

1992-A

CODIGO: 083281731

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



BIBLIOTECA CENTRAL

ESTUDIO CINETICO DE DOS CEPAS DE *Rhodotorula glutinis*
CRECIDAS EN TRES DIFERENTES FUENTES DE CARBONO:
GLUCOSA, SACAROSA Y MELAZA DE CAÑA.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
YOLANDA ESCOBEDO IBARRA
GUADALAJARA, JALISCO. JULIO 1995



Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales
Biología

0715/95

C. YOLANDA ESCOBEDO IBARRA
P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTUDIO CINETICO DE DOS CEPAS DE Rhodotorula glutinis, CRECIDAS EN TRES DIFERENTES FUENTES DE CARBONO: GLUCOSA, SACAROSA Y MELAZA DE CAÑA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido - aceptado como Director de dicha tesis el M. en C. Fernando -- Antonio Peraza Luna.

C.U.C.B.A.



A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, 29 de Mayo de 1995
EL DIRECTOR

M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO

OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p.- M.C. Fernando Antonio Peraza Luna, Director de tesis.-pte.
c.c.p.- El expediente del alumno

AIR/SVM/ban*



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

GUADALAJARA, JALISCO, ABRIL 16 DE 1985.

C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE,
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES,
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E.

Distinguido Sr. Director:

Por este medio me permito conjoinar a Usted, que lo Reciente de Licenciatura en Biología YOLANDA ESCOBEDO IBARRA ha concluido satisfactoriamente el Proyecto de Tesis Titrado " ESTUDIO CINETICO DE DOBLEZA DE *Aspergillus glutus* CRECIDAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO (GLUCOSA, SACAROSA Y MELAZA DE CAÑA)", realizado en el Departamento de Microbiología y Fermentaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Asimismo, le informo que se revisó el manuscrito de la Tesis, encontrando que cumple con los requisitos establecidos por la División a su digno cargo, por lo cual lo presentamos a su atenta consideración.

Sin mas por el momento, aprovecho esta oportunidad para enviare un cordial saludo de su servidor.

ATENTAMENTE

M. en C. FERNANDO ANTONIO PERAZA LUNA.
INVESTIGADOR TITULAR 'A'.

SINODALES:

DR. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ

Q.F.B. MARGARITA BONILLA MORENO

BIOL. MARTHA CEDANO MALDONADO

**ESTUDIO CINETICO DE DOS CEPAS DE *Rhodotorula glutinis*
CRECIDAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO: GLUCOSA,
SACAROSA Y MELAZA DE CAÑA.**

Pasante de Biología: YOLANDA ESCOBEDO IBARRA

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL CENTRO
DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A. C. (CIATEJ)**

**EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y
FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE
BIOTECNOLOGIA, BAJO LA DIRECCION DE EL
M. en C. FERNANDO ANTONIO PERAZA LUNA**

DEDICATORIAS

A DIOS...

Por ser la Luz que me guía y acompaña en todos los momentos de mi vida. Gracias Señor por permitirme alcanzar esta meta siempre anhelada.

A MIS PADRES, ROBERTO Y ANA MARIA...

Gracias por haber inculcado en mí fortaleza, perseverancia, disciplina y sobre todo amor para lograr todos los proyectos que me he trazado.

Gracias por su paciencia, comprensión, apoyo y cariño. Hoy les dedico este trabajo con el mismo amor y respeto que siempre me han demostrado.

LOS QUIERO.

A MIS HERMANOS...

Rodolfo y Susana que con su ejemplo y cariño me han servido de guía para seguir siempre adelante.

Raúl y Edith, gracias por demostrarme su cariño y apoyo cuando más lo necesité.

A CESAR...

Por acompañarme y compartir conmigo los momentos agradables y difíciles de este trabajo, en los cuales no permitiste que desistiera en mi propósito. Y por ser con quién deseo compartir no sólo éstos sino todos los momentos de mi vida.

GRACIAS...

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO...

A mi director de tesis M. en C. Fernando Antonio Peraza Luna:

Por su amistad, dedicación, tiempo, guía y apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos:

Con quienes he compartido muchos de los momentos más agradables de mi vida. Gracias a todos, especialmente a Martina que me ha acompañado desde el inicio de este proyecto y siempre me ha demostrado cariño, comprensión y apoyo.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología:

Por su amistad, apoyo, conocimientos y comprensión a lo largo de la realización de este trabajo.

A CIATEJ:

Por permitirme lograr esta meta. Gracias por las facilidades prestadas para la elaboración de este proyecto.

INDICE

	Página
Indice de tablas	i
Indice de figuras	ii
Resumen	iii
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	6
III. JUSTIFICACION.	18
IV. HIPOTESIS.	19
V. OBJETIVOS.	20
VI. MATERIALES Y METODOS.	21
VII. RESULTADOS.	27
VIII. DISCUSION.	42
IX. CONCLUSIONES.	49
X. RECOMENDACIONES.	50
XI. FIGURAS.	51
XII. BIBLIOGRAFIA.	65

INDICE DE TABLAS**PAGINA**

Tabla No. 1	Dextrosa como fuente de carbono en procesos comerciales de importancia.....	11
Tabla No. 2	Efecto del control de pH sobre el crecimiento y producción de pigmento por <i>Rhodotorula glutinis</i> en agua de coco.....	12
Tabla No. 3	Contenido de beta-caroteno en algunas cepas de <i>Rhodotorula</i>	13
Tabla No. 4	Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de β -caroteno por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	14
Tabla No. 5	Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de <i>Rhodotorula glutinis</i>	15
Tabla No. 6	Determinación de peso seco de varias especies de <i>Rhodotorula</i>	16
Tabla No. 7	Parámetros de crecimiento de <i>Rhodotorula rubra</i> crecida en extracto de turba.....	17
Tabla No. 8	Formación de biomasa por <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033 y L-040 en medio con glucosa.....	35
Tabla No. 9	Formación de biomasa por <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033 y L-040 en medio con sacarosa.....	36
Tabla No. 10	Formación de biomasa por <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033 y L-040 en medio con melaza.....	37
Tabla No. 11	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento, pH y rendimiento global de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033.....	38
Tabla No. 12	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento, pH y rendimiento global de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040.....	39
Tabla No. 13	Análisis de varianza del coeficiente de rendimiento (Y x/s) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033.....	40
Tabla No. 14	Análisis de varianza del coeficiente de rendimiento (Y x/s) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040.....	41

INDICE DE FIGURAS

PAGINA

Figura 1	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con glucosa (30 g/l).....	5 1
Figura 2	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con glucosa (30 g/l).....	5 2
Figura 3	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con sacarosa (30 g/l).....	5 3
Figura 4	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con sacarosa (30 g/l).....	5 4
Figura 5	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con melaza (20 g/l).....	5 5
Figura 6	Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores (g/l) de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con melaza (20 g/l).....	5 6
Figura 7	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con glucosa (30 g/l).....	5 7
Figura 8	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con glucosa (30 g/l).....	5 8
Figura 9	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con sacarosa (30 g/l).....	5 9
Figura 10	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con sacarosa (30 g/l).....	6 0
Figura 11	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033. Medio con melaza (20 g/l).....	6 1
Figura 12	Cinética de crecimiento y pH de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040. Medio con melaza (20 g/l).....	6 2
Figura 13	Estimación de la velocidad de crecimiento de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-033, en los medios suplementados con glucosa ($\mu 1$), sacarosa ($\mu 2$) y melaza ($\mu 3$).....	6 3
Figura 14	Estimación de la velocidad de crecimiento de <i>Rhodotorula glutinis</i> L-040, en los medios suplementados con glucosa ($\mu 1$), sacarosa ($\mu 2$) y melaza ($\mu 3$).....	6 4

RESUMEN

El presente estudio especifica las condiciones en que se llevaron a cabo las cinéticas de crecimiento de las dos cepas de levadura, evaluando su rendimiento y determinando la influencia de la fuente de carbono sobre dichas cepas.

A nivel laboratorio, se comparó la velocidad de crecimiento de las cepas de *Rhodotorula glutinis* L-040 y *Rhodotorula glutinis* L-033, siendo ésta última la que presentó una velocidad mayor. Se utilizaron como fuentes de carbono glucosa, sacarosa y melaza de caña, observándose que la fuente de carbono que permitió un crecimiento con mayores rendimientos en biomasa celular fue la melaza de caña para ambas cepas.

Los resultados fueron procesados a través de un análisis de varianza lo que determinó que sí existen diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas cultivadas en los diferentes sustratos, los datos utilizados se obtuvieron de los resultados de los valores del coeficiente de conversión del sustrato ($Y_{x/s}$). Asimismo se determinó el consumo de azúcares reductores y los cambios de pH de cada muestra.

I. INTRODUCCION

La levadura aeróbica obligada *Rhodotorula glutinis* es conocida como una levadura típicamente oleaginosa, debido a que puede acumular grandes cantidades de lípidos. Es reconocida también como productora de pigmentos carotenoides. (1,4,6,12,16,18,20,21,23)

Los carotenoides son polienos y pertenecen a cuatro grupos principales:

1. Los carotenos, hidrocarburos carotenoides, (C₄₀H₅₆) que incluyen a los alfa-, beta- gama- carotenos y licopeno.
2. Las xantofilas, derivados oxi- e hidroxii- de los carotenos, que incluyen, entre otros, la criptoxantina y la luteína.
3. Los ésteres xantofílicos, ésteres de las xantofilas con ácidos grasos.
4. Los ácidos carotenoides, derivados carboxílicos de los carotenos.

Desde el punto de vista de la nutrición humana y animal, los pigmentos carotenoides no solo son importantes por ser precursores de vitamina A o como colorantes de alimentos, sino también por ser utilizados como antioxidantes, así como su posible actividad anticancerígena. Estos pigmentos se encuentran abundantemente en las plantas amarillas y en las verdes, junto a la clorofila. En vista de la importancia de estas actividades biológicas, son utilizados como suplementos alimenticios para prevenir deficiencias vitamínicas; son usados también para intensificar o modificar el color de grasas, aceites, queso y bebidas, así como también como suplemento de forraje animal intensificando el color de yemas de huevo y carne de pollo. En los últimos años se producen carotenoides puros por fermentación, que son sintetizados por varios microorganismos (entre ellos *Rhodotorula glutinis*), tales como β-caroteno, licopeno y xantofilas, los cuales son adicionados directamente al forraje animal. (2,6,10,12,13,16,23,26,29)

El β-caroteno puede obtenerse de los vegetales como la zanahoria, en los jugos de frutas como en el de la naranja, en los animales

como el pescado, o bien puede obtenerse por síntesis química con rendimientos apreciables. Por otro lado, la obtención del β -caroteno por vía microbiológica ha recibido una atención especial en los últimos años, utilizándose algas, hongos filamentosos, bacterias y levaduras. (15,16,17,18)

La formación de estos pigmentos es característica de varias especies de *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*. (6)

Según la clasificación de Stelling-Dekker con algunas modificaciones derivadas de la de Lodder y Van Rij (19), *Rhodotorula glutinis* se clasifica dentro de la familia de las Criptococaceas, que se caracteriza por la ausencia de todo medio de reproducción sexual. Esta familia se subdivide a su vez en tres subfamilias, que se distinguen por la formación de artrosporas y la presencia de pigmentos carotenoides en las células:

- I. Criptococoideas
- II. Tricosporoideas
- III. Rhodotoruloideas; perteneciendo a ésta el género *Rhodotorula* (35,38).

La presencia de pigmentos carotenoides es utilizada en la taxonomía de levaduras para diferenciar el género *Rhodotorula* de los géneros *Cryptococcus* y *Torulopsis* (36, 38).

1. SUSTRATOS.

Una gran variedad de materias primas son comúnmente utilizadas como nutrientes para la industria de la fermentación. Esta variedad aparte de las sustancias carbonadas y nitrogenadas tradicionales, incluye varios subproductos agrícolas e industriales y materiales de desecho, los cuales en muchos países no han sido considerados como sustratos.

Los sustratos para la industria fermentativa están clasificados acorde a su función predominante dentro de un medio nutritivo, contienen sustancias carbonadas, nitrogenadas, minerales y vitaminas. Por ejemplo, los carbohidratos actúan como fuentes de carbono, pero también proporcionan oxígeno e hidrógeno. Los medios complementados con materiales de desecho, tales como melazas o suero, adicionalmente

proporcionan nitrógeno, minerales y vitaminas.

Para el desarrollo de un medio complejo para la fermentación industrial es necesario considerar los siguientes criterios:

1. Requerimientos nutricionales específicos, seleccionados de acuerdo al microorganismo y procedimiento a seguir.

2. Composición exacta de nutrientes industriales, posibles modificaciones durante el almacenaje, y la influencia del procedimiento tecnológico empleado en su fabricación.

3. Propiedades de los nutrientes en condiciones de almacenamiento y manejo, así como su reacción como componente de un medio complejo, durante la preparación de éste (esterilización), fermentación y como producto aislado.

4. Costo de los nutrientes.

1.1. FUENTES DE CARBONO

A) MONOSACARIDOS

GLUCOSA. La glucosa es frecuentemente usada en fermentaciones realizadas para producir productos altamente purificados, especialmente donde las mezclas de sustrato contengan carbohidratos que pudieran requerir posteriores procesos económicamente ineficientes.

La glucosa se obtiene mediante algún proceso de hidrólisis enzimática de maíz o almidón de papa.

La dextrosa monohidratada es la forma más frecuentemente empleada de la glucosa. Es utilizada en la producción de antibióticos, esteroides, aminoácidos, ácido butírico, itatónico y tartárico, enzimas líticas de levaduras, goma xantánica y heteropolisacáridos. (Tabla No. 1)

B) DISACARIDOS

SACAROSA. La sacarosa pura ha sido el principal sustrato para escala industrial, en la producción de ácido cítrico en Inglaterra. El ácido láctico, también se ha producido con sacarosa pura; esto minimiza la

purificación del ácido láctico. Además, la sacarosa sirve como fuente de carbono en un medio nutritivo complejo para la producción de L-triptofano, alcaloides de centeno, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, L-lisina, clorotetraciclina y goma xantánica.

Por otro lado, la mayoría del uso de la sacarosa es en forma de melazas.

MELAZAS. Las melazas están entre los más importantes materiales crudos de la industria de la fermentación. Los procedimientos de extracción son por productos de remolacha de azúcar y caña de azúcar y son llamadas melazas de remolacha y caña, respectivamente.

Las melazas son el mayor material crudo empleado para la producción de levaduras para hornear, ácido cítrico, levaduras alimenticias, acetona/butanol, ácidos orgánicos y aminoácidos. Son incluso adicionadas como una fuente de carbono al medio nutritivo para la producción de antibióticos y enzimas.

Además de sacarosa, las melazas contienen los siguientes mono y oligosacáridos: glucosa, fructosa, rafinosa, fructosilacarosa y galactosil inositol.

Los componentes no azucarados, conforman alrededor del 30% de materia seca, están compuestos tanto por componentes orgánicos e inorgánicos, libres de nitrógeno y compuestos nitrogenados.

La conveniencia de las melazas para las fermentaciones industriales no pueden ser evaluadas de acuerdo a su origen y composición química. El único recurso efectivo para tal evaluación es la prueba biológica.

El tipo de melaza de mayor uso industrial son las de remolacha y caña de azúcar. Durante los últimos años la calidad de las melazas ha cambiado debido a la optimización de la tecnología de la extracción de remolacha de azúcar y a la fertilización más intensa y efectiva de las cosechas; estas consideraciones son válidas solamente en los países de Europa y en los Estados Unidos de América. En México se utiliza preferentemente la melaza de caña.

MELAZAS DE CAÑA DE AZUCAR. Son empleadas en fermentaciones industriales tanto las de refinera como melazas crudas de caña de azúcar.

Estas melazas se caracterizan por un alto contenido de azúcar invertido y biotina (vitamina B6) y algunos minerales. Las melazas crudas de caña de azúcar se utilizan como el principal material crudo para la producción de etanol, levaduras para hornear y para forraje, acetona y butanol. (32)

II. ANTECEDENTES

1. CULTIVO DE *Rhodotorula* EN DIFERENTES SUSTRATOS.

Cabello y col., 1986 (3), realizaron un estudio cinético del crecimiento y producción de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* L-022, cultivándola en agua de coco, bajo diferentes condiciones.

En la Tabla 2 se pueden apreciar los resultados obtenidos por estos autores, donde se observa que la producción máxima de biomasa (17.5 g/l) se obtuvo cuando el medio se suplementó con hidróxido de amonio al 15% y un pH de 5.5, notándose a la vez que bajo estas mismas condiciones se obtuvo una producción de 0.98 mg de carotenoides por litro.

Fromageot y Tchang en 1938, citado por Oura (32) observaron que en *Rhodotorula sannici* (ahora considerada sinónimo de *R. rubra*), el glicerol mostró ser efectivo en fomentar la carotenogénesis, pero fue menos efectivo que glucosa en *Rhodotorula sp.* 100, una cepa la cual produce principalmente β -caroteno.

Nakawa y Tatsumi en 1960, citado por Oura (32) observaron que el fenol, resorcinol y el ácido kójico estimularon la producción de β -caroteno en *Rhodotorula sp.* 100 en concentraciones apropiadas. El efecto del ácido kójico fue especialmente notable. Para otra cepa de *Rhodotorula rubra*, que creció con asparagina como fuente de nitrógeno, el glicerol estuvo lejos de ser la mejor fuente de carbono, debido a los altos porcentajes de torularhodina que se produjo, pero en sacarosa se obtuvieron los más altos porcentajes de toruleno, β -caroteno, γ -caroteno, y el mejor porcentaje total de caroteno bajo otras condiciones idénticas de crecimiento (32).

Aunque se obtuvieron los mejores porcentajes celulares con glucosa, esta fuente de carbono fue inferior a fructosa, glicerol y sacarosa en obtención de altos porcentajes de torularhodina y ϵ -caroteno, aunque el glicerol fue inferior a la glucosa en la producción de toruleno.

Los hidrocarburos de petróleo han sido usados como fuentes de carbono en especies de *Rhodotorula* (Nikolaev y col., 1966; Vaskimyok y Kvasnikov, 1968, citados por Oura) (32). Cepas de *R. glutinis*, *R. auriantica* y *R. mucilaginosa* fueron aisladas de manchas que contenían aceite. En medio mineral con parafinas líquidas como fuente de carbono, las últimas especies requirieron vitaminas para el buen crecimiento, *Rhodotorula glutinis* dio los mejores porcentajes y se acumuló alrededor de 360 μg de carotenoides por gramo de peso seco.

Benigni y col., en 1963, citado por Oura (32), mostraron que si los azúcares de melazas se reemplazaran por 10-20% de un homogeneizado de zanahoria, la producción de carotenos por *Rhodotorula* se incrementaría sustancialmente.

Similarmente, Vecher y col., en 1965, citado por Oura (32) encontraron que una cepa de *Rhodotorula gracilis* produjo altos contenidos carotenoides cuando creció en jugo de zanahoria depigmentizado sin adicionar sales minerales. Bajo esas condiciones 97% de los pigmentos consistieron en β -caroteno. En medios con otros extractos vegetales el contenido total de carotenoides, tanto como el porcentaje de β -caroteno fue más bajo.

Medrano, Ruiz y Magaña en 1969 (25), realizaron un estudio sobre la producción de beta-caroteno por algunas especies de *Rhodotorula* en el cual obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3, donde se puede apreciar que la máxima producción de carotenoides se obtuvo con *Rhodotorula mucilaginosa* (L-35) con 2.05 mg/100 ml, mientras que los más bajos se observaron cuando cultivaron *Rhodotorula glutinis* (L-32) con 0.06 mg de caroteno /100 ml de medio de cultivo.

En experimentos posteriores los autores eligieron la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* por ser de la cual se obtuvo mayor producción de caroteno y con esta misma se realizaron estudios para observar el efecto de la fuente de carbono sobre dicha cepa.

En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos en la producción de caroteno cuando se emplearon diversas fuentes de carbono en

el medio de cultivo. Los mejores rendimientos de caroteno se obtuvieron cuando se empleó glucosa Q. P.. En posteriores experimentos en los cuales se usó glucosa comercial purificada se logró obtener igual rendimiento al obtenido con glucosa Q. P.

Johnson Von y col., en 1992 (16), realizaron un estudio para evaluar la producción de bioemulsificantes por *Rhodotorula glutinis* IIP-30, estimándose también el rendimiento en biomasa.

Los resultados obtenidos fueron de 20 g/l de biomasa en un tiempo de 120 horas con un consumo casi total de los azúcares.

Se analizó también el efecto de diversas fuente de nitrógeno sobre el crecimiento, lográndose 25 g/l de peso seco al adicionarse al medio nitrato de potasio en un periodo de cultivo de 120 horas.

Paparaskevas y col., en 1992 (34) estimaron la posible optimización de producción de lipasa extracelular obtenida de *Rhodotorula glutinis*. En la Tabla 5 se muestra el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento. En esta misma tabla se puede observar que los carbohidratos con los cuales se obtuvo un rendimiento mayor fueron el almidón y el suero con 4.5 y 4.9 mg/ml, respectivamente. En cuanto a los lípidos utilizados como fuente de carbono los más aptos para obtener un peso seco mayor fueron el aceite de pescado y la troleína con 14.0 y 13.1 mg/ml, respectivamente.

Peterson W. J. y col., 1958 (37), realizaron una determinación cuantitativa de los carotenoides en levaduras del género *Rhodotorula*, en el cual también se realizó la evaluación del crecimiento de diversas especies de levaduras pertenecientes a este género. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Como se puede observar en la Tabla 6, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula pallida* y *Rhodotorula mucilaginosa* fueron las especies que presentaron mayor crecimiento, obteniéndose 7.181, 6.755 y 5.943 g/l, respectivamente.

Costa I. y cols., en 1987 (5), realizaron una evaluación de la producción de β -caroteno por una cepa de *Rhodotorula*, utilizando glucosa (20 g/l) como fuente de carbono. Estos autores obtuvieron un máximo de 11.7 g/l

de biomasa seca a las 48 horas de cultivo en condiciones controladas, y un crecimiento idéntico en condiciones no proliferativas (sometida a agitación en agua destilada).

Los resultados promedio muestran que la producción de β -caroteno no cambia mucho cuando las células son mantenidas en la fase estacionaria de crecimiento o en condiciones no proliferativas en buffer o sustratos azucarados. La biomasa permanece de color rosa. Sin embargo, cuando las células incoloras o escasamente coloreadas fueron transferidas y sometidas a agitación durante 24 horas en agua destilada empezaron a pigmentar de naranja a amarillo y la concentración de β -caroteno se incrementó de 4.2 a 4.8 veces.

Granger L. M. y cols., 1993 (12) evaluaron el efecto de varias limitantes de nutrientes en la producción de ácidos grasos por *Rhodotorula glutinis*. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron pH de 5.5, temperatura 30°C y glucosa (20 g/l) como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en biomasa al final de la fase de crecimiento exponencial al limitar ciertos elementos como el carbono y el zinc fueron de 11.2 y 9.1 g/l, respectivamente.

Aunque los diversos niveles de concentración de biomasa obtenidos al final de la fase exponencial de crecimiento mostraron que solo las limitaciones de hierro y nitrógeno estuvieron relativamente bien controladas, mientras que en los otros medios la disminución del crecimiento ocurrió a concentraciones de biomasa mucho más altas de 1.5 g/l.

Martin M. y cols., en 1993 (23) realizaron un estudio de parámetros de crecimiento para la levadura *Rhodotorula rubra* crecida en extracto de turba. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: Concentración de carbohidratos, efecto del pH, efecto del tiempo de cultivo, efecto de la temperatura y efecto de la velocidad de agitación.

En relación a la concentración de carbohidratos se observó que a una concentración de 15.0 g/l se obtuvo una producción de biomasa mayor (4.35 g/l), mientras que de los valores de pH evaluados se aprecia que a un pH de 5.5 se logró una producción mayor de biomasa seca con 5.0 g/l (Tabla

7).

Con respecto al tiempo de cultivo se observó que los mejores resultados se obtuvieron a los 3 días y medio con 4.8 g/l , la temperatura ideal fue de 22°C (4.8 g/l), mientras que la velocidad de agitación óptima fue de 200 rpm (7 g) con 4.8 g/l de biomasa seca (Tabla 7).

Tabla 1.- DEXTROSA COMO FUENTE DE CARBONO EN PROCESOS COMERCIALES DE IMPORTANCIA.

PRODUCTO	MICROORGANISMOS
Antibiótico U 60.394	<i>Streptomyces wolensis</i>
Lysolipina	<i>Streptomyces violaceoniger</i>
Cephalosporina	<i>Streptomyces rochii</i>
Daunorubicina	<i>Streptomyces sp.</i>
Derivados de Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>
Esteroides	<i>Micobacterium fortuitum</i>
	<i>Micobacterium sp.</i>
Acido Butírico	<i>Clostridium butyricum</i>
Acido Itacónico	<i>Aspergillus terreus</i>
Acido tartárico	<i>Gluconobacter suboxydans</i>
Goma xantánica	<i>Xanthomonas sp.</i>
Heteropolisacáridos	<i>Alcaligenes sp.</i>
D-Biotina	<i>Sporobolomyces carniocolor</i>
Enzimas líticas de levaduras	<i>Cytophaga sp.</i>

Oura, E., 1983 (32)



TABLA 2.- EFECTO DEL CONTROL DE pH SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PIGMENTO POR *Rhodotorula glutinis* EN AGUA DE COCO.

Parámetro	NH ₄ OH 15% (pH 5.5)	NaOH 6% (pH 5.5)	Sin control (pH 5.5-6.0)
S_o	96.5	78.0	72.0
S_f	18.5	25.5	5.0
X	17.5	14.5	15.2
P	112.5	19.8	45.2
Y_{x/s}	0.21	0.29	0.22
Y_{p/s}	1.410	0.358	0.646
Y_{p/x}	6.71	1.96	2.86
P_m	0.98	0.135	0.50
μ	0.086	0.066	n.c.

S_o: Concentración inicial de azúcares (g / l)

S_f: Concentración final de azúcares (g / l)

X: Biomasa (g / l)

P: Producción de carotenoides (mg / l)

Y_{x/s}: Coeficiente global de rendimiento (g biomasa / g subst. consumido)

Y_{p/s}: Coeficiente global de rendimiento (mg producto / g subst. consumido)

Y_{p/x}: Coeficiente global de rendimiento (mg producto / g biomasa)

P_m: Productividad máxima de carotenoides (mg / l)

μ: Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

n.c.: No calculada.

Cabello, Castro, Jiménez y Bautista, 1986. (3)

TABLA 3.- CONTENIDO DE B-CAROTENO EN ALGUNAS CEPAS DE *Rhodotorula*.

C E P A	mg de caroteno/100ml de medio de cultivo
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L-35)	2.05
<i>Rhodotorula sp.</i> (L-3)	0.49
<i>Rhodotorula sp.</i> (L-7)	1.98
<i>Rhodotorula glutinis</i> (L-022)	1.03
<i>Rhodotorula glutinis</i> (L-32)	0.06
<i>Rhodotorula rubra</i> (L-20)	0.66
<i>Rhodotorula minuta</i> (L-47)	0.40
<i>Rhodotorula minuta</i> (L-48)	0.66

Medrano Hiram, J. Ruiz Herrera e Ignacio Magaña Plaza, 1969. (25)

TABLA 4.- EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE β -CAROTENO POR *Rhodotorula mucilaginosa*.

Fuente de carbono (10% expresado como glucosa)	mg de caroteno/100ml de medio de cultivo
Melazas de caña clarificadas	0.10
Melazas de caña sin clarificar	0.99
Melazas de maíz	1.23
Sacarosa comercial	0.30
Glucosa comercial	0.40
Glucosa Q.P.	1.52

Medrano Hiram, J. Ruiz Herrera e Ignacio Magaña Herrera, 1969. (25)

**TABLA No. 5.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL
CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis*.**

FUENTE DE CARBONO 1% (peso/vol)	PESO SECO (mg/ml)
CARBOHIDRATOS	
Fructosa	2.7
Galactosa	3.0
Glucosa	3.3
Lactosa	3.0
Maltosa	3.1
Rafinosa	3.7
Almidón	4.5
Sacarosa	2.3
Suero*	4.9
Xylosa	3.0
LIPIDOS	
Aceite de maíz	5.1
Aceite de algodón	5.8
Aceite de pescado	14.0
Aceite de oliva	7.3
Aceite de palma	2.9
Aceite de soya	4.0
Aceite de girasol	4.0
Troleína	13.1

*Ajustado a un equivalente del 2% de lactosa

Papaparaskevas D. y cols., 1992 (34)

Tabla 6.- DETERMINACION DE PESO SECO DE VARIAS ESPECIES DE Rhodotorula.

ESPECIES	PESO SECO (g/l)
<u>R. mucilaginosa</u>	5.943
<u>R. glutinis</u>	4.481
<u>R. glutinis var. rubescens</u>	2.346
<u>R. rubra</u>	3.806
<u>R. pallida</u>	6.755
<u>R. minuta</u>	7.181
<u>R. aurantiaca</u>	3.909
<u>R. flava</u>	4.919

Peterson W.J. y cols. 1958 (37)

TABLA No. 7.- PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE *Rhodotorula rubra* CRECIDA EN EXTRACTO DE TURBA.

PARAMETROS	BIOMASA SECA (g/l)
-CONCENTRACION TOTAL DE CARBOHIDRATOS (g/l).	
12.0	4.17 ± 0.30
15.0	4.35 ± 0.10
18.0	3.19 ± 0.21
-pH.	
4.0	3.30
4.5	4.3
5.0	4.8
5.5	5.0
6.0	4.3
-TIEMPO.	
2.5	3.0
3.0	4.2
3.5	4.8
4.0	4.5
5.0	4.2
-TEMPERATURA.	
18°C	2.3
20°C	2.5
22°C	4.8
24°C	3.3
26°C	3.0
-VELOCIDAD DE AGITACION (rpm).	
150	2.8
200	4.8
250	4.5
300	3.8

Martin M. y cols., 1993. (23)

III. JUSTIFICACION

Los carotenoides proporcionan un color atractivo en los productos en que se utilizan, los carotenoides también tienen importantes funciones metabólicas en los animales y en el hombre, incluyendo la conversión a vitamina A, elevación de la respuesta inmune, y la protección en contra de enfermedades tales como el cáncer.

Por estas últimas propiedades, la demanda del β -caroteno en el mercado se ha incrementado notablemente y como esta demanda no será satisfecha totalmente por la síntesis química, se ha buscado sintetizarlo por vía biológica, ya que el β -caroteno producido es soluble y más fácilmente absorbido en los organismos que el sintético.

Se pronostica que para el año 2000, el mercado de β -caroteno utilizado en forma nutricional y en cosméticos, casi igualará al sintético, y en cuanto a su uso como colorante alimenticio constituirá casi la mitad de este último.

Recientemente, ha sido considerado de interés comercial el uso de levaduras tales como *Rhodotorula glutinis* como fuente de pigmentos carotenoides, específicamente β -caroteno. El β -caroteno es un pigmento liposoluble que varía de amarillo a naranja, se encuentra presente en flores, frutas, raíces de plantas, así como en hongos y bacterias.

Debido a lo anterior nos parece importante conocer las condiciones óptimas de crecimiento de *Rhodotorula glutinis* para su posible utilización industrial, proporcionando así, una fuente natural de pigmentos. (4,10,13,16,18)

Actualmente el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del estado de Jalisco (CIATEJ) está desarrollando un proyecto de investigación con las cepas L-033 y L-040 de *Rhodotorula glutinis*, realizándose estudios con el fin de un mejoramiento genético. Este proyecto incluye, a la vez, el conocimiento de las condiciones de crecimiento que propicien un mejor desarrollo de este microorganismo, para su posible utilización en la industria farmacéutica, así como para consumo animal.

IV. HIPOTESIS

La fuente de carbono más asimilable (glucosa) permitirá obtener un crecimiento con mayor rendimiento en masa celular (g/l) de *Rhodotorula glutinis* (L-040) y *Rhodotorula glutinis* (L-033), y éste decrecerá proporcionalmente con sacarosa y melaza, respectivamente.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la fuente de carbono (glucosa, sacarosa y melaza de caña) en el crecimiento y la producción de β -caroteno en *Rhodotorula glutinis* (L-040) y *Rhodotorula glutinis* (L-033).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Analizar el consumo de azúcares reductores libres en cada una de las muestras para determinar su relación con el crecimiento de las cepas *Rhodotorula glutinis* L-033 y *Rhodotorula glutinis* L-040.
- 2.- Evaluar cada una de las fuentes de carbono, y determinar estadísticamente, cual es la más significativa.
- 3.- Determinar por medio de un análisis estadístico, la diferencia en el crecimiento de las cepas *Rhodotorula glutinis* L-033 y *Rhodotorula glutinis* L-040 en los diferentes medios a utilizar.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. MICROORGANISMOS.

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas:

- * *Rhodotorula glutinis* BCGC L-040
- * *Rhodotorula glutinis* BCGC L-033

obtenidas de la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A.C. CIATEJ.

2. EQUIPO.

- Orbital rotatorio. New Brunswick G25
- Espectrofotómetro. Perkin Elmer Lamda 2 . Mod. 0352
- Balanza analítica. Ohaus GA200
- Balanza electrónica. Chyo JP-5000
- Estufa de incubación. Felisa. Mod. 133
- Centrífuga. Ecosa
- Potenciómetro. Beckman 50 pHmeter
- Agitador magnético. Felisa Fisherbrand 12-810
- Micropipeta. Gilson
- Autoclave. Infra. Mod. 0491
- Parrilla de calentamiento. Corning-Stirrer 260-0
- Termobañó. Felisa L-0210
- Horno. Felisa

- Campana de flujo laminar. Veco Mod. 17928
- Termómetro

3. MEDIOS.

A. Medio de Conservación.

Para la conservación de las cepas en placa se utilizó el "Medio rico para levaduras", que tiene la siguiente composición:

- Cloruro de Sodio (NaCl)	10.00 g/l
- Sacarosa	20.00 g/l
- Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	0.084 g/l
- Extracto de levadura	10.00 g/l
- Agar- agar	15.00 g/l

El medio se esterilizó por calor húmedo durante 15 minutos a 120°C.

B. Medios de propagación.

Se utilizaron 3 medios de propagación, variando la fuente de carbono: glucosa, sacarosa y melaza de caña clarificada.

MEDIO CON GLUCOSA:

- Glucosa	30 g/l
- Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
- Fosfato de amonio dibásico (NH ₄)HPO ₄	5 g/l
- Extracto de levadura	2 g/l
- Agua destilada	1000 ml
- Agar-agar	15 g/l

MEDIO CON SACAROSA:

- Sacarosa	30 g/l
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l
- Fosfato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5 g/l
- Extracto de levadura	2 g/l
- Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5 g/l
- Agar- agar	15 g/l
- Agua destilada	1000 ml

MEDIO CON MELAZA DE CAÑA:

- Melaza clarificada (300 g AR/L)	66.666 ml
- Fosfato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.5 g/l
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 g/l
- Extracto de levadura	2.0 g/l
- Agua destilada	933.33 ml
- Agar- agar	15.0 g/l

C. Medios líquidos para cinéticas.

Se utilizaron 3 medios para las cinéticas de crecimiento variando la fuente de carbono: glucosa, sacarosa y melaza de caña, respectivamente, los cuales tenían la misma composición de los medios de propagación (medio sólido), con la diferencia de que a estos no se les adicionó agar-agar.

4. TECNICAS ANALITICAS.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las cinéticas de crecimiento se evaluaron mediante el análisis de los siguientes parámetros:

A) pH. Se empleó un potenciómetro digital, para medir las unidades potenciométricas que nos expresaron valores de pH de la muestra.

B) Técnica para determinar azúcares reductores libres por el método DNS (Acido dinitrosalicílico).

Los reactivos utilizados son:

- Hidróxido de sodio (NaOH)	10.0 g/l
- Acido 3,5 dinitrosalicílico DNS ($C_7H_4N_2O_7$)	10.0 g/l
- Tartrato de sodio y potasio ($C_4H_4KNaO_6$)	200.0 g/l
- Metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$)	0.5 g/l
- Fenol	2.0 g/l

Se mezclaron uno a uno en ese orden y posteriormente la solución se aforó a 1000 ml.

PROCEDIMIENTO:

A 0.5 ml de muestra se agregó 1.5 ml de solución de DNS, se agitó y se puso a baño maría a punto de ebullición durante 10 minutos. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadió 8 ml de agua destilada. Se agitó y se leyó la absorbancia a 550 nm. (27)

C) Determinación de peso seco.

PROCEDIMIENTO:

El método consiste en centrifugar 10 ml del medio a 3000 rpm (1530 g) durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender las células sedimentadas en agua destilada. Se repite esta operación de lavado dos veces más. La masa celular sedimentada se seca en una estufa de aire a 80°C durante 24 horas.

5. METODOLOGIA.

a) Estandarización de técnicas analíticas.

-CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES LIBRES.

Se obtuvo una curva por medio de la técnica DNS utilizando una solución patrón de dextrosa anhidra a una concentración de 1 g/l; el rango de concentración a probar fue de 0.1 a 1 g/l. Se realizó el análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación de la curva, usada para conocer la concentración de azúcares reductores libres en cada muestra.

b) CINETICAS DE CRECIMIENTO.

Una vez crecidas las cepas *Rhodotorula glutinis* L-033 y *Rhodotorula glutinis* L-040 en cajas de petri (medio de conservación), se resembraron en 8 tubos de medio sólido de glucosa, sacarosa y melaza de caña (medio de propagación) con un total de 4 tubos de medio para cada cepa; se incubaron por 72 hrs a una temperatura de 30°C. A cada tubo se le añadió 5 ml de NaCl (85% p/v) para obtener una suspensión. Posteriormente, se inocularon dos matraces de 500 ml que contenían medio líquido con cada una de las fuentes de carbono diferentes; los matraces inoculados contenían 90 ml de medio y 10 ml de la suspensión. Se inocularon un total de 2 matraces de cada medio por cepa. Dichos matraces se colocaron en un orbital a una temperatura de 30°C, a 300 rpm durante 72 hrs. Se tomaron muestras de 5 ml cada 12 hrs para determinar la cantidad de azúcares reductores libres, medición de pH y determinación de peso seco de cada muestra. Para cada una de las cepas y medio se siguió el mismo procedimiento.

c) MEDICION DE PARAMETROS.

Velocidad de crecimiento (μ).- Se determinó mediante una regresión lineal del logaritmo natural de los datos ($\ln X$) respecto al tiempo (t). (41)

$$\mu = \ln X_0 / X$$

Tiempo de duplicación (t_d).- Se obtuvo de la división del logaritmo natural de 2 entre la velocidad de crecimiento (μ). (41)

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

Coefficiente de conversión del sustrato (Y x/s).-

$$Y \text{ x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S}$$

Siendo X_f la concentración final de biomasa, X_0 la concentración inicial de biomasa, S_0 la concentración inicial del sustrato y S la concentración residual, casi siempre vecina a 0 y despreciable con respecto a S_0 . (41)

d) ANALISIS ESTADISTICO.

Prueba Análisis de Varianza. Se realizó una análisis de varianza (Prueba ANOVA de una vía) en un programa de cómputo llamado "Statgraph", el cual analiza si existe diferencias significativas en la media de los resultados.

VII. RESULTADOS

1. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033 Y L-040.

A. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON GLUCOSA DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

Con el fin de evaluar las distintas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y melaza) sobre el crecimiento de las cepas *R. glutinis* L-033 y L-040, se realizaron cinéticas durante 72 h.

La cepa L-033 tuvo una $\mu = 0.051 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 13 horas con 59 minutos (Fig.13). Respecto al crecimiento celular la máxima formación de biomasa se observó a las 48 h con 7.88 g/l alcanzándose en este mismo tiempo, la fase estacionaria del cultivo y terminando la cinética a las 72 h con un peso celular de 7.80 g/l (Tabla 6). También se notó que la fase de adaptación de la misma fue casi inapreciable y la fase logarítmica se alcanzó desde la primeras horas de la corrida hasta un periodo de 48 horas (Fig. 1).

Cinética de consumo de azúcares de la cepa L-033 .- En la Figura 1 se observa la cinética de consumo de azúcar, como se puede apreciar, éste es directamente proporcional al crecimiento de la levadura. Estos azúcares decrecieron de 32.415 g/l a 2.877 g/l a la hora 72, también, se observó que a partir de las 48 h la velocidad de consumo disminuyó considerablemente en el medio, esto debido, como se mencionó anteriormente, a la relación existente entre el consumo del sustrato y el crecimiento de la levadura.

Efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa L-033.- Paralelamente a la determinación del crecimiento y de los azúcares se cuantificó la variación

del pH durante la cinética. El pH mostró una progresiva disminución hasta alcanzar valores de 3.77 a las 48 h. Sin embargo se observó un ligero aumento del pH entre las 48 y 72 h hasta finalizar la cinética con un pH de 4.48. El crecimiento alcanzó su fase estacionaria a las 30 h. (Fig. 7)

B. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON GLUCOSA DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

En la Figura 14 se puede apreciar que la cepa L-040 presentó una $\mu = 0.029 \text{ h}^{-1}$, más baja que la cepa L-033 con un tiempo de duplicación de 24 horas con 30 minutos, esto debido a que el crecimiento celular fue muy irregular; en la Figura 2 se observa este hecho más notoriamente, apreciándose también que a partir de la hora 0 hasta la 12 se observó una fase de arranque del microorganismo, a la vez puede notarse que presentó una fase estacionaria de las 12 a las 48 horas e iniciando en este mismo periodo una fase logarítmica hasta las 72 horas. Con relación al crecimiento celular se apreció un aumento relativamente bajo en comparación con la cepa L-033, ya con esta cepa solo se lograron obtener 3.24 g/l al final de la cinética (Tabla 6).

Cinética de consumo de azúcares reductores de la cepa L-040.- Se puede notar en la Figura 2 que el consumo del sustrato decreció en menor cantidad que en la cepa L-033, de 30.725 g/l al inicio de la cinética a 10.387 g/l a las 72 horas, no llegando por consiguiente al agotamiento de la fuente de carbono, esto tal vez se debió al crecimiento poco común de la levadura.

Efecto del pH sobre el crecimiento sobre la cepa L-040.- Las fluctuaciones en los valores de pH para *Rhodotorula glutinis* L-040 fueron muy parecidas a las ocurridas con la cepa L-033; se notaron cambios que fueron de 6.01 a 4.68 al término de la corrida, observándose a la vez un valor mínimo de 3.77 a la hora 48, esto tal vez relacionado con el hecho de que en este mismo tiempo se inició la fase logarítmica de la levadura.

C. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON SACAROSA DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

Utilizando sacarosa como fuente de carbono la cepa L-033 presentó una $\mu = 0.038 \text{ h}^{-1}$, menor que la velocidad obtenida por esta misma cepa pero en medio con glucosa, y un tiempo de duplicación de 18 horas con 24 minutos (Fig. 13). El peso seco celular máximo obtenido por esta cepa fue de 9.26 g/l al final de la cinética (Tabla No.7).

En la Figura 3 se puede apreciar el comportamiento de *Rhodotorula glutinis* L-033 en este medio donde se observa una fase de adaptación casi inapreciable y una fase logarítmica que duró casi al final de la cinética, a partir de la hora 48 a la 72 no se observaron aumentos muy notorios de peso.

Cinética de consumo de azúcares reductores por la cepa L-033.-

La concentración de azúcares en medio varió de 26.468 g/l al inicio de la cinética a 11.184 g/l a las 72 horas, en la Figura 3 se pueden observar estos cambios, notándose también, que a las 24 horas hubo un incremento notable (30.19 g/l) de los azúcares reductores presentes en el medio esto debido a la hidrólisis de la sacarosa por el microorganismo.

Efecto del pH sobre el crecimiento por la cepa L-033.- Los valores de pH fluctuaron de 6.88 a 3.93 al término de la corrida, se observó además, que de las 0 a las 12 horas estos valores sólo variaron de 6.88 a 6.84 (Fig. 9).

D. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON SACAROSA DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

Con esta cepa se puede observar una velocidad de crecimiento de $\mu = 0.018 \text{ h}^{-1}$, menor que la obtenida por esta misma cepa en medio con glucosa y a la vez más baja que la alcanzada por la cepa L-033 en este mismo medio. *Rhodotorula glutinis* L-040 en medio con sacarosa presentó un tiempo de duplicación de 38 horas con 51 minutos (Fig. 14).

En la Figura 4 se observa el comportamiento de la cepa L-040, notándose un decremento celular de las 0 a las 12 horas y a partir de ésta se inicia la fase logarítmica hasta las 48 horas; se advierte también que desde las 60 horas la levadura empieza su fase de declinación aparentemente sin presentar fase estacionaria.

Con respecto al peso celular obtenido se observó un máximo a las 60 horas de 1.48 g/l y terminando la cinética con 1.36 g/l (Tabla 7).

Cinética de consumo de azúcares reductores por la cepa L-040.- Al principio de la cinética se observó una concentración de 15.462 g/l el cual fue decreciendo, al igual que en la cepa L-033 en este mismo medio, un aumento a las 24 horas de 20.41 g/l, no llegando a un agotamiento de la fuente de carbono al final del estudio, obteniéndose 6.21 g/l. En este punto también se notó que el consumo del sustrato no siempre se relaciona con el crecimiento del microorganismo ya que *Rhodotorula glutinis* L-040 en medio con sacarosa no cumplió con el desarrollo esperado. (Fig. 4)

Efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa L-040.- En la Figura 10 se observa el decremento en los valores de pH del medio para esta cepa. Puede notarse también un comportamiento parecido al de la cepa L-033 en este mismo medio. Los valores fluctuaron de 6.73 al inicio de la cinética a 2.61 al final de la misma.

E. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON MELAZA DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

En la Figura 5 se puede observar el crecimiento de esta cepa, se aprecia a la vez que ésta presentó un buen crecimiento, posteriormente se obtuvo un total en biomasa de 10.52 g/l un poco más alto que el obtenido por esta misma cepa en medio con glucosa (7.88) y sacarosa (9.26); partiendo de un peso de 1.24 g/l a las 0 horas. (Tabla 8)

En este estudio se observó también que la levadura presentó una fase de arranque casi inapreciable, una fase logarítmica de las 0 a las 36

horas y una fase estacionaria que permaneció hasta el final de la cinética. (Fig. 5). En relación a la velocidad de crecimiento se obtuvo una $\mu = 0.078 \text{ h}^{-1}$ la mas alta observada en todos los medios y para ambas cepas, con un tiempo de duplicación de 9 horas con 29 minutos siendo éste a la vez el menor alcanzado. (Fig. 13)

Cinética de consumo de azúcares reductores por la cepa L-033.- Se observó un consumo normal del sustrato que varió de 18.358 g/l a las 0 horas y casi llegando a un agotamiento de la fuente de carbono a las 72 horas con 3.167 g/l, notándose también que a partir de las 60 horas hubo muy poco consumo de la misma. (Fig. 5)

Efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa L-033.- Como se puede notar en la Figura 11, los valores de pH decrecieron conforme avanzó el tiempo, observándose una variación de 6.60 a las 0 horas hasta 2.75 a las 60 horas, se observó a la vez un ligero aumento al final de la cinética donde se obtuvo un valor de 2.83.

E. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON MELAZA DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

Como se mencionó anteriormente, este fue el medio donde se observó un crecimiento mayor, tanto para *Rhodotorula glutinis* L-033, así como para L-040. En la Figura 6 se puede apreciar este hecho con más facilidad, a la vez se observan algunas de las fases de crecimiento del microorganismo: a) una fase de arranque casi imperceptible, b) fase logarítmica que duró de las 0 a las 60 horas y c) fase estacionaria en inicio (de las 60 a las 72 horas). El comportamiento fue muy similar en ambas cepas en este medio, obteniéndose una biomasa total a las 72 horas de 9.52 g/l, el más alto alcanzado por esta misma cepa en los tres medios, partiendo de 1.56 g/l al inicio de la cinética (Tabla 8).

En la Figura 14 se realizó la estimación de la velocidad de

crecimiento, obteniéndose una $\mu = 0.034 \text{ h}^{-1}$, la más alta para la cepa L-040 en cualquiera de los medios y un tiempo de duplicación de 20 horas con 39 minutos, siendo también el más bajo alcanzado.

Cinética de consumo de azúcares reductores por la cepa L-040.- En relación al consumo del sustrato se observó un decremento similar al obtenido por la cepa L-033, este decremento fue de 19.904 g/l a 3.049 g/l a las 72 horas, llegando casi al agotamiento del mismo. (Fig. 6)

Efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa L-040.- Los valores de pH fluctuaron de 6.68 a 4.20, obteniéndose puntos más altos que los obtenidos por la cepa L-033 al final de la cinética. (Fig. 12)

2. ANALISIS ESTADISTICO.

A. ANALISIS DE VARIANZA DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y x/s) DE *Rhodotorula glutinis* L-033 EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

En la Tabla 11 se observa la ANOVA obtenida con el análisis de varianza realizado con los valores del coeficiente de rendimiento (Y x/s) alcanzados por *Rhodotorula glutinis* L-033 en los tres diferentes medios.

Este tipo de análisis se realizó para determinar si existen diferencias significativas en la relación crecimiento/sustrato consumido obtenida en cada uno de los medios estudiados.

Al analizar la tabla, se constata lo observado en las gráficas de crecimiento contra consumo de sustrato, asegurando que en realidad existen diferencias notables entre ellas. Esta tabla muestra a la vez, que el valor obtenido con los resultados (F calculada = 20.684) es mayor que el obtenido en las tablas (F tabulada = 4.26); por lo tanto se rechaza la hipótesis nula: "la media obtenida de los valores Y x/s es igual para cada uno de los medios".

Ho: $M_1 = M_2 = M_3$. siendo M_1 : Media de los valores Y x/s (medio con

glucosa).

M_2 : Media de los valores Y x/s (medio con sacarosa).

M_3 : Media de los valores Y x/s (medio con melaza).

Se acepta la hipótesis alterna: "la media obtenida de los valores Y x/s es diferente en cada uno de los tres medios".

Ha: $M_1 \neq M_2 \neq M_3$, ya que la F calculada $>$ que la F tabulada.

Estos datos corroboran lo observado en las cinéticas, ya que la media mayor fue la obtenida en el medio con melaza (M_3), considerándose éste, como el mejor para el desarrollo de *Rhodotorula glutinis* L-033.

B. Análisis de varianza del Coeficiente de rendimiento (Y x/s) de *Rhodotorula glutinis* L-040 EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

En la Tabla 12 se muestran los resultados logrados en el análisis de varianza del coeficiente de rendimiento (Y x/s) alcanzados por esta cepa, exhibe a la vez, que el valor obtenido de los resultados (F calculada = 290.891) es mayor que el que se muestra en las tablas (F tabulada = 4.26), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula: "la media de los valores Y x/s de *Rhodotorula glutinis* L-040 es igual en los tres medios".

Ho: $M_1 = M_2 = M_3$, siendo M_1 : Media de los valores Y x/s (medio con glucosa).

M_2 : Media de los valores Y x/s (medio con sacarosa).

M_3 : Media de los valores Y x/s (medio con melaza).

Se acepta la hipótesis alterna: "la media obtenida de los valores Y

x/s es diferente para cada uno de los medios".

Ha: $M_1 \neq M_2 \neq M_3$, ya que la F calculada > que la F tabulada.

Esto ratifica lo observado en las gráficas de crecimiento contra consumo de sustrato, corroborándose que el mejor medio para el desarrollo de ambas cepas de *Rhodotorula glutinis* fue el que contenía melaza como fuente de carbono (M_3).

C. COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040.

Para la comparación de las dos cepas, se utilizó el Método de prueba sobre dos medias poblacionales (Prueba de T). Este análisis se realizó con los valores del coeficiente de conversión del sustrato ($Y x/s$). Los resultados obtenidos en esta prueba, ratifican lo observado en los resultados de las cinéticas (Tablas 8, 9 y 10).

Teniéndose una hipótesis de investigación:

Hi: $M_1 > M_2$, siendo M_1 : Media de los valores del coeficiente de conversión del sustrato ($Y x/s$) de *Rhodotorula glutinis* L-033.

M_2 : Media de ($Y x/s$) de *Rhodotorula glutinis* L-040.

Y una hipótesis alterna:

Ho: $M_1 \leq M_2$.

Esta prueba se realizó comparando la M_1 y M_2 de los valores obtenidos de las cinéticas en los medios suplementados con Glucosa, Sacarosa y Melaza de caña, obteniéndose en ellos, análisis de valores más altos que el dado en las tablas (T tabulada = 1.943), resultando una T calculada= 6.486, 8.651 y 4.38, respectivamente; por lo que se acepta la hipótesis de investigación con un 95% de confianza y corroborando que *Rhodotorula glutinis* L-033 presentó un mejor rendimiento que *Rhodotorula glutinis* L-040.

Tabla 8.- FORMACION DE BIOMASA POR Rhodotorula glutinis L-033 y L-040 EN MEDIO CON GLUCOSA.

TIEMPO (Hrs.)	Rhodotorula glutinis L-033 Peso seco (g/l)	Rhodotorula glutinis L-040 Peso seco (g/l)
0	1.18	0.42
12	3.80	1.26
24	6.18	1.10
36	7.82	1.28
48	7.88	1.36
60	7.66	2.48
72	7.80	3.24

Medio con Glucosa (30 g/l). Condiciones:
T= 30°C, 250 rpm.

TABLA 9.- FORMACION DE BIOMASA POR Rhodotorula glutinis L-033 y L-040 EN MEDIO CON SACAROSA.

TIEMPO (Hrs.)	Rhodotorula glutinis L-033 Peso seco (g/l)	Rhodotorula glutinis L-040 Peso seco (g/l)
0	1.72	0.62
12	4.44	0.54
24	5.92	0.74
36	7.12	0.94
48	7.86	1.38
60	8.64	1.48
72	9.26	1.36

Medio con Sacarosa (30 g/l). Condiciones:
T= 30°C, 250 rpm.

TABLA 10.- FORMACION DE BIOMASA POR *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040 EN MEDIO CON MELAZA.

TIEMPO (Hrs.)	<i>Rhodotorula glutinis</i> L-033 Peso seco (g/l)	<i>Rhodotorula glutinis</i> L-040 Peso seco (g/l)
0	1.24	1.56
12	4.04	3.74
24	8.00	5.64
36	9.26	7.04
48	10.06	8.86
60	10.42	9.64
72	10.52	9.52

Medio con melaza (20 g/l). Condiciones:
T= 30°C , 250 rpm.

TABLA 11.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO, pH Y RENDIMIENTO GLOBAL DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

Parámetro	Medio con Glucosa.	Medio con Sacarosa.	Medio con Melaza.
S_o	26.47	22.47	18.36
S_f	2.88	2.73	3.17
X_o	1.18	1.72	1.24
X_f	7.80	9.26	10.52
Y_{x/s}	0.22	0.38	0.61
pH_o	5.72	6.88	6.60
pH_f	4.48	3.93	2.83
μ	0.051	0.038	0.078

S_o : Concentración inicial de azúcares (g / l)

S_f : Concentración final de azúcares (g / l)

X_o : Biomasa inicial (g / l)

X_f : Biomasa final (g/l)

Y_{x/s} : Coeficiente global de rendimiento (g biomasa / g subst. consumido)

pH_o : pH inicial

pH_f : pH final

μ : Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

TABLA 12.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO, pH Y RENDIMIENTO GLOBAL DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

Parámetro	Medio con Glucosa	Medio con Sacarosa	Medio con Melaza
S_o	30.725	15.462	19.904
S_f	10.387	6.21	3.049
X_o	0.42	0.62	1.56
X_f	30.725	15.462	29.904
Y_{x/s}	0.139	0.08	0.472
pH_o	6.01	6.73	6.68
pH_f	4.68	2.61	4.20
μ	0.029	0.018	0.034

S_o: Concentración inicial de azúcares (g/l)

S_f: Concentración final de azúcares (g/l)

X_o: Biomasa inicial (g/l)

X_f: Biomasa final (g/l)

Y_{x/s}: Coeficiente global de rendimiento (g biomasa/ g subst. consumido)

pH_o: pH inicial

pH_f: pH final

μ: Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

TABLA 13.- ANALISIS DE VARIANZA DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y x/s) DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

FUENTE DE VARIACION	SUMATORIA DE LOS CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F CALCULADA	F TABULADA
TOTAL	0.5160127	11			
MODELO	0.4238087	2	0.2119043	20.684	4.26
ERROR	0.0922040	9	0.0102449		

TABLA ANOVA
RESPUESTA ANALIZADA: Y x/s DE *Rhodotorula glutinis* L-033.

TABLA 14.- ANALISIS DE VARIANZA DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO Y x/s DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

FUENTE DE VARIACION	SUMATORIA DE LOS CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F CALCULADA	F TABULADA
TOTAL	0.3630357	11			
MODELO	0.3575052	2	0.1787526	290.891	4.26
ERROR	0.0055305	9	0.0006145		

TABLA ANOVA
RESPUESTA ANALIZADA: Y x/s DE *Rhodotorula glutinis* L-040.

VIII. DISCUSION

1. CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040 EN GLUCOSA.

Los experimentos realizados describen el estudio cinético de *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040, haciendola crecer en medios suplementados con glucosa, sacarosa y melaza de caña como fuentes de carbono. Observando el efecto de la glucosa, cuando se cultivaron ambas cepas en el medio suplementado con este sustrato, se obtuvieron 7.88 g/l para la cepa L-033, mientras que para la cepa L-040 se observó un crecimiento menor, obteniéndose 3.24 g/l, mayor al obtenido en nuestro estudio.

En la Fig. 2, se puede observar el crecimiento de *R. glutinis* L-040, donde se nota que la determinación del peso seco en los puntos experimentales de las 12 y 48 h están fuera de lo que posiblemente sería un comportamiento normal de crecimiento; por lo que se considera, que tal vez estos datos pudieran ser incorrectos ya que existe un decremento gradual de la concentración del sustrato, lo que podría indicar que la levadura continúa desarrollandose y consumiendo glucosa.

En relación a la velocidad de crecimiento, se obtuvo una $\mu=0.051\text{h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 13 horas con 59 minutos, mientras que la cepa L-040 presentó un valor menor, logrando una $\mu=0.029\text{h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación mayor que el obtenido por la cepa L-033, de 24 horas con 30 minutos, por lo que se concluye que la cepa L-033 crece mejor en glucosa.

Por lo anterior también se observa que el sustrato se aproximó al agotamiento en el medio de cultivo de la cepa L-033, consumiendo alrededor del 91%, con un rendimiento total $Y_{x/s}=0.24\text{g/g}$, mientras que la cepa L-040 consumió aproximadamente el 67% del sustrato, logrando una rendimiento menor que la cepa L-033 ($Y_{x/s}=0.139\text{g/g}$), lo que corrobora nuestra anterior conclusión.

Por otro lado, el pH mostró una progresiva disminución a partir de valores cercanos a 6 en las 0 h, hasta 3.77 a las 48 h. En este punto se observó un ligero incremento del pH de 3.77 a 4.3, lo que se considera sea debido a que la levadura consume los ácidos orgánicos producidos durante el metabolismo celular. Este fenómeno se observó en ambas cepas.

Utilizando glucosa al 3%, Johnson y cols¹⁶, lograron un máximo en biomasa de 20 g/l, cuando cultivaron *Rhodotorula glutinis* en fermentador de 1 litro durante 120 h. Se considera que la diferencia con los resultados obtenidos en nuestro estudio, radica en que estas condiciones de cultivo propician una mayor oxigenación en el medio y, al utilizar un tiempo de cultivo mayor, ocasiona por consiguiente, un crecimiento también mayor. En el caso de haber utilizado en nuestro trabajo condiciones semejantes a las anteriores, tal vez hubiéramos podido obtener resultados semejantes a los alcanzados por estos autores, por lo que se recomienda, en trabajos posteriores, ampliar el tiempo y emplear un fermentador para obtener rendimientos más altos.

En contraste, cuando se utilizó glucosa al 1% como fuente de carbono, Papaparaskevas y cols³⁴ obtuvieron 3.3 g/l de biomasa seca de *Rhodotorula glutinis*, condiciones similares a las utilizadas en este trabajo, pero con un tiempo de cultivo mayor (144 h); este peso constituye alrededor de 10 g/l si se hubiera utilizado una concentración de 3% como la empleada por nosotros, lo que obviamente representa que estos autores obtuvieron rendimientos superiores a los alcanzados en este estudio, por lo que se ratifica que el tiempo de cultivo es un factor de suma importancia, ya que el aumento de este tiempo se traduce en un crecimiento mejor.

2. CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040 EN SACAROSA.

Cuando el medio se suplementó con sacarosa, se obtuvieron 9.26 g/l de biomasa celular seca de la cepa L-033, para la cepa L-040 sólo se logró un máximo de 1.48 g/l, muy por debajo de lo esperado.

Se plantearon las siguientes hipótesis para la explicación de el crecimiento de *Rhodotorula glutinis* L-040:

a) La hidrólisis del azúcar por el microorganismo. Se consideró que este fenómeno pudiera constituir un problema para la cepa, ya que tiene que hidrolizar la sacarosa antes de consumirla; lo que podría inhibir el crecimiento, pero al observar la concentración de azúcares en el medio (Fig. 4) se aprecia que a partir de las 12 h, *R. glutinis* L-040 empieza a romper la sacarosa elevándose esta concentración para después consumir el sustrato, lo que indica que esta hidrólisis no representa un posible factor de inhibición del crecimiento.

b) La probable presencia de inhibidores en el medio suplementado con sacarosa. Esta hipótesis se descartó debido a que en comparación con la cepa L-040, la cepa L-033 presentó rendimientos más elevados utilizando el mismo medio, incluso mayores a los alcanzados en el medio con glucosa, por lo que se deshecha esta posible causa.

c) La presencia de algún contaminante en el medio. Esta hipótesis se eliminó, ya que los resultados que se obtuvieron en el crecimiento de la cepa L-040 se repitieron en todas las cinéticas realizadas en este medio, por el contrario, cuando se cultivó la cepa en otros sustratos, no se presentó este factor, por lo que se concluye que nuestra hipótesis carece de validez.

d) Formación de ácidos orgánicos producidos durante el metabolismo celular. Esta hipótesis se considera que posiblemente sea la más acertada, ya que al analizar la variación de pH en el medio (Fig. 10), se observa que *Rhodotorula glutinis* L-040 al final de la cinética alcanzó valores de pH cercanos a 2, lo que se traduce en concentraciones altas de ácidos en el medio. Esto podría significar, que la levadura posiblemente esté utilizando los azúcares obtenidos de la hidrólisis para la producción de estos ácidos, por lo que se considera que el medio con sacarosa probablemente altere el metabolismo de la cepa L-040 e induzca una inhibición del crecimiento. En contraste, los valores de pH en el medio con sacarosa, alcanzados por la cepa L-033 al final de la cinética fueron mayores (cerca de 4), lo que indica un medio menos ácido que el de

la cepa L-040, lo que podría corroborar nuestra hipótesis.

Por otro lado, en la Fig. 4 se observa que aparentemente existe crecimiento de la cepa L-040, pero debe considerarse que la escala de la gráfica que determina el peso seco celular varía de 0.4 hasta 1.6 g/l, por lo que si esta escala se modificara a una que fluctuara, por ejemplo, de 0 a 10 g/l como la utilizada en la determinación de la biomasa de la cepa L-033, se observaría una recta, por lo que concluimos que no existe crecimiento significativo de *Rhodotorula glutinis* L-040 en medio con sacarosa.

Sin embargo, la cepa L-033 consumió alrededor del 63% de los azúcares, siendo el más bajo porcentaje de consumo de azúcares encontrado en este estudio, con un rendimiento total de 0.382 g/g en contraste con la cepa L-040 que consumió aproximadamente el 70% del sustrato y se logró un rendimiento total más bajo ($Y_{x/s} = 0.08$ g/g). Por lo anterior también se observa que la velocidad de crecimiento lograda por la cepa L-033 fue de $\mu = 0.038$ h⁻¹, mientras que la cepa L-040 presentó un $\mu = 0.018$ h⁻¹, la menor alcanzada en este estudio. En consecuencia, el tiempo de duplicación de la cepa L-033 fue de 18 horas con 24 minutos, en comparación con el obtenido por la cepa L-040 de 38 horas con 51 minutos, lo cual ratifica que el crecimiento de *Rhodotorula glutinis* L-040 en sacarosa es el más bajo y lento encontrado en este trabajo.

Lateralmente a esto, en el medio suplementado con sacarosa de *Rhodotorula glutinis* L-033 se observó un decremento de los azúcares reductores (Fig. 3) hasta las 12 h (de 26.468 a las 0 h hasta 22.804 a las 12 h), a partir de la cual los azúcares ascendieron hasta 30.19 g/l para después descender gradualmente conforme avanzó el estudio, llegando a 11.184 g/l al final de la cinética. Se considera que este hecho se deba a que las células sufren un periodo de adaptación debido al cambio de medio, de uno sólido a líquido, por lo que probablemente en este periodo de adaptación el microorganismo empieza a producir las enzimas necesarias para el rompimiento de la sacarosa en los azúcares que la forman (glucosa y fructosa), los cuales son más fácilmente asimilables por el microorganismo. en esta misma figura se observa que de las 0 a las 12 h la levadura

probablemente consuma más azúcar del que puede hidrolizar, mientras produce las enzimas necesarias para el rompimiento de la sacarosa, y, a partir de este tiempo (12 h) se supone podría ocurrir lo contrario, que hidrolice más azúcar del que en realidad consume, por que se incrementa notoriamente y empiece a descender conforme se desarrolla. Este fenómeno se observa también en la cepa L-040. Notándose una variación de 15.462 g/l a las 0 h hasta 14.158 g/l a las 12 h, para después incrementarse hasta 20.41 g/l, finalizando la cinética con 6.21 g/l. Esto comprueba que *Rhodotorula glutinis* puede hidrolizar la sacarosa para después utilizarla durante su metabolismo.

Por otro lado, la pigmentación observada de la cepa L-033 en el medio suplementado con sacarosa presentó un color casi naranja, a diferencia de la cepa L-040 en la que se obtuvo un color amarillo pálido en todas las cinéticas realizadas en este sustrato con esta cepa, esto tal vez debido a la posible presencia de altos niveles de ácidos orgánicos en el medio.

Cuando el medio fue suplementado con sacarosa al 1% al cultivar *Rhodotorula glutinis*, Papaparaskevas y cols³⁴ reportan una producción de 2.3 g/l. A pesar de que nuestros resultados fueron más altos para la cepa L-033 (9.26 g/l), a la vez fueron más elevados que los obtenidos en el presente trabajo en medio con sacarosa de la cepa L-040 con 1.48 g/l. Se considera que la baja producción de biomasa seca obtenida por estos autores se deba al bajo porcentaje de azúcares empleado en el medio.

3. CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033 y L-040 EN MEDIO CON MELAZA.

Observando el efecto de la fuente de carbono cuando se cultivó *Rhodotorula glutinis* en medio suplementado con melaza, se encontró que el crecimiento se vio favorecido en este medio, en el cual se obtuvieron 10.52 y 9.52 g/l de biomasa celular seca de las cepas L-033 y L-040, respectivamente, considerándose como el mejor medio de los utilizados en este trabajo para el desarrollo de este microorganismo.

Sin embargo, los resultados de peso seco obtenidos en el medio suplementado con melaza, refutan nuestra hipótesis de investigación ya que

en la fuente de carbono que consideramos más asimilable (glucosa) se obtuvieron solamente 7.88 g/l de *R. glutinis* L-033 y 3.24 g/l de la cepa L-040. Se considera que esto probablemente es debido a que el medio con melaza posee otros azúcares, además de glucosa, como sacarosa, fructosa, rafinosa, fructosil sacarosa, entre otros, así como diferentes compuestos tanto orgánicos, inorgánicos, vitaminas (por ejemplo biotina), que pudieran propiciar un medio más rico y favorecedor para el desarrollo del microorganismo. Estos resultados fueron superiores a los obtenidos tanto en el medio con glucosa como con sacarosa, a pesar de haber utilizado un porcentaje menor de azúcares en el medio suplementado con melaza (20 g/l) que el utilizado en los otros dos medios (30 g/l), posiblemente se hubieran alcanzado porcentajes celulares más altos de haber utilizado la misma concentración de azúcares.

Por otro lado, los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento fueron una $\mu=0.078 \text{ h}^{-1}$ para la cepa L-033 y $\mu=0.034 \text{ h}^{-1}$ para la cepa L-040, mientras que el tiempo de duplicación fue de 9 horas con 29 minutos y 20 horas con 39 minutos para las cepas L-033 y L-040, respectivamente. Así mismo, los porcentajes de sustrato consumido dieron resultados muy parecidos, la cepa L-033 consumió alrededor del 83%, mientras que *R. glutinis* L-040 consumió cerca del 85%, los más altos obtenidos en este trabajo, a excepción de *R. glutinis* L-033 que consumió el 91% en medio con glucosa. En este medio, por consiguiente, se obtuvieron los más altos rendimientos totales con 0.611 g/g para la cepa L-033 y 0.472 g/g para la cepa L-040, esto obviamente relacionado con los valores a la vez elevados, tanto de crecimiento como de consumo de sustrato, por lo que concluimos que el mejor medio para la obtención de biomasa de *Rhodotorula glutinis* fue el suplementado con melaza de caña.

Con respecto a los valores de pH obtenidos, se observó que estos decrecieron gradualmente conforme avanzó la cinética, al igual que en el medio suplementado con glucosa, no llegando a la acidez del medio como se observó cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono.

Por otro lado, la pigmentación observada cuando el medio se

suplementó con melaza varió de marrón a café claro, esto debido al color mismo de la melaza, por lo que no se puede tomar como parámetro de crecimiento.

Cuando se utilizaron melazas de caña clarificadas y no clarificadas para la producción de β -caroteno por diferentes especies de *Rhodotorula glutinis*, Medrano y cols²⁵, observaron que propician la producción de éste con rendimientos satisfactorios. Aunque estos autores no reportan producción de biomasa, no recomiendan su uso a nivel industrial debido al alto valor económico de éstas y algunos problemas de extracción del β -caroteno cuando se utilizaron melazas como fuente de carbono.

Por otro lado, cuando se cultivo *Rhodotorula glutinis* en agua de coco, Cabello-Velasco y cols³, reportan una $\mu=0.086 \text{ h}^{-1}$ mayor a la más alta obtenida en el presente trabajo en medio con melaza (0.078 h^{-1}), se considera que esto es debido a que el agua de coco pudiera ser un medio más complementario y a la vez favorecedor del crecimiento ya que además de contener glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol, contiene además proteínas, vitaminas y minerales.

El análisis estadístico realizado nos permite concluir que la cepa que presenta un mejor crecimiento fue la L-033 en todos los medios probados y que la fuente de carbono que propicia un crecimiento mejor fue la melaza para ambas cepas.

IX. CONCLUSIONES

- 1.- Las concentraciones máximas de biomasa celular seca alcanzadas para *Rhodotorula glutinis* L-033 (10.52 g/l) y *Rhodotorula glutinis* L-040 (9.52 g/l) en medio suplementado con melaza, invalidan nuestra hipótesis de investigación, ya que fueron superiores a las obtenidas en medio con glucosa.
- 2.- La cepa L-033 presentó rendimientos en glucosa (0.224g/g), sacarosa (0.382 g/g) y melaza (0.611 g/g), mejores a los obtenidos por la cepa L-040 con 0.139, 0.08 y 0.472 g/g en glucosa, sacarosa y melaza, respectivamente.
- 3.- La causa probable, por la cual *Rhodotorula glutinis* L-040 resultó menos eficiente cuando el medio se suplementó con sacarosa, fue que el sustrato provocó alguna modificación en el metabolismo de este microorganismo.
- 4.- La pigmentación observada en el medio suplementado con glucosa fue durazno para ambas cepas, en sacarosa la cepa L-033 presentó un color casi naranja, mientras que la L-040 fue amarillo pálido, y cuando se utilizó melaza como fuente de carbono el color obtenido varió de marrón a café claro, propio de la melaza. Esta variación de color pudiera relacionarse con la producción de carotenoides, lo cual sólo es una especulación, ya que no se demostró experimentalmente.
- 5.- Estadísticamente se comprobó que el mejor medio probado fue el suplementado con melaza de caña, y que la cepa L-033 presentó un crecimiento superior a la cepa L-040.

XI. RECOMENDACIONES

- 1.- En caso de posteriores experimentos con esta levadura se recomienda emplear un tiempo de cultivo mayor a 72 h y cultivo a nivel fermentador, ya que esto propiciaría incrementar la producción de biomasa.
- 2.- Se aconseja realizar experimentos para detectar la influencia de elementos presentes en la sacarosa sobre el crecimiento de *Rhodotorula glutinis* L-040 que pudieran resultar inhibitorios.
- 3.- Desarrollar algún método para eliminar este inhibidor, ya que como se observó en la cepa L-033, la sacarosa podría resultar una fuente de carbono que propiciara un buen crecimiento de *Rhodotorula glutinis* L-040, considerando que este sustrato es más accesible y a la vez más económico que la melaza.
- 4.- Se recomienda implementar un método para la identificación y cuantificación de los pigmentos, y así seleccionar la cepa que produzca mayor cantidad de carotenoides para su posible utilización industrial.

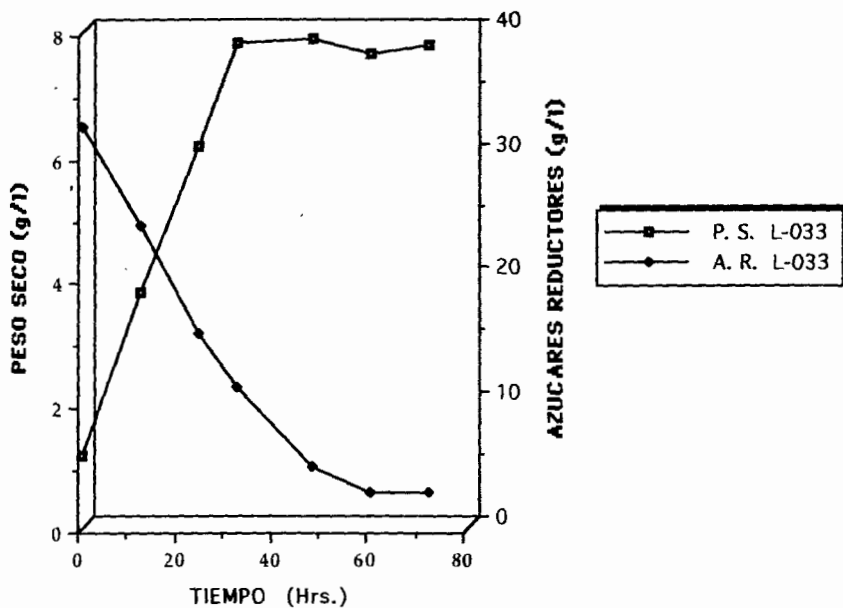


FIGURA 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON GLUCOSA (30 g/l).

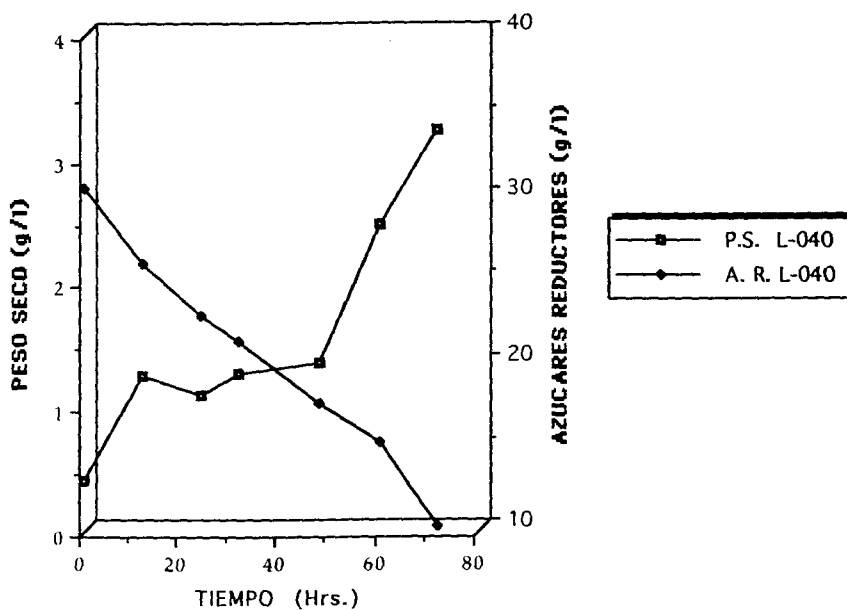


FIGURA 2.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON GLUCOSA (30 g/l).

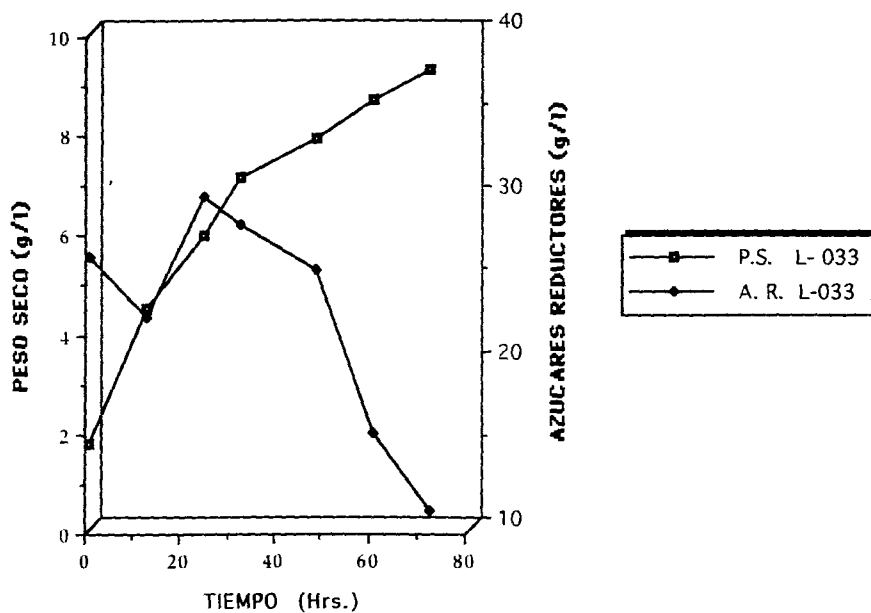


FIGURA 3.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON SACAROSA (30 g/l).

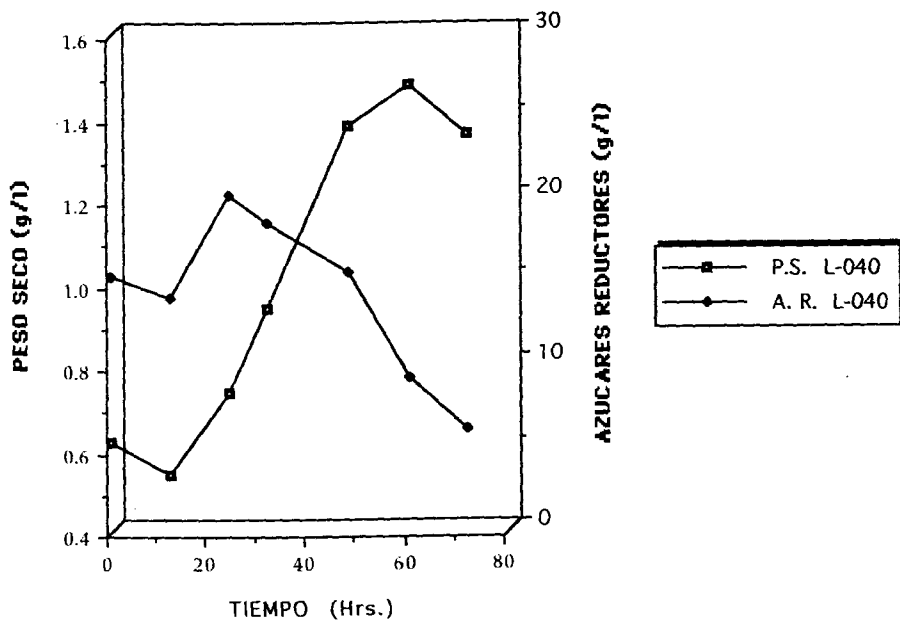


FIGURA 4.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON SACAROSA (30 g/l).

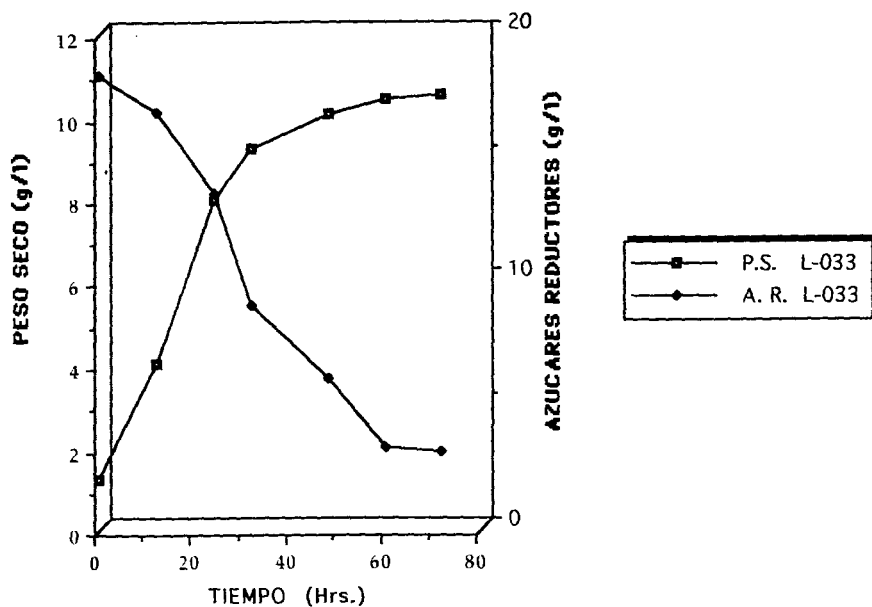


FIGURA 5.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON MELAZA (20 g/l).

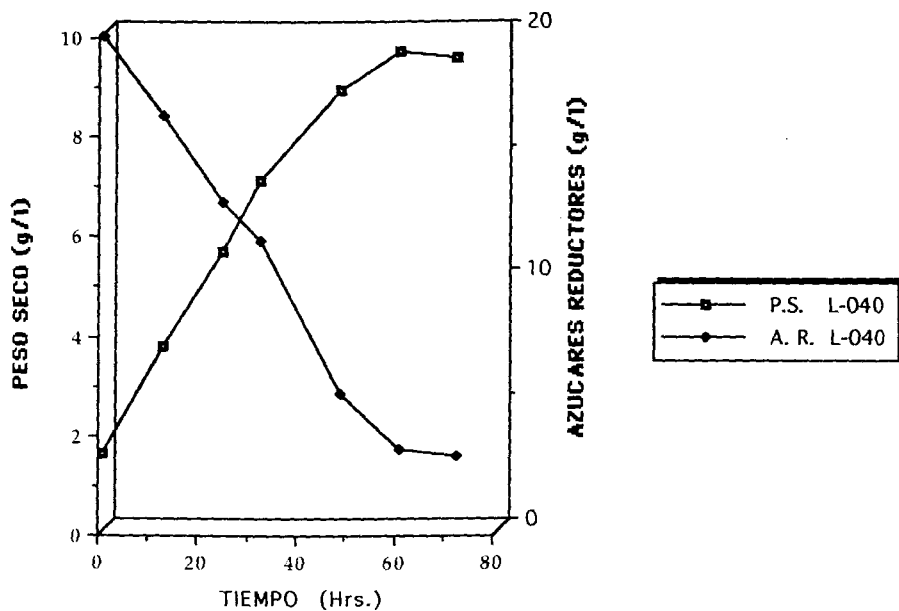


FIGURA 6.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES (g/l) DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON MELAZA (20 g/l).

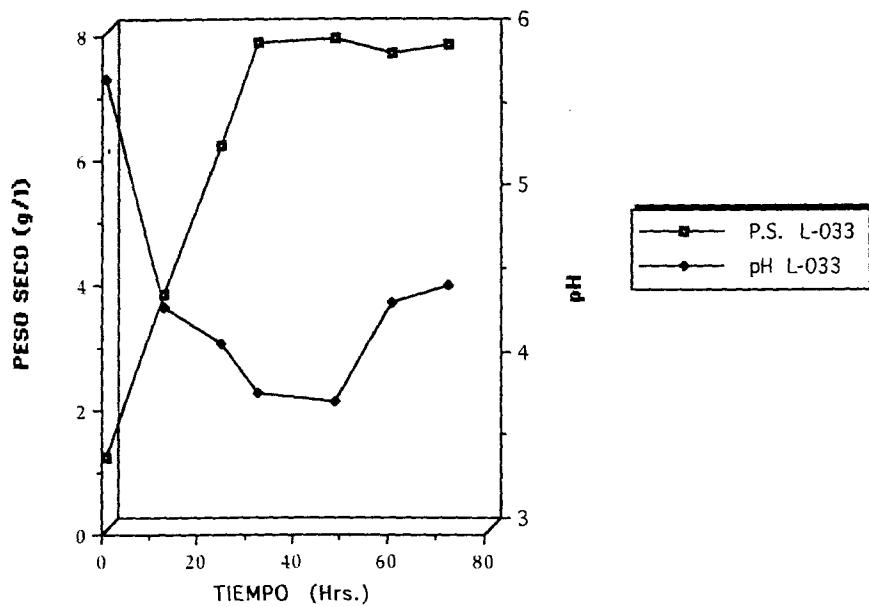


FIGURA 7.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON GLUCOSA (30 g/l).

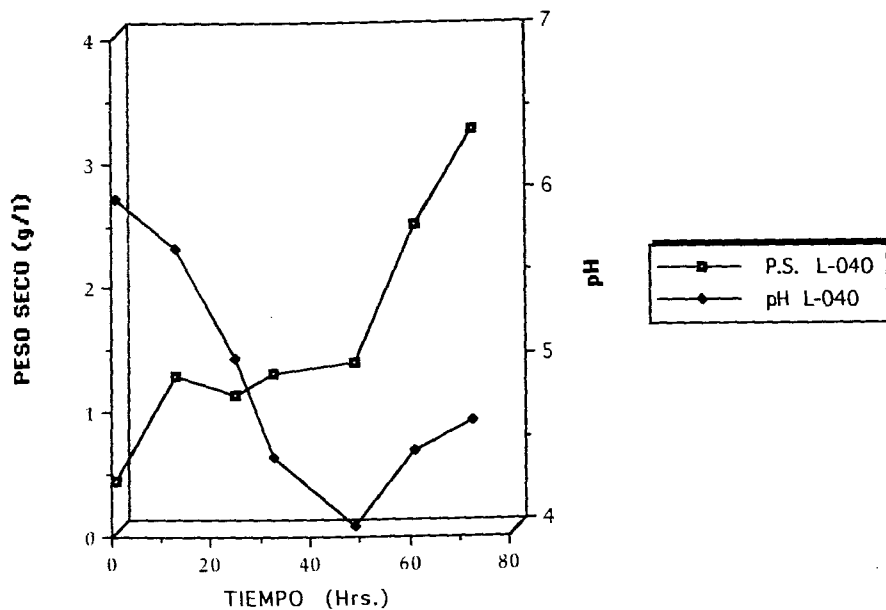


FIGURA 8.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON GLUCOSA (30 g/l).

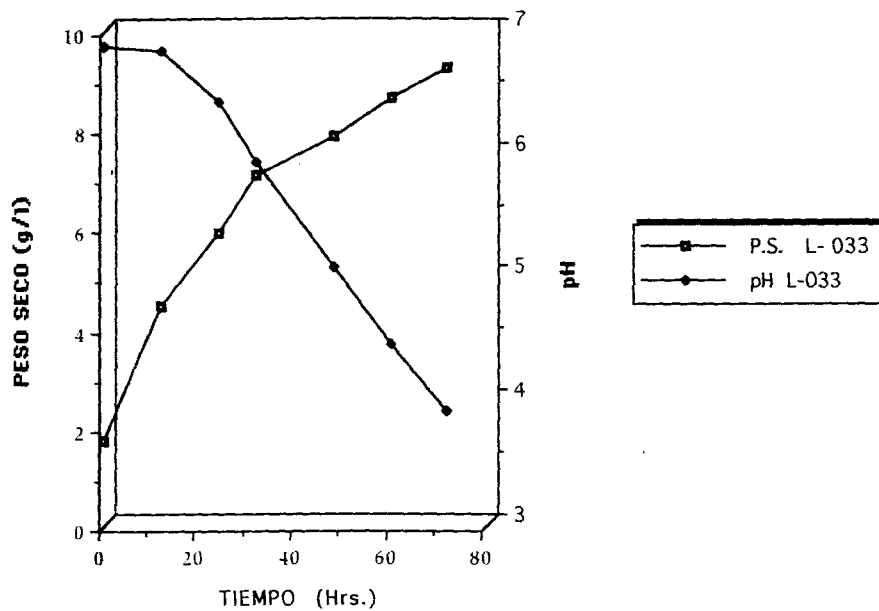


FIGURA 9.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON SACAROSA (30 g/l).

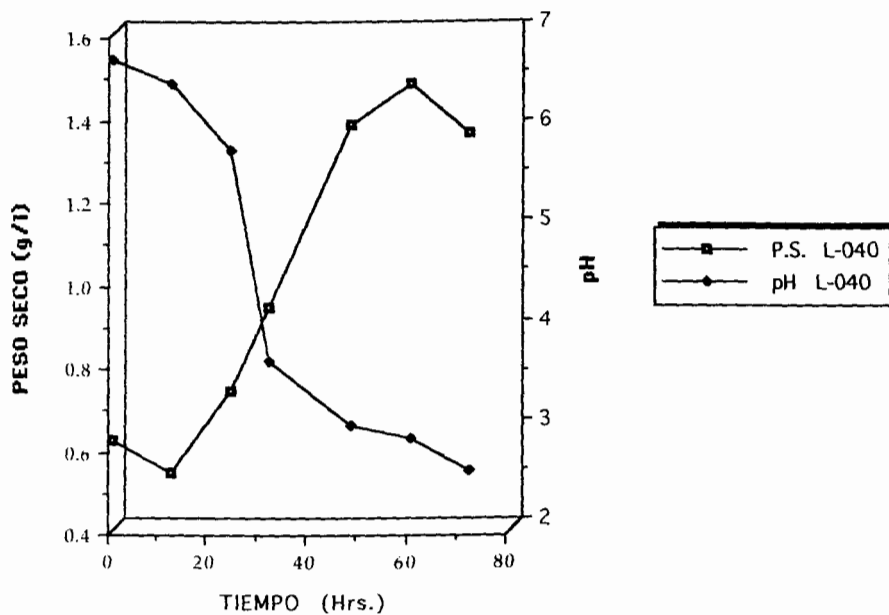


FIGURA 10.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON SACAROSA (30 g/l).

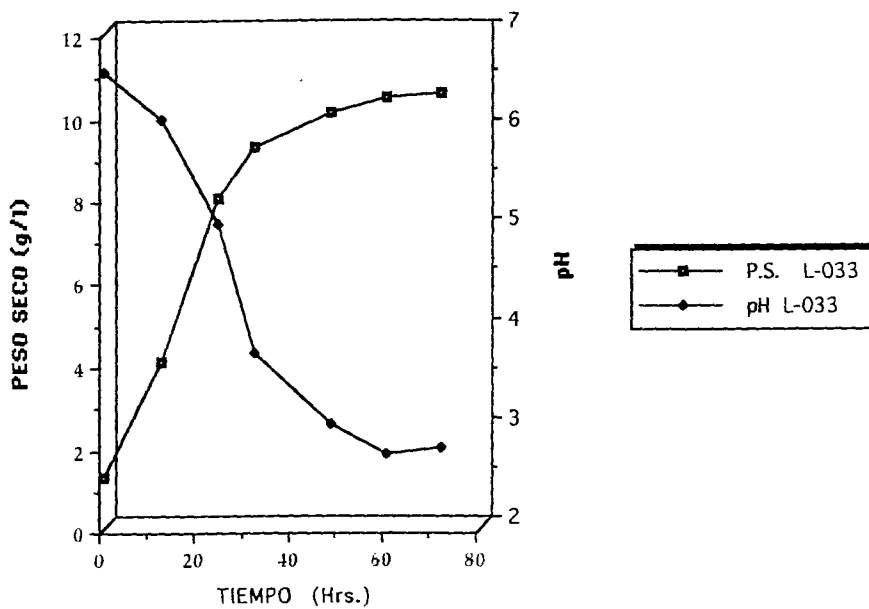


FIGURA 11.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-033. MEDIO CON MELAZA (20 g/l).

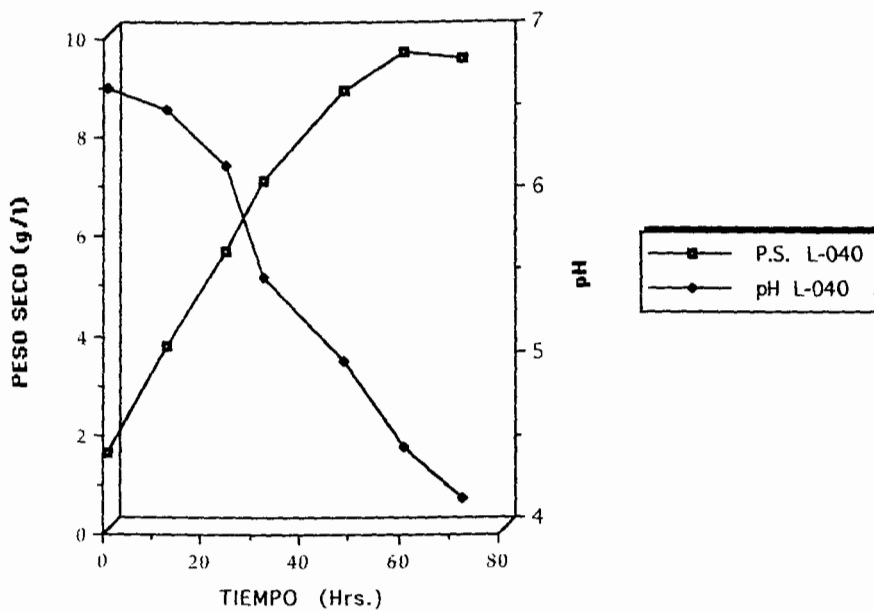


FIGURA 12.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y pH DE *Rhodotorula glutinis* L-040. MEDIO CON MELAZA (20 g/l).

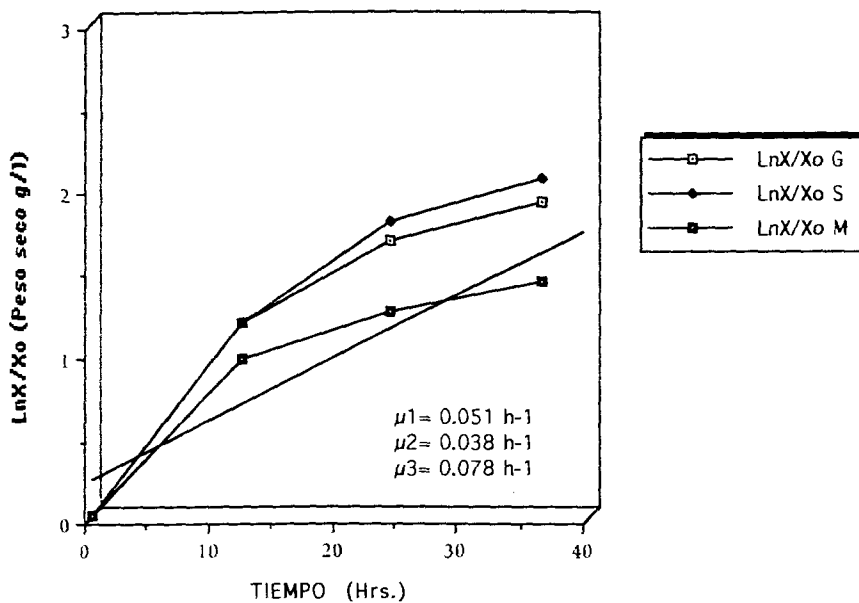


FIGURA 13.- ESTIMACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-033, EN LOS MEDIOS SUPLEMENTADOS CON GLUCOSA (μ_1), SACAROSA (μ_2) Y MELAZA (μ_3).

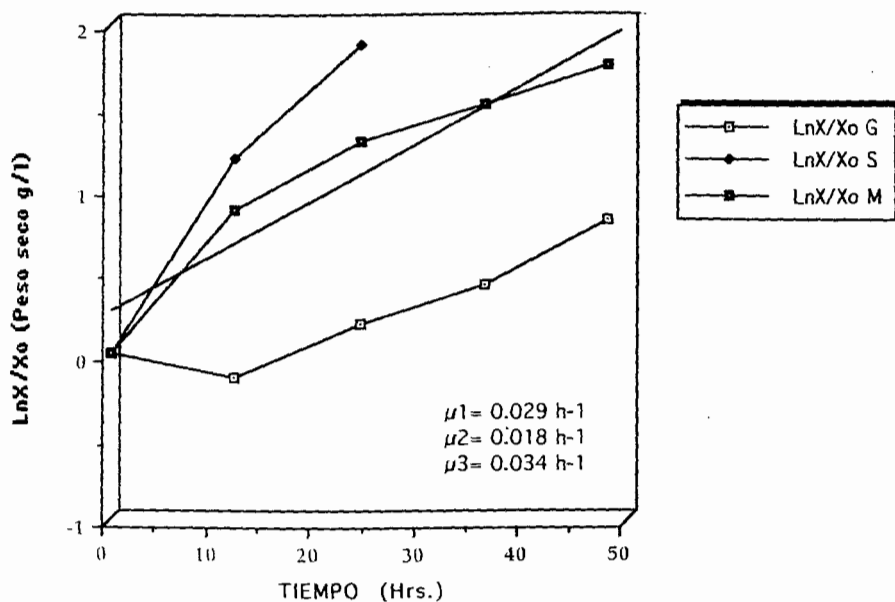


FIGURA 14.- ESTIMACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Rhodotorula glutinis* L-040, EN LOS MEDIOS SUPLEMENTADOS CON GLUCOSA (μ_1), SACAROSA (μ_2) Y MELAZA (μ_3).

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Beadle B. W. y Zscheile F. P. 1942. Studies on the carotenoids. *Journal of Biology and Chemistry*. 2. (144): 21-33.
2. Britton G. 1988. Cap. 3. Biosynthesis of carotenoids. **Plant Pigments**. Academic Press.
- 3.- Cabello Velasco A., Castro-Trinidad G., Jiménez-Lozano M., y Bautista-Manzo V. 1986. Evaluación cinética del crecimiento de *Rhodotorula glutinis* y pigmentación usando agua de coco como medio de cultivo. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. (28): 177-182.
- 4.- Casida, L. E., Jr. 1968. Vitamins and growth stimulants. *Industrial Microbiology*. (24): 385-387.
- 5.- Costa I., Matelli H.L., da Silva I. M. and Pomeroy D. 1987. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnology Letters*. 9 (5): 373- 375.
- 6.- Choy S. Y., Ryu Dewey D. Y., and Rhee J. S. 1982. Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. (24): 1165-1172.
- 7.- Cygnarowicz M. L. 1990. Design and control of a process to extract β -carotene with supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.* (6): 82- 91.
- 8.- Favio F., King J. W., Friedrich J. P., and Eskins K. 1988. Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *Journal of Food Science*. 53 (5): 1532- 1536.

- 9.- Fletcher D. L. 1992. Methodology for achieving pigment specifications. *Poultry Science*. (71): 733- 743.
- 10.- Gerster H. 1991. Review: Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* (61): 277-291.
- 11.- González de Mejía E., y Arriaga E. Cuantificación de los carotenoides presentes en el aceite de palma y en los subproductos de su refinación. *Tec. Aliment.* 23 (6): 5 - 13.
- 12.- Granger L. M., Perlot P., Goma G. and Pareilleux A. 1993. Effect of various nutrient limitations on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (38): 784- 789
- 13.- Gu P. J., Young K. M., and Shick R. J. 1986. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxigen-enriched air. *Biotechnology Letters*. 8. (110) : 715-718.
- 14.- Hamilton P. B. 1992. The use of high-performance liquid chromatography for studying pigmentation. *Poultry Science*. (71): 718-724.
- 15.- Hencken H. 1992. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*. (71): 711-717.
- 16.- Johnson V., Singh M., Saini V. S., Dilip, Adhikari K., Sista, and Yadav N. K. 1992. Bioemulsifier production by an oleaginous yeasts *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology Letters*. 14. (6): 487-490.
- 17.- La Asociación de Químicos de Vitaminas, Inc. 1969. Cap. 5 Caroteno. **Métodos de Análisis de Vitaminas**. Editorial Academia. León, España.

- 18.- Liaaen-Jensen S. y Andrewes A. G. 1972. Microbial carotenoids. Annual Review of Microbiology. (26): 225-248.
- 19.- Lodder J., and Kreger van-Rij. N. J. W. 1954-1955. Cap. 4. Clasificación and identification of yeasts. **Laboratory Practice**.
- 20.- Mares D. 1982. Ultraestructural and citochemical study of *Rhodotorula glutinis* in the main growth phases. Micopathology. 80 (3): 179- 188.
- 21.- Margalith P. 1993. Enhancement of carotenoid synthesis by fungal metabolites. Applied Microbiology and Biotechnology. (38): 664-666.
- 22.- Market Forecast. 1992. Biopigments: Biotech. pigments poised to challenge synthetic colors., Biopigment market could reach \$350 million by 2000. Industrial Bioprocessing: 4-5.
- 23.- Martin M. A., Lu C. and Patel T. R. . 1993. Growth parameters for the yeasts *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76. (4): 321-325.
- 24.- Matelli H. L., da Silva I. M., Souza N. O. y Pomeroy D. 1990. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. Biotechnology Letters. 12 (3): 207-208.
- 25.- Medrano H., Ruíz-Herrera J. y Magaña-Plaza I. 1969. Producción de beta caroteno por algunas especies de *Rhodotorula*. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. (11): 45-50.
- 26.- Miller. 1961. Carotenes and carotenoids. Cap. 5 **The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites**. McGraw Hill, Nueva York.
- 27.- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination

of reducing sugar. Cap. 3 **Analytical chemistry.**

28.- Moore M. M., Breedveld M. W., and Autor A. P. 1989. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 270 (2): 419-431.

29.- Nam H. S., Cho S. Y. and Rhee J. S. 1988. High performance liquid chromatographic analysis of major carotenoids from *Rhodotorula glutinis*." *Journal of Chromatography*. (448): 445-447.

30.- Nelis H. J. and De Leenherr A. P. 1991. A Review: Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*. (70): 181- 191.

31.- Ninet L., and Renaut J. 1979. Carotenoids. **Microbial Technology**. Academic Press. Inc. 2a. Ed.

32.- Oura, E. 1983. Cap. 26. Biomass from carbohydrates. **In Biotechnology: A comprehensive treatise**. Ed. H-J. Rehm and G. Reed.

33.- Pan J. G., Kwak M. Y., and Rhee J. S. 1986. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology Letters*. 8 (10): 715-718.

34.- Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., and Macris B. J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis* . *Biotechnology Letters*. 14 (5): 397- 402.

35.- Pelczar M. J. Jr., Reid R. D., y Chan E. C. S. 1982. **Microbiología**. Editorial McGraw Hill. 2da. Edición en español.

- 36.- Peterson W. J., Bell T. A., Etchells J. L., and Smart W. W. G. Jr. 1954. Procedure for demonstrating the presence of carotenoid pigments in yeasts. *J. Bacteriology*. (67): 708-713.
- 37.- Peterson W. J., Bell T. A., Etchells J. L. and Smart W. W. G. Jr. 1958. Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. *J. Bacteriology*. (75): 585-591.
- 38.- Reed G., and Peppler H. J. 1973. **Yeast Technology**. Comp. Publ. Avi, Inc.
- 39.- Rubio Hernández R. M., y Llamas Saín M. E. 1978. Estudios sobre levaduras de alta fermentación en la producción de alcohol. Tesis de la Fac. de Cs. Químicas. Universidad de Guadalajara.
- 40.- Scalia S., and Francis G. W. 1989. Preparative scales reversed-phase HPLC method for simultaneous separation of carotenoids and carotenoid esters. *Chromatographia*. 28 (3/4): 129- 132.
- 41.- Sriban R. 1985. Cap. 4. Cinéticas Microbianas. **Biotecnología**. Editorial El Manual Moderno.
- 42.- Shane S. M., BvSc, PhD ACPV. El uso de pigmentantes en alimentos para aves. *Tecnología Avípecuaria*. (72): 5 - 6.
- 43.- Shibata H., Kurosaki C., Kawashima T., and Ochiai H. 1987. Preparation of water-soluble and stable chlorophylls and β -carotene by forming complexes with egg albumin. *Agric. Biol. Chem.* 51 (12): 3261- 3266.
- 44.- Shon M. 1992. Beta-carotene makers add capacity to meet demand. *Chemical Marketing Reporter*. 241 (1): 16-17.

45.- Simpson Kenneth L., Nakayama O. M. and Chichester C. O. 1964. Biosynthesis of yeasts carotenoids. *Journal of Biotechnology*. 88. (66): 1688- 1694.

46.- Simpson, K.L., Chichester C. O. and Phaff H. J. 1971. Cap. 12. Carotenoid pigments of yeasts. **The yeasts**. Academic Press, Londres y Nueva York., por Rose A. H. and Harrison.