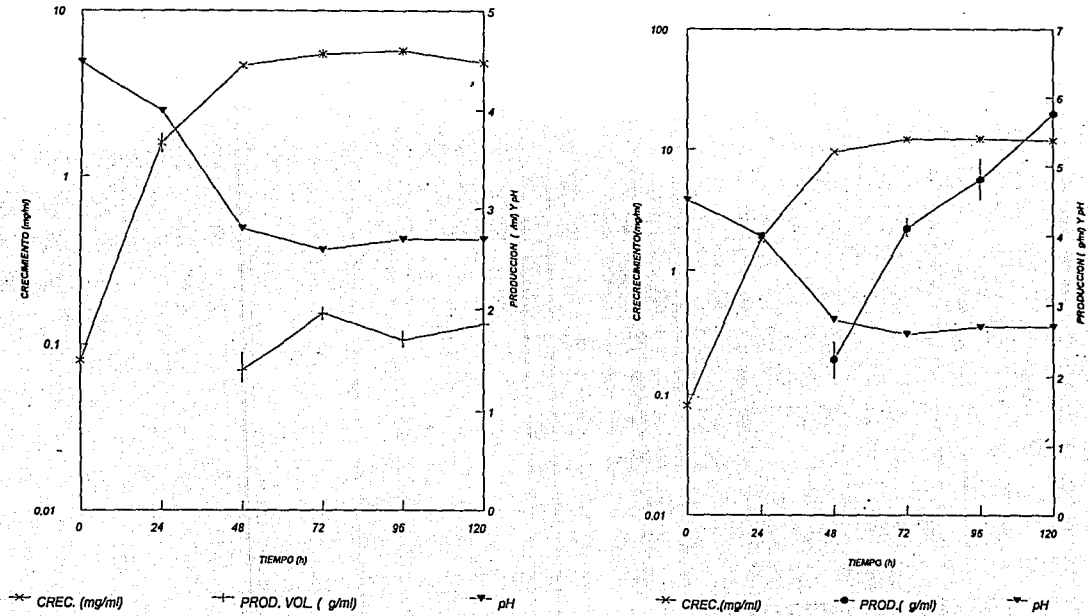


Figura 13. Comparación del perfil de producción de carotenoides totales por *P. rhodozyma* NRR (Y-10922), utilizando el medio sin optimizar (A) y después de optimizar (B), en matraces con deflectores de 500 ml con 75 ml de medio, incubados a 22 °C y 150 rpm.

optimizado y en el medio original. Como se muestra en la tabla 21, con el medio original se obtuvo una producción de 1.8  $\mu\text{g/ml}$  como máxima producción para carotenoides totales y en el medio optimizado la máxima fue de 5.8  $\mu\text{g/ml}$  lo cual indica que esta se aumento en un 320 %.

Otro dato importante es que la máxima productividad volumétrica, en el medio control se obtuvo a las 48 h de incubación, mientras que en optimizado a hasta las 72 h; por otra parte, el crecimiento se incremento en 25% aproximadamente y el perfil de pH no presento diferencias entre los dos medios, es decir inicia en 4.5 y termina en 2.8 a las 120 h.

Con la finalidad de confirmar la presencia de la astaxantina a lo largo de la fermentación en ambos medios se realizó una cromatografía en placa fina, según las condiciones citadas en la sección de Material y Métodos. Como puede observarse en la figura. 14 la astaxantina apárese como principal pigmento en ambos medios. Posteriormente se cuantificó la xantofila por medio de un densitómetro como apárese en Material y Métodos; los resultados muestran en el medio control y en el medio optimizado la producción máxima de astaxantina a las 48 h y 120 h (1.2  $\mu\text{g/ml}$  y 3.5  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente, con esto se obtuvo un incremento de 3 veces lo que correspondió a 290 % (tabla 21). Sin embargo estas producciones estan por abajo de lo reportado para las cepas mejoradas genéticamente para las cuales se reportan niveles de producción entre 1000 - 8000  $\mu\text{g/g}$  de levadura y una producción volumetrica de 37-5.2  $\mu\text{g/ml}$ .

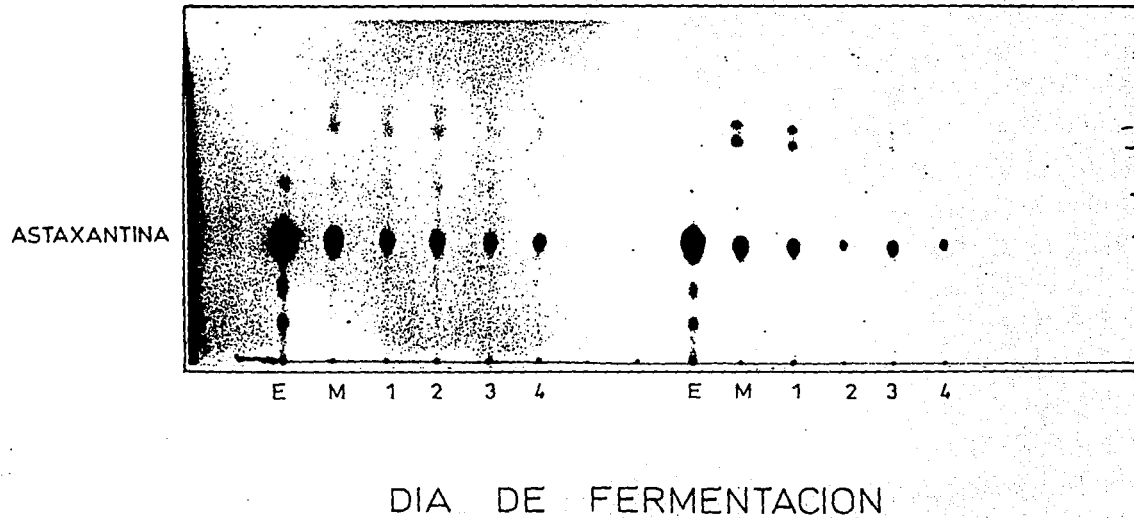


Figura 14. Cromatografía en placa fina de la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* en en dos los medios de producción, A) Medio control, B) Medio optimizado, E) Estándar de astaxantina, M) mezcla de estándar y extracto celular y 1, 2, 3 y 4 tiempo de fermentación.

**TABLA 21**

**PRODUCCIÓN DE ASTANXANTINA Y CAROTENOIDES TOTALES  
EN DOS MEDIOS DE PRODUCCIÓN.**

<i>Medio</i>	<i>Máxima producción de astaxantina (µg/ml)</i>	<i>Máxima producción de carotenoides totales (µg/ml)</i>
<i>Original</i>	1.2	1.8
<i>Optimizado</i>	3.6	5.8

El experimento se realizó por triplicado en matraces de 500 ml con deflectores con 75 ml de medio, incubados a 22 °C y 150 rpm, la fermentación total duró 120 h.

#### 4.6. EFECTO DEL pH INICIAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.

De acuerdo a lo reportado por Johnson y col.,(1979), el pH inicial tiene un efecto importante sobre la producción de astaxantina para la cepa UCD 67 210 de *P. rhodozyma*. Este antecedente nos llevó a evaluar también el efecto del pH inicial del medio, sobre la producción de carotenoides totales en la cepa utilizada en este estudio, ya que al modificar las concentraciones de los nutrientes, del medio de cultivo durante la optimización, podría sufrir variaciones que resultara en una alteración de la producción del pigmento.

La realización de este experimento se efectuó, bajo las condiciones de producción ya establecidas al inicio del trabajo. Se evaluó un rango de pH inicial de 4 a 6.5, con intervalos de 0.5 unidades de diferencia entre los valores enteros de pH. Como control se utilizó el medio optimizado, ajustando el pH a 4.5 con ácido fólico. Para asegurarnos de que no existiera variación entre el valor obtenido antes y después de esterilizar, se midió el pH antes y después de esterilizar para posteriormente ajustar lo de acuerdo a los valores a probar.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento y de acuerdo a la comparación de medias utilizando la prueba modificada LSD al 99% de probabilidad (ver anexo); el pH inicial tuvo un efecto negativo sobre la producción de pigmentos totales por *P. rhodozyma*, cuando se disminuyó el pH a valores de 4, mientras que en un rango de 4.5 a 6.5 no existió efecto significativo sobre la producción de pigmento. Para el crecimiento después de valores de pH de 4 este se estimula ligeramente (26%), hasta un pH de 6 después el crecimiento vuelve a estimularse en un 25%. Solamente se evaluó hasta un pH de 6. Figura 15.

Para posteriores experimentos se decidió utilizar el pH inicial de 5, por cuestiones prácticas. Resultados similares fueron reportados por, Fang y Cheng, 1993, al evaluar el efecto del pH inicial en una cepa mutante NCHU FS301. Meyer y col., (1994), encontraron

que la máxima producción de astaxantina y de carotenoides totales, en un medio que contenía 10 g/l de glucosa, valores de pH inicial entre 4.5 y 5, para la cepa J43. Valores por abajo de estos valores disminuyeron la producción.

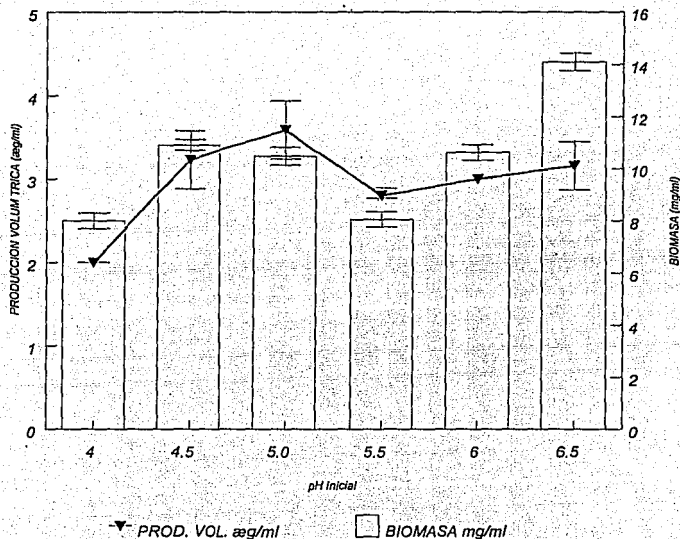


Figura 15. Efecto del pH inicial sobre la producción de carotenoides totales, la fermentación se realizó en matraces con deflectores de 500 ml, con 75 ml de medio y se incubó a 22 °C, 150 rpm y durante 72 h.

### 5.7 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CAROTENOIDES.

La temperatura óptima que ha sido reportada para la producción de astaxantina, en *P. rhodozyma* fue 22 °C, y la de máxima crecimiento 27.5 °C, Jonhson y col., 1979. Estos



autores también observaron que por arriba de 22 °C la producción de astaxantina se ve disminuida.

Esta temperatura ocasionaría que los costos de producción del colorante a nivel industrial, aumentarían por la necesidad de estar enfriando continuamente el reactor.

Con estos antecedentes y con la finalidad de observar si a valores de temperatura de 25°C y 29° C el pigmento podría producirse, se realizó un experimento en el medio optimizado, utilizando 22°C como temperatura control.

Los resultados se presentan en la figura 16 donde se aprecia que a temperatura de 29°C no se presentó crecimiento del microorganismo ni producción del pigmento. Sin embargo, a 25°C, se obtuvo buena producción de carotenoides y crecimiento del microorganismo. Al comparar las medias de producción de los tratamientos contra el control, se observó que existe una diferencia altamente significativa entre las tres temperaturas probadas, de acuerdo al análisis estadístico. De este modo, la temperatura de 22°C resultó ser la que permite una mejor producción del pigmento, mientras que al aumentar la temperatura a 25°C, la producción disminuyó en un 25%. Fang y col., (1994), estudiaron el efecto de la temperatura sobre la producción de astaxantina y sobre el crecimiento en una mutante NCHFS301, y observaron que en un rango de 15 a 20 °C, la producción permaneció relativamente constante, mientras que por abajo y por arriba de estos valores, la producción y el crecimiento disminuyeron marcadamente.

Por otra parte, Longo y col., (1992), únicamente evaluaron el efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa, encontrando que a 23°C, se produjo el mayor crecimiento, mientras que a valores por abajo de esta temperatura la cantidad de biomasa fue menor.

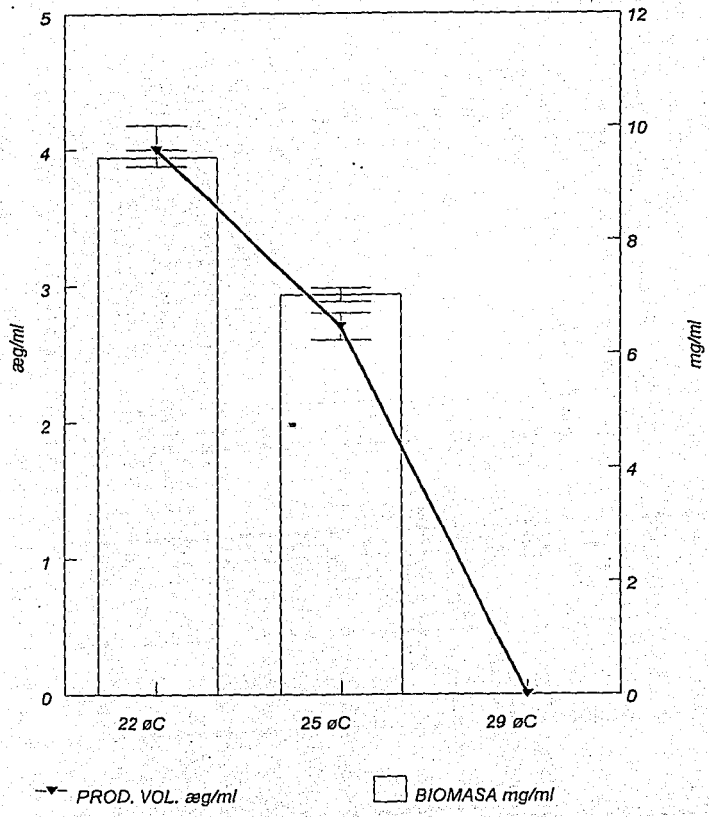


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la producción de carotenoides totales . La fermentación se realizó en matraces (con deflectores de 500 ml) con 75 ml de medio de cultivo, incubados a 22, 25 y 29 °C durante 72 h.

## 5.8. PRODUCCIÓN DEL CAROTENOIDE A NIVEL DE FERMENTADOR AGITADO DE 4 LITROS

Se ha reportado que los parámetros más críticos para la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*, en fermentación sumergida, son la aireación y la agitación; se plantearon diferentes condiciones de éstas variables para conocer su efecto sobre el crecimiento y la producción de los carotenoides utilizando el medio de cultivo previamente optimizado a nivel de matraz agitado. La figura 17 nos muestra que a una velocidad volumétrica de 1 vvm y 300 rpm., se presenta un buen crecimiento microbiano pero sin la producción del pigmento, el crecimiento máximo se alcanzó a las 120 h y fue de 10 mg/ml, consumiéndose en su totalidad la fuente de carbono y se observó que el oxígeno se consumió rápidamente durante los primeras 24 h. Estos resultados sugieren que la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es menor a la demanda del microorganismo para la producción del metabolito, lo cual provoca un desplazamiento del metabolismo hacia la producción de etanol.

De acuerdo con lo reportado por Jonhson y col., (1990) los cuales mencionan que para obtener un buen crecimiento y la producción del carotenoide es importante mantener niveles de saturación de oxígeno por arriba del 30% durante todo el proceso en un cultivo en lote. Por lo anterior se decidió plantear un segundo experimento en el cual los niveles de oxígeno estuvieran por arriba del 30% y se varió la velocidad de agitación de 300 a 500 r.p.m., manteniendo fija la velocidad volumétrica de aire a 1.0 vvm.

Los resultados muestran (figura 18) que durante las primeras 24 h de cultivo el consumo de oxígeno fue muy rápido, llegando a obtener condiciones de anaerobiosis y provocando una disminución en el crecimiento (lo cual se observa por la disminución de la pendiente) y sin la producción de carotenoides con lo que se confirma la importancia del oxígeno. A las 48 h, ya en fase estacionaria, la velocidad de agitación se incrementó a 400 rpm, obteniéndose niveles de saturación de oxígeno del 50%, en este tiempo se presenta la

producción del pigmento y coincide con el consumo en su totalidad de la fuente de carbono; cuando se observó una disminución en el nivel de saturación de oxígeno después de las siguientes 24 h, se incrementó la velocidad de agitación a 500 r.p.m. incrementándose el nivel de oxígeno disuelto por arriba del 75% de saturación. Obteniéndose 6  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides a las 96 h y la máxima de 8.5  $\mu\text{g/ml}$  al final de la fermentación.

Bajo estas condiciones el metabolito se comportó como no asociado al crecimiento, sin embargo algunos autores mencionan que es un metabolito asociado al crecimiento cuando se mantienen niveles de saturación de aire disuelto por arriba del 30% desde el inicio de la fermentación.

Otra de las alternativas que se plantearon para tratar de mantener buenos niveles de saturación de oxígeno fue aumentando la velocidad volumétrica de oxígeno de 1 a 1.5 vvm y la velocidad de agitación de 300 a 400 rpm como lo reportan Jonhson y col. (1990a); la primera condición es para la producción de biomasa y la segunda para la producción del carotenoide, con ésta se lograron niveles de saturación de oxígeno por arriba de 30%. Los resultados (figura 19) nos indican que durante las primeras 24 h de fermentación no hay producción de pigmento, únicamente se observa producción de biomasa y el consumo de oxígeno fue de 20%; consumiéndose únicamente el 5% de la fuente de carbono, sin la producción de los carotenoides; presentándose la producción de este después de las 48 h, que es el tiempo en el cual se realiza el aumento en la velocidad de agitación ya en fase estacionaria; a las 72 h se obtiene niveles de saturación de oxígeno del 55%, a las 96 h de fermentación la producción de los carotenoides fue de 9.1  $\mu\text{g/ml}$  con 44% de saturación de oxígeno y a las 120 h fue de 80% con una producción de carotenoides de 10.1  $\mu\text{g/ml}$ ; bajo estas condiciones de cultivo la producción de los carotenoides se comportó como un metabolito no asociado al crecimiento.

Considerando la importancia que tiene los niveles de saturación de oxígeno en el medio de cultivo para la producción del pigmento, se aumentó la velocidad volumétrica de aire a 2 vvm, manteniendo las condiciones de agitación anteriores (300 y 400). Durante las primeras

24 h de fermentación (fase de crecimiento logarítmica), la concentración de oxígeno disminuye hasta un 80% de la concentración inicial y se consumió un 10% de la fuente de carbono. En este tiempo el microorganismo no produjo pigmento. A las 48 h el microorganismo pasó a fase preestacionaria. En ella el consumo de sacarosa fue más lento y los niveles de oxígeno fueron de 80%. Sin embargo no se observó producción del pigmento.

La producción del metabolito empezó a las 72 h de fermentación durante la fase estacionaria con una concentración de oxígeno disuelto en el medio de 60%. A las 96 h de fermentación la producción de pigmento fue de 5  $\mu\text{g/ml}$  y el nivel de oxígeno de 50%, durante las siguientes 24 h el nivel de oxígeno alcanzó 80% de saturación y la máxima producción fue de 11.7  $\mu\text{g/ml}$ , (Figura 18). Bajo estas condiciones la producción del metabolito se comportó como parcialmente asociado al crecimiento.

Bajo estas últimas condiciones se obtuvo la mejor producción (tabla 22) en la cual aparecen las máximas producciones obtenidas a las 120 h de fermentación; se realizó una cromatografía en placa fina para asegurarnos que la astaxantina fuera el principal pigmento presente en la fermentación, (figura 21).

En esta figura aparecen en los carriles números 5, 6 y 7 el estándar de astaxantina y en los carriles 1, 2, 3 y 4 las muestras de los extractos del caldo de cultivo, a lo largo de la fermentación. Como se puede observar la astaxantina está presente en todos los tiempos de la fermentación, sin embargo se presenta la acumulación de otros intermediarios menos polares.

Los resultados obtenidos indican que *P. rhodozyma* requiere de niveles de saturación de oxígeno por arriba del 30 % para la producción de carotenoides (principalmente astaxantina) y este nivel de oxigenación es obtenido con altas velocidades de agitación, aunque algunos autores han obtenido estos niveles de saturación dosificando la fuente de carbono a través de un cultivo en alimentado obteniendo buenos rendimientos de axantina,

otra alternativa ha sido el cultivo continuo donde se obtienen niveles de saturación de oxígeno por arriba del 60% con velocidades de aireación y agitación no muy altas haciendo un buen manejo de la velocidad de dilución obteniendo buenas producciones. Estas alternativas no fueron probadas por lo que se recomienda evaluarlas en erimentos posteriores.

TABLA 22. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN MÁXIMA DE CAROTENOIDES EN FERMENTADOR DE 4 l

Velocidad (rpm)	Aireación (v/v)	Agitación (rpm)	Crecimiento (mg/ml)	Carotenoides (Ug/ml)
1	1	300	10	*
2	1	300-400-500	21	8.5
3	1.5	300-400	14.4	10.1
4	2	300-400	18.3	11.3
Matr�az de 500 ml	-	175	9	5.2

\* No hubo producción del pigmento

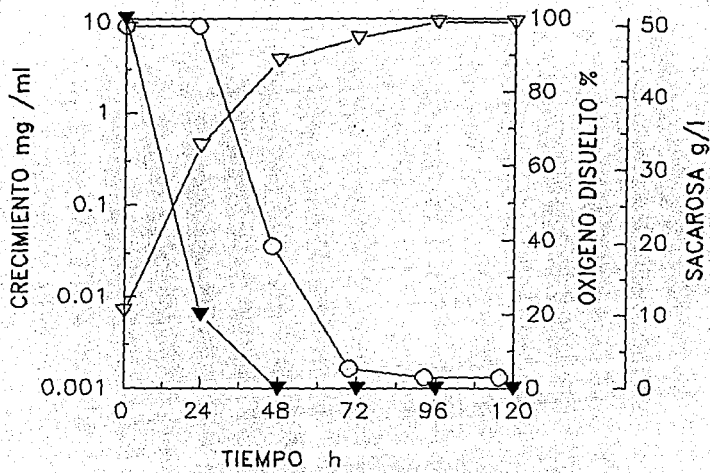


FIGURA 17. Crecimiento y producción de carotenoides de *P. rhodoszyma*, en fermentador de 4 L a 23 °C, 300 rpm y 1.0 vvm.

( ▽ crecimiento, ○ sacarosa, ▼ oxígeno disuelto ).

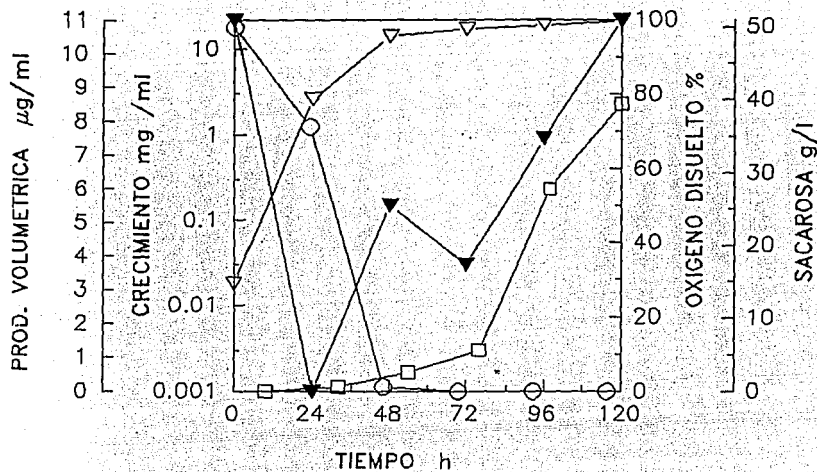


Figura 18. Crecimiento y producción carotenoides de *P. rhodozyma*, en fermentador de 4 L a 30 °C, 1.0 vvm y variando la velocidad de agitación de 300 , 400 y 500 rpm. ( ▽ crecimiento, ▼ oxígeno disuelto, ○ sacarosa, □ producción volumétrica ).



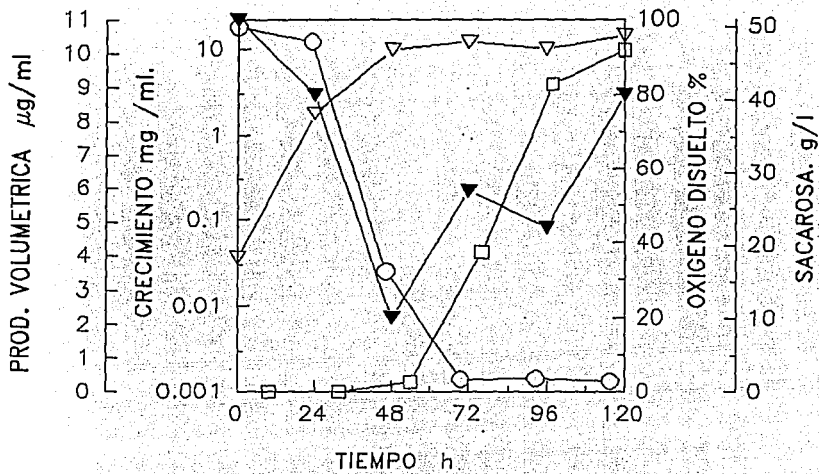


Figura 19. Crecimiento y producción de carotenoides de *P. rhodozyma*, en fermentador de 4 L, a 23 °C, 1.5 vvm, variando la velocidad de agitación, 300 y 400 rpm.  
 ( ▽ crecimiento, ▼ oxígeno disuelto, ○ sacarosa, □ producción volumétrica ).

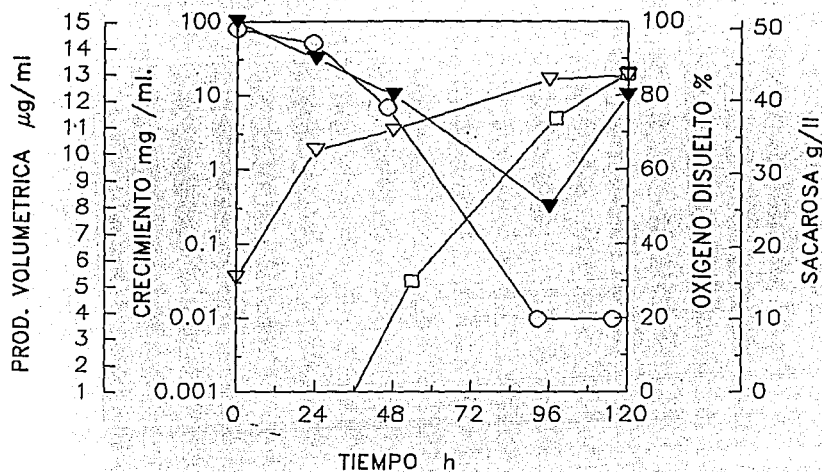


Figura 20. Crecimiento y producción de carotenoides de *P. rhodozyma*, en fermentador de 4 L a 23 °C, 2.0 vvm, variando la velocidad de agitación de 300 - 400 rpm..

( ▽ crecimiento, ▼ oxígeno disuelto, ○ sacarosa, □ producción volumétrica ).

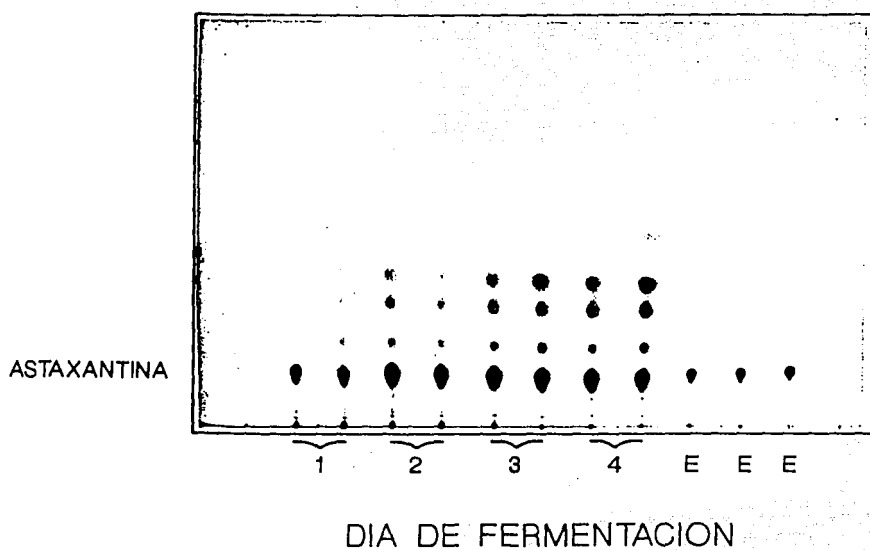


Figura 21. Cromatografía en placa fina de la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* en fermentador de 4 l. Los carriles E: corresponden a un estándar de astaxantina por triplicado y los carriles 1 al 4 corresponden a los duplicados de 48, 96, 120 y 140 h de fermentación.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La astaxantina fue el principal pigmento producido por *P. rhodozyma* en una proporción del 66 % de los carotenoides totales determinados en el medio de cultivo de la cepa NRRL Y- 10922.
- La sacarosa (15 g/l) como fuente de carbono y el extracto de levadura (2 g/l) suplementado con sulfato de amonio (2 g/l) como fuentes de nitrógeno, dieron la máxima productividad y producción volumétrica a las 48 h de fermentación. Sin embargo es recomendable plantear un diseño factorial que permita evaluar fuentes de nitrógeno como levadura autolizada a diferentes niveles de concentración lo que posiblemente pueda tener ventajas económicas al sustituir al extracto de levadura ya que es el componente más costoso del medio de cultivo; otra posibilidad es probar combinaciones entre el extracto de levadura y otra fuente de nitrógeno más económica.
- Las sales (sulfato de magnesio y cloruro de calcio) no son componentes importantes en la formulación del medio de cultivo para la producción cuando se utiliza agua de la llave y fuentes complejas de nitrógeno.
- Con la optimización del medio de cultivo se incrementó 4.6 veces la producción volumétrica de astaxantina a nivel de matraces de 500 ml. Lo que resulta superior a la producción reportada para cepas silvestres. Sin embargo con este incremento no se logra competir con las cepas patentadas.
- La producción de carotenoides totales no se ve afectada por el pH en un rango de 4.5-6.5 lo cual permite tener un amplio margen de pH para trabajar utilizando el medio de cultivo sin necesidad de ajustarlo.
- La producción de carotenoides totales se disminuye con el aumento de la temperatura por arriba de 22 °C.
- La producción de carotenoides totales fue de 11.3 µg/ml a nivel de fermentador de 4 l con lo cual se incrementó 2.1 con respecto a la producción a nivel de matraz de 500 ml. Es necesario también optimizar las condiciones de agitación y aireación a esta escala monitoreándose específicamente los niveles de astaxantina.

- Es recomendable que siempre que se inicie un trabajo se confirme la presencia y los niveles de producción de la cepa, considerando que no siempre es posible contar con esta información.

- La variabilidad de los nutrientes en el medio de cultivo principalmente cuando se utilizan materias primas complejas es una variable que se debe de considerar en este tipo de trabajo para evitar variaciones en la producción..

- Para poder obtener niveles competitivos de producción de astaxantina, es necesario realizar manipulaciones genéticas de la cepa utilizada y /o seleccionar otras cepas con mejores niveles de producción.

## BIBLIOGRAFÍA

- \* Andrewes, A. G., Phaff H. J. Starr M. P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting Yeast. *Phytochemistry*. 15:1003-1007.
- \* An, G. H., Schuman D. B. and Johnson E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:116-126.
- \* An, G. H., Bielich, J., Auerbach, R., and Johnson, E.A. (1991). Isolation and characterization of carotenid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology*, 9:70-73.
- \*Britton G. and Goodwin (1971). Biosynthesis of carotenoids. En *Methods in enzymology*. Vol. XVIII:654-701.
- \*Britton, G. (1985). General Carotenoids Methods. *Methods in Enzymology* 111:115-149.
- \*Box, G. E., Hunter W. and Hunter S. J. (1989). *Estadística para Investigadores*, Ed. Reverté, S.A. pp. 317-329.
- \*Cerdeira - Olmedo, E. (1985). Carotene mutants of *Phycomyces*. *Meth. Enzymol.* 110:220-243.
- \*Chapman, J. W. Hakkaart, M. J. Maume K. (1991). Astaxanthin generating yeast cells. European Patent Application 0 474 347 A1.

\*Chun, S. B., Chin, J. E., Bai Suk. (1992). Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. FEMS Microbiology Letters. 93:221-226.

\*Dendeker, S. and Modi, V.V. (1980). Involvement of cyclic AMP in carotenogenesis and cell differentiation in *Blakeslea trispora*. Biochim. Biophys. Acta 628:398-406.

\*Evans, Ch., T. y Adams D. (1991). Yeast and their use in astaxanthin production. European Patent Application, 0427 405 A1.

\*Fang T. and Cheng Y. (1993). Improvement of Astaxanthina. Production by *Phaffia rhodozyma* through Mutation and Optimization of Culture Conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 75(6):466-469.

\*Flonoe, B., Christensen, Y., and Larsen, R., (1988). Astaxanthin - Producing Yeast Cells, Methods for Their Preparation and Their Use, European Patent Application, WO 88/08025.

\*Goodwin, T.W. (1959). Biosynthesis. En: Carotenoids, (DE.) Otto Isler Press. New York. p.p. 578-599.

\*Haard, N.F. (1988). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. Biotechnology letters 10(9):609-614.

\*Johnson, A.E., and Lewis, M.J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. Journal of general microbiology. 115:173-183.

\*Johnson E. A., Villa T. and Lewis J. (1980). *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in Salmon diets. Acuaculture, 20:123-124.

\*Johnson, E. A., Schreiber, D. and Hall, W., Yang, H., Geldiay T. (1991a). Processes for *in vivo* production of Astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* Yeast of enhanced Astaxanthin Content. US Patent Application, WO 91/02060.

\*Johnson, A. E., An, G. H. (1991b). Astaxanthin from microbial sources. Critical reviews in Biotechnology. 11(4):247-326.

\*Kurt Bernhard, (1990). Synthetic Astaxanthin. The route of a Carotenoid from research to commercialisation. En Carotenoids Chemistry and Biology. De por: Krinsky Y. Norman, Mathews M. Roth y Taylor F. Richard. Plenum Press (1990). pp. 337-364.

\*Katsuyama M., Hagi M. y Yamamoto (1993). Cosmetic Application of Astaxanthin. 10 th International Symposium on Carotenoids. Oslo Noruega.

\*Krinsky, I.N. (1987). Overview of carotenoids in medicine. 8th. International Symposium on Carotenoids in medicine. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. pp 42A.

\*Lewis, J.M., Ragon N., Berlant and Miranda M. (1990). Selection of Astaxanthin - Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -Ionone. Applied and Environmental Microbiology; Vol. 56, No.9:2944-2945.

\*Longo, E., Siero C. Velázquez J., Calo, P. Cansado J. and Villa T. (1992). Astaxanthin Production from *Phaffia rhodozyma*. BFE 9:565-567.

\*Loewus, F.A. (1958). Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Analytical Chemistry 24(1):219

\*Meyer P.S. and Du Preez J. C. (1994a). Astaxanthin Production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 10:178-183.



- \*Meyer, P.S., Du Preez, J.C. (1994b). Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. Appl Microbiol Biotechnol 40:780-785.
- \* Miller, M.W. (1984). *Phaffia*. In: The yeasts, a taxonomic study, Kreger - van Rij, N.J. W. (de), Third Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 890-892.
- \*Muller, R.K., Bernhard, K., Mayer, H., Ruttimann, A., and Vecchi, M. (1980). Beitrag zur analytik und synthese von 3-hydroxy-4-oxocarotinoiden. Helv. Chim. Acta, 63:1654.
- \*Nelis, H.J., De Leenheer A.P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. Journal of applied bacteriology, 70:181-191.
- \*Nelson, T.S. and N. Baptist, 1968. Feed pigments. The influence of feeding single and combined sources of red and yellow pigments on egg yolk color Poultry Sci. 47: 924-931
- \*Newsome, R.L. (1986). Food colors. En: Food technology. pp. 49-56.
- \*Ninet, L., Renaut J. (1979). Carotenoids. Microbial technology. 2d. De. vol. 1. De. Pepper, HJ and Perlman, D. New York Academic Press pp. 529-544.
- \*Okagbue, R.N. and Lewis, M. W. (1983). Mixed culture of *Bacillus circulans* WL - 12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast - wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. Biotechnology letters 5(11):731-736.
- \*Phaff, H.J. "Structure and Biosynthesis of the Yeast Cell Envelope", En: The Yeast, Rose A.H. and Harrison, Eds. Academic Press, London and New York, Vol. 2, pp. 135-270 (1971).

\*Prevatt, W. D.; Batelsville, Dickson, T. D.; Harris, R. L. (1991). Novel strains of *Phaffia rhodozyma* containing high levels of astaxanthin. European patent application 0438182.

\*Rosas S. R. (1993). "Efecto de Diversas Fuentes de Carbono sobre la Síntesis de Carotenoides en el Hongo *Dacrymyces deliquescens*". Tesis de Maestría. UNAM.

\*Santamaria, L. and Bianchi, A. (1987). Cancer chemoprevention by carotenoids in animal models and perspectives in human interventions. 8<sup>th</sup>. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. pp . 27-31.

\*Saval B. S. (1990). Desarrollo de un Proceso Fermentativo para la Producción de Estreptomina. Tesis de Doctorado. UNAM.

\*Schwart, R., Rosas, R.; Farrés, A.; Paredes, L. y Sánchez, S. (1989). Producción Microbiana de carotenoides y perspectivas de su utilización. Boletín de Educación Bioquímica 8:44-51.

\*Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety & Nutrition and the Committee on Public Information . (1980) Food Colors. Food Technology.

\*Soon Bai Chun, Jong Eon Chin, Gill - Hwan An. (1992). Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. FEMS Microbiology Letters 93:221-226.

\*Storebakken, T., Foss, P., Austreng, E. and Liaaen-Jensen, S.(1984). Carotenoids in diets for salmonids II. Epimerization studies with astaxanthin in Atlantic salmon, Aquaculture. 44:259

\*Tafoya A. y García F. (1993). Colorantes. En: Biotecnología Alimentaria, Ed. por: García Garibay, Quintero Ramírez y López Munguía, pp. 479-517. ED. Limusa Noriega Editores.

\*Vandame, J. E. (1992). Production of Vitamins, Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes. J. Chem. Tech. Biotechnol. 53:313-327.

\*Yobayashi Makio, Kakizono Toshihide and Nagai Shiro. (1991). Astaxanthin Production by a green alga, *Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 5:335-339.

## ANEXO

TABLA 1

VARIABILIDAD DE LA PRODUCCION DE CAROTENOIDES TOTALES EN UN MISMO EXPERIMENTO

MATRAZ	PRODUCCION DE CAROTENOIDES ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	1.28 + 0.83
2	1.28 + 0.14
3	1.26 + 0.7
4	1.28 + 0.04
5	1.31 + 0.06
Promedio	1.28
desviación estándar	0.081

**TABLA 2**

**VARIABILIDAD DE LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA EN UN MISMO EXPERIMENTO**

<b>MATRAZ</b>	<b>ASTAXANTINA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>1</b>	<b>0.90 + 0.5</b>
<b>2</b>	<b>0.70 + 0.07</b>
<b>3</b>	<b>0.60 + 0.4</b>

**TABLA 3**

**VARIABILIDAD DE LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA EN DOS EXPERIMENTOS**

<b>EXPERIMENTO</b>	<b>ASTAXANTINA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>1</b>	<b>0.73 + 0.15</b>
<b>2</b>	<b>0.74 + 0.14</b>

**TABLA 4****VARIABILIDAD DE CAROTENOIDES TOTALES EN DIFERENTES EXPERIMENTOS**

EXPERIMENTO	PRODUCCION DE CAROTENOIDES ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	1.8 $\pm$ 0.83
2	1.28 $\pm$ 0.14
3	1.26 $\pm$ 0.7
4	1.28 $\pm$ 0.04
5	1.31 $\pm$ 0.06
Promedio	1.28
desviación estándar	0.081